

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az endokannabinoid jelátvitel új aspektusainak
vizsgálata humán korneális epitélisejteken és
szebocitákon**

Angyal Ágnes

Témavezető: Dr. Oláh Attila



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2022

**Az endokannabinoid jelátvitel új aspektusainak vizsgálata humán korneális
epitélsejteken és szebocitákon**

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

Írta: Angyal Ágnes
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia program) keretében

Témavezető: Dr. Oláh Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Dr. Szöőr Árpád, PhD

Dr. Szűts Viktória, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettani Intézet
2020. október 29. 14.00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Griger Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Dr. Szöőr Árpád, PhD

Dr. Szűts Viktória, PhD

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Griger Zoltán, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2022. július 6. 14:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze az angyal.agnes@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző nap (2022. július 5.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Munkacsoportunk fő kutatási területe az emberi bőr különböző betegségeinek tanulmányozása különös tekintettel azok molekuláris hátterének feltérképezésére, valamint az endokannabinoid rendszer (ECS) lehetséges szerepének vizsgálatára. Az ECS egy komplex jelátviteli hálózat. Felépítésében a definíció szigorúságától függően akár több tucat endogén ligand (pl. anandamid [AEA]), számos ezeket érzékelni képes metabotróp (pl. CB₁, CB₂, GPR55, GPR119 stb.), ionotróp (különböző tranziens receptorpotenciálú [TRP] ioncsatornák), illetve intranukleáris (peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptorok [PPAR-ok]) receptor, valamint a ligandok szintézisében (pl. N-acil-foszfatidil-etanolamin specifikus foszfolipáz D [NAPE-PLD], diacilglicerol-lipáz [DAGL]- α és $-\beta$), és lebontásában (pl. zsírsavamid-hidroláz [FAAH], monoacilglicerol-lipáz [MAGL]) résztvevő enzim és transzport (pl. a hipotetikus endokannabinoid [eCB] membrántranszporter [EMT]) vesz részt.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a helyileg termelődő eCB-ok, mint az AEA és a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), a CB₂ receptor \rightarrow extracelluláris szignál–regulált kináz (ERK)-1/2 mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) \rightarrow peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor (PPAR)- γ útvonal aktiválásával fokozzák a faggyúlipidek szintézisét. Kimutattuk azt is, hogy a humán szebociták mind mRNS, mind fehérje szinten kifejezik az eCB-ok szintézisében és lebontásában szerepet játszó kulcsenzimeket, az eCB membrántranszporter farmakológiai gátlása pedig (az eCB-tónus emelése révén) mérsékelten fokozta a faggyúlipid-termelést és gyulladáscsökkentő hatást eredményezett. Kísérleteink emellett arra a nemvárt eredményre vezettek, hogy az AEA és a 2-AG mellett a szebociták részt vesznek a „nem-klasszikus” eCB oleoil-etanolamid (OEA) metabolizmusában is.

Mint ahogy az OEA, illetve legfontosabb receptora, a GPR119 kifejeződéséről és lehetséges szerepéről a humán faggyúmirigyekben még nem állt rendelkezésre semmilyen irodalmi adat, kísérleteink első felében az OEA biológiai hatásait

vizsgáltuk meg humán szebocitákon, különös tekintettel arra, hogy a fenti molekulák szerepet játszhatnak-e a kórosan fokozott faggyúlipid-termeléssel és gyulladásos folyamatokkal jellemezhető akne kialakulásában.

Kísérleteink második felében a bőr után egy másik fontos barrier, a szaruhártya ECS-ét vizsgáltuk meg. A szaruhártya (kornea) a szemgolyó külső védőburkának az elülső, áttetsző része. Feladatai közé tartozik a szem belsejében levő struktúrák védelme, emellett pedig kulcsszerepe van a szembe belépő fény törésében is. A korneális epitélisejtek a szaruhártya legkülső rétegét alkotják, így ezen sejtek találkoznak először a külvilágból érkező ingerekkel, fizikokémiai hatásokkal, mikrobákkal. Ezek a sejtek a fizikai és immunológiai barrier létrehozásával nemcsak passzív elszennvedői ennek a találkozásnak, hanem ennek nyomán különféle válaszokat adnak, pl. citokineket és kemokineket termelnek, amelyek befolyásolják a lokális gyulladásos folyamatokat. A szaruhártya epitéliumának károsodása gyulladást válthat ki, ami a barrier károsodásához, vagy - ha a károsodás kiterjedtebb – akár a kornea beereződéséhez is vezethet, ami a látás elvesztését eredményezheti.

A szaruhártya gyulladásos válaszában fontos szerepet játszik a már említett TRP csatornák közé tartozó TRPV1, melynek aktiválása súlyosbíthatja a szaruhártya gyulladásos folyamatait. A humán korneális epitélisejteken szintén kifejeződő CB₁ AEA-dal történő aktiválása ugyanakkor kivédte a TRPV1 aktiváció gyulladásos hatását. Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok alapján az AEA (más eCB-okkal együtt) jelen van a humán korneális epitélisejteken, ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AEA-függő CB₁ aktiváció egy folyamatos gyulladáscsökkentő tónust alakíthat ki ezeken a sejteken.

Minthogy a szaruhártya élettani körülmények között egy avaszkuláris szövet, az itt kimutatott eCB-ok nem származhattak közvetlenül a keringésből, ami arra utal, hogy a kornea egyes sejtjei képesek lehetnek az eCB-ok *de novo* szintézisére, azonban az eCB-ok metabolizmusában részt vevő enzimrendszer

tagjainak kifejeződéséről kísérleteink idején még nem állt rendelkezésre irodalmi adat. Mindezek fényében a korneális epitéliumot érintő kísérleteink során a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az eCB-metabolizmus legfőbb enzimeinek (lásd fentebb) a kifejeződését a szaruhártyában, illetve, hogy klinikailag releváns gyulladásos körülmények között tanulmányozzuk az AEA esetleges gyulladáscsökkentő hatását. Ez utóbbi cél eléréséhez (a fénykárosodást modellezendő) UVB besugárzást, valamint (a virális keratitiszeket modellezendő) TLR3 aktivátor poliinozin-policitidilsav (p(I:C)) kezelést alkalmaztunk. Tekintettel arra, hogy primer humán korneális epitélisejtekhez lényegében lehetetlen hozzájutni, kísérleteinket egy rekombináns SV40-adenovírus vektor segítségével immortalizált humán korneális epitélium eredetű sejtvonalon (HCEC) végeztük.

Célkitűzés

A fentiek fényében a jelen dolgozatban bemutatandó vizsgálatok keretein belül a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Milyen hatást gyakorol az OEA a humán szebociták biológiai folyamataira, és mi a hatás mechanizmusa?
2. Az ECS mely tagjai vannak jelen humán korneális epitélisejteken?
3. Milyen hatást gyakorol az AEA kezelés a HCEC-ek UVB irradiációra, illetve TLR3 aktivációra adott gyulladásos válaszaira?

Anyagok és módszerek

A humán immortalizált SZ95 szebociták és HCEC tenyésztése és kezelése

Az SZ95 szebocitákat Sebomed™ Basal Medium-ban tenyésztettük, amelyet 10 (V/V)% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal, 1 mM CaCl₂-dal, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról, valamint MycoZap™ Plus-CL-lel egészítettük ki. A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, és - annak érdekében, hogy megelőzzük a tenyészetek konfluencia-indukált differenciálódását - a sejteket a 60-70%-os konfluenciaszint elérésekor passzáltuk.

A HCEC-ek tenyésztő médiuma 1:1 arányú Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's Medium keveréke volt, melyet 6 (V/V)% hővel inaktivált FBS-sel, 1 mM CaCl₂, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktorról, valamint MycoZap™ Plus-CL-lel egészítettük ki.

Tenyészetek esetleges *Mycoplasma* kontaminációját időről-időre teszteltük MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit segítségével, és minden esetben negatív eredményt kaptunk. A tenyésztést 5% CO₂ tartalmú, párasított légtérben, 37°C-on végeztük. Annak érdekében, hogy kizárhassuk az esetleges nem-specifikus oldószerhatásokat, minden anyagból ezerszeres töménységű törzsoldatot készítettünk, amiket a gyártó javaslata alapján -20°C-on vagy 4°C-on tároltunk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelés előtt készítettük el a szükséges munkaoldatokat a sejtek tápoldatában ezerszeres hígítást alkalmazva, és ügyelve arra, hogy az összehasonlítható kezelések mindig azonos „oldószerhátteren” valósuljanak meg. Ezzel összhangban vizsgálataink során kontrollként minden esetben az anyagok oldószerével megfelelő hígításban kezelt sejteket használtunk. A sejtek tenyésztését *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Péntes Zsófia, Dr. Shahrzad Alimohammadi, Horváth Dorottya* és *Dr. Magi József* végezte.

A szebociták intracelluláris lipidtartalmának meghatározása

A lipidtermelés szemikvantitatív vizsgálatához fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. A sejteket speciális, fluoreszcens mérésekhez használatos 96 lyukú lemezre szélesztettük (20.000 sejt/lyuk; 24 és 48 órás kezelések), majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (végkoncentráció: 1 µg/ml) mértünk a sejtekre, majd 30 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását FlexStation™ II³⁸⁴ vagy FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk (excitáció: 485 nm; emisszió: 565 nm). A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

Az életképesség vizsgálata (MTT-assay)

A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban a szebociták és 10.000 sejt/lyuk a korneális epitélisejtek esetében, majd a megfelelő anyagok különböző koncentrációival kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után minden lyukba 100 µl PBS-ben oldott MTT oldatot (végkoncentráció: 0,5 mg/ml) pipettáztunk, és 37°C-on 2-3 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezután az MTT oldatot eltávolítottuk, minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” adtunk, és feloldottuk sejtekben keletkező formazán kristályokat, amelyek mennyiségét 565 nm-en mérve kolorimetriás úton határoztuk meg a korábban már említett FlexStation 3 készülék segítségével. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

Az apoptózis és nekrozis vizsgálata

Kísérleteink során az apoptotikus folyamatok vizsgálatára a mitokondriális membránpotenciál fluoreszcens vizsgálatát végeztük el MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit segítségével. Az apoptózis mellett ugyanazon mintákban az esetleges nekrotikus folyamatok felléptét is megvizsgáltuk a DiIC₁(5) festés mellett szimultán alkalmazott fluoreszcens SYTOX Green jelöléssel, ami a membránok

nekrózisra jellemző dezintegrálódásakor tud a sejtmagi DNS-hez kötődni. A szebocitákat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96 lyukú lemezekre, majd a jelzett módokon kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on PBS-ben hígított DilC₁(5) (1:200) és SYTOX Green (1 µM) reagensekkel (50 µl/lyuk). Az inkubáció végeztével 100 µl/lyuk PBS-sel kétszer mostuk a sejteket, és FlexStation 3 készülék segítségével lemértük a fluoreszcencia intenzitást (DilC₁(5) excitáció/emisszió: 630/670 nm; SYTOX Green excitáció/emisszió: 490/520 nm). Az apoptózis és a nekrosis pozitív kontrolljaként rendre CCCP (1:200; 37°C 30 perc), illetve lízis puffer kezelést (1:100; 37°C 30 perc) alkalmaztunk. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Ádám Dorottya, Tóth Kinga Fanni és Dr. Magi József* végezte.

A proliferáció meghatározása (CyQUANT proliferációs assay)

A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 2.000 sejt/lyuk denzitásban, és a jelzett módokon kezeltük őket. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a lemezeket a mérésig -80°C-on helyeztük el, ami permeabilizálta a sejteket. Ezután a gyártó protokollja szerint hígított „CyQUANT GR stock solution” munkaoldatból 200 µl-t mértünk minden wellbe, majd öt percig szobahőn fénytől védve inkubáltuk a lemezeket. A fluoreszcencia intenzitást FlexStation 3 készülék segítségével detektáltuk (excitáció: 480 nm; emisszió: 520 nm). A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold és Dr. Magi József* végezte.

Áramlási citometria

Az SZ95 szebocitákat 6 lyukú lemezekre szélesztettük 200.000 sejt/lyuk denzitásban, és a jelzett módon kezeltük őket. Ezután a sejteket PBS-ben felkapartuk, és a szuszpenziót intenzív triturálással homogenizáltuk, az áramlási citometriás mérést pedig BD FACS Calibur készülékkel végeztük el. A sejtek differenciáltsági állapotát a granuláltság mértékét jól tükröző paraméter, az oldalra irányuló fényszórás („side scatter”) detektálásával vizsgáltuk, és az

adatokat *FlowJo V10.4* szoftver segítségével elemeztük. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold* és *Pénzes Zsófia* végezte.

UVB besugárzás

A HCEC-eket 500.000 sejt/Petri-csésze (d=35 mm) denzitásban szélesztettük. A sejtek letapadását követően a tápoldatot 800 µl szintelen Sebomed™ Basal Mediumra cseréltük, és a sejteket UVB (hullámhossz: 312 nm) besugárzásnak tettük ki 40 mJ/cm² dózist alkalmazva. A besugárzást követően a médiumot azonnal lecseréltük a megfelelő kezelőanyagokat vagy azok oldószerét tartalmazó tápoldatra. A méréseket *Angyal Ágnes* végezte.

Reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)

A reverz transzkripciót követő, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakciót Roche LightCycler 480 System segítségével, 5' nukleáz assay használatával végeztük. A teljes RNS-t TRIzol felhasználásával izoláltuk, majd DNáz kezelést végeztünk. Ezt követően az RNS 1 µg-jából kiindulva állítottunk elő cDNS-t. A Q-PCR reakciót TaqMan assay-kkel végeztük. Belső kontrollként a 18S RNS, a GAPDH vagy a PPIA expresszióját határoztuk meg. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Dr. Lisztes Erika* és *Dr. Magi József* végezte.

Western blot

A sejteket 96 mm átmérőjű Petri-csészékbe szélesztettük, majd a megfelelő konfluencia szint elérésekor, illetve a jelzett kezeléseket követően begyűjtöttük a mintákat. Mintagyűjtéskor proteáz inhibitor koktélt és PhosSTOP reagenst tartalmazó „detergens mix”-ben vettük fel a sejteket. Ezután jégen szonikátor segítségével ultrahangos feltárást végeztünk. A fehérjekoncentrációt BCA protein assay-vel határoztuk meg, és egységesen 1 mg/ml-re állítottuk be. Az így

elkészített mintákból azonos mennyiségű (10 µg) fehérjét használva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Ezt követően a szabad kötőhelyek blokkolására 50 mg/ml tejpport tartalmazó TBST-ben 1 óráig szobahőmérsékleten tartottuk a membránokat, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk őket a blokkoló oldatban hígított elsődleges antitestekkel. A másodlagos antitesteket szintén a blokkoló oldatban hígítottuk (inkubáció: 37°C, 1 óra). Az immunjeleket SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate kittel tettük láthatóvá, melyeket KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülékkel rögzítettük. A fentiekben leírtak szerint vizualizált kemilumineszcens jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését *Fiji* szoftver segítségével végeztük. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Tóth Kinga Fanni* és *Dr. Magi József* végezte.

Foszfokináz-array

Az OEA kezelés hatására aktiválódó kináz kaszkádok szűrőjellegű vizsgálatára Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kitet alkalmaztunk a gyártó protokollja szerint. A szecocitákat Petri-csészékbe szélesztettük 10 millió sejt/15 ml tápoldat denzitásban. A mintákat a Western blotnál leírtak szerint begyűjtöttük, és meghatároztuk a fehérjetartalmukat. Egyenlő fehérjemennyiségeket vittünk a membránokra, a kemilumineszcens jeleket pedig a KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülékkel detektáltuk minden membrán esetében azonos beállításokat használva. A jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését *Fiji* szoftver segítségével végeztük. A kísérleteket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold* és *Tóth Kinga Fanni* végezte.

A GPR119 immunhisztokémiai kimutatása

A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban járultak hozzá a minták kutatási célú felhasználásához; a kísérletek a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával történtek (azonosítók: IX-R-052/01396-2/2012,

IF-12817/2015, IF-1647/2016, IF-778-5/2017, DE RKEB/IKEB 4988-2018) a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával.

A GPR119 *in situ* immunhisztokémiai kimutatását 3 trichilemmális cisztával diagnosztizált donor formalinnal fixált, paraffinba ágyazott bőrmintáinak diagnosztikus célra fel nem használt, faggyúmirigyekben gazdag területeit vizsgálva végeztük. A paraffinba ágyazott blokkokból metszeteket készítettünk, és a metszeteken hőindukált antigénfeltárást végeztünk citrát pufferben kuktafazékban maximális nyomás mellett. Az endogén peroxidázok gátlására 3% H₂O₂ oldatot használtunk 10 percig. Ezután a metszeteket szobahőmérsékleten inkubáltuk humán GPR119-et felismerő primer antitesttel melyet BSA-t tartalmazó TBS-ben hígítottunk. A másodlagos immunjelölés és az előhívás „EnVision FLEX Labeled polymer-HRP anti rabbit and anti-mouse System”, valamint DAB segítségével történt. A sejtmagokat hematoxilinnel jelöltük, a metszeteket pedig megfelelő fedőmédiával fedtük. A kísérleteket *Dr. Pór Ágnes* és *Dr. Kovács Ilona* végezte.

A GPR119 expresszióváltozásának szemikvantitatív vizsgálata aknéban

A GPR119 expressziós mintázatát 6 aknéban szenvedő, kezeletlen és 6 nem aknés donor bőrmintáin vizsgáltuk. A paraffinba ágyazott blokkokból metszeteket készítettünk és a metszeteken hőindukált antigénfeltárást végeztünk. Az endogén peroxidázok gátlására 3% H₂O₂ oldatot használtunk 10 percig. Ezután a metszeteket szobahőmérsékleten inkubáltuk a humán GPR119-et felismerő primer antitesttel melyet BSA-t tartalmazó PBS-ben hígítottunk. A másodlagos immunjelölés, valamint a metszetek előhívása és fedése mindenben megegyezik az előző fejezetben ismertetett protokollal. Fontos hangsúlyozni, hogy a szemikvantitatív összevetésben résztvevő metszetek feldolgozása és festése szigorúan sztenderdizált módon, szimultán történt, és a minták fotózását is azonos beállítások (fényerősség, féhéregyensúly stb.) mellett végeztük. A szemikvantitatív képanalízist *ImageJ 1.49v* szoftver (NIH) alkalmazásával

végeztük. A mintákat *Dr. Törőcsik Dániel* biztosította, a kísérleteket *Dr. Pór Ágnes* és *Dr. Kovács Ilona*, a képanalízist pedig *Dr. Oláh Attila* végezte.

Az ECS tagjainak kimutatása HCEC-eken (immunfluoreszcens jelölés)

A HCEC-eket fedőlemezeken 60-70%-os konfluenciáig növesztettük, majd -20°C-os acetonban 10 percig fixáltuk. A sejteket 0,6% Triton X-100-at és 10 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben blokkoltuk és permeabilizáltuk (5 perc, szobahőmérséklet). A sejteket FAAH, CB₁, NAPE-PLD, MAGL, CB₂, DAGL α , illetve DAGL β ellen termeltetett elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A PBS-ben történő mosást követően a fedőlemezeket Alexa-488[®]-konjugált, kecskében termelt egér IgG Fc-szegmens elleni vagy kecskében termelt, nyúl IgG Fc-szegmens elleni másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festettük. Negatív kontrollként az elsődleges antitestek elhagyásával készült jelölést használtuk. A képeket Olympus Xcellence RT fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. A kísérleteket *Angyal Ágnes* végezte.

Az ECS tagjainak kimutatása humán szaruhártyán (immunfluoreszcens jelölés)

Az elhunytakból származó szaruhártyaminták felhasználása a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával történtek (azonosítók: IX-R-052/00016-28/2012; DE OEC RKEB/IKEB 3580-2012) a Helsink Deklaráció irányelveinek betartásával. A metszeteket acetonban fixáltuk, 0,1%-os Triton X-100-at és 10 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-ben blokkoltuk és permeabilizáltuk, majd az előző alfejezetben bemutatott, blokkoló oldatban hígított antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A tárgylemezeket ezután PBS-sel mostuk, majd Alexa-568[®]-konjugált kecskében termelt egér IgG Fc-szegmens elleni, illetve szintén kecskében termelt nyúl IgG Fc-szegmens elleni másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A magfestést DAPI-val végeztük, végül a metszeteket Fluoromount-

G fedőmédiával fedtük. A képeket Zeiss LSM 880 fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. A negatív kontrollokat minden esetben az elsődleges antitest elhagyásával nyertük. A humán korneamintákat *Dr. Takács Lili* biztosította, a kísérleteket *Angyal Ágnes*, *Dr. Zsebik Barbara* és *Prof. Dr. Vereb György* végezte.

Az intracelluláris 3'5'-ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) koncentráció meghatározása (cAMP ELISA)

Az SZ95 sebocitákat 1 órán át kezeltük OEA-dal (50 μ M) vagy azonos térfogatú oldószerrel (abszolút etanol), majd a sejteket a gyártó által javasolt protokollt követve 10^7 sejt/ml-es denzitásban lizáltuk, és az intracelluláris cAMP szintet Parameter Cyclic AMP Assay kit segítségével vizsgáltuk a gyártó protokollját követve. A kísérleteket *Angyal Ágnes* végezte.

A citokin-felzabadosulás vizsgálata (IL-6 és IL-8 ELISA)

A citokin-felzabadosulás vizsgálata során a standardizált módon (500.000 sejt/1,5 ml tápoldat/Petri-csésze; d=35 mm) szélesztett sejteket a jelzettek szerint kezeltük 3, illetve 24 órán keresztül. Ezt követően a felülúszókat begyűjtöttük, lecentrifugáltuk (500 g; 10 perc), és a törmelékmentes felülúszót -80°C -on tároltuk, majd OptEIA kitek segítségével, a gyártó protokollját követve meghatároztuk a felzabadosult IL-6 és IL-8 mennyiségét. A méréseket *Angyal Ágnes*, *Dr. Markovics Arnold*, *Tóth Kinga Fanni*, *Pénzes Zsófia*, *Dr. Shahrzad Alimohammadi* és *Horváth Dorottya* végezte.

Fluoreszcens Ca^{2+} mérés

Az OEA Ca^{2+} -homeosztázisra gyakorolt hatásainak vizsgálatához fluoreszcens Fluo-4 AM jelölést használtunk. A sejteket 20.000 sejt/lyuk denzitásban tenyésztettük speciális, fluoreszcens mérésekhez optimalizált 96 lyukú lemezre. A sejteket egyszer mostuk 100 μ l/lyuk Hank-oldattal, melyet probeneciddel és BSA-val egészítettünk ki (végkoncentrációk: 2,5 mM, illetve 10 mg/ml), majd 1 μ M Fluo-4 AM festéket tartalmazó Hank-oldattal (100 μ l/lyuk)

30 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-on. A sejteket ezután háromszor mostuk Hank-oldattal (100 µl/lyuk), majd FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével „Flex” módban meghatároztuk az egyes wellek fluoreszcencia intenzitását (gerjesztés: 490 nm; detektálás: 520 nm). A sejtek válaszadási képességének ellenőrzésére minden mérés végén pozitív kontrollként ATP-t mértünk a sejtekre (végkoncentráció: 0,2 mg/ml). Az adatokat F/F_0 formában adtuk meg, ahol F_0 a kezelést megelőzően lemerített alapvonal átlagos fluoreszcencia intenzitása, míg F az aktuális fluoreszcencia. A méréseket *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold és Tóth Kinga Fanni* végezte.

Szelektív géncsendesítés (siRNS transzfekció)

Az SZ95 szebocitákat Petri-csészékbe, 96 lyukú lemezekre vagy 6 lyukú tenyésztőedényekbe helyezett steril fedőlemezekre szélesztettük. Másnap (50-70%-os konfluenciaszinten) a tápoldatot szérumentes OptiMem médiumra cseréltük, és a sejteket GPR119-re specifikus, duplaszálú, kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine[®] RNA_i MAX transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNA_i Negative Control „medium” duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával sem mutat homológiát. A géncsendesítés hatékonyságát a transzfekciót követően a 2. és 3. napon ellenőriztük mRNS, illetve fehérje szinten. A kísérleteket *Angyal Ágnes és Dr. Markovics Arnold* végezte.

Statisztikai analízis

Az adatokat az IBM SPSS Statistics 20, illetve GraphPad Prism 8.3.1 szoftverrel, Student-féle kétoldalú, kétmintás t -próbával vagy egyutas ANOVA-t követő Bonferroni *post hoc* teszttel (rendre páros, illetve többszörös összehasonlítás) vizsgáltuk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek. A grafikonokat Origin Pro Plus 6.0 vagy *GraphPad Prism 8.3.1* segítségével ábrázoltuk. Az analízist és az ábrák elkészítését *Angyal Ágnes, Dr. Markovics Arnold, Dr. Szöllősi Attila Gábor és Dr. Oláh Attila* végezte.

Eredmények

Az OEA elősegíti a szebociták differenciálódását

A „klasszikus” eCB-ok (pl. az AEA), valamint a gyulladásos lipidmediátor arachidonsav (AA) is jellemzően a 30-50 μM -os koncentrációban alkalmazva fokozzák a szebociták faggyúlipid-termelését 24-48 órás kezelések során. Ebből kiindulva az OEA hatásait is elsőként a 10 nM és 50 μM közötti koncentrációtartományban vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy 50 μM -ig az OEA nem befolyásolta az életképességet (24-48 órás kezelések; MTT-assay), valamint nem volt hatással az SZ95 szebociták proliferációjára sem (CyQUANT-assay; 48 órás kezelések). Ezzel szemben az OEA koncentrációfüggő módon és szignifikánsan megnövelte a faggyúlipid-termelést (1-50 μM ; 24-48 órás kezelések; Nile Red jelölés), és fokozta a szebociták granuláltságát (48 órás kezelések; áramlási citometria) is. Ezen eredmények azt sugallták, hogy a „klasszikus” eCB-okhoz hasonlóan az OEA is képes elősegíteni a szebociták differenciálódását, lipogén hatása pedig összemérhető a „klasszikus” eCB-ok (pl. AEA), az AA, valamint a linolsav és a tesztoszteron kombinációja által kiváltott hatásokkal. Tekintettel arra, hogy a szebociták differenciációját a faggyúlipid-termelés és a granuláció fokozódása mellett (a holokrin szekréció sajátosságaként) sejthalálfolyamatok is kísérik, kíváncsiak voltunk, hogy az OEA kezelés befolyásolja-e az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát. Kombinált DilC₁(5)-SYTOX Green jelöléssel nyert eredményeink alapján a 48 órás OEA kezelés kismértékben, de szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciált (DilC₁(5) jelölés), jelezve a korai apoptotikus folyamatok elindulását, miközben a nekrotikus sejtek aránya változatlan maradt (SYTOX Green jelölés). Ez az eredmény ismét azt erősíti meg, hogy az OEA-kezelés valóban elindítja a humán szebociták differenciálódását.

Az OEA gyulladásoos választ vált ki humán szebocitákon

Annak érdekében, hogy tovább vizsgáljuk az OEA hatását a humán szebocitákra, megvizsgáltuk a sejtek immunfenotípusára gyakorolt hatásait. Megállapítottuk, hogy a 3 órás OEA-kezelés (50 μ M) szignifikáns mértékben fokozta számos kulcsfontosságú gyulladásoos citokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 és IL-8) mRNS szintű kifejeződését (Q-PCR), és megnövelte az IL-6 és IL-8 felszabadulását (ELISA), bár a hatása rendre elmaradt a pozitív kontrollként alkalmazott Toll-like receptor 4 aktivátor LPS esetében tapasztaltaktól. Adataink tehát arra engednek következtetni, hogy a differenciálódás elősegítése mellett az OEA számottevő gyulladásoos választ is kiválthat humán szebocitákon.

Az OEA lipogén hatása nem a PPAR α útvonalon keresztül valósul meg

Ezután megvizsgáltuk, hogy mi állhat a fent leírt differenciálódást elősegítő hatások háttérében. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PPAR-ok fontos szereplői a lipidszintézis szabályozásának, és a humán szebocitákon is kifejeződnek. Mivel az OEA képes aktiválni a PPAR α -t, megvizsgáltuk, hogy ez a nukleáris receptor részt vesz-e az OEA lipogén hatásának közvetítésében humán szebocitákon. Megállapítottuk, hogy a szelektív PPAR α antagonistá GW 6471 (1 μ M) nem befolyásolta szignifikánsan az OEA által kiváltott faggyúlipid-termelést (48 órás kezelése), így elmondható, hogy az OEA differenciációt és faggyúlipid-termelést fokozó hatása minden valószínűség szerint a PPAR α -tól független útvonalon keresztül alakul ki humán szebocitákon.

A GPR119 kifejeződik humán szebocitákon *in vitro* és *in situ* is

Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok alapján nemcsak a PPAR α , hanem a korábban „árvareceptor”-ként számon tartott GPR119 is közvetítheti az OEA biológiai hatásait, megvizsgáltuk, hogy ez a receptor expresszálódik-e humán szebocitákon. Kimutattuk, hogy a GPR119 mind mRNS (Q-PCR), mind fehérje szinten (Western blot) jelen van tenyésztett humán szebocitákon, és kifejeződik *in situ* humán faggyúmirigyekben is (immunhisztokémia).

A GPR119 szelektív géncsendesítése csökkenti az OEA lipogén hatását

Miután többféle módszerrel is sikerült bizonyítanunk, hogy az OEA lehetséges receptora, a GPR119 kifejeződik humán sebocitákon, megvizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e az OEA biológiai hatásainak közvetítésében. Ezt (ismert szelektív antagonisták hiányában) siRNS-mediált szelektív géncsendesítés segítségével vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy a GPR119 expressziójának csökkentése (melyet mRNS szinten Q-PCR, fehérje szinten pedig Western blot segítségével követtünk nyomon), bár teljesen nem védte ki, de szignifikánsan csökkentette az OEA lipogén hatását a non-sense RNS-sel transzfektált SCR kontroll sejtek esetében tapasztalhatóhoz képest. Mindez azt jelzi, hogy az OEA faggyúlipid-szintézist fokozó hatásának kialakításában nagy valószínűséggel szerepet játszik a GPR119 aktiválódása, azonban nem zárható ki, hogy GPR119-független lipogén útvonalak is hozzájárulhatnak a folyamathoz.

A receptorok által közvetített hatások általában telítési kinetikát mutatnak, ezért az eredmények indirekt megerősítésére megvizsgáltuk azt is, hogy az OEA magasabb koncentrációi (100, 300 és 500 μM) milyen hatással vannak a lipidszintézisre. Megállapítottuk, hogy a faggyúlipid-szintézis tovább fokozódott 100 és 300 μM -os OEA koncentrációk hatására, ahol a hatás szaturálódott, hiszen a 100 és 300 μM -os kezelést követően létrejött lipidtermelés nem különbözött szignifikánsan, míg az egyértelműen citotoxikus 500 μM -os OEA koncentráció alkalmazása már értelemszerűen alacsonyabb lipidszintet eredményezett.

Az OEA lipogén hatásának kialakításában több kináz kaszkád is részt vesz

Ezután megvizsgáltuk az OEA egyes, a faggyúlipid-termelés szempontjából fontos szabályozókra, így a Ca^{2+} homeosztázisra és az ERK1/2 MAPK kaszkádra gyakorolt hatásait. Megállapítottuk, hogy az akut OEA-kezelés (50 μM) nem befolyásolta az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t (Fluo-4 AM fluoreszcens Ca^{2+} -jelölés), azonban jelentősen fokozta az ERK1/2 MAPK foszforilációját (Western blot), azaz a „klasszikus” eCB-okhoz hasonlóan aktiválta a kaszkádot. Tekintettel arra, hogy a

„klasszikus” eCB-ok esetén az ERK1/2 MAPK gátlása szignifikánsan csökkentette a faggyúlipid-termelést, következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a PD 98059 nevű ERK1/2 MAPK inhibitor miként befolyásolja az OEA lipogén hatását. Megállapítottuk, hogy a PD 98059 egyidejű alkalmazása jelentősen csökkentette az OEA lipogén hatását, megerősítve, hogy ezen útvonal aktiválása valóban részt vesz az OEA hatásainak közvetítésében. Azt is meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy a PD 98059 önmagában alkalmazva csökkentette a bazális faggyúlipid-termelést, jelezve, hogy az útvonal „alap” aktivitása valószínűleg hozzájárul a sebociták homeosztatis faggyúlipid-termelésének fenntartásához is. Mivel a GPR119 általában (bár nem kizárólag) G_s-proteinhez kapcsolt receptorként fejt ki biológiai hatásait, megvizsgáltuk azt is, hogy az OEA befolyásolja-e az intracelluláris cAMP szintet humán sebocitákban. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy az OEA-kezelés (50 µM; 60 perc) csak kis, nem szignifikáns mértékben fokozta a humán sebociták cAMP-szintjét.

Annak érdekében, hogy további információt nyerjünk az OEA sejtélettani hatásainak pontos mechanizmusáról, „Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit” segítségével megvizsgáltuk, hogy milyen kináz kaszkádok aktiválódnak humán sebocitákon OEA-kezelés hatására. Megállapítottuk, hogy az OEA-kezelés (20 perc; 50 µM) hatására egyebek mellett aktiválódott a CREB, STAT5a/b, JNK 1/2/3, Akt/PKB jelátviteli útvonalak. Ezt követően a leginkább relevánsnak tűnő útvonalak (a már említett JNK, Akt/PKB, CREB, illetve STAT5) részvételét az OEA hatásainak közvetítésében specifikus inhibitorok alkalmazásával is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a STAT5 farmakológiai gátlása nem változtatta meg szignifikánsan az OEA által indukált lipogenezist, míg a JNK, a CREB és az Akt/PKB szelektív gátlása jelentősen csökkentette azt.

A GPR119 down-regulálódik aknéban

A fenti adatok alapján feltételezhető, hogy ha a homeosztatis OEA→GPR119 jelátvitel szabályozásában zavar keletkezik, az hozzájárulhat

olyan, rendellenes faggyúmirigy-működéssel jellemezhető kórképek kialakulásához, mint pl. a szeborrea vagy az akne. Ezért kísérleteink transzlációs relevanciáját növelendő úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a GPR119 expressziójának esetleges változásait aknés, valamint aknéban nem szenvedő donorok faggyúmirigyeiben. A szigorúan sztenderdizált módon elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat és a szemikvantitatív képanalízis elvégzését követően azt tapasztaltuk, hogy a viszonylag alacsony donorszám és a donorok közötti nagy variabilitás ellenére is a GPR119 expressziója szignifikánsan csökkent az aknés donorok faggyúmirigyeiben. Mindez azt jelenti, hogy a homeosztatisz GPR119 jelátvitel zavara legalább az aknés betegek egy részében előfordulhat.

A humán korneális epitelsejtek kifejezik az ECS legfontosabb tagjait

Kísérleteink második felében az ECS legfontosabb tagjai, azaz a „klasszikus” kannabinoid receptorok (CB₁ és CB₂), valamint az eCB-okat felépítő (NAPE-PLD, DAGL α és $-\beta$) és lebontó (FAAH és MAGL) enzimek jelenlétét vizsgáltuk meg humán korneális epitelsejteken *in vitro* és *in situ*. Immunfluoreszcens jelöléssel megerősítettük, hogy a HCEC-ek kifejezik a CB₁-et és a CB₂-t, valamint az eCB-okat szintetizáló és lebontó legfontosabb enzimeket is. Fontos megjegyezni, hogy ugyanezen fehérjék megtalálhatók a humán korneális epitéliumban *in situ* is. Mindez tehát azt jelenti, hogy a humán korneális epitélium valóban képes lehet eCB termelésre és lebontásra. A két folyamat által szabályozott eCB tónus pedig szerepet játszhat egyebek mellett a lokális gyulladási folyamatok finomhangolásában.

A TLR3 aktivációval és UVB besugárzással kiváltott gyulladási válasz jellegzetes időfüggést mutat HCEC-eken

Ezt követően célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az AEA irodalmi adatok alapján ismert CB₁-függő gyulladáscsökkentő hatása kizárólag a TRPV1 aktiváció esetén alakul-e ki, vagy esetleg egy univerzális hatásról van szó, ami a

TRPV1-től független gyulladásoz szignálok esetén is hatékony marad. Ennek érdekében először két klinikailag releváns, a TRPV1-től és egymástól is független mechanizmus révén ható gyulladásoz-induktort alkalmaztunk: a TLR3 aktiváció révén virális keratitiszt utáázó p(I:C)-t (20 µg/ml), valamint a fénykárosodás által kiváltott keratitisz modelljeként UVB besugáázást (40 mJ/cm²). Első lépésként megvizsgáltuk a két kezelés által kiváltott gyulladásoz válasz dinamikáát. Megállapítottuk, hogy mindkét inger fokozta több gyulladásoz citokin (IL-1α, IL-1β, IL-6 és IL-8) mRNS szintű kifejeződéset. A növekedés a vizsgált időpontok (p(I:C): 3, 6, 12 és 24 óra; UVB 3, 6, 12, 24 és 48 óra) közül 3 óránál (p(I:C) kezelés), illetve 12 óránál (UVB besugáázás) bizonyult a legmarkánsabbnak, ezért ezekben az időpontokban a gyulladásoz citokinek felülúszóba történő felszabaduláát is megvizsgáltuk ELISA technikával. Azt tapasztaltuk, hogy az IL-6 és az IL-8 szintje mindkét esetben megnövekedett, míg az IL-1α és IL-1β koncentrációja a detekciós küszöb alattinak bizonyult (nem publikált megfigyelés). A fenti eredmények fényében további kísérleteink során 3 (TLR3 aktiváció), illetve 12 órász kezeléseket, illetve inkubációs időket (UVB modell) alkalmaztunk.

Az AEA hatásai a gyulladásoz citokinek expresszióáa és felszabaduláára jelentős koncentráció- és modelfüggést mutat HCEC-eken

Az AEA humán korneális epitélsejtekre gyakorolt lehetséges gyulladásozcsökkentő hatásainak vizsgálata érdekében az AEA-t alacsony (100 nM) és magas (10 µM) koncentrációban alkalmaztuk az említett modellekben. Kísérleteink „nulladik” lépéseként megállapítottuk, hogy az AEA a jelzett koncentrációkban nem befolyáosolta szignifikánsan a HCEC-ek életképepepeget, így a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható. Meglepő módon az önmagában alkalmazott AEA mindkét koncentrációban jelentős növekedést okozott a vizsgált gyulladásoz citokinek mRNS szintű kifejeződéseben 3 órával a kezelés után, és ez a növekedés 12 óra elteltével is megfigyelhető maradt az IL-6 és IL-8 esetén

(mindkét koncentráció), illetve az IL-1 α esetén (10 μ M). Érdekes módon, bár az adott időpontban (3 óra) önmagában gyulladáshoz vezető választ indukált, a 100 nM-os AEA-kezelés mégis szignifikánsan csökkentette a p(I:C) hatását az IL-6, az IL-8 és az IL-1 β kifejeződésére. 10 μ M-os koncentrációban viszont ellenkező hatást figyeltünk meg, ugyanis az AEA az IL-6 és az IL-1 β szintjének további növekedését okozta, miközben nem volt hatással az IL-8 és az IL-1 α expresszióra. A TLR3 aktivációs modell esetén tapasztaltakkal szemben UVB besugárzást (40 mJ/cm²) követően (12 órás kezelés) egyáltalán nem figyeltünk meg gyulladásgátló hatást. Sőt, az AEA 10 μ M-os koncentrációja tovább növelte az IL-6 és az IL-8 expressziót, de nem befolyásolta az IL-1 α és - β kifejeződését, és még az alacsonyabb, 100 nM-os koncentrációban alkalmazott AEA is fokozta az IL-8 szintjét. A leghatékosabb változásokat szeretnénk volna fehérje szinten is megvizsgálni, így a tenyészetek felülúszójából ELISA technika segítségével mutattuk ki az IL-6-ot és az IL-8-at. Amint az várható volt, mind a p(I:C), mind az UVB besugárzás jelentősen fokozta az IL-6 és az IL-8 koncentrációját a felülúszóban, amit érdekes módon az AEA mindkét koncentrációja tovább fokozott. Ezzel szemben az önmagában alkalmazott AEA hatásait vizsgálva azt tapasztaltuk, 100 nM-os koncentrációban mind 3, mind 12 órás kezelést követően szignifikánsan csökkentette a spontán IL-8 felszabadulást, de nem volt hatással az IL-6 koncentrációjára. 10 μ M-os koncentrációban ezzel szemben mindkét időpontban fokozta az IL-8 és 3 órás kezelése során szignifikánsan növelte az IL-6 felszabadulását.

Diszkusszió

Kísérleteink első felében a humán faggyúmirigyek ECS-ének eleddig nem vizsgált aspektusaival foglalkoztunk. A korábbiakban kimutattuk, hogy a szebociták képesek az OEA metabolizmusára, így felmerült, hogy a korábban leírt „klasszikus” eCB-ok (azaz az AEA és a 2-AG) mellett ez az „eCB-szerű” molekula is befolyásolhatja a humán faggyúmirigyek biológiai folyamatait.

A „nem-klasszikus” eCB jelátvitel vizsgálata humán faggyúmirigyekben

Az OEA lehetséges szerepének tisztázására elsőként egymást kiegészítő sejtlejtani vizsgálómódszereket alkalmazva megállapítottuk, hogy ez a molekula elősegíti a humán szebociták differenciálódását, szignifikánsan fokozza faggyúlipid-termelést, megnöveli szebociták granuláltságát, és korai apoptotikus folyamatokat indukál. Az OEA biológiai hatásait tovább vizsgálva kimutattuk azt is, hogy potens lipogén koncentrációja (50 μM) gyulladáshoz vezet a szebocitákon, de nem befolyásolja az életképességet, illetve a sejtszámot (24- és 48 órás kezeléseknél).

Az alapjelenség leírását követően hatásmechanizmus tanulmányozásával folytattuk kísérleteinket. Kimutattuk, hogy az OEA lipogén hatása független a PPAR α -tól, ezért megvizsgáltuk, hogy az OEA egy másik lehetséges receptora, a GPR119 kifejeződik-e a szebocitákon. Megállapítottuk, hogy a GPR119 mind mRNS, mind fehérje szinten megtalálható a sejteken, és kifejeződik intakt faggyúmirigyekben is. Szelektív antagonisták hiányában a következőkben siRNS transzfekció segítségével sikeresen csökkentettük a GPR119 kifejeződését humán szebocitákon, és megállapítottuk, hogy a beavatkozás jelentősen mérsékelte az OEA lipogén hatását, így az nagy valószínűséggel (legalább részben) a GPR119 aktivációja révén alakult ki.

Az OEA lipogén hatásának mechanizmusát „szűrőjellegű” foszfokináz array-vel, illetve célzott, cAMP ELISA-val tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy nemcsak a „klasszikus” eCB-ok esetén leírt ERK1/2 MAPK kaszkád, hanem

más jelátviteli útvonalak (a JNK, az Akt/PKB és a CREB) aktiválása is szerepet játszik a kialakulásában, míg a piloszebáceus egység immunfolyamatainak befolyásolásában részt vevő STAT5 farmakológiai gátlásának nem volt rá szignifikáns hatása. Fontos megemlíteni, hogy az OEA 50 μM -os koncentrációban alkalmazva nem volt hatással a szebociták Ca^{2+} homeosztázisára (akut kezelés), és - habár a GPR119 aktiválódása jellemzően G_s -fehérjéhez kapcsolt útvonalon keresztül emeli az intracelluláris cAMP szintet - érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a szebociták cAMP szintjét is csak kis, nem szignifikáns mértékben emelte meg (60 perces kezelés). Ez utóbbi eredmény egyrészt magyarázható lehet alternatív másodlagos jelátviteli útvonalak aktiválásával („elfogult agonizmus”); másfelől azonban, ha figyelembe vesszük a cAMP szignaling jólismert kompartmentizációját, nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a cAMP hozzájárulhat az OEA bizonyos hatásaihoz, hiszen kísérleteinkben a cAMP szintet teljessejt-lizátumból (és csak egyetlen időpontban) határoztuk meg, de nem vizsgáltuk meg, hogy statisztikailag szignifikánsan emelkedik-e a cAMP szintje a különböző sejten belüli mikrokompartmentekben (és/vagy más időpontokban) az OEA kezelés hatására. Mindezzel együtt a foszfokináz array során nyert eredményeink (jelesül hogy a CREB foszforilálódik [aktiválódik] OEA kezelés hatására, a CREB farmakológiai gátlása pedig számottevően csökkenti az OEA lipogén hatását) alapján feltételezhető, hogy a cAMP (is) szerepet játszhat az OEA bizonyos hatásainak közvetítésében humán szebocitákon. Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy a CREB aktiválása nemcsak a cAMP szint emelkedésén keresztül érhető el, hanem alternatív másodlagos jelpályákon keresztül is, ideértve egyebek mellett az Akt/PKB útvonalat is.

Ismert, hogy az Akt/PKB, valamint a JNK MAPK útvonalak közvetíthetik különféle mediátorok lipogén hatásait humán szebocitákon. Ezzel összhangban eredményeink azt mutatták, hogy az OEA kezelés aktiválta ezeket az útvonalakat,

farmakológiai gátlásuk pedig csökkentette az OEA által kiváltott faggyúlipid-termelést.

A jelátvitel vizsgálata után az OEA-GPR119 tengellyel kapcsolatos kísérleteink zárásaként aknés és aknéban nem szenvedő donorok bőrmintáiban hasonlítottuk össze a GPR119 fehérje szintű kifejeződését. Megállapítottuk, hogy az aknés betegek faggyúmirigyeiben a GPR119 fehérje szintű expressziója szignifikánsan csökkent. Bár a kísérletbe bevont donorok viszonylag kis száma, valamint az egyes donorok közötti relatíve nagy variabilitás miatt korai lenne merész következtetéseket levonni, adataink alapján mégis úgy tűnik, hogy a homeosztatis GPR119 jelátvitel az aknés betegek egy részénél valóban zavart szenvedhet. Bár jelen kísérleteink nem adnak választ arra a kérdésre, hogy az egyébként eredményeink alapján lipogén hatásokat közvetítő GPR119 kifejeződése miért csökken aknéban szenvedő betegek faggyúmirigyeiben, elméleti megfontolások alapján több lehetséges magyarázat is kínálkozik. Az aktivációt követő down-reguláció/deszzenzitizálódás jólismert jelenség több G-fehérjéhez kapcsolt receptor, így a GPR119 esetében is. Ennek fényében eredményeink egyik lehetséges magyarázata, hogy a GPR119 (túl) aktiválódása inkább az akne patogenezisének kezdeti szakaszában és nem a későbbi progresszióban játszik szerepet. Alternatív hipotézisként természetesen az is lehetséges, hogy a lipogén GPR119 receptor down-regulációja egy a már eleve kórosan magas szintet elérő faggyútermelésre adott másodlagos, kompenzációs mechanizmusként alakul ki.

Ismert, hogy a GPR119 a jövőben terápiás célpont lehet a 2-es típusú cukorbetegség kiegészítő kezelésében. Bár az eddig vizsgált szintetikus agonisták nem jutottak túl a II. fázisú klinikai vizsgálatokon, az ígéretes állatkísérletes adatok ösztönzőleg hatnak új, nagyobb *in vivo* hatékonysággal bíró GPR119-aktivátorok fejlesztésére, tesztelésére. Tekintve, hogy a GPR119 különböző agonistái eltérő másodlagos jelpályákat aktiválhatnak, eredményeink nem feltétlenül jelentik azt, hogy minden GPR119 agonista esetében számítani kell

majd bőrgyógyászati, a faggyúmirigyek működését érintő mellékhatások kialakulására. Azonban azon agonisták esetében, amelyek az OEA-dal nagymértékben átfedő másodlagos jelpályákat aktiválnak, az ilyen mellékhatások kialakulása nem zárható ki, feltéve, hogy kellően magas koncentrációt érnek el a faggyúmirigyekben. Most közölt kísérletes adataink fényében ezért a jövőbeli klinikai vizsgálatok során a lehetséges bőrgyógyászati komplikációk kialakulására is érdemes lesz figyelmet fordítani.

Eredményeink összességében az OEA-GPR119 jelátviteli útvonalat a humán faggyúlipid-termelés és a szebociták differenciálódásának egy korábban ismeretlen, pozitív regulátoraként azonosítják. A sejtek OEA kezelése proinflammatorikus fenotípus kialakulásához vezetett, ami felveti annak lehetőségét, hogy ennek a jelátviteli rendszernek a diszregulációja hozzájárulhat a fokozott faggyúlipid-termeléssel és gyulladással jellemezhető akne kialakulásához.

Az ECS vizsgálata HCEC-eken

A szaruhártya külső rétegét felépítő epitelsejtek a szemfelszín első védelmi vonalaként működnek, és ennek során fizikai és immunológiai jellegű kihívásoknak is meg kell felelniük. Ez utóbbi kihívások jelentősége igen nagy, hiszen a kornea kóros gyulladással járó folyamatai a szaruhártya átlátszóságának elvesztéséhez és ezzel vaksághoz vezethetnek. Újabb eredmények alapján a HCEC-ek nem kizárólag „passzív elszennvedői”, hanem aktív alakítói is a lokális gyulladással járó folyamatoknak.

A HCEC-ek gyulladással járó válaszainak egyik szabályozója a TRPV1, hiszen a receptor aktiválása gyulladással járó mediátorok felszabadulásához vezet. Tekintve, hogy a legfőbb „klasszikus” eCB-ok (AEA és 2-AG) jelen vannak a humán korneális epitéliumban, jelen kísérleteink során azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy feltérképezzük az ECS eddig nem azonosított tagjainak kifejeződését a humán korneális epitéliumban, illetve megvizsgáljuk, hogy az AEA más (a

TRPV1 aktivációjától függetlenül kialakuló) gyulladásos folyamatok esetén is gyulladásgátló hatást mutat-e.

Kísérleteink során elsőként megerősítettük (CB₁ és CB₂), illetve kimutattuk (NAPE-PLD, DAGL α és $-\beta$, MAGL, FAAH), hogy az ECS legfontosabb tagjai kifejeződnek tenyésztett HCEC-eken és intakt humán korneális epitéliumban is. Ezt követően az AEA lehetséges gyulladásgátló szerepét vizsgáltuk meg részletesebben. Ehhez két olyan, klinikailag releváns stresszort (a vírusfertőzéseket modellező TLR3 aktivációt, valamint az UVB-besugárzást) választottunk, melyek gyulladást kiváltó hatása nagy valószínűséggel független a TRPV1 aktivitásától. Kimutattuk, hogy mind a p(I:C)-kezelés, mind az UVB besugárzás jellegzetes időbeli lefutással fokozza különböző gyulladásos citokinek (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) mRNS-szintű kifejeződését HCEC-ekben. Miután kimutattuk, hogy az AEA vizsgálni tervezett koncentrációi (100 nM és 10 μ M) nem befolyásolják a HCEC-ek életképességét, először az önmagában adagolt AEA hatásait figyeltük meg. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy az AEA mindkét koncentrációban és mindkét időpontban fokozta több gyulladásos citokin mRNS-szintű expresszióját. Emellett – bár 100 nM-ban alkalmazva 3 és 12 órás kezelések során is csökkentette a spontán IL-8 felszabadulást - 10 μ M-os koncentrációban alkalmazva már mindkét időpontban fokozta azt, sőt, 3 órás kezelések során az IL-6 szintjét is szignifikánsan növelte, azaz várakozásainkkal szemben döntően proinflammatorikusnak bizonyult. Adataink emellett arra is rávilágítottak, hogy az AEA differenciáltan modulálhatja a már meglévő, tárolt citokinek felszabadulását és *de novo* termelését. Kimutattuk azt is, hogy – bár az AEA 100 nM-os koncentrációban csökkentette több gyulladásos citokin p(I:C) által indukált mRNS-szintű kifejeződését, az IL-6 és IL-8 felszabadulást már tovább fokozta, 10 μ M-os koncentrációban pedig szintén egyértelműen proinflammatorikusnak bizonyult. Az UVB modell vizsgálatokor még egységesebb biológiai viselkedéssel szembesültünk: azon esetekben, amikor az

AEA bármelyik koncentrációjának volt statisztikailag szignifikáns hatása, az minden esetben a gyulladáshoz való válasz további fokozása volt.

Ezek az eredmények első ránézésre ellentmondanak azon irodalmi adatoknak, amelyek szerint a CB₁ aktiválása egy szintetikus agonistával vagy AEA-dal gátolta a TRPV1 aktiváció által kiváltott gyulladáshoz való válasz kialakulását. Bár a jelenség háttérében álló mechanizmust nem vizsgáltuk részletesebben, az ellentmondás feloldására több feltételezéssel is élhetünk. Elsőként fontos megjegyezni, hogy az AEA maga is képes aktiválni a TRPV1-et, így lehetséges, hogy csak akkor gyulladásgátló hatású, ha a TRPV1-et egy erősebb hatást kiváltó (magasabb „efficacy”-val jellemezhető) ligandum aktiválja a szaruhártya epitélisejtjein, aminek a hatásával az AEA „gyengébb”, parciális agonistaként interferálhat. Ilyen ligand hiányában azonban a mi kísérleteinkben maga is TRPV1-mediált mechanizmussal válhatott gyulladáshoz való válasz, és ez a gyulladáshoz való válasz a független mechanizmussal kiváltott gyulladáshoz való válaszokkal additívnak bizonyult. A jelenség háttérét kutatva természetesen azt is érdemes tekintetbe venni, hogy az AEA számos más molekuláris célpontra (pl. GPR18, GPR55, számos kalcium csatorna stb.) is hathat. Annak eldöntése, hogy bármelyik már ismert vagy még azonosításra váró alternatív célpont kifejeződik-e a korneális epitélisejtjein, és befolyásolhatja-e azok gyulladáshoz való folyamatait, jövőbeli, célzott kísérletek feladata lesz.

Végezetül azt is meg kell jegyezni, hogy eredményeink alapján az AEA lebontásáért felelős fő katabolikus enzim, a FAAH, kifejeződik a humán szaruhártya epitélisejtjein *in vitro* és *in situ* is, az AEA FAAH általi lebontása pedig egy gyulladáshoz való válasz lipidmediátor, az arachidonsav termelését eredményezi. Az arachidonsav és származékai (pl. a leukotrién B₄) fontos szereplők a szemészeti betegségek széles skálájának patogenezisében, ideértve számos szaruhártyával kapcsolatos kórképet is olyannyira, hogy gátlásuk a közelmúltban ígéretes, új terápiás eszközként jelent meg egyes szemészeti gyulladáshoz való folyamatok mérséklésében. Mindezek fényében lehetséges, hogy bizonyos körülmények

között az AEA gyorsan arachidonsavvá, majd más proinflammatorikus mediátorokká metabolizálódva váltja ki a kísérleteink során tapasztalt gyulladási választ, ami valamilyen módon nem következik be TRPV1-aktivátorok jelenlétében. Természetesen jelenlegi ismereteink nem elégségesek annak eldöntésére, hogy a fenti mechanizmusok közül melyik milyen mértékben járulhat hozzá az AEA most leírt gyulladási hatásához, így a folyamat jobb megértéséhez további vizsgálatokra van szükség.

Akárhogy is, az ECS szerepének pontosabb megértése a különféle keratitiszek és egyéb gyulladási szembetegségek patomechanizmusában közelebb vihet a jelzett betegségekben hatékony, új terápiás eszközök kifejlesztéséhez. Jelen tanulmányunk eredményei azonban arra is ráirányítják a figyelmet, hogy egy ilyen összetett rendszerbe való beavatkozáskor fokozott óvatosságra van szükség, hiszen akár az általánosságban gyulladásgátlóként ismert eCB-ok is fejthetnek ki gyulladási folyamatokat fokozó hatást.

Összefoglalás

Kísérleteink első felében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk milyen hatást gyakorol az OEA a humán szebociták biológiai folyamataira. Megállapítottuk, hogy 50 μM -os koncentrációig a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható, és nem befolyásolja az SZ95 szebociták proliferációját. Többféle vizsgálómódszert alkalmazva kimutattuk azt is, hogy az OEA-kezelés fokozta a faggyúlipid-termelést és a szebociták differenciálódását, valamint megnövelte több gyulladásos citokin kifejeződését és felszabadulását. A jelenség mechanizmusát kutatva megállapítottuk, hogy az OEA nem a PPAR α aktiválása révén fejti ki a lipogén hatását, hiszen a szelektív PPAR α antagonistá GW 6471 nem befolyásolta azt. A következőkben kimutattuk, hogy a humán szebociták kifejezik az OEA egy másik lehetséges receptorát, a GPR119-et is, amelynek a szelektív géncsendesítése jelentősen csökkentette az OEA faggyúlipid-termelést fokozó hatását. Megállapítottuk, hogy a lipogén hatás kialakításában több kináz kaszkád (ERK1/2, JNK, CREB, Akt/PKB) aktiválódása is szerepet játszik. Végezetül a GPR119 expresszióját aknés, valamint aknéban nem szenvedő donorok faggyúmirigyében vizsgálva azt találtuk, hogy GPR119 kifejeződése aknéban csökken, ami arra utal, hogy az OEA-GPR119 jelátviteli tengely valóban zavart szenvedhet a betegség patogenezise során.

Kísérleteink második felében HCEC-eket és humán szaruhártyamintákat vizsgálva megállapítottuk, hogy a humán korneális epitélisejtek kifejezik az ECS legfőbb tagjait *in vitro* és *in situ*. Kimutattuk azt is, hogy a várttal ellentétben HCEC-ek AEA kezelése már önmagában is proinflammatorikus hatást váltott ki, és megállapítottuk, hogy az AEA (bár a hatásai koncentrációfüggőnek bizonyultak) többnyire tovább fokozta a TLR3 aktivációt, illetve UVB-besugárzás által kiváltott virális keratitiszt, illetve fénykárosodást modellező gyulladásos választ. Eredményeink szerint tehát az egyébként általában gyulladásgátló hatásúnak ismert eCB jelátvitel bizonyos körülmények között proinflammatorikus hatásokat is közvetíthet a humán korneális epitéliumban.

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. 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. Közöttük is különösen közvetlen munkatársaim, **Dr. Mihály Johanna, Dr. Tóth István Balázs, Dr. Szöllősi Attila Gábor, Dr. Czifra Gabriella, Ádám Dorottya, Dr. Shahrzad Alimohammadi, Dr. Ambrus Lídia, Balogh Norbert, Dr. Kelemen Balázs, Dr. Lisztes Erika, Dr. Markovics Arnold, Tóth Kinga Fanni, Dr. Szabó Imre Lőrinc, Dr. Vasas Nikolett, Vladár Anita, Dr. Zákány Nóra, Bánhalminé Szilágyi Szilvia, Fricz Nikolett, Furin Lilla, Galicz Anita, Hollósi Erika, Szabó-Papp Judit, Uzonyi Renáta, Kovács Gergő, Dr. Budai Marietta Margit, Dr. Takács Erika és Péntes Zsófia** segítségéért vagyok rendkívül hálás.

Köszönöm kollaborációs partnereink (**Prof. Dr. Christos C. Zouboulis, Dr. Pór Ágnes, Prof. Dr. Vereb György, Dr. Zsebik Barbara** és még sokan mások) felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Végezetül ebben a pár sorban szeretnék mindent megköszönni családomnak, hiszen nélkülük nem jutottam volna el eddig, nagyon hálás vagyok nekik. Külön szeretném megköszönni Balogh Norbertnek a PhD évek alatt született barátságot és a „ha már ennyi évet belefeccöltél, csináld végig” támogatását.

A kutatás az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, az NKFIH 120552, 121360, 125055, 125053, 128034, 135938, 134235, 134993, 134725, 134791, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00020 jelű projektek támogatásával valósult meg.

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/49/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Angyal Ágnes
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Angyal, Á.**, Péntes, Z., Alimohammadi, S., Horváth, D., Takács, L., Vereb, G., Zsebik, B., Bíró, T., 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: 5.923 (2020)
2. Markovics, A.*, **Angyal, Á.***, Tóth, K. F., Ádám, D., Péntes, 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>
* These authors contributed equally this work.
IF: 8.551

További közlemények

3. Singlár, Z., Szentesi, P., Fodor, J., **Angyal, Á.**, Csernoch, L., Sztretye, M.: Assessing the Potential of Nutraceuticals as Geroprotectors on Muscle Performance and Cognition in Aging Mice.
Antioxidants. 10 (9), 1415, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10091415>
IF: 6.312 (2020)
4. Sztretye, M., Singlár, Z., Szabó, L., **Angyal, Á.**, Balogh, N., Vakilzadeh, F., Szentesi, P., Dienes, B., Csernoch, L.: Improved Tetanic Force and Mitochondrial Calcium Homeostasis by Astaxanthin Treatment in Mouse Skeletal Muscle.
Antioxidants. 9 (2), 98, 2020.
IF: 6.312





5. Sztretye, M., Singlár, Z., Balogh, N., Kis, G., Szentesi, P., **Angyal, Á.**, Balatoni, I., Csernoch, L., Dienes, B.: The Role of Orai1 in Regulating Sarcoplasmic Calcium Release, Mitochondrial Morphology and Function in Myostatin Deficient Skeletal Muscle.
Front. Physiol. 11, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.601090>
IF: 4.566
6. Szöllösi, A. G., Molnárné Vasas, N., **Angyal, Á.**, Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., Béke, G., Lisztes, E., Szegedi, A., Kawada, N., Yanagida, T., Mori, T., Kemény, L., Bíró, T.: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 138 (2), 365-374, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>
IF: 6.29

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,954

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,474**

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, 2022.01.20.

