

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ÚJ MECHANIZMUSOK A HUMÁN HAJNÖVEKEDÉS
BIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Írta:
Borbíró István

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
Élettan és Neurobiológia Doktori Program
2011

ÚJ MECHANIZMUSOK A HUMÁN HAJNÖVEKEDÉS BIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Borbíró István okleveles biológus (biokémikus)

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

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Csernoch László, az MTA doktora
Tagok: Dr. Szentmiklósi József, kandidátus
Dr. Balla András, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. április 21.

Az értekezés bírálói:

Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D.

A bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Csernoch László, az MTA doktora
Tagok: Dr. Szentmiklósi József, kandidátus
Dr. Balla András, Ph.D.
Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. április 21.

BEVEZETÉS

Az utóbbi évek kutatásai rámutattak arra, hogy számos neuro-immuno-endokrin mechanizmus jelentős mértékben képes a szőrtüsző alapvető biológiai folyamatainak szabályozására, egerekben és az emberben egyaránt. Ezen terület ugrásszerű fejlődése annak is köszönhető, hogy a kutatóknak lehetőségük nyílt a szőrtüsző alapvető folyamatainak tanulmányozására humán szőrtüsző szervkultúrákban *in vitro*. Jelen munkánk alapját is ezen modellen nyert eredmények adják.

Munkacsoportunk korábban sikerrel igazolta a celluláris receptorként ismert tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák vanilloid alcsaládjába tartozó TRPV1 („kapszaicin receptor”) szerepét az egér és humán szőrtüszők növekedésének szabályozásában. Az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően ugyanakkor a TRP család egy másik tagja, a meleg érzékeny TRPV3 is a figyelem középpontjába került. Bizonyos szőrtelen rágcslótörzsek vizsgálatakor kiderült ugyanis, hogy a szőrtelen fenotípust okozó mutáció a *trpv3* gén kódoló régiójában található. Jelen munkánk célja a TRPV3 szerepének feltárása volt a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában.

Az általunk is alkalmazott modell mélyreható vizsgálata vezetett szőrtüszők eddig ismeretlen endokrinológiai jelentőségének megismeréséhez is. Bebizonyosodott ugyanis, hogy a humán szőrtüsző nem csak célpontja, hanem forrása is számos klasszikus hormonnak. Ezen túlmenően a humán piloszebáceus egység rendelkezik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely teljesen működőképes perifériás megfelelőjével is. Mivel mindezidáig nem vizsgálták a pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH) közvetlen szerepét a humán szőrtüsző élettani folyamatainak szabályozásában, munkánk második felében a TSH hatását kívántuk tanulmányozni izolált humán szőrtüsző szervkultúrában.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hajciklus

A szőrtüszőt az egész életen át váltakozó regressziós és regenerációs tevékenysége teszi egyedülállóvá a többi emlős szerv között. A regresszió és regeneráció ezen ciklikus váltakozását nevezzük hajciklusnak, melynek három jellegzetes szakaszát különböztetjük meg. Az *anagén* fázisban aktív növekedés és fejlődés történik, a szőrtüsző ebben a fázisban éri el maximális fejlettségét. A *katagén* szakaszban a növekedés megáll, regressziós folyamatok indulnak be, a nyugalmi *telogén* fázis pedig a tulajdonképpeni felkészülés a következő anagénre.

Amint az egyedfejlődés során létrejön az első haj vagy szőrszál, a szőrtüszőn hamar jelentkeznek a gyors regresszió jelei, megkezdődik az első katagén fázis. A katagén fázisban, mely átlagosan 2-3 hétig tart, a szőrtüsző visszafejlődése során apoptotikus sejtfolyamatok indulnak be. Ez a programozott sejthalál megfigyelhető a külső és a belső gyökérhüvely (ORS és IRS) rétegekben, a mátrix keratinocytákban, illetve a melanocytákban is. Ennek megfelelően a katagén fázis során a bulbus egyre inkább elvékonyodik, valamint egyre közelebb emelkedik az epidermiszhez. A hagyma közepét adó demális papilla (DP) proximális irányba húzódik, majd a késői katagén fázis során egy epiteliális nyéllel el is távolodik a már nem-növekvő hajszál bunkós végétől.

A viszonylag rövid regressziós, katagén stádium után a follikulus a nyugalmi, telogén fázisba kerül, melynek hossza átlagosan 3 hónap. Lényegében ezen időszak készíti fel a szőrtüszőt arra, hogy a növekedési anagén fázisba lépve elinduljon az első hajciklus. Az anagén fázis elején a szőrtüsző egyre inkább meghosszabbodik, és egyre mélyebbre nyúlik. A mátrix keratinocyták igen gyors proliferációja kialakítja a hajszál és az IRS egymást határoló rétegeit, miközben a bulbus keratinocytái egyre inkább körbeveszik a DP-t, és ezzel újra felépülnek az ORS tápláló rétegei is. Az utolsó, hatodik anagén stádiumban a

szőrtüsző eléri jellegzetes hagyma formáját, létrejön egy új, folyamatosan növekvő hajszál, melyet a gyökérhüvely keratinocyták és a kötőszövetes tok (CTS) határol. Az emberi szőrtüsző 2-6 éven át ebben a fázisban működik a fejbőrben, míg újra be nem indulnak a katagén átalakuláshoz vezető regressziós folyamatok.

A szőrtüsző, mint „önálló” neuroendokrin rendszer?

A legújabb kutatások szerint a szőrtüsző kiemelkedő célszövege a legtöbb jelentős hormonális útvonalnak is. Többek között nemihormonok, retinoidok, glükokortikoidok, pajzsmirigyhormonok, adrenokortikotróp hormon (ACTH), kortikotropin felszabadító hormon (CRH), melanokortinok, D3-vitamin, inzulin, prolaktin, P-anyag, melatonin, acetilkolin, endovanilloidok, endokannabinoidok, katekolaminok és prosztaglandinok képesek befolyásolni a szőrtüsző alapvető biológiai folyamatait; azaz módosítják a növekedést, a hajciklust, a pigmentációt és a szőrszál kialakulását, továbbá növekedési faktorok, citokinek és hormonok termelését, felszabadulását idézik elő.

Kiderült az is, hogy maga a pilosebáceus egység, mint nem-klasszikus, perifériás hormontermelő terület az ismert szteroid hormonok, neuropeptidek és neurotrofinok egy meglepően széles skáláját képes termelni. Mindemellett érzékeny célszervei és termelői a stresszválasz mediátorainak is.

Végül, de nem utolsó sorban a szőrtüsző egy teljes mértékben működőképes perifériás hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengellyel rendelkezik, ugyanis kimutatták a központi hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyre jellemző szabályozó visszacsatolási hurkok jelenlétét (CRH, ACTH és kortizol). Mindezek alapján nem túlzás kijelenteni, hogy a pilosebáceus egység egy aktív, autoregulált (neuro-) endokrin szervnek tekinthető.

A TRPV3 csatorna és a bőr kapcsolata

A tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV) család tagjai olyan hőérzékeny nem-szelektív kationcsatornák, melyek különböző környezeti tényezők (pl. a hőmérséklet, a pH és az ozmolaritás változása) érzékelésére képesek. A TRPV3 ezen csatornák közül a közepes, azaz a 31-39°C közötti hőmérsékleti tartományban aktiválódik. A csatorna bőrrel való potenciális kapcsolatát már az is „előrevetítette”, hogy a fehérje molekuláris leírása és karakterizálása nem szenzoros neuronokon, hanem keratinocytákon történt. BALB/c egértörzsből származó sejtvonalon, valamint a humán *trpv3*-mal transzfektált sejteken kimutatták, hogy 23-36°C között emelve a környezeti hőmérsékletet nem-specifikus kationáram aktiválódik. TRPV3-at overexpresszáló sejteken emellett megállapították, hogy a TRPV3 olyan, a bőrre kenve kisebb-nagyobb irritációt okozó terpenoidokkal is aktiválható, mint a szegfűszeg elsődleges hatóanyaga, az eugenol; a kakukkfűből származó thymol; a kámforfából izolálható kámfor; valamint az oregánó olajában jelentős mennyiségben megtalálható carvacrol. Bőr eredetű sejteken vizsgálva a TRPV3-at emellett leírták első szintetikus agonistáját, a 2-aminoetoxidifenil borátot is (2-APB).

A legizgalmasabb eredményre ugyanakkor a TRPV3 funkcióját elemző állatkísérletek vezettek. Bizonyos szőrtelen rágszáló törzsek (DS-*Nh* egér és WBN/Kob-Ht patkány) vizsgálatokor kiderült ugyanis, hogy ezen állatok szőrtelen (*Nh* – no hair, *Ht* – hairless type) fenotípusát a *trpv3* gén kódoló régiójába eső „*gain-of-function*” mutáció okozza. Ezen kutatások alapján feltételezhető, hogy a TRPV3 mutációja korai anagén fázisban állította meg a szőrnövekedést.

Nemrégiben beszámoltak arról is, hogy különféle pro-inflammatórikus mediátorok és hormonok (pl. dihidrotesztoszteron) szintén fokozzák a TRPV3 aktivitását, illetve kifejeződésének mértékét. Ugyanakkor, egyáltalán nem rendelkezünk adatokkal a TRPV3 *humán* bőrben betöltött funkcionális szerepéről

annak ellenére sem, hogy a TRPV3 fehérje jelenlétét már leírták humán epidermális keratinocytaon is.

A pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH) és a szőrnövekedés

Évtizedek óta ismert, hogy a pajzsmirigy-rendellenességek összefüggésbe hozhatóak az emberi bőr és haj szerkezetét, valamint funkcióját érintő elváltozásokkal. Számos klinikai és *in vitro* megfigyelés számol be például magasabb telogén arányról, megváltozott hajátmérőről, száraz, rideg, durva hajszálról, lecsökkent hajhagyma sejtproliferációról és hajhullásról (effluvium/alopecia) pajzsmirigy-alulműködés esetén, valamint emelkedett sejtproliferációról a bulbusban és hajhullásról pajzsmirigy-túlműködés során.

Mivel a pajzsmirigy rendellenességek jellegzetesen nagy szérum TSH szint ingadozással járnak, különösen érdekes lehet a TSH közvetlen, az emberi hajnövekedésre kifejtett hatásainak tanulmányozása.

Célkitűzések

Jelen munkánk célja az volt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a szőrtüsző biológiai folyamatainak regulációjába az alábbi két kérdéskörben:

1. Amint azt korábban bemutattuk, bizonyos TRPV3 mutációval rendelkező egerekben a folyamatosan aktív, mutáns TRPV3 csatorna szőrtelen fenotípus kialakulását okozta. Mindezidáig azonban nem volt ismeretünk arról, hogy humán szőrtüszőkben jelen van-e a TRPV3, illetve milyen biológiai szereppel bírhat. Ennek megismerése érdekében kísérleteink első felében az alábbi célokat foglalmaztuk meg:

- A TRPV3 kifejeződésének vizsgálata humán szőrtüszőkön, illetve szőrtüsző eredetű ORS keratinocita tenyészetekben (gén- és fehérjeszinten).
- A TRPV3 aktiváció hatásainak vizsgálata az izolált humán szőrtüszők biológiai folyamataira *in vitro* (hossznövekedés, proliferáló és apoptotizáló sejtek aránya, anagén-katagén átmenet).

- A TRPV3 aktiváció hatásainak és specificitásának vizsgálata szőrtüsző eredetű primer ORS keratinocita tenyészet biológiai folyamataira *in vitro* (csatornafunkció, proliferáció, sejthalál, aktivátorok specificitásának vizsgálata RNSi technikával).

2. Az utóbbi években számos hormonális jelátviteli útvonal jelenlétét vizsgálták humán szőrtüszőkben. Jelen munkánk második felében a TSH közvetlen hatásait vizsgáltuk a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában. Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- A TSH receptor kifejeződésének vizsgálata humán fejbőrön és izolált szőrtüszőkön (gén- és fehérjeszinten).
- A TSH kezelés hatásainak vizsgálata izolált humán szőrtüszők biológiai folyamataira *in vitro* (hossznövekedés, proliferáló és apoptotizáló sejtek aránya, anagén-katagén átmenet, pigmentáció).
- A TSH receptorhoz kapcsolódó jelátviteli folyamatok azonosítása izolált humán szőrtüszőkön és szőrtüsző eredetű DP fibroblastokon *in vitro* (cAMP felszabadulás vizsgálata, TSH receptor aktiváció célgénjeinek azonosítása).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése, hisztomorfometriai vizsgálatok

A funkcionális kísérleteink alapjául szolgáló szőrtüszőket plasztikai sebészeti operációk során visszamaradt, halánték (női) és tarkó (férfi) tájról származó hajas fejbőrből izoláltuk. A telogén fázisú szőrtüszők vizsgálatára gluteális területről származó bőrmintát használtunk. A mintákat a WHO Helsinki Deklarációjának megfelelően használtuk fel. A hajas fejbőrt elsőként kb. 0,5x1 cm-es szeletekre vágtuk, a bőr felszínével párhuzamosan elmetsettük, majd az epidermiszt és a dermiszt eltávolítottuk, és a szőrtüszőket csipesz segítségével kiemeltük a szubkutiszból. Ezt követően az ép, anagén VI növekedési fázisban levő szőrtüszőket hármassával 24-lyukú tenyésztőedénybe

helyeztük. A follikulusok tenyésztését 9 napon keresztül 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában végeztük. A fenntartás során alkalmazott Williams' E tenyésztőoldatot 2 mM L-glutaminnal, 10 ng/ml hidrokortizonnal, 10 µg/ml inzulinnal valamint penicillinnel és streptomocinnal egészítettük ki. A tenyésztés végén a szőrtüszőket fagyasztó médiumba ágyasztuk, majd Cryotome-mal metszeteket készítettünk belőlük. A hajciklus különböző stádiumainak elkülönítésére hematoxin-eozin festést követően, hisztomorfometriai analízist alkalmaztunk. A melanin-tartalom láthatóvá tételére a Fontana-Masson szövettani eljárást alkalmaztuk.

Proliferáló és apoptotizáló sejtek együttes kimutatása a szőrtüszőben

A tenyésztett szőrtüszőkön a proliferáló és az apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására a Ki-67/TUNEL kettős festést használtuk. Az eljárás során az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker fluoreszcens immunhisztokémiai kimutatása ad felvilágosítást, az apoptotizáló sejtek megjelenítése pedig a DNS-fragmentáció során keletkezett szabad 3' végek jelölésén alapul.

Külső gyökérhüvely (ORS) és HaCaT keratinocyták tenyésztése

Az ORS keratinocytákat anagén VI follikulusokból nyertük, melyeket egy csipesz segítségével a szemöldök területéről távolítottunk el. Az eltávolított szőrtüszőket PBS-ben mostuk, majd egy órán át 0,1% tripszin-0,2% EDTA oldatban emésztettük. Az emésztést követően nyert ORS sejteket 0,4 µg/ml mitomycin-C oldattal előkezelt, osztódásában gátolt humán dermális fibroblast (HDF) tápláló sejtrétegre szélesztettük. A tenyésztés megfelelően kiegészített Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatok 1:3 arányú keverékében történt: 10% Fetal Clone II, 0,1 nM koleratoxin, 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 2,43 µg/ml adenin, 2 nM T3, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 1 mM aszkorbil-2-foszfát valamint penicillin-streptomycin.

A HaCaT keratinocytaikat 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint és a fent említett antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban tenyésztettük.

Dermális papilla (DP) eredetű primer fibroblast tenyészet létrehozása

A DP fibroblast tenyészet kialakításához frissen izolált anagén VI szőrtüszőket alkalmaztunk. Az eljárás során az izolált szőrtüszőt hossz tengelyével párhuzamosan tartva a CTS proximális végét szikével átvágtuk. Az így szabaddá vált DP-t petricsészékben gyűjtöttük, és megfelelő tenyésztőmédiumban (follikuláris DP sejt médium kiegészítve: 4% FBS, 5 µg/ml inzulin, 1 ng/ml fibroblast növekedési faktor) tartottuk, míg a DP fibroblast sejtek kinőttek a DP-ből.

Szemi-kvantitatív reverztranszkriptáz PCR (RT-PCR) és termék szekvencia analízis

Első lépésként teljes RNS frakciót izoláltunk tenyésztett szőrtüszőkből RNeasy Kit segítségével, majd az izolált RNS frakció 0,5 µg-jának reverz transzkripcióját hajtottuk végre SuperScript reverz transzkriptáz segítségével a gyártó leírásának megfelelően. Az így kapott cDNS-t használtuk fel a polimeráz láncreakciók (PCR) templátjaként a TSH receptor, a tireoglobulin (TG), a pajzsmirigy-transzkripció faktor 1 (TTF-1) és a belső kontrollként alkalmazott glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) és 18S riboszómális RNS-t esetében. A PCR termékeket etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélen választottuk el, majd a lefotózott sávokat ImageJ szoftver segítségével elemeztük.

A TG cDNS amplifikációjának specificitását olvadási görbe analízissel, Light Cycler segítségével vizsgáltuk. Emellett elvégeztük a TG cDNS szekvencia elemzését is 377 DNA szekvencia analízáló készülékkel.

Microarray analízis

A Microarray alapú génexpresszió analízishez két donortól származó szőrtüsző minták kerültek felhasználásra Human Whole Genome Oligo Microarray® (44K) chip-en. A vizsgálatot a Miltenyi Biotech GmbH végezte. A mindkét egyénben megfigyelhető, azonos irányú, minimum 1,5-szeres változásokat ($p < 0,0001$ esetében) tekintettük szignifikáns expresszió-változásnak.

RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív PCR (q-PCR)

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagens felhasználásával izoláltuk. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk AMV reverz transzkriptázt és random primert felhasználva. Az így előállított cDNS-ből q-PCR segítségével TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol alapján mutattuk ki a következőkben felsorolt transzkripteket TaqMan primerek és próbák alkalmazásával: TRPV3, kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), glutation peroxidáz 3 (GPX3), izom típusú piruvát kináz 2 (PKM2), citokróm-C oxidáz 1 (MTCO1). Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), valamint ciklofilin A (PPIA) transzkriptjeit határoztuk meg.

Immunhiszto- és citokémia

Fluoreszcens immunhisztokémiai (F-IHC) illetve immunhisztokémiai (F-ICC) módszereket alkalmaztunk a TRPV3, a keratin 7 (KRT7), a fibroblast marker CD90 és az MTCO1 kimutatására (1. táblázat). A TSH receptor, a simaizom alfa-aktin (ACTA2), az MTCO1 és KRT5 proteinek immunhisztokémiai kimutatásához peroxidáz alapú avidin-biotin-komplexet (ABC) alkalmaztunk (1. táblázat). Az izolált szőrtüszők TSH kezelés hatására megfigyelhető TSH receptor expresszióváltozás kimutatásához pedig tiramid szubsztrát amplifikációs (TSA) módszert alkalmaztunk (1. táblázat). Az immunfestésekről

Nikon Eclipse E600 fluoreszcens és Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal készültek a felvételek.

Western blot

A sejteket lízis pufferben arattuk le, majd jégen ultrahangos sejtfeltárást végeztünk. Ezt követően meghatároztuk a lizátumok proteintartalmát, majd a minta denaturálását követően azonos mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Ezt követően a gélből a proteint nitrocellulóz membránra transzferáltuk, és a membrán blokkolását követően a fent említett TRPV3 ellenes antitesttel majd egy torna peroxidázzal-konjugált nyúl ellenes másodlagos antitesttel inkubáltuk. Végül ECL kemilumineszcens szubsztrát segítségével kapott jeleket Kodak Gel Logic 1500 képalkotó rendszer alkalmazásával detektáltuk.

<i>Célfehérje</i>	<i>Eredet</i>	<i>Faj</i>	<i>Hígítás</i>	<i>Módszer</i>
ACTA2	Sigma-Aldrich,	Egér	1:50	ABC
CD90	Dianova	Egér	1:100	F-ICC
KRT5	PROGEN	Tengerimalac	1:500	ABC
KRT7	Novus Biologicals	Egér	1:100	F-ICC
Ki-67	DAKO	Egér	1:20	F-IHC
MTCO1	Mitosciences	Egér	1:50, 1:50	ABC, F-ICC
TRPV3	Abcam	Nyúl	1:200	F-IHC, F-ICC
TSH receptor	InVivo BioTech Services	Egér	1:200, 1:1000, 1: 100, 1:100	ABC, TSA, F-IHC, F-ICC

1. táblázat: Az immunjelölések során felhasznált elsődleges antitestek

Alkamazott módszerek rövidítései: ABC: avidin-biotin komplex, F-ICC: fluoreszcens immuncitokémia F-IHC: fluoreszcens immunhisztokémia, TSA: tiramid szubsztrát amplifikáció.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) meghatározása

Az ORS keratinocita sejteket 20.000 sejt/lyuk sűrűségben osztódásukban gátolt HDF (900 sejt/lyuk) táplálórétegre szélesztettük 96-lyukú fekete falú, átlátszó aljú edényekbe, majd a letapadt sejteket másnap 2 μ M Fluo-4 AM-rel töltöttük (probenecidet és albumint tartalmazó Hank oldatban). A sejtek Ca^{2+} -jelét FlexStation II³⁸⁴ fluoreszcens mikroplate reader segítségével mértük (λ_{EX} : 480 nm, λ_{EM} : 520 nm).

Patch-clamp mérés

A patch-clamp mérésekhez az ORS keratinocytákat vékony fedőlemezre szélesztettük. A mérésekhez Multiclamp-700A típusú erősítőt használtunk teljes-sejtes konfigurációban. A 2-4 M Ω ellenállású boroszilikát pipettákat K-aszpartátos belső oldattal (pH 7,2) töltöttük fel. A fedőlemezeket normál ringer oldattal (pH 7,4) perfundáltuk. Minden sejt esetében a mért ionáramokat az adott sejt kapacitására normalizáltuk. Az elektromos jeleket 10 kHz frekvenciával rögzítettük (Digidata 1322A), majd az elemzést pClamp 9.0 szoftver segítségével hajtottuk végre.

Az életképesség meghatározása

A sejtek növekedését CyQuant sejtproliferációs kit segítségével a sejtek DNS tartalmának mérésével határoztuk meg. Az ORS keratinocita sejteket 10.000 sejt/lyuk sűrűségben osztódásukban gátolt HDF (900 sejt/lyuk) táplálórétegre szélesztettük, majd 72 órán keresztül tenyésztettük és kezeltük. A mérés napján a sejteket lizáltuk, és CyQuant festékkel 5 percig inkubáltuk. A festék fluoreszcenciáját FlexStation II³⁸⁴ segítségével mértük (λ_{EX} : 480 nm, λ_{EM} : 520 nm).

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legelső markere, amit MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit-tel vizsgáltuk. Az ORS

keratinocytákat a fent említett módon tenyésztettük és kezeltük. A felülúszók leszívása után a sejteket a gyártó utasításai szerint hígított DiIC₁(5) munkareagenssel inkubáltuk, majd a fluoreszcenciát FlexStation II³⁸⁴ segítségével mértük (λ_{EX} : 630 nm, λ_{EM} : 670 nm).

A citotoxicitás vizsgálata

A sejtmembránt károsító citotoxikus folyamatok nyomon követésére SYTOX Green fluoreszcens festéket alkalmaztunk, amely csak a sérült membránú sejtekben képes bejutni és azok DNS-éhez kötődve fluoreszkálni. Ehhez a sejteket a fent említett módon tenyésztettük és kezeltük, majd 1 μM SYTOX Green festékkal inkubáltuk, és a fluoreszcenciát FlexStation II³⁸⁴ segítségével mértük (λ_{EX} : 480 nm, λ_{EM} : 520 nm).

RNS interferencia (RNSi)

Az ORS keratinocytákat TRPV3-specifikus kis interferáló RNS-sel (siRNS) Neon Transzfekciós Kit segítségével transzfektáltuk. Az RNSi mediált géncsendesítés hatékonyságát négy napig naponta ellenőriztük Western blot és Ca^{2+} -imaging technikákkal. Két siRNS oligonukleotid esetében a TRPV3 géncsendesítés hatékonysága több mint 70% volt a transzfekciót követő 2. napon és az azt követő két napban is, ezért kísérleteinket a transzfekciót követő 2. napon végeztük el.

cAMP szint meghatározása felülúszóból

A cAMP szint meghatározáshoz a szőrtüszőket, valamint a DP fibroblastok tenyészetek felülúszójából kvantitatív cAMP-szint mérést végeztünk kompetitív ELISA segítségével a gyártó leírásának megfelelően.

Statisztikai elemzések

Mérési eredményeinket átlag $\pm$ SE formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szint mellett kétmintás párosítatlan t-próbát

(patch-clamp mérések esetében párosított t-próba) alkalmaztunk. A 7. és 17.A ábrák esetében egyutas varianciaanalízist és Dunnett-tesztet is végeztünk.

EREDMÉNYEK

A TRPV3 kifejeződik humán szőrtüszőkben és primer külső gyökérhüvely (ORS) keratinocyta tenyészetben

Korábbi irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy a TRPV3 expresszálódik a humán bőr interfollikuláris epidermális keratinocytaiban. Jelen kísérleteink során először meg kívántuk határozni a TRPV3 kifejeződését rutin plasztikai műtétekből származó, egészséges fejbőrből izolált, humán szőrtüszőkön. Immunhisztokémiai technikával kimutattuk, hogy a TRPV3 fehérje expresszálódik az anagén VI fázisban levő szőrtüszőkön; jelenléte elsősorban az ORS, valamint kismértékben a mátrix keratinocyta rétegére korlátozódik. Ezen megfigyelésekkel összhangban jelentős TRPV3 immunreaktivitást figyeltünk meg KRT7 pozitív ORS keratinocyta primer tenyészetén mind immuncitokémia, mind Western blot technikákat alkalmazva.

Frissen izolált szőrtüszőkből és ORS keratinocyta tenyészetből kivont RNS mintákon q-PCR vizsgálatokat végeztünk a TRPV3 transzkriptek intraepiteliális jelenlétének ellenőrzése érdekében. A TRPV3 specifikus mRNS szakaszok egyértelműen azonosíthatóak voltak egészséges fejbőrből származó szőrtüszőkben, valamint szőrtüsző eredetű ORS keratinocytaiban.

Ezen kísérleteink további fontos eredménye az volt, hogy a TRPV3 immunreaktivitás és a specifikus mRNS nem volt kimutatható a szőrtüsző mezenhimális eredetű DP fibroblastjaiból, valamint az ORS keratinocyta tenyésztése során tápláló réteggént alkalmazott HDF-ből.

A TRPV3 stimuláció gátolja a hajszál hossznövekedését, a haj mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózis-vezérelt korai regressziót okoz

Miután igazoltuk a TRPV3 jelenlétét humán szőrtüszőben, a fehérje aktiváció funkcionális következményeinek megismerése érdekében a fiziológiás körülményekhez legközelebb álló modellen, emberi fejbőrből izolált anagén VI fázisú szőrtüsző-szervkultúrán vizsgáltuk a TRPV3 agonisták hatásait *in vitro*. A nyolc napon át tartó kezelés során naponta mértük a hajszál hossznövekedését mind a kontroll, mind a kezelt csoportokban, majd a mért adatokból növekedési görbét készítettünk. Megállapítottuk, hogy a növényi eredetű hatóanyagok, mint például az eugenol, thymol, carvacrol és a szintetikus agonista 2-APB idő- és dóziszfüggő módon jelentősen gátolták a hajszál hossznövekedését.

A továbbiakban megvizsgáltuk a TRPV3 aktiváció hatását a szőrtüszők alapvető biológiai folyamataira. A kontroll és a kezelt csoportokból származó follikulusokból metszeteket készítettünk, majd a proliferáló sejtek kimutatására Ki-67 festést, az apoptotikus folyamatok láthatóvá tételére pedig TUNEL reakciót alkalmaztunk. A kapott eredmények összhangban álltak a korábban megfigyelt hajnövekedést gátló hatással: az öt napig kezelt szőrtüsző szervkultúrában a korábban is alkalmazott növényi eredetű és szintetikus TRPV3 aktivátorok szignifikánsan csökkentették a Ki-67 pozitív keratinocyták arányát az anagén szőrtüsző bulbusában. Fontos megemlíteni azt is, hogy a fenti szerek jelentősen megnövelték a TUNEL pozitív keratinocyták számát is, ami a TRPV3 stimuláció okozta apoptózis beindulására utal.

A TRPV3 agonisták hajciklusra kifejtett hatásának megismerésére a szőrtüszők anagén-katagén átmenetét vizsgáltuk. Míg a kontroll szőrtüszők túlnyomó többsége (>80%) 8 nap után is anagén VI fázisban volt, az eugenol és 2-APB kezelt szőrtüszők 60–100%-a lépett katagén stádiumba. Meg kell jegyezni azonban azt is, hogy ezek a TRPV3 agonisták jórészt csak korai katagén transzformációt voltak képesek indukálni; nagyon ritkán fordult elő,

hogy a szőrtüszők késői katagén regresszió mentek keresztül ezen szerek alkalmazását követően.

A TRPV3 Ca^{2+} -csatornaként működik az ORS keratinocytákban

Bár a fenti adatok a TRPV3 „aktív” kifejeződésre utalnak a humán szőrtüsző keratinocytáiban, tovább kívántuk elemezni a TRPV3 csatorna funkcionalitását. Ehhez sejtelettani kísérleteket végeztünk primer humán ORS keratinocytákon, amelyek, mint már korábban említettük, mind mRNS, mind fehérje szinten kifejezik a TRPV3 csatornát. FLIPR alapú Ca^{2+} -imaging technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy a TRPV3 agonisták jelentősen és dóziszfüggő módon megemelték a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját. Ezen felül az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ lecsökkentése (1,8 mM-ról 0,02 mM-ra), továbbá a nem-szelektív TRP csatorna blokkoló ruténium vörös 10 μM -jának együttes alkalmazása szinte teljesen megakadályozta a TRPV3 agonisták $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -szint növelő hatását.

A csatorna funkció további vizsgálatára patch-clamp technika teljes sejt konfigurációját rámpa protokollal alkalmaztuk. Kontroll esetben, azaz a vivőanyag-kezelt ORS keratinocytákon kifelé egyenirányító áramot mértünk $-12,6 \pm 1,5$ mV (átlag $\pm$ SE, $n=7$) reverz potenciállal. Ezután áramméréseket végeztünk a rámpa protokoll négy pontján (-90 , -40 , $+40$ és $+90$ mV), majd az adatokat minden esetben normalizáltuk az aktuális sejtmembrán kapacitásra (rendre $-9,5 \pm 2,5$, $-3,5 \pm 1,0$, $6,2 \pm 1,0$ és $15,9 \pm 3,5$ pA/pF) (az összes adat átlag $\pm$ SE értékek).

A 100 μM 2-APB kezelés jelentősen és szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövelte mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat, amely hatás reverzibilisnek adódott. 2-APB jelenlétében a -90 , -40 , $+40$ és $+90$ mV-nál mért áramok a következőknek adódtak: $-31,9 \pm 14,2$, $-13,8 \pm 6,4$, $17,3 \pm 6,1$ és $57,7 \pm 16,6$ pA/pF (átlag $\pm$ SE, $n=7$). A TRPV3 aktivátor 2-APB átlagosan mintegy háromszorosára növelte mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat a vizsgált feszültségek mindegyikénél.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az emberi szőrtüsző eredetű ORS keratinocyták valóban funkcionális TRPV3 csatornával rendelkeznek, amely Ca^{2+} -permeabilis kationcsatornaként működik a sejtek felszínén.

A TRPV3-aktiváció gátolja a proliferációt és sejthalált indukál tenyésztett ORS keratinocytákban

Mivel humán szőrtüsző szervkultúrában a TRPV3 stimulálása gátolta a hajszál növekedését, és az intrafollikuláris proliferációt valamint apoptózist indukált, a következő vizsgálatunk a TRPV3 aktiváció sejtnövekedésre és túlélésre kifejtett hatásainak feltérképezésére irányultak ORS keratinocytákban. Az eddigi adatokkal jó összhangban az eugenol és a 2-APB dózisfüggő módon csökkentették az ORS keratinocyták proliferációját jelző DNS szintézist (CyQuant assay). Ezen túlmenően, a TRPV3 aktiváció jelentősen lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált, ami az apoptózis egyik legkorábbi markerének tekinthető. Végül, a legmagasabb koncentrációban alkalmazott anyagok szignifikánsan megnövelték a SYTOX Green felhalmozódását, ami érzékeny mutatója a nekrotikus, citotoxikus folyamatoknak.

Bebizonyosodott mindemellett az is, hogy a TRPV3 aktivátorok növekedésgátló és sejthalált okozó tevékenységét jelentősen gátolta a tenyésztőmédium Ca^{2+} tartalmának lecsökkentése (1,8 mM-ról 0,02 mM-ra), valamint 10 μM ruténium vörös együttes alkalmazása. Ezen jelenségek alátámasztják azt a feltevést, miszerint az ORS keratinocytákon megfigyelhető celluláris folyamatok a sejtfelszíni TRPV3 ioncsatornák megnyitását követő Ca^{2+} -beáramlásnak köszönhetőek.

Annak érdekében, hogy a felsorolt celluláris válaszok TRPV3 specificitásáról meggyőződjünk, RNSi technikát alkalmaztunk. Tökéletes összhangban a fenti adatokkal megállapítottuk, hogy a TRPV3 lecsendesítése jelentős mértékben kivédte az eugenol és a 2-APB növekedést gátló és

apoptózist indukáló hatását, ami egyértelműen igazolja a TRPV3 specifikus szerepét az ORS keratinocyták biológiai folyamataiban.

A TSH receptor mRNS és fehérje szinten egyaránt kifejeződik az emberi fejbőr és a szőrtüsző mezenhimális területein

A következőkben a TSH receptorral kapcsolatos vizsgálatok eredményeit mutatjuk be. RT-PCR és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon a normál emberi fejbőr és a szőrtüszők expresszálják-e a TSH receptort mRNS és fehérje szinten *in situ*. Sikeresen bizonyítottuk a TSH receptor specifikus transzkript jelenlétét az emberi fejbőrből frissen izolált anagén VI follikulusokban. Az említett transzkripteknek megfelelően TSH receptor specifikus immunreaktivitást is tapasztaltunk az emberi fejbőrben és függelékeiben, jobbra a piloszebáceus egység mezenhimális területein (pl. a DP, a CTS, valamint a szőrszál egyenesítő izom). Az anagén VI szőrtüszőkhöz hasonló intenzitású TSH receptor festődés túlnyomórészt a mezenhimális elemeken volt megfigyelhető (DP, CTS). Emellett a gluteális régióból származó telogén mintákon néhány TSH receptor-pozitív sejt a szőrtüsző hámlójában is megfigyelhető volt.

Ezen túlmenően, a bőr nagy idegkötegei, az erek, a verejték és a faggyúmirigyek körüli mioepitél sejtek is TSH receptor immunpozitivitást mutattak *in situ*.

A TSH kezelés nem befolyásolja jelentősen az emberi hajszál növekedését, a proliferáló és apoptotizáló sejtek arányát, valamint a pigmentációt

A TSH közvetlen, funkcionális hatásainak tanulmányozása érdekében a szőrtüszők klasszikus haj-biológiai paramétereit vizsgáltuk kontroll és 1-100 mIU/ml TSH kezelt izolált anagén VI szőrtüsző szövettenyésztésében. Az alkalmazott TSH koncentrációk egyike sem befolyásolta a hajszál hossznövekedését, és a haj mátrix keratinocyták proliferációját, valamint nem változott jelentősen az apoptotizáló sejtek aránya sem. Az eddigiekhez

hasonlóan, a TSH nem volt hatással az anagén és katagén szőrtüszők arányára, azaz nem befolyásolta közvetlenül az emberi hajciklust *in vitro*. Emellett a TSH nem változtatta meg jelentősen az intrafollikuláris melanintermelést sem, amit Masson-Fontana hisztokémiai festés alapján állapítottunk meg.

A TSH alkalmazása serkenti a cAMP-szint emelkedést okoz

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a TSH receptor nagy affinitású ligandjának bekötődése okoz-e bármilyen változást a cAMP, mint másodlagos hírvivő szintjében, hiszen a TSH receptor aktiválódást klasszikusan cAMP szint emelkedés követi. Eredményeink szerint a TSH-kezelést követően a médiumban megjelenő cAMP szintje háromszor magasabb volt, mint az oldószer-kontroll szőrtüszők esetében.

Az emberi szőrtüszők TSH kezelése nem indukál mérhető pajzsmirigyhormon szekréciót, de serkenti a klasszikus TSH célgének átírását

Ezután megvizsgáltuk, hogy a TSH receptor-kapcsolt jelátviteli útvonal aktivációja megváltoztatja-e a klasszikus TSH célgének transzkripcióját. Kísérleteink során nem tudtuk kimutatni a pajzsmirigy-hormon termelés egyik legfontosabb enzimét a pajzsmirigy peroxidázt, sem mRNS, sem fehérje szinten. Egyúttal nincs bizonyíték arra sem, hogy az emberi fejbőr follikulus szervkultúra felülúszójában megtalálható lenne mérhető mennyiségű pajzsmirigyhormon.

Továbbá jelen kísérleteinkben mind frissen izolált szőrtüszőből, mind oldószer-kezelt kontroll szőrtüsző tenyészetből nyert RNS mintában kimutattuk a tireoglobulin (TG) mRNS transzkript jelenlétét. Kimutattuk azt is, hogy a TSH stimuláció ugyancsak képes volt a TG transzkriptek kiindulási szintjének megemelésére izolált szőrtüsző tenyészetben. Az említett szőrtüsző mintákban kimutathatóak voltak a pajzsmirigy-transzkripció faktor 1 (TTF-1) specifikus transzkriptjei is, amelyek egyensúlyi mRNS szintjei megemelkedtek TSH kezelés hatására.

TSH stimuláció megváltoztatja az emberi szőrtüszők génexpressziós mintázatát

Annak érdekében, hogy a TSH receptor funkcionalitásáról és korábban ismeretlen TSH stimulációt követő pajzsmirigyen kívüli célgének kifejeződéséről további információkat szerezzünk DNS Microarray vizsgálatot végeztünk kontroll és TSH kezelt mintákon. Szigorú kiválasztási szempontok alapján egy down- és tizenkét upregulált gént azonosítottunk: savas hajkeratin-1 (KRTHa1), keratin 5 (KRT5), involukrin (IVL), keratin-kapcsolt fehérje (KRTAP) 4-4, KRTAP 4-7, KRTAP 4-14, alfa-aktin 2 (ACTA2), fibronectin 1 (FN1), filamin A α (FLNA), kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), glutation peroxidáz 3 (GPX3), piruvát kináz (PKM2), citokróm-C oxidáz 1 (MTCO1).

Kvantitatív PCR technikával tudtuk igazolni, hogy a TSH kezelés képes upregulálni a CTGF transzkripciót, míg a GPX3 és PKM2 transzkripció szintje változatlan maradt. Az MTCO1, ACTA és KRT5 esetében a kvantitatív immunhisztomorfometria egyértelműen megerősítette a megváltozott fehérje expressziót *in situ*. Mindemellett az izolált emberi szőrtüszők TSH stimulációját követően az MTCO1 upreguláció a szőrtüsző több területén megfigyelhető volt. Ezen túlmenően az ACTA intenzív immunhisztokémiai festést mutatott humán CTS fibroblastokon *in vitro*, ami tovább emelkedett TSH stimuláció hatására. Emellett a TSH kezelés jelentősen megemelte a KRT5-immunfestődést a hajszál mátrix keratinocytáinak rétegében. Mindezen kísérleti adatok egyértelműen azt mutatják, hogy az egészséges emberi fejbőr follikulusaiban kifejeződő TSH receptor funkcionálisan aktív.

A tenyésztett emberi DP fibroblastok közvetlen célpontjai a TSH receptor-közvetített jelátvitelnek

Mivel minden eddigi leírt TSH-hatás egy összetett miniszerv-modellben vizsgáltuk, ami különböző eredetű és a funkciójú sejtpopulációkból épül fel, ezért a továbbiakban primer humán DP fibroblast sejtkultúrát alkalmaztunk. A CD90 fibroblast marker immunreaktivitást mutató tenyésztett DP fibroblastokon

TSH receptor-specifikus immunreaktivitást találtunk konfokális mikroszkóp segítségével. Kimutattuk azt is, hogy a TSH-kezelés szignifikánsan és dózisfüggő módon megnövelte a fibroblast sejtek tápoldatba történő cAMP szekrécióját. Hasonlóan a szőrtüsző kultúrákhoz, a DP fibroblastok TSH kezelése jelentősen és dózisfüggően upregulálta bizonyos mRNS transzkriptek szintjét (PKM2, GPX3 és CTGF). A MTCO1 upregulációját immunfluoreszcens jelöléssel is ellenőriztük.

MEGBESZÉLÉS

A TRPV3 szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

Bizonyos rágsáló törzseken (DS-*Nh* egér és WBN/Kob-*Ht* patkány) végzett vizsgálatok során fény derült arra, hogy a kialakuló szőrtelen fenotípus megjelenéséért felelős mutáció a *trpv3* gén kódoló régióját érinti. A DS-*Nh* egereken végzett további vizsgálatok rámutattak a TRPV3 egerek bőrében betöltött funkciójának fontosságára. Egyrészt bebizonyosodott, hogy a TRPV3 megfelelő működése elengedhetetlen a szőrtüszők normál fejlődéséhez, másrészt az említett csupasz egértörzsben erőteljes viszketéssel járó spontán dermatitis alakult ki.

A rágsálókon végzett kísérletekből bebizonyosodott, hogy a mutációnak köszönhetően folyamatosan aktív TRPV3 gátolta a szőrnövekedést. Arra nézve viszont nem voltak adataink, hogy a TRPV3 megtalálható-e humán follikulusokon, illetve milyen szerepet játszik a humán hajciklus szabályozásában. Ezen kérdések sarkalltak minket arra, hogy vizsgálatokat végezzünk a TRPV3 expresszió feltérképezésére izolált humán szőrtüszőkön, illetve hogy kiderítsük milyen funkcionális szereppel bírnak a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában.

Korábbi irodalmi adatok alapján ismeretes volt, hogy a TRPV3 expresszálódik humán epidermális keratinocytaikon, de magán a humán follikuluson még nem mutatták ki a jelenlétét. A TRP csatornák szerepének

jellemzése az emberi bőr fiziológiás és patológiás folyamataiban korántsem mondható kielégítőnek. Ezen molekulák nem-neuronális sejtek és szövetek szabályozási mechanizmusaiban betöltött szerepének feltárása napjainkban is zajlik. Ebben az összefüggésben jelen kísérleteink szolgáltatták az első bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a TRPV3 – azáltal, hogy visszaszorítja a szőrtüsző keratinocyták proliferációját és apoptózis-vezérelt katagén regressziót indukál – gátolja az emberi haj növekedését *in vitro*. Tekintettel arra, hogy ezek a hatások egy olyan elfogadott emberi szervtenyészet modellen jöttek létre, mely lehetővé teszi a szőrtüszők alapvető funkcióinak kvázi *in vivo* vizsgálatát, jelen megállapításaink élettanilag és klinikailag egyaránt relevánsnak tekinthetők. Ezért elmondhatjuk, hogy a bemutatott eredmények alapján a TRPV3 a humán hajnövekedés és hajciklus újonnan megismert szabályozó molekulája, ami tökéletesen összhangban áll az egér modelleken nyert korábbi adatokkal.

A TRPV3 funkcionális jelenlétét az emberi szőrtüsző epiteliális területein számos, primer ORS keratinocytá tenyészet vizsgálatából nyert bizonyítékkal támasztottuk alá; úgy mint FLIPR alapú Ca^{2+} -imaging, patch-clamp mérések valamint életképesség és sejthalál vizsgálatok. Emellett a TRPV3 aktivátorokkal kiváltott ionáramok és az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ emelkedés gátolhatók voltak az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ lecsökkentésével, vagy az általános TRP csatorna blokkoló ruténium vörös együttes alkalmazásával. A TRPV3 funkcionális szerepét meggyőzően támasztották alá az siRNS mediált géncsendesítést követő vizsgálataink is, amelynek során sikeresen gátoltuk a TRPV3 aktivátorok celluláris hatásait (pl. proliferáció gátlás, apoptózis indukció). Mindent összevetve, ezen adatok amellet érvelnek, hogy létezik egy olyan jelátviteli útvonal emberi szőrtüszőben, amelyet a TRPV3 csatorna megnyitásával Ca^{2+} beáramlás idéz elő a sejtbe, ami megakadályozza az ORS keratinocyták proliferációját és apoptózist indukálva gátolja a szőrnövekedést.

Korábban a TRPV3 funkcionális kifejeződését nagyrészt egér epidermális keratinocytákon írták le; sőt, TRPV3-specifikus hő- és farmakológiai ingerekkel

aktivált membránáramokat és $[Ca^{2+}]_{IC}$ emelkedést is tapasztaltak ezekben a sejtekben. Ezen túlmenően a keratinocytákon a TRPV3 aktivációja különböző mediátorok felszabadításához vezetett (pl. IL-1 α , prosztaglandin E2, ATP), amelyek fájdalom és/vagy viszketés érzékeny szenzoros afferensek "intercelluláris hírvivői". Mivel ezen mediátorok gyulladáskeltő hatása ismert a bőrben is, így a keratinocytákon kifejeződő TRPV3 csatorna szerepet játszhat a bőr gyulladásos folyamataiban. Valójában a *trpv3* gén "*gain-of-function*" mutációja epidermális keratinocitákban történő overexpressziója nem csak a viszketést, de súlyos bőrgyulladást is okoz DS-*Nh* egerekben. Emellett a mi előzetes adataink arra utalnak, hogy a TRPV3 aktivációja jelentősen csökkenti a humán epidermális keratinocyták növekedését (előkészületben). Ezen megállapítások, valamint jelen eredményeink hangsúlyozzák a TRPV3 csatorna és a hozzá kötődő (mindeddig meghatározatlan) endogén ligandok, valamint a kapcsolódó jelátviteli mechanizmusok élettani és kórélettani jelentőségét az emberi haj- illetve egér szőrnövekedés szabályozásában.

Összegezve kísérleteink eredményeit azt a megállapítást tehetjük, hogy az izolált humán szőrtüszőkben jelenlévő TRPV3 fontos szereppel bír a szőrnövekedés és a hajciklus szabályozásában. A jelen munkánkban bemutatott TRPV3 aktiváció hatásosan gátolja az emberi hajszál növekedését, mely arra utal, hogy (pl. a helyileg alkalmazott) a TRPV3 agonisták (akár TRPV1 aktivátorokkal együtt alkalmazva) a nem kívánt szőrnövekedés (pl. hipertrihózis, hirsutizmus) klinikai kezelésében alkalmazható új, jól tolerálható szerek kifejlesztésére adnak lehetőséget. A lehetséges TRPV3 antagonisták jövőbeli vizsgálata mára már szintén indokolttá vált a hajhullás különböző formáinak (pl. alopecia, effluvium) kezelésében. Végezetül adataink rávilágítanak a proinflammatorikus, pruritogén és anti-proliferatív TRPV3-kapcsolt jelátviteli útvonalak szisztematikus vizsgálatának jövőbeli fontosságára olyan kórképekben, mint például a pikkelysömör, egyes dermatitiszek vagy akár bőrdaganatok kezelésében. A fentiek figyelembevételével érdemes átgondolni a

TRPV3 aktivációt és/vagy szenzitizációt okozó anyagok (pl. a kámfor) klinikai alkalmazásának lehetőségeit is.

A TSH receptor szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

Jelen munkánkban azt is be kívántuk mutatni, hogy az elsődlegesen a pajzsmirigyhormon-szintézis fokozásáért és a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely központi szabályozásáért felelős TSH számára az emberi fejbőr szőrtüszői is direkt célpontként szolgálnak. Mindez egy új, TSH receptor-mediált neuroendokrin jelátviteli útvonal azonosítására ad lehetőséget emberi bőrben. Lehetséges, hogy ezek a folyamatok állnak a közismert endokrin modulátorok emberi bőrben és szőrtüszőben kifejtett hatásainak hátterében.

A hipotireoid betegeknél megfigyelhető szőrnövekedés változások nagyobb valószínűséggel pajzsmirigyhormon-hatás eredményei, hiszen a (kísérletesen) megemelt TSH szint közvetlenül nem mutatott szignifikáns hatást az emberi hajszálnövekedésre, hajciklusra és a haj mátrix keratinocytáinak proliferációjára izolált szőrtüsző szervkultúrában. Ezt az elképzelést az a nemrégiben bemutatott cikk is alátámasztja, mely szerint a pajzsmirigy hormonok befolyásolják az anagén fázis hosszát szőrtüsző szervkultúrában.

Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a TSH receptor kifejeződése kizárólag a fejbőr szőrtüszőinek mezenhimájában volt megfigyelhető, míg a normál emberi fej és gluteális bőr interfollikularis dermális fibroblastjai nem mutattak a TSH receptorra jellemző immunreaktivitást *in situ*. Mivel az emberi szőrtüsző mesenchymaja, úgy tűnik, bizonyos mértékű védelmet élvez a kilökődési reakcióval szemben, lehetséges allogén transzplantáció akár eltérő nemű páciensek esetében is. Felmerül tehát, hogy a TSH receptor ellen kialakuló autoimmunitás, valamint az ennek következtében létrejövő pajzsmirigy megbetegedések ok-okozati összefüggésben lehetnek a szőrtüsző mesenchyma említett elszigeteltségével és/vagy az immuntolerancia előzetes összeomlásával.

Az emberi haj follikulusaiban a TSH receptor szigorúan mezenhimális kifejeződése is magyarázatul szolgálhat arra, hogy a TSH stimuláció miért nem befolyásolja a szőrnövekedést, a sejt proliferációt, apoptózist és a pigmentációt, hiszen az intrafollikularis hám és a pigmenttermelő egység láthatóan nem mutat TSH receptor expressziót anagén VI és katagén fázisok alatt sem. A tény azonban az, hogy egyértelműen intraepiteliális célgénnek és/vagy géntermékek (pl. KRT5, KRTHa1) expresszióját is módosította a TSH emberi izolált szőrtüsző tenyészetben. Mindez azt sugallja, hogy a fejbőr szőrtüsző mezenhimális receptorainak stimulálása alapvetően közvetett úton befolyásolja a szőrtüsző hámsejtek működését. Így elképzelhető, hogy a szőrtüsző CTS-ében levő TSH receptorok stimulálása bizonyos diffúzibilis faktorok termelését és szekrécióját indukálja, mint például a CTGF-ét. Valószínűleg ezek a szőrtüsző mezenhimából származó faktorok a szőrtüsző epitheliumának különböző feladatait (mint például a hajkeratin termelését, ahogy azt a KRT5 és több KRTAP up-regulációja is mutatja) parakrin módon befolyásolják. Így a központi és esetleg a perifériás TSH szekréció valószínűleg képes bonyolult szabályozó hurkok aktiválására, ami például mezenhimális faktorok (mint a CTGF) toborzása révén közvetett módon modulálja a szőrtüsző hámsejtek funkcióit. Ezen epitheliális-mezenhimális kölcsönhatások valószínűleg kissé eltérőek lehetnek a kültakaró különböző területein és a hajciklus különféle szakaszaiban, amint azt emberi gluteális régióból származó telogén szőrtüszőn kapott eredményeink mutatják, ahol néhány TSH receptor-pozitív sejt megjelent a szőrtüsző epitheliumában is. Ezzel együtt nem zárhatjuk ki a TSH közvetlen hatásának lehetőségét epithemális keratinocytákon, mivel a TSH receptor kifejeződik felnőtt és újszülött keratinocytákon, valamint aktivációja cAMP szintnövekedést okoz humán keratinocytákban.

A tény, hogy a két klasszikus TSH-célgén, a TG és a TTF-1 transzkripciós szintje upregulálódott az emberi fejbőrön szőrtüszőkben TSH-kezelés után *in vitro*, újabb bizonyítékkal szolgál az intrafollikulárisan kifejeződő TSH receptor

funkcionalitására. Emellett jól illeszkedik a TSH hatására klasszikusan bekövetkező cAMP jelátviteli útvonal aktivációhoz, ami jellemzően TSH receptor mediált folyamat. Habár korábban kimutatták TG transzkriptek jelenlétét humán keratinocytá (HaCaT) és humán melanoma sejtvonalakon *in vitro*, jelenlétüket korábban soha nem észlelték normál emberi bőrben *in situ*. Így a mi megfigyeléseink szolgáltatják az első bizonyítékot a TG transzkripcióra emberi bőrben és a fejbőr follikulusaiban arra, hogy a szőrtüszők ugyanazt a transzkripciós faktort (pl. TTF-1) használják a TG upregulációhoz, amit a pajzsmirigy hámsejtjei.

Bemutattuk azt is, hogy az emberi fejbőrből származó szőrtüsző egy könnyen kezelhető, élettanilag releváns eszközként szolgálhat új, nem-klasszikus TSH célgének elemzéséhez. Ez a szokatlan, de jól tanulmányozható új modell korábban feltérképezetlen TSH funkciók megismerésének kulcsa lehet, ami jóval túlmutat a TSH-nak a bőr és a haj biológiai folyamataiban betöltött szerepének megismerésén. Emellett a génexpressziót elemezve számos olyan új TSH-célgént azonosítottunk emberi fejbőr follikulusaiban, amit korábban nem vettek figyelembe a TSH/TSH receptor biológiai összefüggéseinek vizsgálatában (pl. KRTAP, CTGF, ACTA). Több, a szőrtüszőben azonosított új TSH-célgén (CTGF, ACTA, MTCO1, és a KRT5) mRNS és/vagy a fehérje szintű expresszió változásait további páciensekből származó minták egymástól függetlenül is megerősítik (kvantitatív PCR és kvantitatív immunohisztomorfometria technikák), míg más faktorok (FLNA, IVL) expressziós változásait, amelyeket a Microarray analízis eltérőnek mutatott a két vizsgált páciensben, ilyen módon nem sikerült megerősítenünk.

Bár az említett új célgének az emberi bőr és szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött funkcionális jelentőségének megismerése további vizsgálatokat igényel, a fenti eredmények alapján már most kijelenthetjük, hogy a TSH által gyakorolt új hatások jóval túlmutatnak a klasszikusan ismert folyamatok skáláján (pl. a pajzsmirigyhormon termelés serkentése, pajzsmirigy-

növekedés, illetve a pajzsmirigy enzim termelés szabályozása). A TSH által szabályozott expressziójú FLNA például a normál kötőszöveti működés egy fontos eleme az emberi bőrben, míg a CTGF (együttműködve a „*wingless*” típusú fehérje (WNT) receptor komplexxel) modulálja a WNT jelátviteli útvonalat, a szőrtüsző morfogenezis és hajciklus egyik fő szabályozóját. A TSH hatására *in situ* megfigyelt follicularis MTCO1 upreguláció pedig felveti az elméleti lehetőségét annak, hogy a TSH akár képes lehet közvetlenül befolyásolni a szőrtüsző energia metabolismusát. Végezetül a humán DP fibroblastokon (a TSH receptor által közvetített stimuláció közvetlen célsejtjein) a TSH adagolást követően PKM2, GPX3, CTGF és MTCO1 upreguláció volt megfigyelhető. Mindez arra utal, hogy szőrtüsző DP fibroblastjaiban a TSH-jelátvitel közvetlen szerepet játszhat az anyagcsere és az oxidációs folyamatok szabályozásában.

Az viszont, hogy a TSH upregulálja a myofibroblast marker ACTA immunreaktivitását bőrben azt sugallta, hogy a TSH is képes elősegíteni a fibroblastok myofibroblastokká történő átalakulását. Ez az átalakulás jellemzően sebgyógyulás és seblezárás idején fordul elő, amikor a normál bőr fibroblastok fenotípusa simaizom fibroblastokra jellemzően megváltozik; azaz kontraktilis fehérjéket expresszálnak és megváltozik az orientációjuk is. Elképzelésünk szerint az ACTA upregulációja szőrtüsző eredetű fibroblastok mioepiteliális fenotípusúvá történő átalakulására utalhat. Mivel a folliculáris CTS is kiemelkedő szerepet játszik a sebgyógyulásban; és mivel a szőrtüsző szervkultúra létrehozása során a mikrodisszekció alkalmával a szőrtüszőt jelentős sebesülés éri, az emberi szőrtüsző szervkultúra egy nem megszokott, de tanulságos modellként szolgálhat a TSH sebgyógyulásra, hegesezésre és a bőr megújulására kifejtett hatásainak további felderítésére is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink első felében sikerrel igazoltuk a tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) protein (immunhisztokémia) és mRNS szintű (q-PCR) jelenlétét humán izolált szőrtüsző tenyészetben. Kimutattuk, hogy a különböző TRPV3 aktivátorok dóziszfüggő módon gátolták a szőrszál növekedését és lecsökkentették a proliferáló (Ki-67 nukleáris proliferációs markert kifejező) sejtek számát, valamint növelték az apoptózis (DNS-fragmentációt kimutató TUNEL reakció) intenzitását, illetve regressziós folyamatokkal jellemezhető katagén transzformációt indukáltak. ORS keratinocyták tenyészetén is sikerrel igazoltuk a TRPV3 csatorna funkcionális jelenlétét, hiszen aktivációja hatására indukált mebránáramokat, és megemelkedett Ca^{2+} -szintet mértünk, ami a sejtek proliferáció csökkenéséhez és apoptózis kialakulásához vezetett. Az ORS keratinocytákon megfigyelhető hatások TRPV3 specifikusnak adódtak, mivel a folyamatok kivédhetőnek bizonyultak TRPV3 specifikus géncsendesítés segítségével. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a humán szőrtüsző bizonyos sejtjei TRPV3 csatornával rendelkeznek, mely jelentős szerepet tölthet be a follikulus növekedésének (így a hajciklus folyamatainak) szabályozásában.

Ezek után a pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH) hatásait vizsgáltuk humán szőrtüszőben, ami az utóbbi idők kutatásai alapján egyedülállóan hormonérzékeny szövetnek bizonyult. A TSH receptor mRNS szintű jelenléte mellett a TSH receptor immunpozitivitás az emberi bőr mesenchymalis területein volt kimutatható. A TSH receptor stimulációja szőrtüsző és DP fibroblast tenyészetekben cAMP szint emelkedéséhez, valamint bizonyos klasszikus és eddig ismeretlen TSH célgének expresszió változásához vezet egyaránt. Habár a TSH emberi szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött szerepének megértéséhez további vizsgálatok szükségesek, eredményeink szerint a szőrtüsző egy új, pajzsmirigytől távoleső célpontja a TSH-nak.

Iktatószám: DEENKÉTK /44/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Borbíró István

Neptun kód: SUHT5T

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Borbíró, I.**, Lisztes, E., Tóth, I.B., Czifra, G., Oláh, A., Szöllősi, A., Szentandrassy, N., Nánási, P.P., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth.
J. Invest. Dermatol. "accepted by publisher", 2011.
IF:5.543 (2009)
2. Bodó, E., Kromminga, A., Bíró, T., **Borbíró, I.**, Gáspár, E., Zmijewski, M.A., van Beek, N., Langbein, L., Slominski, A.T., Paus, R.: Human female hair follicles are a direct, nonclassical target for thyroid-stimulating hormone.
J. Invest. Dermatol. 129 (5), 1126-1139, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.361>
IF:5.543

További Közlemények

3. Mamo, S., Kobolák, J., **Borbíró, I.**, Bíró, T., Bock, I., Dinnyés, A.: Gene targeting and Calcium handling efficiencies in mouse embryonic stem cell lines.
World J. Stem Cells. 2 (6), 127-140, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v2.i6.127>
4. Szikszai, Z., Kertész, Z., Bodnár, E., Major, I., **Borbíró, I.**, Kiss, Á.Z., Hunyadi, J.: Nuclear microprobe investigation of the penetration of ultrafine zinc oxide into intact and tape-stripped human skin.
Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater. Atoms. 268 (11-12), 2160-2163, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2010.02.040>

IF:1.156 (2009)

5. Telek, A., Bíró, T., Bodó, E., Tóth, I.B., **Borbíró, I.**, Kunos, G., Paus, R.: Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids.

FASEB J. 21 (13), 3534-3541, 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7689com>

IF:6.791

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.03.17



Idézhető előadáskivonatok

1. Páyer, E., **Borbíró, I.**, Dobrosi, N., Tóth, I.B., Szegedi, A., Bíró, T.: Transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) regulates cell growth and death of human and mouse epidermal keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 127, S62, 2007.
2. **Borbíró, I.**, Géczy, T., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Activation of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) inhibits human hair growth.
J. Invest. Dermatol. 128, S151, 2008.
3. Gáspár, E., Bodó, E., Hardenbicker, C., **Borbíró, I.**, Bíró, T., Kromminga, A., Paus, R.: Thyrotropin-releasing hormone (TRH) as a novel, potent modulator of human hair follicle pigmentation and growth: reminiscences of our amphibian past?
J. Invest. Dermatol. 129, S103, 2009.
4. **Borbíró, I.**, Lisztes, E., Ambrus, L., Tóth, B.I., Czifra, G., Kovács, L., Bíró, T.: Thermosensitive transient receptor potential vanilloid-3 ion channels regulate human keratinocyte biology.
J. Invest. Dermatol. 129, S65, 2009.