

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Vasas Nikolett

**A tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3
ioncsatorna szerepe humán epidermális keratinociták
gyulladásos folyamatainak szabályozásában**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3 ioncsatorna szerepe humán epidermális keratinociták gyulladásos folyamatainak szabályozásában

Dr. Vasas Nikolett

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
Tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád.....	8
Hőérzékeny „termo” TRP-csatornák.....	10
Tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3 ioncsatorna.....	13
A bőr anatómiája, felépítése.....	15
Az epidermisz domináns sejtípusa: a keratinocita	17
Bőrünk elsődleges védelmi rendszere: az epidermális barrier	19
Az epidermális barrier egyensúlyát érintő betegségek „prototípusa”: az atópiás dermatitisz.....	22
A TRPV3 ioncsatorna és a bőr kapcsolata	25
CÉLKITŰZÉS.....	28
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
Felhasznált anyagok.....	29
Egészséges és AD-s betegekből származó epidermális keratinociták izolálása és tenyésztése ...	29
Immunhisztokémia.....	31
Immuncitokémia	31
Génexpressziós változások vizsgálata.....	32
TRPV3 fehérje szintű kimutatása (Western blot)	33
Citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)	34
Patch-clamp vizsgálat.....	35
Intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) meghatározása	36
Életképesség meghatározása (MTT assay)	36
Sejtproliferáció vizsgálata (CyQuant assay)	37
Apoptózis vizsgálata	38

Nekrotikus folyamatok vizsgálata.....	38
TRPV3 RNS interferencia.....	39
Statisztikai analízis.....	39
EREDMÉNYEK	41
A TRPV3 kifejeződik a humán bőrben és primer epidermális keratinocita tenyészetben	41
A TRPV3 Ca^{2+} -permeábilis ioncsatornaként működik normál humán epidermális keratinocitákon	42
A TRPV3-aktiváció gátolja a proliferációt és sejthalált indukál normál humán epidermális keratinocitákon	46
A TRPV3 aktiváció erős proinflammatorikus választ vált ki.....	48
A TRPV3 indukálta proinflammatorikus hatások az NF- κ B jelátviteli útvonalat érintik	49
A TRPV3 expressziója szignifikánsan megemelkedett AD-s betegek szövet mintáiban	52
A TRPV3 molekuláris vizsgálatok során fokozott expressziót mutat AD-s betegek „epidermális szövetében”	53
A TRPV3 sejt szinten is emelkedett expressziót mutat AD-s betegek keratinocitáiban.....	55
A TRPV3 funkcionálisan is szignifikáns túlműködést mutat AD-s betegekben.....	57
MEGBESZÉLÉS.....	60
ÖSSZEFOGLALÁS.....	65
SUMMARY	66
IRODALOMJEGYZÉK.....	67
KULCSSZAVAK / KEYWORDS.....	87
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	88
FÜGGELÉK.....	89

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-APB: 2-aminoetoxidifenil borát	FBS: embrionális borjúsérum
ACTB: β -aktin	FITC: fluoreszcein-izothiociánát
AD: atópiás dermatitisz	GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
AD-HEK: AD-s beteg lézionális bőrterületéről izolált humán epidermális keratinocita	HKGS: humán keratinocita növekedési faktor
AD-L: AD-s beteg lézionális bőrterülete	Ig: immunglobulin
AD-NHEK: AD-s beteg nem-lézionális bőrterületéről izolált normál humán epidermális keratinocita	IL: interleukin
AD-NL: AD-s beteg nem-lézionális bőrterülete	MTT: metilthiazol-tetrazólium
ARD: ankyrin repeat domain	NF-κB: nukleáris faktor- κ B
ATP: adenozin-trifoszfát	NGF: neuronális növekedési faktor
BAA: bisandrographolide	NHEK: normál humán epidermális keratinocita
BCA:	NK: negatív kontroll
BSA: borjú szérum albumin	NMF: természetes hidratáltsági faktor
CaM: kalmodulin	PBS: foszfát puffer oldat
CBD: kannabidiol	PBST: Tween 20-at tartalmazó PBS
CCCP: karbonil-cianid-3-klorofenil-hidrazon	PC2: 100%-os konfluenciát követő 2. nap
CCL: kemokin ligand	PGE2: prosztaglandin E2
DAB: diamino-benzidin	PPIA: ciklofilin A
DAPI: 4',-6-diamidino-2-fenilindol	RT-qPCR: reverz transzkripciót követő kvantitatív „valós idejű” polimeráz láncreakció
DMSO: dimetil-szulfoxid	SDS: nátrium-dodecil-szulfát
DS-Nh: DS egértörzsben mutáció során kialakult szőrtelen fenotípusú egértörzs	SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
E: egészséges	SE: standard hiba
ECS: endokannabinoid rendszer	SEM: standard hiba átlaga
EDTA: etilén-diamin-tetra-ecetsav	TEWL: transzepidermális vízvesztés

TGF- β 1: transzformáló növekedési faktor- β 1

TLR: Toll-like receptor

TNF α : tumor nekrozis faktor- α

TRP: tranziens receptor potenciál

TRPV: TRP család vanilloid (alcsalád)

TSLP: thymic stromal lymphopoietin

UV: ultraviola

UVB: ultraviola B

VR: vanilloid receptor

Δ CT: küszöbciklusok különbségén alapuló
RT-qPCR értékelési módszer

BEVEZETÉS

Napjainkban nagy figyelem helyeződik esztétikai megjelenésünkre, melyen belül nagy hangsúlyt fektetünk a rendszeres bőrápolásra, ami a mindennapi rutinunk része. Ehhez a szépségipar a kozmetikumok kimeríthetetlen tárházát kínálja a felhasználóknak. A kozmetikai készítményeken feltüntetett összetevők számos jótékony hatással „kecsegtetnek” a szebb, egészségesebb bőr eléréseért. Ahhoz azonban, hogy egy bőrápoló ágens piaci forgalomba kerüljön és biztonsággal alkalmazható legyen, számtalan klinikai és molekuláris biológiai kutatás és eredmény szükséges. Manapság lehetőség van nemcsak szöveti, hanem sejt szinten is vizsgálni a különböző hatóanyagokat - milyen receptoron hatnak, hogyan befolyásolják a sejtek normál működését, ezen hatásait milyen jelátviteli útvonalon fejtik ki -, továbbá magukon a sejteken lévő receptorok feltérképezését és biológiai folyamatokban betöltött szerepét is számos molekuláris módszerrel vizsgálhatjuk. A világon számtalan kutatócsoport foglalkozik a bőr biológiájának pontos megismerésével, hiszen ez az a „szervünk”, mely közvetlenül ki van téve a környezeti ártalmaknak, ugyanakkor a bőrbetegségek esetén is a terápiás lehetőségek nem csak szisztémásan, hanem topikálisan, közvetlenül az érintett bőrterületen is alkalmazhatóak. Laboratóriumunk - részben kozmetikai cégekkel együttműködve - évek óta szerepet vállal ezen kutatásokban.

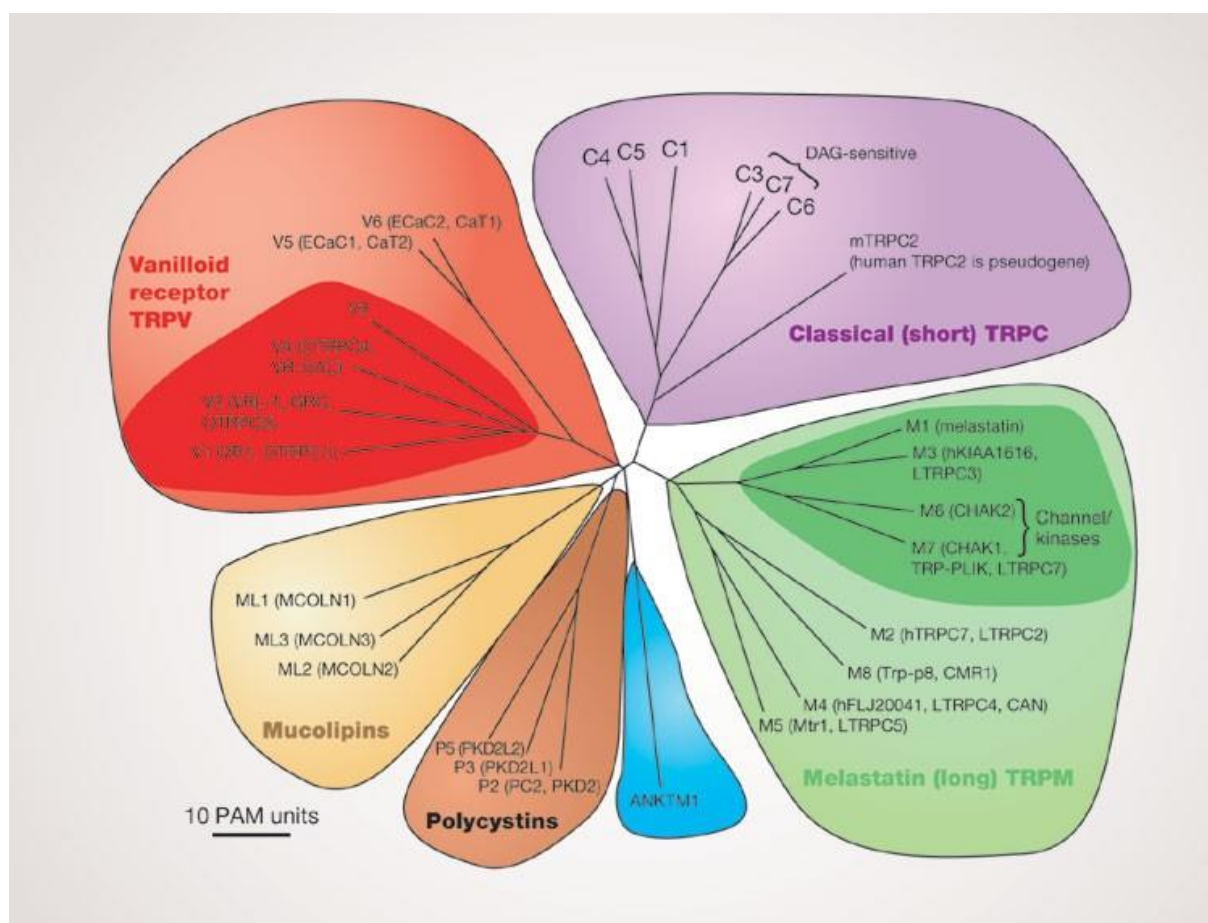
Kutatócsoportunk fő profilja az endokannabinoid rendszer (ECS) vizsgálata, mely az elmúlt évtizedek kutatásainak köszönhetően nagy mértékben kibővült. Az ECS részét képező ionotróp receptorokon belül a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák vanilloid alcsaládjának több tagját azonosítottuk a bőr számos alkotóelemén (szőrtüsző, piloszebáceus egység, keratinociták).

Az elmúlt évek kutatásainak köszönhetően kiderült, hogy bizonyos rágcslók szőrtelen fenotípusát és bőrbetegségét okozó mutáció a *Trpv3* gént kódoló régióban található, továbbá a hasonló fenotípussal és tünetekkel rendelkező Olmsted-szindrómás betegekben több más mutáció mellett ugyanezt a régiót érintő mutációk is kimutathatók. Jelen munkánk során a tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna vizsgálatát végeztük a bőr legkülső rétegét alkotó epidermális keratinocitákon. Az egészséges szöveteken, és azokból izolált keratinocitákon végzett kísérleteinket kiterjesztettük az egyik leggyakoribb bőrbetegség, az atópiás dermatitiszes (AD) betegekben származó mintákra is. Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a TRPV3 ioncsatorna milyen mértékben expresszálódik az egészséges és AD-s keratinocitákban, funkcionálisan aktív formában van-e jelen és az aktivált csatorna szerepet játszik-e a bőr gyulladásos folyamatainak kialakulásában, fenntartásában. Amennyiben a csatorna aktívan részt vesz ezen biológiai folyamatokban, úgy a TRPV3 ioncsatorna aktivációja vagy gátlása hatékony terápiás célpont lehet a gyulladásos bőrbetegségek kezelésében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád

A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna szupercsalád tagjai már több mint 30 éve adnak kutatási témát a világ számos tudományterületének. A TRP-csatornák nagyfokú homológiát mutatnak az 1989-ben elsőként Montell és Rubin által leírt *Drosophila melanogaster*-ben azonosított *trp* génnel, melyről a család a nevét is kapta (Montell és Rubin, 1989; Clapham, 2003; Clapham és mtsai., 2003). Jelenleg közel 30 féle humán TRP-csatorna ismert, melyek a szekvencia homológia analízisek alapján 6 alcsaládba oszthatók (**1. ábra**). Az alcsaládok kb. 20-35%-os génazonosságot mutatnak, míg az alcsaládokon belül akár 50-80%-os homológia is lehet (Clapham, 2003; Nilius és Owsianik, 2011).



1. ábra: Az emlős TRP receptorok családfája Clapham (2003) munkája alapján

Az evolúciós ágak hossza PAM(point accepted mutation) egységben van megadva, ami az átlagos szubsztitúciók száma 100 aminosavra vonatkoztatva (Clapham, 2003)

A TRPC „canonical” alcsalád receptorai mutatják a legnagyobb homológiát a *Drosophila* TRP-csatornákkal. A TRPV „vanilloid” alcsalád a TRPV1 receptoráról kapta a nevét. A TRPM család nevét a vele leginkább homológiát mutató melasztatin 1-ről kapta. A TRP szupercsaládhoz tartoznak továbbá a mukolipinek (TRPML) és policisztinek (TRPP), valamint az ismétlődő ankyrin-szerű doméneket nagy számban tartalmazó TRPA1 fehérje, mely a fájdalmas hideg érzékelésében vesz részt (Benham és mtsai., 2002; Clapham, 2003; Clapham és mtsai., 2003; Huamg, 2004; Pedersen és mtsai., 2005; Wu és mtsai., 2010) (**1. ábra**).

Általánosságban elmondható, hogy a TRP-csatornák 6 transzmembrán doménnel rendelkeznek (S1-S6), melyek közül az S5 és S6 között egy pórusformáló régió helyezkedik el, létrehozva egy kationpermeábilis pórust. Az intracelluláris amino-, és karboxi-terminális végek hossza változó, melyekhez különböző domének kapcsolódhatnak (Owsianik és mtsai., 2006; Gaudet, 2008a). A kapcsolódó domének száma és megoszlása eltérő a különböző TRP-alcsaládok között (Nilius és Owsianik, 2011). Gyakori a karboxi-terminális véghez kapcsolódó különböző enzim aktivitással bíró domén (Perraud és mtsai., 2001; Runnels és mtsai., 2001; Nadler és mtsai., 2001), vagy az amino-terminálishoz kapcsolódó „ankyrin repeat domain” (ARD), mely elsősorban a csatorna tetramerizációjában, valamint a ligand és más fehérjékkel való kölcsönhatásban játszik szerepet (Gaudet, 2008b). Mindemellett a terminális végekhez kapcsolódhat kalmodulin kötőhely, foszforilációs hely, lipid kötőhely, melyek a csatorna funkcióját befolyásolják. Ugyanakkor ezek a domének ritkábbak és egy alcsaládon belül sem található meg minden egyes csatornán (Owsianik és mtsai., 2006).

A TRP-csatornák szinte minden sejttípusban expresszálódnak, lokalizációjukat tekintve a külső plazmamembránban és számos sejtorganelum membránjában egyaránt megtalálhatók. Funkciójuk igen széleskörű, elengedhetetlenek számos fiziológiai folyamathoz, úgymint az érzékszervi funkciók (pl.: ízérzés, fájdalom-, illetve hőérzékelés), a homeosztatikus folyamatok

(pl.: Ca^{2+} és Mg^{2+} transzport, ozmoreguláció), vagy a motoros funkciók (pl.: izomkontrakció, vazomotor kontroll) (Gees és mtsai., 2010; Nilius és Owsianik, 2011).

Hőérzékeny „termo” TRP-csatornák

A TRP-csatornákon belül megkülönböztetünk egy 11 csatornából álló „alcsoporthoz”, ami nevét arról kapta, hogy különböző hőhatásokra aktiválódnak. Ezen ioncsatornák szinte mindegyike kifejeződik primer szomatoszenzoros neuronokon és specifikus hőmérsékleti tartományokon – a káros hőtől a fájdalmas hidegig – aktiválódnak. Ezen csatornák szöveti eloszlását, hőérzékenységet és egyéb aktivátorait az **1. táblázat** foglalja össze (Uchida és mtsai., 2017). Az elsőként leírt, „klasszikusnak” számító 6 termo TRP-csatornát a hőmérsékleten kívül számos, a természetben és az élelmiszerekben (elsősorban fűszerekben) található vegyületek is képesek aktiválni (Vay és mtsai., 2012; Uchida és mtsai., 2017).

		Hőmérsékleti küszöb	Szöveti eloszlás	Egyéb aktivátorok
Forró	TRPV1	>42 °C	Szenzoros neuron, agy bőr	Capsaicin, proton, capsate, gyömbér, shogaol, allicin, shanshool, kámfor, resiniferatoxin, vanillotoxin, 2-APB, propofol, anandamid, arachidonsav anyagcseretermékek, monoacilglicerol, NO, extracelluláris kationok
	TRPV2	>52 °C	Szenzoros neuron, agy, gerincvelő, tüdő, máj, lép, vastagbél, szív, immunocita	probenecid, 2-APB, cannabidiol, mechanikai inger
Meleg	TRPV3	>32 °C	Bőr, szenzoros neuron, agy, gerincvelő, gyomor, vastagbél	Kámfor, carvacrol, mentol, eugenol, timol, 2-APB
	TRPV4	>27-41 °C	Bőr, szenzoros neuron, agy, vese, tüdő, belső fül, húgyhólyag	4 α -PDD, bisandrografolid, citromsav, arachidonsav anyagcseretermékek, anandamide, hypozmolalitás, mechanikai inger
	TRPM2	>36 °C	Agy, immunocita, hasnyálmirigy	(ciklikus) ADPribóz, β -NAD, H_2O_2 , intracelluláris Ca^{2+}
	TRPM3	Meleg-forró	Agy, szenzoros neuron, hasnyálmirigy, szem	Ca^{2+} raktár kimerülése, pregnenolone-szulfát, nifedipine, clotrimazole
	TRPM4	Meleg	Szív, máj, immunocita, hasnyálmirigy	intracelluláris Ca^{2+}
	TRPM5	Meleg	Ízlelőbimbó, hasnyálmirigy	intracelluláris Ca^{2+}
Hideg	TRPM8	<27 °C	Szenzoros neuron	Mentol, icilin, eukaliptol
	TRPC5	Hideg	Agy, szenzoros neuron, máj, szív, vese	Gq/11 -kapcsolt receptorok, daicilglicerol, Gd^{3+}
	TRPA1	<17 °C	Szenzoros neuron, belső fül	Allil izotiocianát, carvacrol, fahéjaldehid, allicin, dialli-trisulfid, miogadial, miogatrial, capsate, acrolein, icilin, tetrahydrocannabinol, mentol (10-100 μM), formalin, H_2O_2 , alkalizáció, intracelluláris Ca^{2+} , NSAIDs, propofol/isoflurane/desflurane/etomidate/octanol/hexanol stb.

2-APB 2-aminoetoxidifenil borát, NO nitrogen oxid, 4 α -PPD 4 α -forbol-dideconate, ADPribóz adenosin difoszfát ribóz, β -NAD β -nikotinamid adenin dinukleotid, H_2O_2 hidrogén peroxid, NSAIDs non-szteroid gyulladáscsökkentők

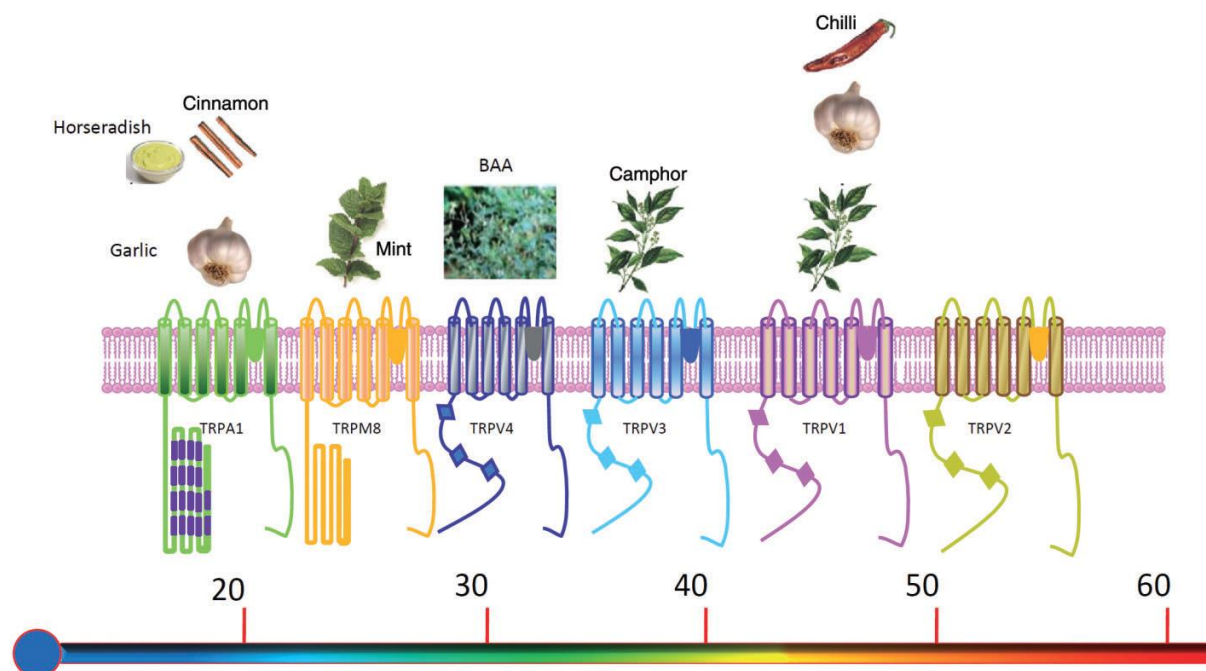
1. táblázat: A termoszenzitív TRP-csatornák tulajdonságai (Uchida és mtsai., 2017)

A hőérzékeny TRP-csatornák közül elsőként a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) került leírásra (Caterina és mtsai. 1997), melyet korábban vanilloid receptor-1 (VR1) néven egy hőérzékeny ioncsatornaként ismertek és primer szenzoros neuronok hőérzékenységéért volt felelős. A TRPV1-et a 43 °C feletti hőhatás mellett számos „nem-termális” agonista is aktiválja, ilyenek a csípőspaprika alkaloidja, a kapszaicin, az alacsony pH (pH < 6), az etanol vagy számos endogén lipid, mint például az anandamid (Oh és mtsai., 1996; Tominga és mtsai., 1998; Trevisani és mtsai., 2002; Ross, 2003).

A TRPV2 fájdalmas hőre (>52 °C), *in vitro* fizikai stimulusokra, mint a hó, ozmotikus stressz, mechanikai feszülés aktiválódik, továbbá nem szelektív kémiai aktivátorai a 2-aminoetoxidifenil borát (2-APB) és a kannabidiol (CBD) (Caterina és mtsai., 1999; Muraki és mtsai., 2003; Hu és mtsai., 2004; Qin és mtsai., 2008). A TRPV3 a fiziológiás hőtartomány (34-38 °C) receptora, amit szintén számos kémiai ágens is aktivál, amik elsősorban a kellemes meleg érzetet keltik az emberben (Smith és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2002; Peier és mtsai., 2002). Ilyenek például a kakukkfűből származó timol, az oregánóból származó carvacrol, vagy a szegfűszeg hatóanyaga az eugenol (Xu és mtsai., 2006), emellett szintetikus aktivátora a 2-APB (Hu és mtsai., 2004) és a drofenine (Deering-Rice és mtsai., 2014). A TRPV4 szintén fiziológiás hőtartományban aktiválódik (27-34 °C) (Watanabe és mtsai., 2002), valamint egyik természetes aktivátora a kínai gyógynövény, az *Andrographis paniculata* hatóanyaga a bisandrographolide (BAA) (Smith és mtsai., 2006). A TRPM8 és TRPA1 a hidegebb hőtartományok receptora. A TRPM8 25 °C körüli hőmérsékleten aktiválódik, és a kellemes hűvös érzetet keltő anyagok, mint a mentol, icilin és az eukaliptol a receptor természetes agonistái (McKemy és mtsai., 2002; Peier és mtsai., 2002; Chuang és mtsai., 2004; Voets és mtsai., 2004; De la Pena és mtsai. 2005). A TRPA1 a fájdalmasan hideg (<17 °C) hőmérsékleteket képes érzékelni és számos kémiai anyag is aktiválja, úgymint a mustár olaj,

allicin, icilin, mentol (McKemy és mtsai., 2002; Peier és mtsai., 2002; Story és mtsai., 2004).

(2. ábra)

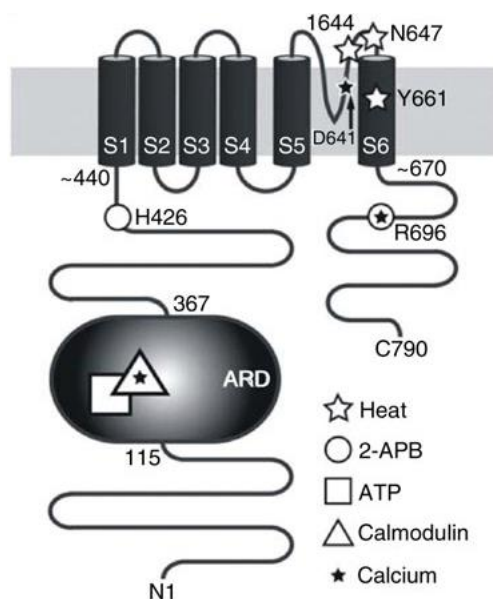


2. ábra: A „klasszikus” termo TRP-csatornák sematikus ábrázolása

Mindegyik csatorna 6 transzmembrán doménnel rendelkezik egy-egy pórusformáló régióval az S5-S6 szegmens között, valamint citoplazmatikus N- és C-terminalis véggel. A TRPM8-at kivéve mindegyik csatorna N-terminális végén változó számú „ankyrin repeat domain” van. A „termo” TRP-csatornák különböző hőmérsékleti tartományokon aktiválódnak, továbbá mindegyik csatornának van természetes és szintetikus aktivátora, amelyekről ismert, hogy emberben a megfelelő hő-, és fájdalomérzetet váltják ki (Vay és mtsai., 2012).

Az elmúlt évek kutatásai során bebizonyosodott, hogy ezek az ioncsatornák nem csak a hőérzékelésben vesznek részt, hanem egyéb, a bőrből kiinduló folyamatokban is, mint például a fájdalomérzékelés vagy a viszketés érzése. Mindemellett arra is fény derült, hogy ezek a TRP-csatornák nem csak kizárólag a szenzoros neuronokon, hanem számos más, nem neuronális sejtfeleségen is expresszálódnak, mint például epidermális keratinocitákon (Peier és mtsai., 2002), immunsejteken (Link és mtsai., 2010), urotéliumon (Gevaert és mtsai., 2007) vagy bronchiális epitél sejteken (Veronesi és mtsai., 1999).

Tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3 ioncsatorna



3. ábra: A TRPV3 szerkezeti topológiája

A TRPV3 főbb funkcionális régióinak lokalizációja, kiemelve a hőre, 2-APB-re, ATP-re, kalmodulinra valamint a kalciumra érzékeny területeket (Nilius és mtsai., 2014)

A tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna talán az egyik legkülönlegesebb tagja a vanilloid alcsaládnak. Kb. 43 %-os szekvencia-homológiát mutat az alcsalád elsőként leírt tagjával a TRPV1-gyel (Peier és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2002). Az eredetileg termoszenzitív – fiziológiás hőtartományon aktiválódó (<33 °C) – ioncsatorna hasonlóan a többi TRP-csatornához homo-, vagy heterotetramer formát képez, melyen belül az alegységek 6 transzmembrán doménnel rendelkeznek, a kation-permeábilis pórusformáló régió szintén az S5-S6 alegység között helyezkedik el (Blair és mtsai., 2019). Az intracellularis amino-terminális vég 6 ankyrin ismétlődést tartalmaz, létrehozva az „ankyrin repeat domain”-t (TRPV3-ARD), mely igen csekély (1 inszerció és 2 delécio a TRPV3-ARD-ben) mértékben tér el a TRPV1-ARD-től. A TRPV1-hez hasonlóan az AR2 és AR3 közötti konzervált régió vesz részt az ATP és kalmodulin (CaM) kötésében (Phelps és mtsai., 2010).

Mindemellett a TRPV3 tartalmaz egy hőre aktiválódó, egy Ca^{2+} -szenzitív régiót, valamint 2-APB kötőhelyet (Phelps és mtsai., 2010) (**3. ábra**).

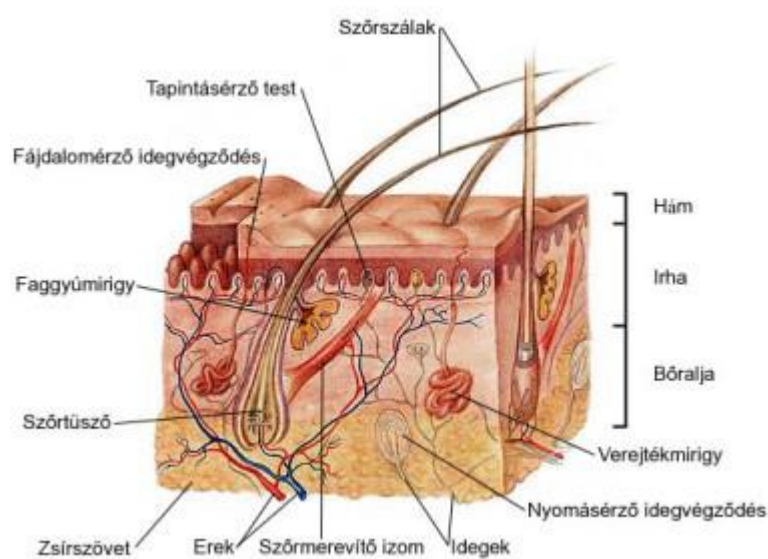
A TRPV3 elsősorban egy nem szelektív kationcsatorna (Gees és mtsai., 2010), melynek a TRPV1-hez hasonlóan aktiváció során a kation permeábilis pórusa dilatál, valamint a pórusban lévő negatív töltésű aminosavak is elősegítik a nagyobb méretű kationok átjutását (Chung és mtsai., 2008; Cao és mtsai., 2012)

A TRPV-csatornák közül a TRPV3 az egyetlen, melynél endogén modulátor vagy ligand nem került leírásra, azonban több exogén, köztük szintetikus és a természetben is előforduló, elsősorban aromás vegyület aktivátora a csatornának (Nilius és mtsai., 2014). A szintetikus vegyületek közül a legismertebb aktivátora a 2-APB (Chung és mtsai., 2004; Colton és Zhu, 2007), valamint a drofenine (Deering-Rice és mtsai., 2014). Természetes aktivátorai közé számos aromás vegyület tartozik, melyek egyben kellemes meleg érzetet keltenek, ezáltal a TRPV3 hőmérsékletre adott válaszát is potenciózzák (Machperson és mtsai., 2006; Xu és mtsai., 2006). A legismertebbek a kámfor (*Cinnamomum camphora*), carvacrol (*Origanum vulgare*), timol (*Thymus vulgaris*), eugenol (*Syzygium aromaticum*), fahéj (*Cinnamomum verum*), mentol (*Mentha piperita*), borneol (*Artemisia*) és tujon (*Thuja*) (Moqrich és mtsai., 2005; Machperson és mtsai., 2006; Xu és mtsai., 2006; Vriens és mtsai., 2009).

A többi TRP-csatornával ellentétben a TRPV3 alacsony expressziót mutat szenzoros neuronokon. Több szervben is kifejeződik, ilyenek az agy, nyelv, herék, szaruhártya, disztális colonfél, gége és belső fül (Peier és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2002; Moqrich és mtsai., 2005; Hamamoto és mtsai., 2008; Ishibashi és mtsai., 2008; Ueda és mtsai., 2009; Borbíró és mtsai., 2011; Mergler és mtsai., 2011; Nilius és mtsai., 2014), azonban az egyik legmagasabb expressziója a bőrben jellemző, elsősorban az epidermális keratinocitákon és a szőrtüsző sejteiben (Valdes-Rodriguez és mtsai., 2013).

A bőr anatómiája, felépítése

A bőr az emberi test egyik legnagyobb és talán legkomplexebb szerve, teljes testtömegünk kb. 15-20 %-át teszi ki. Elsődlegesen fizikai védelmet biztosít a belső szerveknek a különböző külső környezeti hatásokkal szemben, mint például a meleg és hideg hőmérsékelt, mechanikai hatások, UV sugárzás vagy a kórokozók. Mindemellett a passzív barrier funkció mellett aktív szerepet játszik számos élettani funkcióban; ilyenek a test folyadékháztartása, a testhőmérsékelt szabályozása és számos érzékszervi funkcióval is rendelkezik. Az emberi bőr három különálló rétegből áll: a legkülső epidermisz - többrétegű elszarusodó laphám -, a középső dermisz - kötőszövetes réteg - és az alsó hipodermisz - lazább kötőszöveti réteg -, mely a bőrt a mélyebb rétegekhez kapcsolja. A bőrben speciálisan differenciált struktúrák, bőrfüggelékek is vannak, ilyenek: a szőrtüsző, szőr- és hajszál, verejtékmirigyek, faggyúmirigyek, köröm, emlőmirigy (Röhlich, 1999; Ross, 2007; Wong és mtsai., 2015). A bőrben közel 200 féle különböző speciális fehérje található, legfőbb típusai a kollagén (I, II, III, VI, XII és XIV típus), extracelluláris mátrix proteinek (elasztin, lumikán, mimekán, prolargin, periostin, dekorin), citokeratinok, celluláris fehérjék (vimentin, dezmozoplakin, aktin, miozin, tubulin, laminin, hisztonok, annexinek) (Mikesh és mtsai., 2013). (4. ábra)



4. ábra: Az emberi bőr szerkezete

Forrás: www.orvosikozmetika.hu

Az epidermisz a bőr legfelső rétege, mely folyamatosan megújul, legfőbb sejtjei a keratinociták a felszín felé haladva folyamatosan elszarusodnak. Az epidermisz öt rétegre tagolható, ezek a *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* és *stratum corneum*. (Bővebben: *Az epidermisz domináns sejt típusa: a keratinocita* fejezetben). A nagyrészt keratinocitákat tartalmazó epidermiszben találhatók még melanociták, melyek a bőr színét meghatározó pigmentszemcséket, a melanint termelik és védik a bőrt a káros sugárzástól; a bőr immunrendszerében szerepet játszó Langerhans sejtek; valamint a *stratum basale*-ben elhelyezkedő módosult keratinocitáknak tekinthető Merkel sejtek, amikhez szabad idegvégződések kapcsolódnak és legnagyobb számban a tapintásban szerepet játszó bőrterületeken fordulnak elő (Röhlich, 1999; Ross, 2007). Az epidermisz alsó rétege ujjszerű betüremkedéseket tartalmaz, ezáltal biztosított a dermiszhez való stabilabb tapadás és a külső mechanikai hatásokkal szembeni védelem.

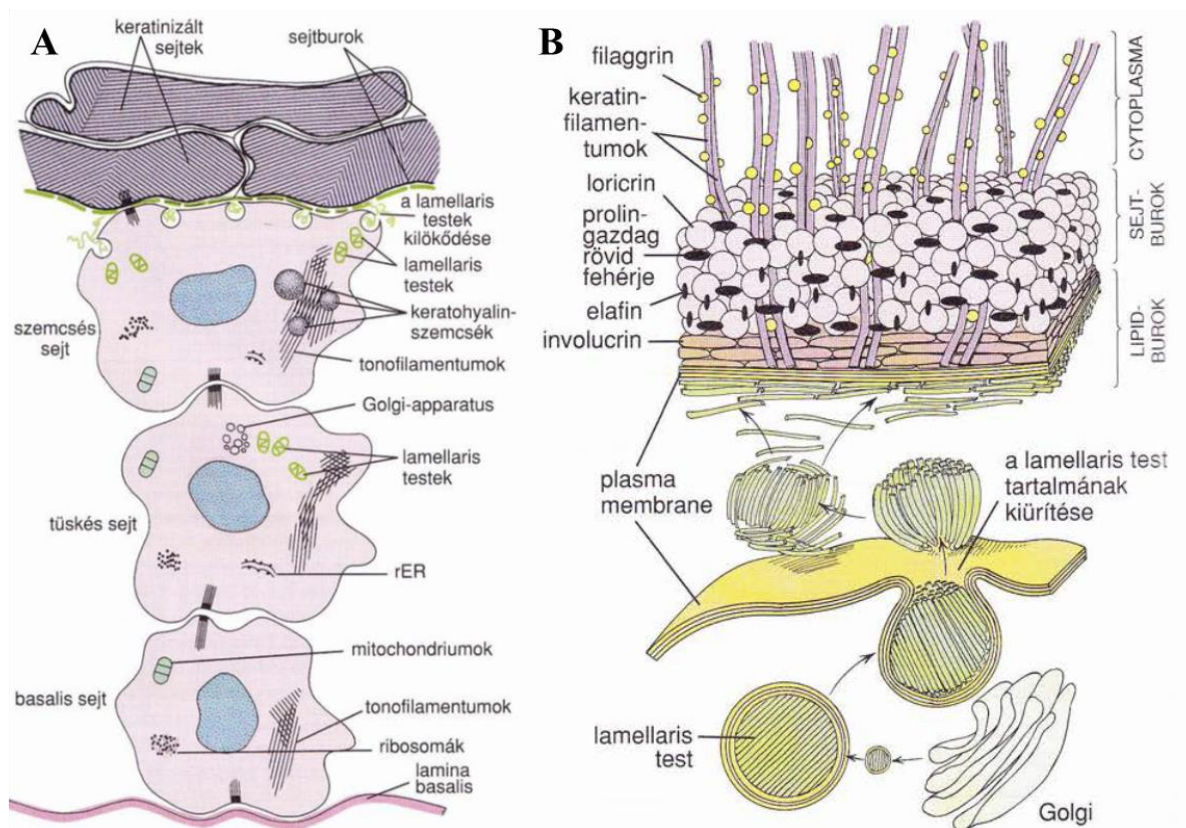
A dermisz 1-2 mm vastagságú, az epidermiszhez szoros kapcsolatban álló kötőszöveti réteg, mely leginkább a bőr mechanikai szilárdságát biztosítja. A dermisz két, egymástól élesen nem elhatárolódó rétegre különül el, ez a felszínes *stratum papillare* és a mélyebben elhelyezkedő, rostosabb szerkezetű *stratum reticulare*. A két réteg különböző típusú rostokból tevődik össze, melyből a rétegek közti szerkezeti különbség is adódik (Driskell és mtsai., 2013). A *stratum papillare*-t sűrű szövésű, kis átmérőjű, rugalmas kollagén rostok alkotják (Hellström és mtsai., 2014), melyek kesztyűujjszerűen türemkednek az epidermisz behúzódásaiba. A *stratum reticulare* egy szélesebb, tömött kötőszövetes réteg, amit túlnyomórészt vastag kollagénrostok alkotnak, melyek kötegekbe rendeződnek. A kötegeket elasztikus rostok veszik körül, létrehozva a réteg strukturális hálózátát (Naylor és mtsai., 2011; Hellström és mtsai., 2014). A dermiszt felépítő kollagén rostok döntően I. (80-90%-ban) és III. (10-20%-ban) típusúak (Epstein és mtsai., 1978), de például a IV. és más típusú kollagén rostok azonosítására is sor került (Oguchi és mtsai., 1985; Mikes és mtsai., 2013).

A dermisz és az epidermisz között elhelyezkedő, fénymikroszkóppal is látható vékony réteg a *membrana basalis*. A *membrana basalis* számos fehérje, úgymint IV. típusú kollagén, laminin, nidogén, perlekán, heparin-szulfát proteoglikánok és junkciós molekulák komplex összekapcsolódása adja (Yurchenco és mtsai., 2004). Ez a dermoepidermális kapcsolat fontos része, mely összeköti a dermiszt az epidermiszsel, egyben egy fizikai barriert is biztosít a két réteg között (Breitkreutz és mtsai., 2013). A mélyebb rétegek felé a dermiszből erős kötőszöveti sávok húzódnak, ezáltal rögzül a dermisz az alapjához, a hipodermiszhez.

A hipodermisz a dermisz alatt elhelyezkedő elsősorban laza kötőszövetből áll, mely testtájanként eltérő vastagságú lehet, néhol egymáson elcsúszó vékony rétegben van jelen, vagy nagy rekeszekbe zárt zsírszövetként párnázza ki a nagy nyomásnak kitett mély szöveteket, ezáltal védelmet nyújt a mechanikai hatásokkal szemben. A hipodermiszre jellemző sejtípusok a fibroblasztok, a zsírsejtek, valamint a makrofágok. Ez a réteg nagy szerepet játszik a zsírsejtek homeosztázisában, ezáltal az elhízás szabályozásában (Fjeldborg és mtsai., 2014; Stienstra és mtsai., 2014), a szöveti remodellingben, valamint a termoregulációban (Nguyen és mtsai., 2011; Lee és Tontonoz, 2014). A hipodermisz rétege különösen gazdag hialuronban, glükózaminoglikánban és proteoglikánban, melyek folyadékot képesek megkötni, befolyásolva a szövet rugalmasságát, valamint nagy szerepet játszik a szervezet folyadékelszívásának fenntartásában (Reed és mtsai., 2010; Reed és Rubin 2010).

Az epidermisz domináns sejtípusa: a keratinocita

Az epidermisz öt rétegében a keratinocita egy dinamikusan változó sejtípus. A *stratum basale*től a *stratum corneum*ig folyamatosan elszarusodik, elhal, majd az átalakult sejtek pikkelyszerűen leválnak. A folyamat során a keratinociták legfontosabb feladata a keratin termelés és az epidermális vízbarrier kialakítása (**5. ábra**). Az elhalt sejtek kopása és a bazális rétegből történő sejtek pótlása normális körülmények között egyensúlyban van.



5. ábra: Az epidermisz keratinizációjának vázlatos ábrázolása (A) és az epidermális vízbarrier sémás ábrázolása (B) (Ross, 2007.)

A *stratum basale* egyetlen sejtsorból épül fel, keratinocitái között vannak osztódó (törzssejtek) és nem osztódó sejtek. A törzssejtek osztódása során újabb törzssejtek és olyan sejtek keletkeznek, melyek keratinocita irányba differenciálódnak. A keratinociták egymáshoz dezmoszómákkal, a lamina basalishoz hemidezmoszómákkal kapcsolódnak. Az osztódás befejeződésével az új sejtek elhagyják a *stratum basale*t és belépnek a *stratum spinosum*ba. Már ebben a rétegben megindul a keratin szintézis, melyek citokeratin intermedier filamentumokká aggregálódnak.

A *stratum spinosum*, másnéven tűskés sejtek rétege több sejtsorból épül fel, nevét onnan kapta, hogy az egymáshoz dezmoszómákkal kapcsolódó sejtek a hisztológiai feldolgozás során zsugorodnak, a dezmoszómák révén viszont összekötetésben maradnak, ezáltal nyúlványossá, sokszögűvé válnak. A keratinocitákban az intermedier filamentumok kötegekbe rendeződnek, „tonofibrillumokat” alkotnak, melyek a dezmoszómákhoz és hemidezmoszómákhoz rögzülnek behálózva az egész sejtet, ezáltal egy erős mechanikai ellenálló képességet biztosít az egész sejtrétegnek. A *stratum spinosum* felsőbb sejtsoraiban megindul a keratohialin szemcsék és a lamellaris testek szintézise.

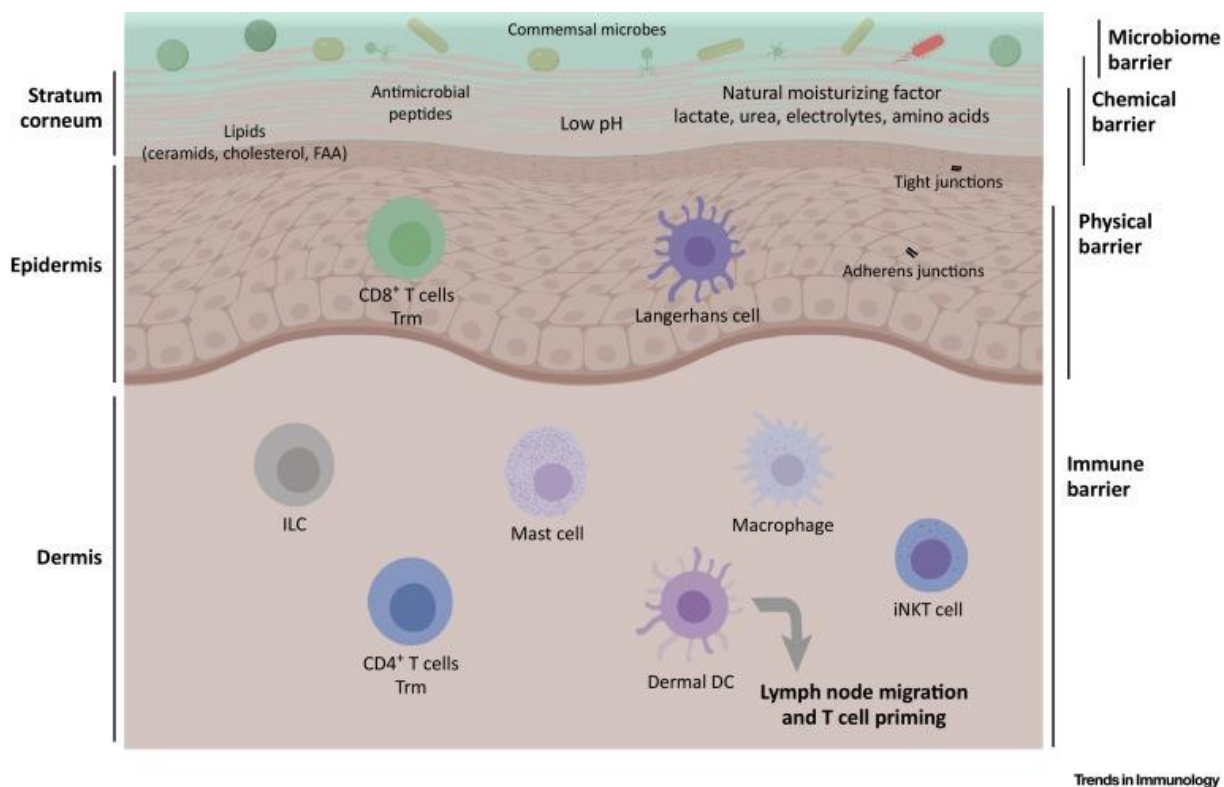
A *stratum granulosum*ban - másnéven szemcsés sejtek rétege – tovább folytatódik a keratohialin szemcsék és a lamellaris testek szintézise. A keratohialin szemcsék filaggrint és trichohialint tartalmaznak, melyek a citoplazmába ürülve elősegítik a keratinfilamentumok aggregációját. Ezzel megindul az elszarusodás folyamata és a sejtek a *stratum corneum*ba jutnak. A lamellaris testek szfingolipidek, ceramidok (45-50%), koleszterin (20-25%) és telített szabad zsírsavak (10-15%) keverékéből épül fel (Verdier-Sevrain és Bonte, 2007; Plasencia és mtsai., 2007), melyek exocitózissal az intercelluláris térbe jutnak, ott a sejtekkel párhuzamosan elhelyezkedve kitöltik a *stratum granulosum* és *stratum corneum* közötti teret, létrehozva az epidermális vízbarriert.

A *stratum corneum*ban teljesen elszarusodott, lapos sejtek vannak, belőlük teljes egészében eltűnnek a sejtmag és a sejtoranellumok, a citoplazmát keratin tölti ki. A felszínen lévő sejtekben savanyú foszfátáz szaporodik fel, mely elősegíti a sejtek leválását, deszkvamálódását.

A *stratum granulosum* és a *stratum corneum* között, kizárólag a tenyér és talp epidermiszében elkülöníthető egy ötödik réteg, a *stratum lucidum*, mely néhány réteg lapos sejtből áll, bennük a sejtmag és a sejtoranellumok eltűnnek, az elszarusodás előrehaladt. A *stratum lucidum* fénymikroszkópban teljesen elkülönül a többi rétegtől, mintegy rosszul festődő fénytörő réteg.

Bőrünk elsődleges védelmi rendszere: az epidermális barrier

Az emberi bőr egyik legfontosabb funkciója a barrier kialakítása, mely egy elsődleges védelmi rendszer a külső környezet káros hatásaival szemben (Madison, 2003; Proksch és mtsai., 2009). Bőrünk barrier rendszerét igen komplex, több funkció együttese hozza létre, kialakításában a bőr dermális és epidermális rétege egymással összehangoltan vesz részt (Eyerich és mtsai., 2018), ezen belül is az epidermiszt alkotó keratinociták kulcsfontosságú szerepet töltenek be, elsősorban a *stratum corneum* rétegében (Del Rosso és mtsai. 2016). Ennek a komplex, összehangolt szabályozást igénylő rendszernek a legfőbb tagjai a kommenzális flóra által kialakított és szabályozott *biológiai barrier*; a bőr hidratáltságát, folyadékegyensúlyát és megfelelő pH-ját biztosító *kémiai barrier*; a bőr szilárdságát adó és a mechanikai hatásoknak ellenálló *fizikai*, vagy *mechanikai barrier*; valamint a kórokozók felismerését és elpusztítását biztosító *immunológiai barrier* (Gallo és Huttner, 1998; Pivarcsi és mtsai., 2004; Rawlings, 2010; Del Rosso és Levin, 2011) (6. ábra).



6. ábra: Az epidermális barrier szintjei és komponensei (Eyerich és mtsai., 2018)

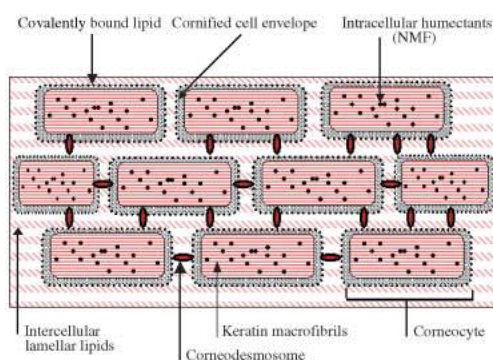
FAA: free fatty acids, ILC: innate lymphoid cell, iNKT: invariant natural killer cell, Trm: Tissue-resident memory cell

A *biológiai barrier*t számos baktérium, gomba és vírus együttélése alakítja ki, melyek a bőrfelszínt mindenhol lefedik. Összetételük testtájanként eltérő, ugyanakkor viszonylag stabil flóra jellemzi a különböző testfelszíneket. A bőr mikroflóráját dominánsan Gram-pozitív baktériumok uralják, leggyakoribbak a *Staphylococcus*, *Propionibaktérium*, illetve a *Corynebaktérium* törzsek. A mikrobák egymással és a bőrsejtekkel együtt megvalósuló együttélését, továbbá a potenciálisan patogén törzsek kontrollált szaporodását számos kommunikációs útvonal és ellenőrző mechanizmus biztosítja (Oh és mtsai., 2016). Ilyenek például, az *Esp* szerin protáz szekréció, mely gátolja a kolonizációt (Iwase és mtsai. 2010); bizonyos baktériumtörzsek által termelt antibiotikumok, melyek gátolják a patogén törzsek túlélését (Zipperer és mtsai., 2016; Nakatsuji és mtsai. 2017); vagy a baktériumok indukálta antimikrobiális peptidek és/vagy fehérjék expressziója az epidermális keratinocitákban, valamint a veleszületett immunitás modulálása a bőrben (Wanke és mtsai., 2011).

A bőr *kémiai barrier*jének meghatározása kevésbé éles, számos ponton összefügg a fizikai barrierrel. A kémiai barrier olyan tényezőket tartalmaz, melyek hozzájárulnak a bőrfelszín pH-jának kialakításához, valamint a természetes hidratáltsági állapot fenntartásához. Ebben nagy szerepe jut a *stratum corneum* rétegének, valamint a korneociták közt szétterülő intercelluláris lamelláris lipideknek (Del Rosso és mtsai., 2016; Eyerich és mtsai., 2018). A korneociták szárazanyag-tartalmának mintegy 20-30 %-át azon higroszkópos vegyületek teszik ki, melyek nagyban hozzájárulnak a szaruréteg hidratáltságának fenntartásához (Verdier-Sevrain és Bonte, 2007). Ezek elsősorban a filaggrin proteolíziséből származó aminosavak és származékaik (McLean, 2016), illetve enzimatis tevékenységekből származó lipidek. Ezek a vegyületek nemcsak a sejteken belül vannak jelen, hanem az intercelluláris lamelláris membrán fő alkotói is és a bőr természetes hidratáltságát nagyban befolyásolják. Ez a külső lipidrég elsősorban ceramidokból (40-50%), koleszterinből (25%) és szabad zsírsavakból (10-15%) tevődik össze (Harding, 2004), mindemellett az itt található laktát, urea és elektrolitok is fontos

szerepet játszanak nemcsak a megfelelő hidratáltság fenntartásában, hanem a bőrfelszín savas pH-jának kialakításában is (Verdier-Sevrain és Bonte, 2007; Ali és Yosipovitch, 2013).

Számos irodalmi összefoglaló említ egy megfelelő hasonlatot a fizikai és kémiai barrier összefüggésére. Többek között például Del Rosso és munkatársai, vagy Eyerich és munkatársai is a „tégla és a habarcs” hasonlatán keresztül mutatja be a kémiai és fizikai barrier funkcióját (Del Rosso és mtsai., 2016; Eyerich és mtsai., 2018) (7. ábra).



7. ábra: A *stratum corneum* „tégla és a habarcs” szerkezetének sematikus ábrázolása Harding (2004) munkája alapján

A korneociták a téglákat, az intercelluláris lamelláris lipidréteg a habarcsot képviseli (Harding, 2004)

A „téglat” a bőr esetében a keratinocita sejtek adják, míg a „habarcsot” az intercelluláris teret kitöltő lamelláris lipid membrán. A természetes hidratáltsági állapotot meghatározó tényezők, elsősorban a trigliceridek, koleszterol, szabad zsírsavak (Fluhr és mtsai., 2001). A *stratum granulosum* és *corneum* sejtjeiben lévő fontosabb fehérjék, úgymint a filaggrin, lorikrin és a keratin filamentumok (McLean 2016) nagyban hozzájárulnak a bőr mechanikai szilárdságának kialakításához is. Továbbá a fizikai barrier kialakításában még egy fontos tényező játszik meghatározó szerepet, nevezetesen a sejtek közötti szoros kapcsolatok, másnéven „tight junction” fehérjék. Ilyenek a klaudinok, az occludin és zonula occludens transzmembrán fehérjék, melyek erős sejt-sejt kapcsolat révén hozzák létre az epidermisz rétegein belüli és közötti sejthálózatot (Basler és mtsai., 2016).

Az epidermális barrier utolsó tagja, az *immunológiai barrier*, elsősorban a patogén kórokozók felismerését és elpusztítását biztosítja különböző védekezési mechanizmusok

aktivációján keresztül. Ebben számos, a dermiszben és az epidermiszben lévő bőrsejt, különösen a keratinociták és szebociták játszanak fontos szerepet. Ezekről a sejtekről kimutatták, hogy számos funkciójuk mellett, úgynevezett „őrszemként” is képesek viselkedni. A felszínükön lévő patogén felismerő receptorok - mint például a Toll-like receptorok -, felismerik a patogén mikrobákat és különböző gyulladásos folyamatok és a veleszületett immunitás aktivációja révén képesek elpusztítani a potenciális kórokozókat (Pivarcsi és mtsai. 2003; Pivarcsi és mtsai. 2004; Miller 2008; Terhorst és mtsai. 2010).

Az epidermális barrier egyensúlyát érintő betegségek „prototípusa”: az atópiás dermatitisz

Az atópiás dermatitisz (AD) az egyik leggyakoribb krónikus, gyulladásos bőrbetegség; tüneteit tekintve leginkább a kiújuló ekcémával (**8. ábra**), száraz bőrrel és erős viszketéssel jellemezhető, ennek következtében világszerte emberek millióinak életminőségét rontja. Nagyon gyakran a barrier betegségek „prototípusának” tekintik, mivel az epidermális barrier valamennyi résztvevője zavart szenved, továbbá a bőr gyulladása és az erőteljes viszketés is nagyban hozzájárul a betegség kialakulásához, progressziójához és krónikussá válásához (Furue és mtsai., 2017; Nakahara és mtsai., 2020). Elsősorban e három tényezőre fókuszálva érthető meg pontosabban a betegség patofiziológiája.



8. ábra: Az AD leggyakoribb tünetei a bőrön

Forrás: www.eucerin.hu

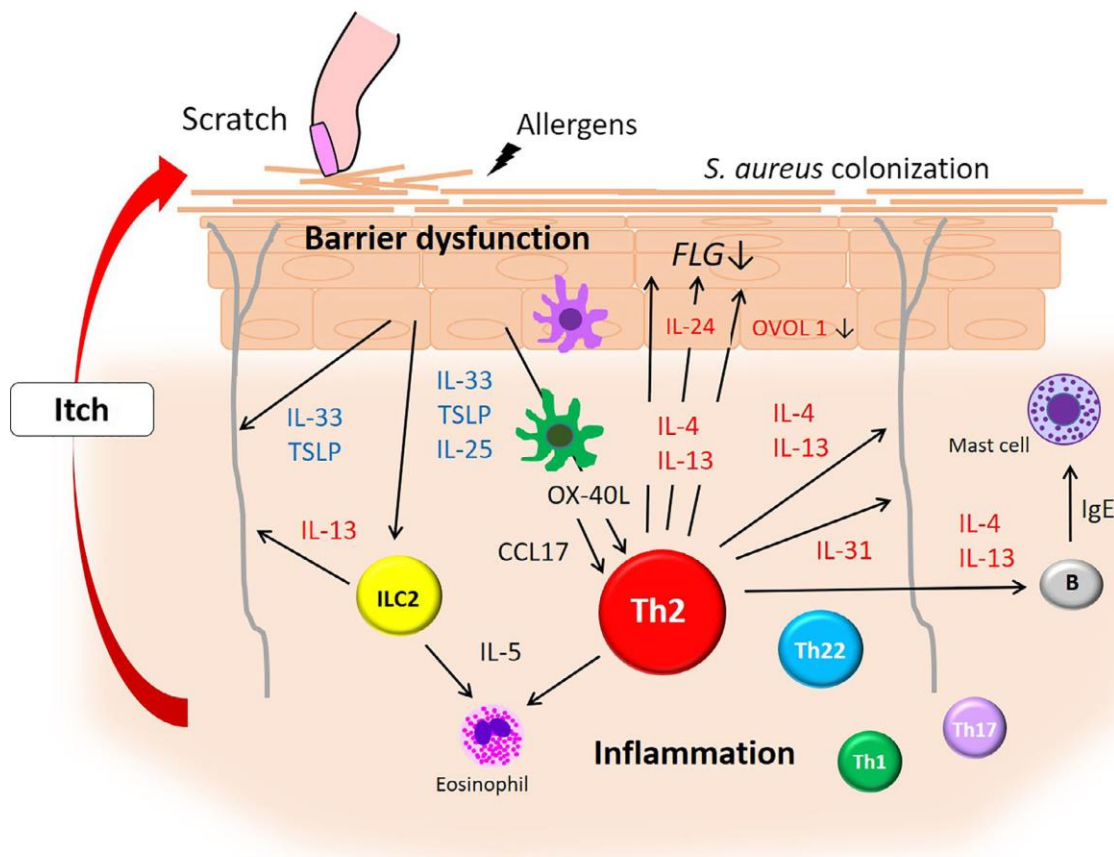
Az epidermális barrier diszfunkciója AD-ben. Az epidermális barrieren belül az intercelluláris lipidösszetétel egyensúlyának felborulása, a filaggrin mutáció és a sejtek közötti kapcsolatok rendellenessége emelendő ki. A lamelláris lipid rétegben csökken a ceramidok mennyisége, valamint a ceramid:koleszterin arány, míg a szabad zsírsavak és egyéb lipidek lánc hosszai rövidülnek (Jungersted és mtsai., 2010; Janssens és mtsai., 2012). A betegek *stratum corneum*ában a pH emelkedik, melynek következtében a fehérje és lipid szintézist és degradációt végző enzimek működése zavart szenved (Elias és Wakefield, 2014), tovább gyengítve az intercelluláris lamelláris lipid réteget.

Az AD genetikai rizikófaktorai közül a leggyakoribb a filaggrin mutáció. A mutáció gyerekkorban kialakuló AD-re hajlamosít, továbbá növeli az érzékenységet és az allergia súlyosságát, valamint az infekciókra való fogékonyságot (Irvine és mtsai., 2011; Szegedi A., 2015; Drislane és Irvine, 2020). Mindezek ellenére a mutációt hordozók közel 40%-ában nem alakul ki a betegség és csupán a betegek 15-50%-ában mutatható ki a filaggrin gén defektusa (Palmer és mtsai., 2006). Mindemellett azon betegek filaggrin expressziója is változik, akiknél nem mutatható ki semmilyen genetikai rendellenesség (Thyssen és Kezoic, 2014). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a mutáció önmagában nem magyarázza az epidermális barrier abnormalitásiat, illetve a bőr homeosztázisának felborulása is befolyásolja a filaggrin expresszióját genetikai mutáció hiányában is.

A fizikai barriert erősítő intercelluláris kapcsolatokat biztosító adhézis fehérjék gyengülése szintén kimutatható AD-ben. Kiemelendő az egyik kulcsfontosságú fehérje, a claudin expressziójának csökkenése, ami szintén gyakran előfordul a betegségben (De Benedetto és mtsai., 2011).

Ezen tényezők együttes eredményeként az epidermális barrier rétege sérül, melynek következtében az allergének és patogén kórokozók kolonizációja és bejutása könnyebbé válik,

továbbá a sérült gáton keresztül fokozódik a transepidermális vízvesztés (TEWL) és csökken a bőr természetes hidratáltsága (9. ábra).



9. ábra: Összefüggés a bőr barrier funkciója, a gyulladás és a viszketés között AD-ben
A barrier funkció sérülése a sérült keratinociták által termelt anyagok 2-es típusú immunválaszt indukálnak. A termelődött citokinek tovább gátolják a barrier funkciókat a filaggrin down-regulációja révén. Ezen kívül a citokinek közvetve és közvetlenül is hatnak az idegekre és viszketést okoznak, ami tovább fokozza a gyulladást és az epidermális barrier gyengülését (Nakahara és mtsai., 2020).

A bőr gyulladása AD-ben. A másik fontos patológiai tényező AD-ben a bőr gyulladása. Kiemelendő, hogy a gyulladás, a barrier diszfunkció és a viszketés is egymással összefüggő, egymást erősítő folyamatok, melyek együttesen felelősek a betegség kialakulásáért (9. ábra). Számos tanulmány kimutatta, hogy a sérült keratinocitákból immunszabályozó citokinek szabadulnak fel, úgymint a thymic stromal lymphopoietin (TSLP), interleukin (IL)-25 és IL-33 (Hammad és Lambrecht, 2015; Han és mtsai., 2017), továbbá igazolt, hogy ezen citokinek expressziója fokozott AD-s betegek lézionális keratinocitáiban (Soumelis és mtsai., 2002;

Aktar és mtsai., 2015). Ezek a citokinek 2-es típusú immunválaszt indukálnak (Hammad és Lambrecht, 2015); ennek megfelelően a T-helper 2 sejtek és a 2-es típusú innate lymphoid sejtek (ILC2) száma fokozódik, melyek IL-4, IL-5, IL-13 és különböző kemokin faktorok (CCL17, 18, 22 és 26) szekréciója révén további T-helper sejteket (Th-2, Th-22), eozinofileket, hízósejteket és endotél sejteket aktiválnak, tovább erősítve a gyulladásos folyamatot (Gittler és mtsai., 2012; Esaki és mtsai., 2015). Mindemellett ezek a citokinek tovább gyengítik az epidermális barriert a filaggrin expresszió down-regulációja révén (Tsuji és mtsai., 2017) (**9. ábra**).

Viszketés AD-ben. Az AD-ben szenvedő betegek esetében a viszketés komplex kölcsönhatások eredménye; nevezetesen a gyulladásos folyamat során felszabaduló mediátorok, mint például a hisztamin, IL-31, -4, -13, a TSLP vagy az endotelin-1 közvetlenül az idegekre hatva viszketést okoznak. A vakarás újabb felszíni bőr sérülést, ezáltal barrier diszfunkciót és gyulladást eredményez még tovább erősítve a patológiás folyamatot (Kido-Nakahara és mtsai., 2017; Szöllősi és mtsai., 2019; Yosipovitch és mtsai., 2020) (**9. ábra**).

A TRPV3 ioncsatorna és a bőr kapcsolata

Bár a TRP ioncsatornák jelenlétét először neuronokon írták le, ahol klasszikusan érzékszervi funkciókban játszanak szerepet, az elmúlt évtizedek kutatásai igazolták, hogy számos TRP-csatorna nem neuronális sejtípuson is expresszálódik. Az újonnan megjelenő eredmények rávilágítottak a TRP-csatornák szerepére a bőrben, ahol kimutatták, hogy számos, a bőrsejtekben lejátszódó folyamatokban fontos szerepet töltenek be. Ebből a szempontból az egyik legérdekesebb a TRPV3 ioncsatorna, amit először keratinocitákon írtak le (Peier és mtsai., 2002).

A TRPV3 expresszió élettani jelentőségét a bőrben az az eredmény igazolja, hogy a DS-Nh egértörzs szőrtelen fenotípusát a keratinocitákban egyetlen pontmutáció okozza a TRPV3

gént kódoló régióban, nevezetesen a Gly573Ser pontmutáció, mely egy „gain-of-function” (funkciónyerés) mutációhoz vezet (Asakawa és mtsai., 2006). Az érintett egerekben nemcsak a szőrtelen fenotípus jellemző, hanem számos bőrelváltozás is, úgymint a spontán dermatitisz, viszketés és hiperkeratózis, mindemellett kiemelendő a *Staphylococcus aureus* kolonizáció, magasabb IgE és IL-4 szintek, valamint a fokozott CD4+ T sejt infiltráció, melyek arra engednek következtetni, hogy a TRPV3 ioncsatornának komplex szerepe lehet a bőr patofiziológiájában (Yoshioka és mtsai., 2009).

Ezen eredmények jelentőségét tovább hangsúlyozza az a bizonyíték, hogy emberben ugyanez a Gly573Ser pontmutáció, valamint több missence mutáció a TRPV3 ioncsatornát kódoló génben egy nagyon ritka rendellenesség, az Olmsted-szindróma kialakulásához vezet (Lin és mtsai., 2012; Nagai és mtsai., 2017; Choi és mtsai., 2018; Chiu és mtsai., 2020; Zhong és mtsai., 2020). A betegségben a leggyakoribb tünetek közé tartozik a palmoplantáris keratoderma, a perioroficiális hiperkeratózis, diffúz szőrhiány, kopaszság és viszketés. Az egyidejű szövettani leletek hiperkeratózist, parakeratózist és pszoriáziform léziókat írnak le hízósejt infiltrációval a dermisz felső részében, amik hasonlóak a fentebb említett egérben leírt tünetekhez (Lin és mtsai., 2012). A GEO Profiles adatbázisban (Barrett és mtsai., 2013) történő keresés eredménye a csatorna további funkcionális jelentőségét bizonyítja a bőrben, miszerint a TRPV3 magasabb expressziós szintet mutat pszoriázisban, mely az egyik leggyakoribb gyulladásos bőrbetegség (GEO ascension GDS 4602) (Nair és mtsai., 2009). Továbbá szintén emelkedett az expressziós szint papulopusztulózus rozáceában és eritemato-telangiektatikus rozáceában (Sulk és mtsai., 2012). Mindemellett molekuláris szinten kimutatták, hogy a TRPV3 aktivációja a keratinocitákban olyan jelátviteli molekulák felszabadulását eredményezi (mint pl.: prosztaglandin E2, ATP, NGF és TSLP), amelyek gyulladást és viszketést okoznak a bőrben (Huang és mtsai., 2008; Mandadi és mtsai., 2009; Yoshioka és mtsai., 2009; Yamamoto-Kasai és mtsai., 2013).

Ezen eredményekkel összhangban, munkacsoportunk korábban a TRPV3 szerepét vizsgálta szőrtüszőkön és külső gyökérhüvely keratinocitákon (Borbíró és mtsai., 2011). Ezek alapján a TRPV3 funkcionálisan aktív formában fejeződik ki ezeken a sejteken, továbbá aktivációjuk gátolja a szőrnövekedést és a sejtproliferációt, valamint sejthalált indukál.

Kutatási témánk szempontjából fontos jelentőségű, hogy a TRPV3 megemelkedett expressziót mutat mRNS-szinten AD-ben szenvedő betegek léziós bőrében, valamint égés utáni viszkető elváltozásokban (Yamamoto-Kasai és mtsai., 2012; Yamamoto-Kasai és mtsai., 2013), továbbá a TRPV3 különböző vegyületek általi gátlása bizonyítottan hatékony az AD-szerű tünetek enyhítésében állatmodellekben (Nam és mtsai., 2013; Kang és mtsai., 2017; Sun és mtsai., 2018; Qu és mtsai., 2019; Zhang és mtsai., 2019; Sun és mtsai., 2020). Ezen ismeretek újabb eredményekkel bővültek, melyek kimondják, hogy a TRPV3 expresszió fehérje szinten is megemelkedik AD léziókban, illetve a hő indukálta viszketés AD betegekben TRPV3 függő. Ezenkívül az AD-betegek léziós bőréből izolált keratinociták fokozott hőérzékenységet mutatnak TRPV3 függő módon, ami pruritogének felszabadulását eredményezi (Seo és mtsai., 2020).

Érdekes módon, a korábbi eredmények ellenére még nem rendelkezünk kellő információval a TRPV3 sejtszintű szerepéről és működéséről keratinocitákon, valamint az eddigi tanulmányok nem vizsgálták részletesen, hogy a TRPV3 expressziója és funkciója megváltozik-e AD betegek nem-lézionális bőrében, amely vélhetően különbözik az egészséges bőrtől a terminális differenciálódás és bizonyos immunfolyamatok tekintetében (Suárez-Fariñas és mtsai., 2011; Pavel és mtsai., 2021).

CÉLKITŰZÉS

A TRPV3 ioncsatorna aktivációjának hatása még nem teljesen tisztázott humán epidermális keratinocitákon, ezért munkánk során célul tűztük ki:

1. A TRPV3 ioncsatorna expressziójának és funkcionális aktivitásának molekuláris szintű vizsgálatát humán epidermális keratinocitákon.
2. A TRPV3 ioncsatorna klasszikus agonistáival történő aktivációja során az epidermális keratinociták gyulladásos folyamataiban betöltött szerepének vizsgálatát, és a folyamatokban részt vevő jelátviteli útvonalak feltérképezését.
3. A TRPV3 ioncsatorna expressziós és funkcionális jellemzőinek felmérésére és összehasonlítására törekedtünk nem-lézionális és lézionális területről származó AD-s betegek mintáiban, valamint egészséges bőrből származó szöveteken.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

A kísérleteink során használt anyagokból ezerszeres töménységű törzsoldatokat készítettünk a gyártó leírásainak alapján. Ennek megfelelően dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk a carvacrolt és a 2-aminoetoxidifenil-borátot (2-APB) (mind Sigma-Aldrich, St Louis, MO). A törzsoldatokat felhasználásig a gyártó által javasolt -20°C-on tároltuk. A törzsoldatokból közvetlenül a kezelések előtt készítettük el a szükséges hígításokat a sejtek tenyésztő oldatában, illetve Ca^{2+} -imaging esetén Hank oldatban, 1:1000 arányban hígítva, így az oldószer koncentrációja a kezelések folyamán minden esetben 0,1 % volt. Kontrollként az önmagában alkalmazott oldószer azonos hígítását használtuk.

Egészséges és AD-s betegekből származó epidermális keratinociták izolálása és tenyésztése

Az egészséges bőrmintákat bőrgyógyászati szempontból egészséges, sebészeti beavatkozáson átesett önkéntesekből nyertük. Atópiás egyénekből csupán a felső epidermális réteg került eltávolításra megfelelő érzéstelenítést követően borotva segítségével, mind az érintett bőrelváltozás területéről, valamint az egészségesnek tűnő régióból is. A donorok a megfelelő tájékoztatást követően írásban járultak hozzá a minták kutatási célú felhasználásához. A kísérletek a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság engedélyének megszerzését követően történtek (protokollszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012 ügyiratszám: IX-R-052/01396-2/2012), valamint a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával. *A donoroktól származó minták vételezéséért köszönet illeti Dr. Gáspár Krisztiánt a Bőrgyógyászati Klinika orvosát.*

A mintákat 3-5 mm²-es négyzetekre daraboltuk fel. Az egészséges egyénekből származó szövetdarabokat 2,4 U/ml diszpáz (Sigma-Aldrich) oldatban emésztettük egy éjszakán keresztül, majd csipesz segítségével választottuk szét a dermo-epidermális réteget. Mind az egészséges, mind az atópiás epidermiszt 0,1% tripszin-0,2% EDTA (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) keverékével emésztettük egy órán keresztül 37 °C-on. A sejtek szétválásának mechanikai elősegítésére vortexelést végeztünk. A tripszin inaktiválására 5x-ös térfogatú 10 v/v %-os embrionális borjúsérummal (FBS) és penicillin, streptomicyannel kiegészített DMEM oldatot használtunk (mind Life Technologies). A sejteket 1000 fordulat/perc-el centrifugáltuk 8 percen keresztül, majd az így nyert epidermális keratinocitákat DMEM/HAM F12 3:1 arányú keverékében tenyésztettük 2 napon keresztül. A tápoldatot az alábbi anyagokkal egészítettük ki: 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 2,43 µg/ml adenin, 2 nM trijód-tironin, 0,1 nM koleratoxin, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 1 mM aszkorbil-2-foszfát, 100 IU/ml penicillin G (mind Sigma-Aldrich), 25 µg/ml gentamicin (Life Technologies), valamint 10 (v/v)% Fetal Clone II (HyClone, Thermo Shandon, South Logan, Utah, USA). A tenyésztést 5% CO₂-tartalmú, párasított légterű, 37°C-os termosztátban végeztük. A sejtek letapadását követően (donortól függően 2-5 nap múlva) a keratinociták tenyésztését szérum mentes EpiLife oldatban folytattuk, a tenyésztőoldatot 5 v/v %-os humán keratinocita növekedési faktorról (HKGS) egészítettük ki (mind Life Technologies). A tápoldatot minden második nap cseréltük. A sejteket kb. 80 %-os konfluencia szintnél passzáltuk megelőzve ezzel a sejtek konfluencia-indukált differenciálódását. *Ezen munkafolyamatokban Hollósi Erika asszisztensnő (Élettani Intézet) és Angyal Ágnes PhD hallgató (Élettani Intézet) voltak segítségemre.*

Immunhisztokémia

A paraffinba ágyazott szövetdarabokból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Ezt követően deparaffinálást és antigén feltárást (citrát-pufferben, pH 6.0, 10 percig 750 W-on mikrohullámú sütőben melegítve) végeztünk. A metszeteket elsődleges humán TRPV3 elleni antitesttel (Novus Biologicals, Littleton, CD) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Az elsődleges antitesttel történő festést követően a metszeteket biotinilált kecske ellenes IgG-vel (1:200 hígítás, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) inkubáltuk. Az immunreakció kimutatására diaminobenzidint (DAB) (DAKO, Golstrup, Dánia), míg a magfestésre hematoxilint (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk. A jelölési eljárás ellenőrzése végett az elsődleges antitest elhagyása történt a negatív kontrollokban. Az immunfestést Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk és értékeltük. *A metszetek készítéséért és festéséért köszönet illeti Péntes Zsófia PhD hallgatót (Immunológiai Intézet) és a Debreceni Egyetem Kenézy Gyula Campus Patológia Osztály dolgozóit.*

Immuncitokémia

A keratinocitákat üveg fedőlemezre szélesztettük és a megfelelő konfluencia eléréséig tenyésztettük. Acetonos fixálását követően a sejteket 0,1 v/v %-os Triton X-100 (Sigma-Aldrich) oldatban permeabilizáltuk, majd TRPV3, illetve p65 ellenes elsődleges antitestekkel (1:200, illetve 1:50 hígítás, mind Novus Biologicals) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. A fluoreszcens festéshez a fedőlemezeket fluoreszcein-izothiociánáttal (FITC) konjugált másodlagos antitestekkel (1:1000 hígítás) inkubáltuk 60 percen keresztül (Dobrosi és mtsai. 2008; Tóth és mtsai. 2009). Mindkét jelölés esetén a sejtmagok festésére 4',6-diamidino-2-fenilindol-t (DAPI) (Life Technologies) alkalmaztunk. A jelölési eljárás ellenőrzése végett az elsődleges antitest elhagyása történt a negatív kontrollokban. Az immunfestést Olympus

Xcellence RT fluoreszcens mikroszkóp (Olympus, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk és értékeltük.

Génexpressziós változások vizsgálata

Kísérleteink során a különböző gének expressziós változásait reverz transzkripciót követő, kvantitatív, „valós idejű” polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) vizsgáltuk. A qPCR-t Stratagene MxPro3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készülék segítségével végeztük az 5'-nukleáz módszer alkalmazásával.

A keratinocitákat TRIzol reagensben arattuk, míg a fagyasztott szövetmintákat folyékony nitrogén alatt mozsárban porítottuk, majd a kapott port szintén TRIzol reagensben oldottuk. A teljes RNS tartalmat a gyártó utasításainak betartásával a TRIzol reagens alkalmazásával izoláltuk, majd az így kapott RNS-t minőségileg a Nanodrop-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop/Thermo Scientific) ellenőriztük. Ezt követően a teljes RNS 1 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (mind Life Technologies) felhasználva. Az így előállított cDNS-ből kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció segítségével mutattuk ki a vizsgált gének specifikus transzkriptjét, TaqMan primerek és próbák, valamint TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (Applied Biosystem) alkalmazásával. TaqMan Gene Expression Assay ID-k: TRPV3: Hs00376854_m1, IL6: Hs00985639_m1, IL8: Hs00174103_m1, IL1a: Hs00174092_m1, TNFA: Hs00174128_m1. Belső kontrollként gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH: Hs99999905_m1), β-aktint (ACTB: Hs99999903_m1), és ciklofilin A-t (PPIA: Hs99999904_m1) alkalmaztunk. A génexpresszió relatív mennyiségét a ΔCT módszer segítségével határoztuk meg.

TRPV3 fehérje szintű kimutatása (Western blot)

A Western blot analízishez használt mintákat detergens mixben (50 mM TRIS HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Igepal CA 630, 0,5% nátrium-deoxicholate, proteáz inhibitor; mind Sigma-Aldrich) learattuk, valamint a fagyasztott szövetmintákat folyékony nitrogén alatt mozsárban porítottuk és az így kapott homogenizátumot szintén detergens mixben oldottuk. Ultrahangos sejtfeltárást követően a minták fehérjetartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, majd 5% β -merkaptóetanollal (Sigma-Aldrich) kiegészített 2x-es SDS puffer (Quality Biological INC, Rockville, MD, USA) felhasználásával mintát készítettünk. Ezt követően 10 perces főzéssel 100 °C-on denaturáltuk a fehérjéket. Az így elkészített mintákból azonos mennyiségeket (1 illetve 2 μ g/well) felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) (10% Mini Protean TGX gél, BioRad, Hercules, CA, USA) végeztünk 140 V konstans feszültségen. Majd a gélből a fehérjét nitrocellulóz membránra (Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Pack és Trans Blot Turbo System készülék segítségével; mind BioRad) transzferáltuk 100 V konstans feszültségen. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben 30 percig blokkoltuk, ezt követően a membránokat elsődleges TRPV3 (1:500 hígítás 5% tej PBS-ben; Novus Biologicals), IkB α , valamint p65 ellenes antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Következő lépésben a membránokat 30 percig mostuk PBST-ben (PBS 1% Tween 20-szal kiegészítve; Sigma-Aldrich), majd torna-peroxidázzal konjugált kecskében termeltetett nyúl, illetve egér elleni másodlagos IgG antitesttel (1:1000 hígítás 5% tej PBS-ben) inkubáltuk 60 percen keresztül szobahőmérsékleten. Újabb PBST-vel történő mosást követően az immunreakciók eredményét SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate-Enhanced Chemiluminescence kit (Pierce) segítségével tettük láthatóvá, a jeleket LAS-3000 Intelligent Dark Box (Fuji, Tokió, Japán), valamint KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, Tokió, Japán) készülékek felhasználásával rögzítettük. Végül az egyenlő fehérjemennyiségek

felvitelének ellenőrzésére a membránokon belső kontrollként nyúlban termeltetett β -aktin ellenes antitesttel (1:1000 hígítás 5% tej PBS-ben; Sigma-Aldrich) való inkubációt is végeztünk. Az optikai denzitás meghatározására ImageJ képelemző szoftvert (NIH, Bethesda, MA) alkalmaztunk.

Citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)

A különböző kezeléseknek kitett keratinocita sejtek által termelt és felszabadult citokinek meghatározásához a sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, majd a felszabadult citokinek mennyiségét specifikus ELISA kitek (IL-6 és IL-8, mind BD Biosciences) segítségével határoztuk meg, a gyártó protokollját követve.

A 96 lyukú lemezeket Coating pufferben (0,1 M nátrium-karbonát, pH 9,5; 10 N NaOH; Sigma-Aldrich) hígított Capture antitesttel vontuk be, melyet egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltunk. Ezt követően a lemezeket Assay Diluent (10 v/v% FBS PBS oldatban) oldattal inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A standard hígítási sort és a mintákat is Assay Diluent oldatban hígítottuk. A standard sort és a minták felvitelét követően a lemezeket 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd minden mintához Working Detector (Detektáló antitest + Sav-HRP reagens) oldatot adtunk és újabb 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Minden egyes lépést követően a lemezeket mosó pufferrel (0,05% Tween-20 PBS-ben; Sigma-Aldrich) 4-szer mostuk. Ismételt mosást követően szubsztrát reagenst (Tetramethylbenzidine (TMB), Sigma-Aldrich; és hidrogén-peroxid citrát pufferben) adtunk a lemezhez, majd 30 percig fénytől védett inkubációt követően a reakciót Stop oldat (2 N H₂SO₄) hozzáadásával állítottuk le. A reakció leállítását követő 30 percen belül az abszorbanciát 450, vagy 405 nm-en mértük. A felszabadult citokin mennyiségét standard görbe segítségével határoztuk meg pg/ml-ben.

Patch-clamp vizsgálat

A patch-clamp mérésekhez a keratinocitákat (NHEK, AD-NHEK és AD-HEK) 10 mm átmérőjű üveg fedőlemezre szélesztettük. A fedőlemezeket egy inverz mikroszkópra felszerelt perfúziós kamrába helyeztük és a sejteket folyamatosan Tyrode külső oldattal (144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glükóz; pH 7,4) perfundáltuk. Az oldatok ozmolaritását ozmométer segítségével állítottuk be (Vapro 5520, Wescor Inc., Logan, UT, USA). A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. A 2-4 M Ω ellenállású üvegpipettákat lézerhúzóval (Model P-2000, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) állítottuk elő és 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP-tartalmú belső oldattal (pH 7,2) töltöttük fel. Az ionáramok rögzítésére egy Multiclamp-700B típusú intracelluláris erősítőt (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) használtunk teljes-sejtes konfigurációban (Hamill és mtsai., 1981). A gigaseal (> 1 G Ω) ellenállást enyhe szívással, a teljes sejtes konfigurációt további enyhe szívással vagy 1,5 V-os, 1 ms-os elektromos impulzusokkal hoztuk létre. A mért ionáramokat az adott sejt kapacitására normalizáltuk, ennek meghatározásához -10 mV és -20 mV közötti depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az elektromos jeleket 10 kHz frekvenciával rögzítettük (Digidata-1440A A/D, Axon Instruments), az elemzést pClamp 10.3 szoftver (Axon Instruments) segítségével végeztük. A sejtek átlagos lineáris kapacitása $44,7 \pm 6,4$ pF, $49,6 \pm 7,7$ pF és $40,7 \pm 4,4$ pF-nak adódott NHEK (n=14), AD-NHEK (n=5) valamint AD-HEK (n=5) esetében, míg a soros ellenállás 6-10 M Ω volt, kompenzációt nem alkalmaztunk. Amennyiben a mérés során a soros ellenállás magas volt vagy megemelkedett esetleg a mért áramok instabilak voltak, a kísérlet adatait kihagytuk a további elemzésből. 1 M, dimetil-szulfoxid-ban (DMSO; Sigma-Aldrich) oldott carvacrol (Sigma-Aldrich) törzsoldat perfúzióját alkalmaztuk a 100 μ M végkoncentráció eléréséig. A DMSO végső koncentrációja

0,1 % volt, mely nem volt hatással a membránáramokra. *A patch-clamp mérések elvégzéséért köszönet illeti Kistamás Kornélt az Élettani Intézet voltPhD hallgatóját.*

Intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) meghatározása

A keratinocita sejteket 10 000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96 lyukú fekete falú, átlátszó aljú lemezekre (Greiner BioOne, Monroe, NC), majd az edényeket 24 órán át 37 °C-on tartottuk termosztátban. A mérés napján kétszeri 1 % BSA-t (Sigma-Aldrich) és 2,5 mmol/l Probenecidet (Sigma-Adrich) tartalmazó Hank oldatos (136,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81 mM $MgSO_4$, 1,26 mM $CaCl_2$, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM $NaHCO_3$; pH 7.2; mind Sigma-Aldrich) mosást követően a sejteket 1 μ mol/l kalciumérzékeny fluoreszcens Fluo-4 acetoximetilészter formájával (Fluo-4 AM Hank oldatban oldva) inkubáltuk 37 °C-on 30 percen keresztül. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk Hank oldatban. A Fluo-4 AM-mel feltöltött sejtek Ca^{2+} -jelét FlexStation II 384 (FLIPR, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) fluoreszcens microplate reader segítségével mértük. A kinetikai mérések 30. másodpercében a műszerbe épített pipettorfej segítségével automatikusan adagoltuk a sejtekhez a megfelelő koncentrációjú kezelőanyagokat. Az így bekövetkezett $[Ca^{2+}]_{IC}$ változásokat 490 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhossz mellett detektáltuk. A számításokhoz négy kísérletben mért eredmények átlagát használtuk, az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel (Borbíró és mtsai., 2011).

Életképesség meghatározása (MTT assay)

A sejtek életképességének vizsgálatakor kolorimetrás MTT assay-t (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk. A módszer alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje a sárga színű metilthiazol-tetrazólium (MTT) porban található tertrazólium gyűrűt hasítja, ennek

hatására lila színű formazán kristályok keletkeznek, melyek mennyisége savas oldásukat követően kolorimetriásan mérhető.

A sejteket 96-lyukú edényekben 10 000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük. A megfelelő farmakonok különböző koncentrációival kezelt sejtekről a mérés napján a tápoldatot eltávolítottuk, ezután minden lyukhoz 100-100 µl 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot adtunk, majd a sejteket 2 óráig 37 °C-on inkubáltuk. Az oldat eltávolítását követően minden lyukba 100-100 µl MTT szolubilizáló oldatot (81:9:10 arányban izopropanol:sósav:Triton X-100) mértünk és 5 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a koncentrációt kolorimetriás úton 550 nm-en mértük. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg.

Sejtprolifерáció vizsgálata (CyQuant assay)

A proliferáló sejtek nyomon követésére (mely az életképes sejtek arányát tükrözi) egy, a DNS tartalom meghatározásán alapuló fluoreszcens kimutatási eljárást, CyQuant assay-t (Invitrogen, Waltham, MA) alkalmaztunk.

A keratinocita sejteket 10 000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük 96 lyukú fekete falú, áttetsző aljú lemezekre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország), majd elvégeztük a különböző koncentrációjú kezeléseket. A felülúszó eltávolítását követően a lemezt -80 °C-ra helyeztük. Szobahőmérsékleten történő felolvasztást követően 200-200 µl, a gyártó protokollja szerint elkészített munkareagenst adtunk a sejtekhez. 5 perc inkubációt követően 480 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhosszokon detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást FlexStation II 384 spektrofluorométer (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) segítségével.

Apoptózis vizsgálata

Az apoptotikus folyamat megállapítására MitoProbe DilC1(5) Assay Kit-et (Life Technologies) használtunk. A mitokondriális membrán potenciál csökkenését az apoptózis korai jelének tekintjük, melyen az alábbi eljárás is alapul. A DilC1(5) festék az aktív mitokondriális membrán potenciállal rendelkező sejtek mitokondriumában akkumulálódik. Az apoptotikus folyamatok során tapasztalható mitokondriális membrán potenciál csökkenésével együtt csökken a fluoreszcencia intenzitás is, ezzel arányban nő az apoptotikus sejtek száma.

A keratinocitákat 10 000 sejt/lyuk denzitásban 96 lyukú fekete falú, áttetsző aljú lemezre (Greiner BioOne) szélesztettük, majd elvégeztük a különböző koncentrációjú kezeléseket. A felülúszó eltávolítását követően a sejteket 30 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on MitoProbe™ DilC₁(5) munkareagenssel. A fluoreszcencia detektálása 630 nm-en történő gerjesztést követően 670 nm-en történt FlexStation II 384 készülék segítségével (Molecular Devices).

Nekrotikus folyamatok vizsgálata

A nekrozissal jellemezhető sejthalál detektálására SYTOX™ Green (Life Technologies) nukleinsav jelölő festéket alkalmaztunk. Az eljárás lényege, hogy a festék méreténél fogva nem képes átjutni az ép sejtmembránon, míg a nekrotikus folyamatok során a töredezett plazmamembránon keresztül a festék képes a sejtbe penetrálni és a nukleáris DNS-hez kötődni. Ez jelentős fluoreszcencia intenzitásbeli növekedést eredményez (pozitív kontrollként a sejtek membránját lízis puffer alkalmazásával tettük átjárhatóvá, szabad utat adva ezzel a festéknek).

A keratinocitákat 10 000 sejt/lyuk denzitásban 96 lyukú fekete falú, áttetsző aljú lemezre (Greiner BioOne) szélesztettük, majd elvégeztük a különböző koncentrációjú kezeléseket. A felülúszó eltávolítását, majd a sejtek PBS-ben történő mosását követően, a

sejteket 1 μ M SYTOXTM Green reagenssel inkubáltuk 30 percen keresztül 37 °C-on. A fluoreszcencia meghatározása 545 nm gerjesztési és 590 nm emissziós hullámhossz mellett történt FlexStation II 384 készülék segítségével (Molecular Devices).

Mint láthatjuk az apoptotikus és nekrotikus folyamatok meghatározására használt módszerek azonos körülményeket kívánnak, viszont eltérő hullámhosszon gerjeszthetőek illetve detektálhatóak. Ezen tulajdonságból előnyt kovácsoltunk és a két festési eljárást szimultán alkalmaztuk.

TRPV3 RNS interferencia

A sejteket kb. 70 %-os konfluenciánál transzfektáltuk TRPV3-ra specifikus (HSS136315, HSS136316 és HSS175965), kis interferáló RNS-sel (40 nmol/l, Invitrogen) és Lipofectamin 2000 Transzfekciós Reagens (Invitrogen) felhasználásával. Kontrollként a sejteket RNAi Negative Control duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk (scrambled siRNS; Invitrogen). Az RNAi-által okozott fehérje expresszió csökkenést négy napig naponta ellenőriztük Western blot segítségével (lásd **Western blot** alfejezetben). Az immunreaktív sávok optikai denzitását a β -aktin jelre normalizáltuk, és a scrambled RNAi-kezelt sejtek értékére normalva fejeztük ki.

Statisztikai analízis

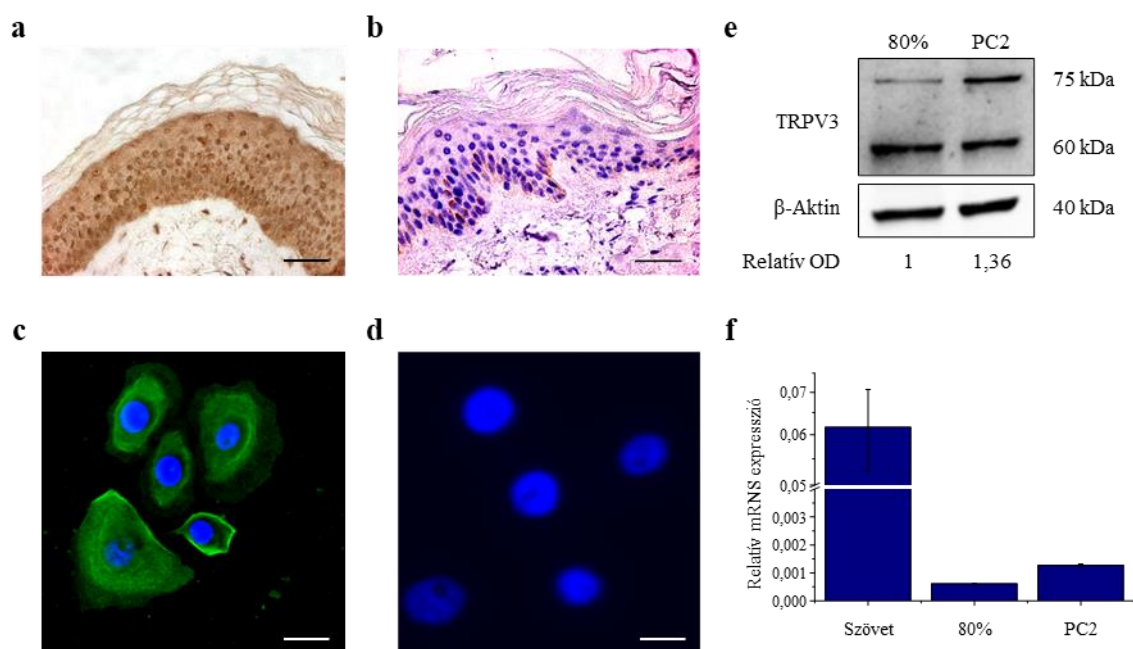
Mérési eredményeinket átlag $\pm$ SE formában, valamint a kontroll csoport százalékában adtuk meg. Hibasávban az eredmények standard hibájának átlagát (SEM) tüntettük fel, szintén a kontroll százalékában kifejezve. Az átlagok különbségét összetartozó minták esetén páros t – próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos variancia analízissel (ANOVA) vizsgáltuk, melynek során Bonferroni *post hoc* tesztet alkalmaztunk a többszörös

összehasonlításra és Dunett *post hoc* tesztet használtunk, amikor a kontroll csoporthoz viszonyítottuk az eloszlást. Az elemzésekhez SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statisztikai szoftvert használtunk. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

A TRPV3 kifejeződik a humán bőrben és primer epidermális keratinocita tenyészetben

Jelen kísérleteink során először a TRPV3 expresszióját kívántuk meghatározni humán bőrben, melyhez egészséges páciensekből származó, punch biopszia segítségével eltávolított teljes vastagságú normál bőrt használtunk. Immunhisztokémiával kimutattuk, hogy a TRPV3 elsősorban a bőr legkülső, epidermális rétegében van jelen (**10/a ábra**), melyen belül a TRPV3 homogén festődést mutat a *stratum basale* és a *stratum corneum* rétegekben.



10. ábra: A tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna kifejeződik humán bőr epidermiszében és tenyésztett normál humán epidermális keratinocytákon (NHEK) (a) TRPV3-specifikus immunreaktivitás (IR) kimutatása EnVision technikával (Agilent, Santa Clara, CA) *in situ* humán bőrön. (b) Az a panel negatív kontrollja. (c) A TRPV3 immuncitokémiával történő kimutatása primer NHEK keratinocytákon (FITC, zöld fluoreszcencia), a sejtmagokat DAPI-val vizualizáltuk (kék fluoreszcencia). (d) A c panel negatív kontrollja. Méretvonal a és b panelen: 100 µm. Méretvonal c és d panelen: 10 µm. (e) Western blot analízis. A TRPV3 fehérje expressziót különféle konfluenciákon leartott NHEK sejtek lizátumából határoztuk meg. Az egyenlő mennyiségű mintafelvitelt a β-aktin expressziójának meghatározásával értékeltük. (f) A TRPV3 mRNS transzkriptumainak kvantitatív valós idejű PCR analízise emberi bőrszöveten és különféle konfluenciákon leartott NHEK sejtek lizátumán. Átlag ± SEM. PC2: 100%-os konfluenciát követő 2. nap.

Ezekkel az adatokkal összhangban erős TRPV3 immunreaktivitás figyelhető meg normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteken immuncitokémiával (**10/c ábra**), illetve Western-blottal (**10/e ábra**) prekonfluens (80%) és posztkonfluens (PC2) sejteken egyaránt. Az

immunjelölések megítéléséhez megfelelő negatív kontrollokat alkalmaztunk (**10/b és d ábra**) (részletesen lásd *Anyagok és Módszerek* fejezetben).

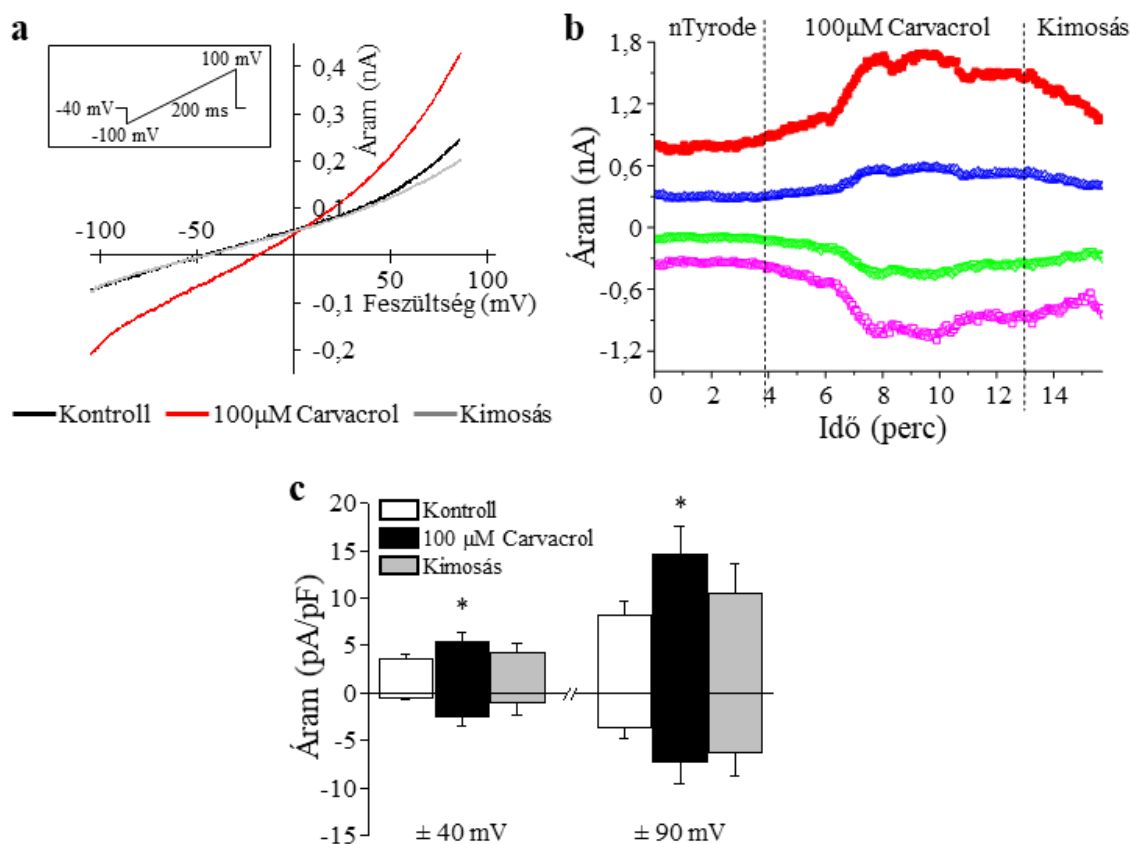
Egészséges emberi bőrből és NHEK tenyészetből kivont RNS mintákon qPCR vizsgálatokat végeztünk a TRPV3 gén expressziójának megerősítésére. Amint az a **10/f ábrán** is látható, a TRPV3 mRNS transzkriptumai egyértelműen azonosíthatók egészséges bőrben, valamint az *Anyagok és Módszerek* fejezetben bemutatott módon izolált és tenyésztett pre- és posztkonfluens primer epidermális keratinocitákon.

A TRPV3 Ca^{2+} -permeábilis ioncsatornaként működik normál humán epidermális keratinocitákon

Ezt követően a TRPV3-csatorna funkcionalitását vizsgáltuk az epidermális keratinocita sejteken, melyhez dinamikus képalkotó és elektrofiziológia kísérleteket végeztünk. A csatornafunkció vizsgálatára patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használtuk, a membránáramok vizsgálatára rámpa protokollt alkalmaztunk (**11/a és b ábra**). Kontroll esetben, kifelé egyenirányító áramot mértünk $-46,1 \pm 1$ mV átlag reverzál potenciállal (átlag $\pm$ SEM, $n = 6$). 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 $-3,6 \pm 1,1$, $-0,4 \pm 0,1$, $3,5 \pm 0,5$ és $8,2 \pm 1,4$ pA/pF (átlag $\pm$ SEM) (**11/c ábra**).

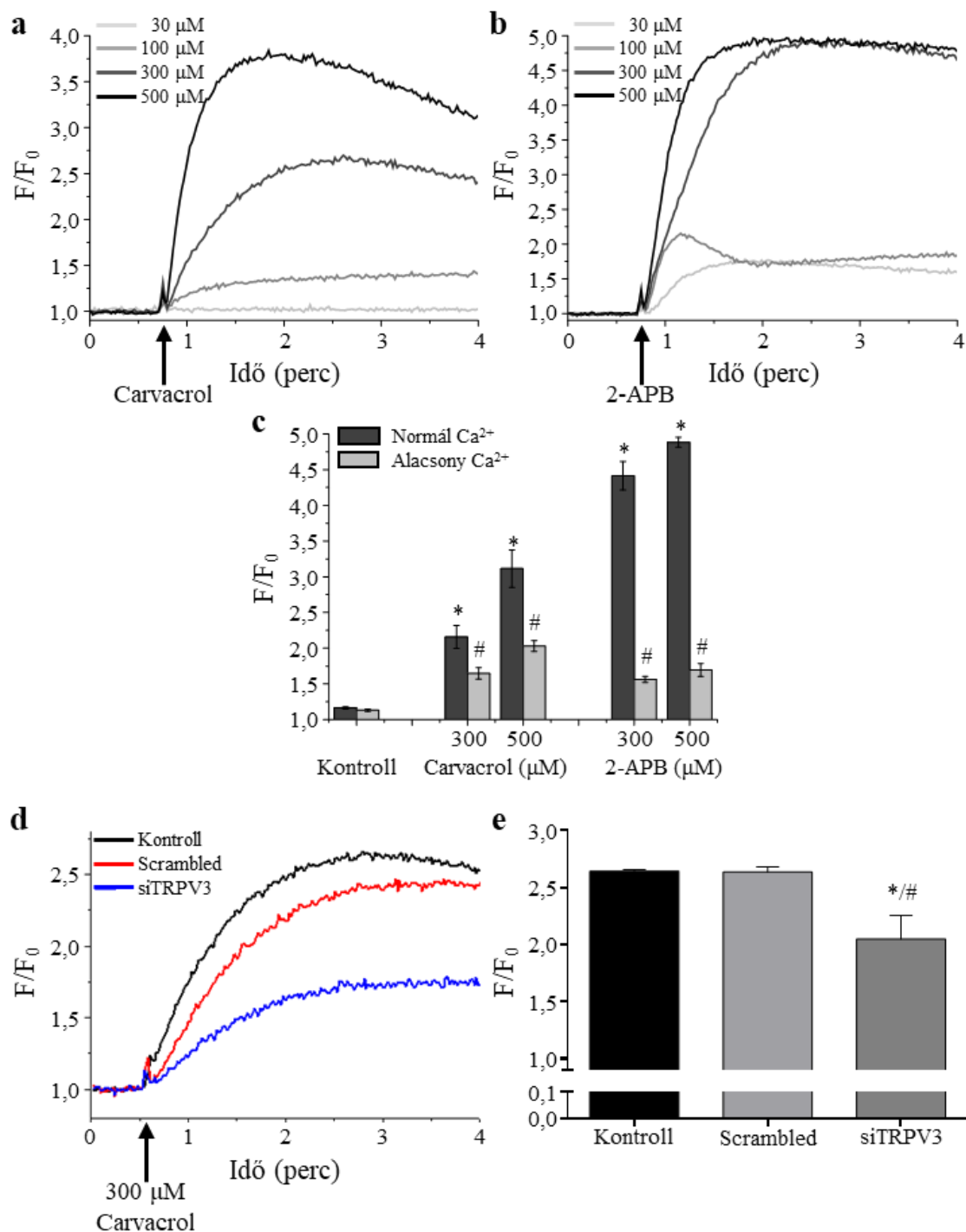
Érdekes módon, a TRPV3 agonista carvacrol $100 \mu\text{M}$ koncentrációjú kezelése jelentősen és szignifikánsan ($P < 0,05$) megnövelte mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat, amely hatás reverzibilisnek adódott (**11/a-c ábra**). Carvacrol jelenlétében a -90 , -40 ,

+40 és +90 mV-nál mért áramok a következők adódtak: $-7,2 \pm 2,3$, $-2,4 \pm 1,0$, $+5,4 \pm 1,0$ és $+14,5 \pm 3,0$ pA/pF (átlag $\pm$ SEM, n = 6).



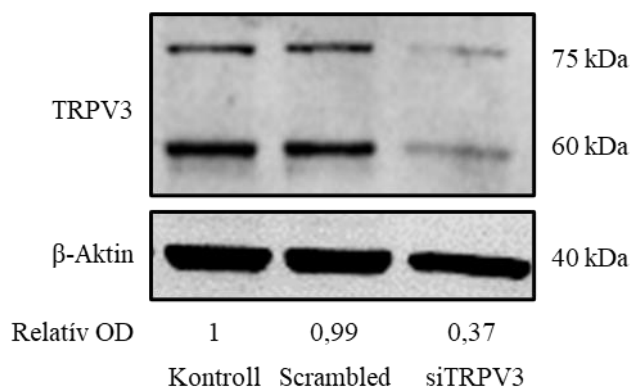
11. ábra: A Carvacrol ionáramokat hoz létre primer epidermális keratinocitákon (NHEK) (a) Patch-clamp rámpa protokollal (inert) mért áramok reprezentatív áram-feszültség görbéi. (b) 100 μ M Carvacrollal kiváltott áramok időfüggése -90 mV (üres lila négyzetek), -40 mV (üres zöld négyzetek), +40 mV (üres kék négyzetek) és +90 mV (töltött piros négyzetek) feszültségnél. (c) A membrán kapacitásra normált áramok statisztikai elemzése -40 mV (balra lent), +40 mV (balra fent), -90 mV (jobbra lent) és +90 mV (jobbra fent) feszültségnél. Átlag $\pm$ SEM, n=6. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest. Statisztikai analízis: páros t-póba.

A TRPV3 funkcionális aktivitásának további bizonyítására abból a jól ismert tulajdonságból indultunk ki, miszerint a TRPV3 (hasonlóan a legtöbb TRP-csatornához) többnyire, (de nem kizárólagosan) Ca-permeábilis csatorna (Moran és mtsai., 2011). Fluoreszcens alapú Ca^{2+} -imaging technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy a TRPV3 agonisták dózis-függő módon szignifikánsan emelték a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját (12/a-c ábra). További jelentőséggel bír, hogy $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ lecsökkentése (1,8 mM-ról 0,02 mM-ra) szinte teljes mértékben kivédte a TRPV3 agonisták $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t növelő hatását (12/c ábra), ami arra utal,



12. ábra: A TRPV3 aktivátorok hatása a primer epidermális keratinociták (NHEK) Ca^{2+} homeosztázisára (a,b) Fluo-4 AM Ca^{2+} -érzékeny festékkel töltött NHEK keratinocitákon mért $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ változások reprezentatív görbéi. A nyíl mutatja a különböző koncentrációjú TRPV3 agonista carvacrol vagy 2-APB alkalmazási időpontját normál (1,8 mM) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ mellett. (c) A TRPV3 agonisták által kiváltott Ca^{2+} jelek maximális amplitúdóinak statisztikai elemzése normál (1,8 mM) vagy alacsony (0,02 mM) Ca^{2+} tartalmú oldatban. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel, #: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest, *: $p < 0,05$ a kizárólag aktivátorral kezelt csoporthoz képest (1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ $n > 3$). (d) Fluo-4 AM Ca^{2+} -érzékeny festékkel töltött NHEK keratinocitákon mért $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ változások reprezentatív görbéi. A nyíl mutatja a 300 μM carvacrol alkalmazási időpontját normál (1,8 mM) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ mellett. (e) 300 μM carvacrol által kiváltott Ca^{2+} jelek maximális amplitúdóinak statisztikai elemzése kontroll, scrambled és TRPV3 specifikus siRNS-sel transzfektált sejteken. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel, *: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest, #: $p < 0,05$ a scrambled csoporthoz képest, $n > 3$. Statisztikai analízis: páros t-póba.

hogy ezek az ágensek valóban a sejtfelszíni membránban lévő Ca^{2+} -permeábilis csatornákat nyitják. Ezeket a megállapításokat siRNS technikával is alátámasztottuk: a *Trpv3* gén csendesítése (**13. ábra**) jelentősen csökkentette a carvacrol által kiváltott Ca jelet (**12/d-e ábra**).

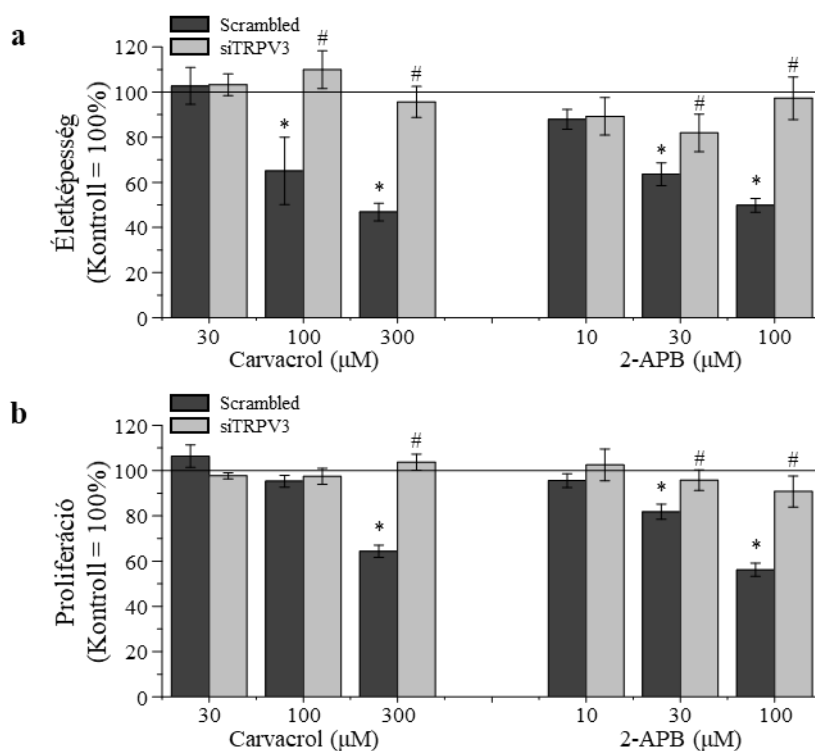


13. ábra: A TRPV3 siRNS általi géncsendesítése Western blot analízis. A TRPV3 siRNS általi géncsendesítés fehérje expressziójának kimutatása NHEK sejteken. Az egyenlő mennyiségű mintafelvitelt a β -aktin expressziójának meghatározásával értékeltük.

A teljes-sejtes konfigurációjú patch-clamp, valamint a fluoreszcens alapú Ca^{2+} -mérési adatok egyöntetűen azt a tényt támasztják alá, miszerint a TRPV3 ioncsatorna valóban funkcionálisan aktív formában expresszálódik a primer epidermális keratinocitákon. Itt leginkább Ca^{2+} -ra permeábilis non-szelektív kationcsatornaként működik a sejtek plazmamembránjában, hasonlóan a már korábban leírt humán külső gyökérhüvely keratinocitákon és egér epidermális keratinocita populációkon (Peier és mtsai., 2002; Chung és mtsai., 2004a, 2004b; Huang és mtsai., 2008; Cheng és mtsai., 2010; Borbíró és mtsai., 2011).

A TRPV3-aktiváció gátolja a proliferációt és sejthalált indukál normál humán epidermális keratinocitákon

Ezt követően a TRPV3 aktiválásának sejtszintű hatásait vizsgáltuk a növekedés és túlélés szempontjából a humán epidermális keratinocita tenyészeteken. A sejteket a növényi eredetű carvacrol és a szintetikus 2-APB TRPV3 agonistákkal kezeltük (Chung és mtsai., 2004a; Xu és mtsai., 2006), mely során azt találtuk, hogy mind a carvacrol, mind a 2-APB dózis-függő módon csökkentették az NHEK sejtek életképességét és proliferációját (14/a és b ábra).

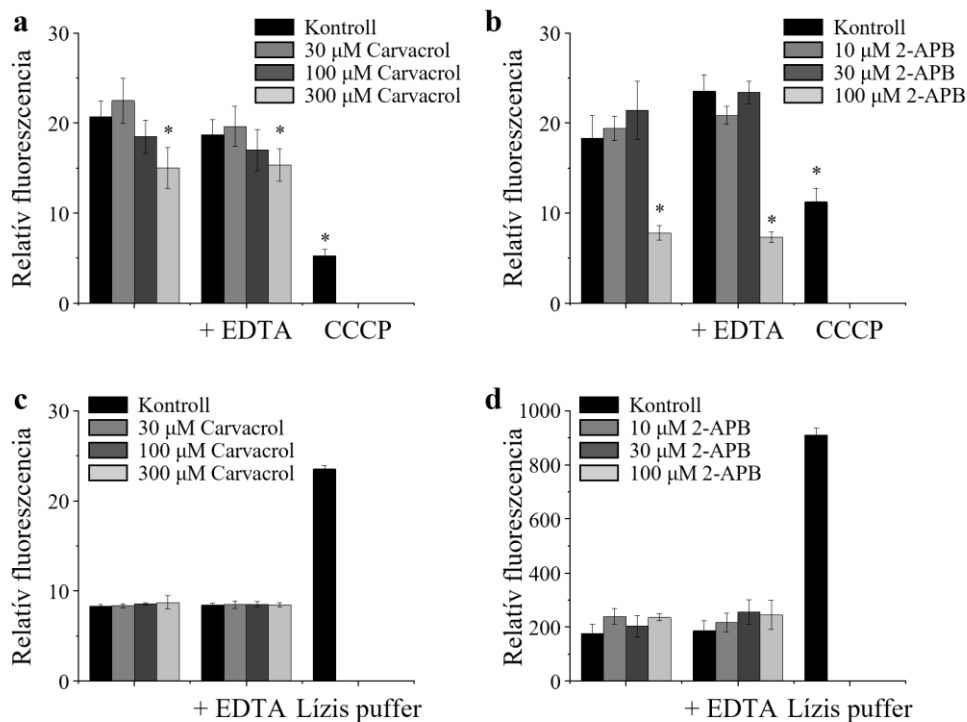


14. ábra: A TRPV3 aktivációja csökkenti a normál humán epidermális keratinociták (NHEK) életképességét és gátolja a proliferációt Az NHEK keratinocitákat különböző koncentrációjú TRPV3 aktivátorokkal kezeltük 24 órán át. **(a)** Az életképesség meghatározása kolorimetriás MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólium bromid) assay-vel. **(b)** A proliferáció mértékének meghatározása fluorimetriás CyQuant assay segítségével. Az értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel, a kezeletlen scrambled kontroll %-ában. *: $p < 0,05$ a kezeletlen scrambled kontrollhoz képest, #: $p < 0,05$ a TRPV3 aktivátorral (carvacrol vagy 2-APB) kezelt scrambled csoporthoz képest. Statisztikai analízis: páros t-póba.

Számos bizonyíték utal arra, hogy a fent említett szerek más TRP-csatornákat is képesek aktiválni (Xu és mtsai., 2006; Bíró és mtsai., 2007). Továbbá a TRPV3 farmakológiai vizsgálatát tovább nehezíti, hogy hiányoznak a kellőképpen szelektív és kereskedelmi

forgalomban kapható TRPV3 antagonisták. Ezért a carvacrol és 2-APB TRPV3 specifikus hatását RNS interferencia technika alkalmazásával ellenőriztük és értékeltük (**13. ábra**), amit a korábbi tanulmányainkban kidolgozott technikáknak megfelelően végeztünk és különféle humán bőrsejt eredetű tenyészeteken optimalizáltunk (Dobrosi és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2009; Borbíró és mtsai., 2011; Szöllősi és mtsai., 2013; Oláh és mtsai., 2014). Eredményeinkkel párhuzamosan azt kaptuk, hogy a TRPV3 sikeres géncsendesítése szinte teljes mértékben képes volt kivédeni a fent említett káros hatásokat az életképesség és proliferáció tekintetében (**14/a és b ábra**), mely alapján arra következtethetünk, hogy ezek az agonisták valóban TRPV3 mediált jelátviteli útvonalon keresztül módosítják a sejtek életképességét és növekedését.

A sejthalál pontos formáját is megvizsgáltuk a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének vizsgálatán keresztül, mely az apoptózis egyik korai jele, valamint a membrán integritás vizsgálatával a nekrozis kizárására. Kombinált DilC₁(5) – SYTOX Green festést alkalmazva megállapítottuk, hogy mind a carvacrol (300 µM), mind a 2-APB (100 µM) magas koncentrációban alkalmazva szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciált (**15/a és b ábra**), ugyanakkor nem okozott SYTOX Green felhalmozódást (**15/c és d ábra**). Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a TRPV3-ioncsatorna aktivációja apoptotikus sejthalálhoz vezet. Továbbá a calcium kötő EDTA alkalmazása nem befolyásolta a megfigyelt hatásokat (**15/a-d ábra**), mely arra enged következtetni, hogy a carvacrol és 2-APB ezen hatása nem függ az extracelluláris térből történő Ca²⁺ mobilizációtól.

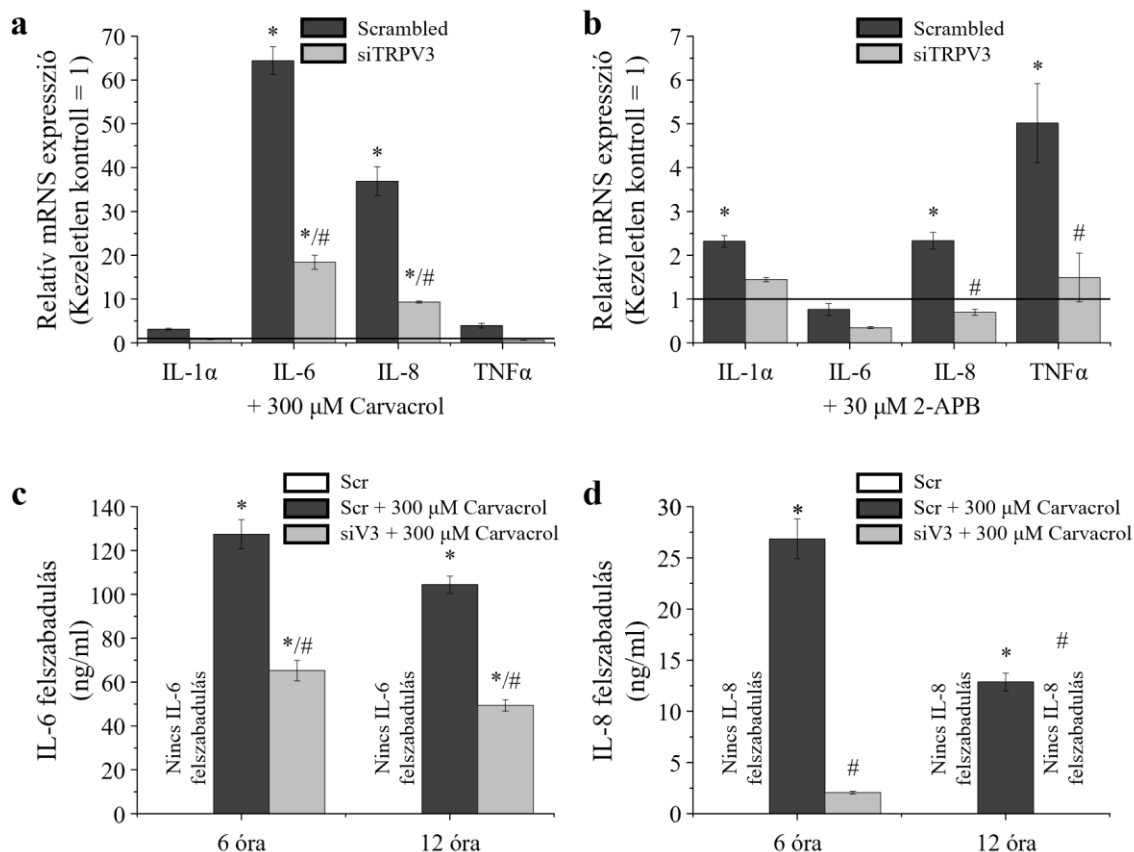


15. ábra: A TRPV3 aktivátorok hatása az NHEK sejtek apoptotikus és nekrotikus folyamataira A normál humán epidermális keratinocitákat különböző koncentrációjú TRPV3 aktivátorokkal kezeltük 24 órán keresztül 1,8 mM Ca^{2+} koncentrációjú tápoldatban. Az apoptotikus folyamatokat $\text{DiIc}_1(5)$ mitokondriális membránpotenciál-érzékeny festékkel (a,b), a nekrotikus folyamamtokat SYTOX Green-nel követtük nyomon (c,d). A mitokondriális membránpotenciál csökkenést kiváltó apoptotikus folyamat pozitív kontrolljaként karbonil-cianid-3-klorofenil-hidrazont (CCCP), míg a nekrotikus sejthalál pozitív kontrolljaként lízis puffert alkalmaztunk. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. *: $p < 0,05$ a kezeletlen kontrollhoz képest. Statisztikai analízis: páros t-póba.

A TRPV3 aktiváció erős proinflammatorikus választ vált ki

Mivel a 24 órás kezelések csökkentik a sejtek életképességét és proliferációját, következő lépésben a TRPV3 aktiváció celluláris hatásait rövid távú kísérletekben vizsgáltuk. A vizsgálat során a kulcsfontosságú proinflammatorikus citokinek (IL-1 α , IL-6, IL-8 és tumor nekrosis faktor- α (TNF α)) expressziós változásait követtük nyomon, mivel korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a TRPV3 aktiváció és „gain-of-function” mutációi kifejezett bőrgyulladást eredményeznek mind emberben, mind egerekben (Yoshioka és mtsai., 2009; Danso-Abeam és mtsai., 2013). Kísérleteink során azt találtuk, hogy a TRPV3 agonisták szignifikáns módon fokozták a proinflammatorikus citokinek expresszióját (16/a és b ábra), továbbá figyelemre méltó IL-6 és IL-8 felszabadulást váltottak ki az epidermális keratinocitákon (16/c és d ábra). Hasonlóan a már fentebb említett életképességre és

proliferációra gyakorolt hatásoknál, jelen esetben is a TRPV3 szelektív géncsendesítése szinte teljes mértékben képes volt kivédeni a vizsgált citokinek up-regulációját és felszabadulását (16/a-d ábra), ami azt jelzi, hogy a carvacrol és a 2-APB proinflammatorikus hatásai valóban TRPV3 aktiváción keresztül valósulnak meg.

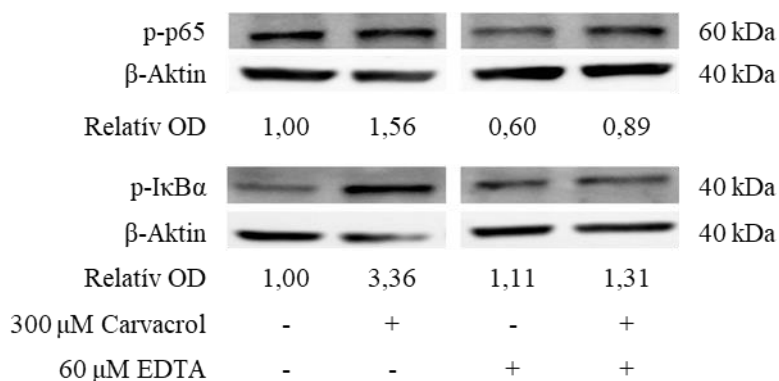


16. ábra: A TRPV3 aktiválása proinflammatorikus citokin felszabadulást indukál a normál humán epidermális keratinocitákon (NHEK) (a,b) Proinflammatorikus citokinek (IL-1α, IL-6, IL-8, TNFα) mRNA transzkriptumainak kvantitatív valós idejű PCR analízise NHEK sejtek TRPV3 aktivátorokkal (300 μM Carvacrol vagy 30 μM 2-APB) történő 3 órás kezelését követően. A kezeletlen scrambled kontrollra normált értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel. (c,d) A felszabadult citokin mennyiségének meghatározása NHEK sejtek 300 μM Carvacrollal végzett kezelését követően 6 és 12 órával. Az értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel. *: p<0,05 a kezeletlen scrambled kontrollhoz képest, #: p<0,05 a TRPV3 aktivátorral (carvacrol vagy 2-APB) kezelt scrambled csoporthoz képest. Statisztikai analízis: páros t-póba.

A TRPV3 indukálta proinflammatorikus hatások az NF-κB jelátviteli útvonalat érintik

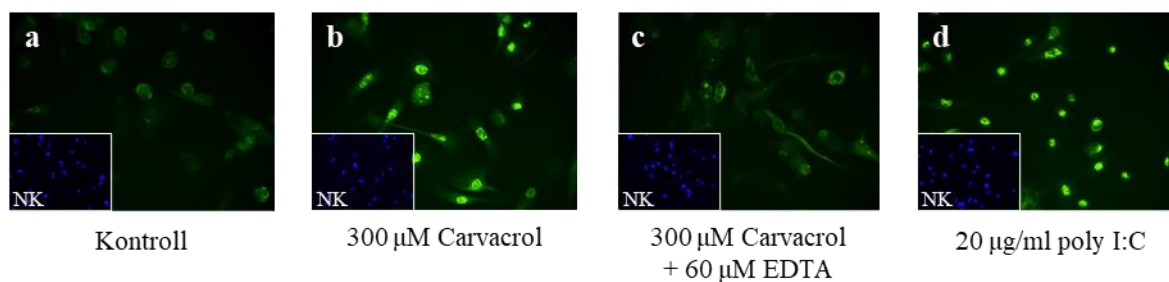
Ezt követően célul tűztük ki az intracelluláris jelátviteli útvonal azonosítását, melyen keresztül megvalósulhatnak a TRPV3 aktiváció okozta proinflammatorikus hatások. Ismert, hogy az NF-κB útvonal aktivációja fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatok szabályozásában (Wullaert és mtsai., 2011), ezért megvizsgáltuk ezt a mechanizmust. 30 perces

carvacrol kezelés indukálta (ennél fogva inaktiválta) a gátló I κ B α foszforilációját, valamint indukálta (és ezáltal aktiválta) a p65 NF- κ B izoforma foszforilációját. Mindkét említett hatás kivédhető volt EDTA alkalmazásával (**17. ábra**).



17. ábra: A TRPV3 aktiváció okozta proinflammatorikus hatások esetleges intracelluláris jelátviteli útvonalának azonosítása 300 μ M Carvacrol, 60 μ M EDTA vagy ezek kombinációjával 30 percen keresztül kezelt NHEK sejtek lizátumának Western blot analízise. A p-p65 és p-I κ B α sávok optikai denzitását a megfelelő β -aktin jelekre normalizálva tüntettük fel. OD: optikai denzitás

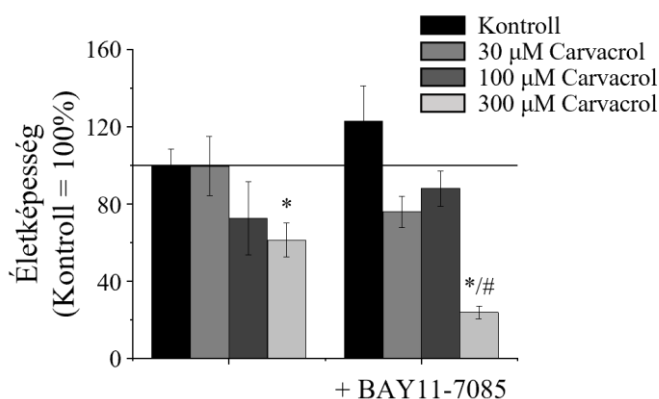
Az NF- κ B út vonal aktiválásának egyik jellemzője a p65 transzlokációja a sejtmagba. Western blot adataink alátámasztására, ezt a folyamatot primer epidermális keratinocita sejteken is megvizsgáltuk (**18/a-d ábra**). A kezeletlen kontrollhoz képest (**18/a ábra**) 300 μ M carvacrol kezelés szignifikánsan fokozta a nukleáris festődést (**18/b ábra**), hasonlóan a pozitív kontrollként használt TLR-3 agonista poly I:C-hez (**18/c ábra**), mely ismert NF- κ B transzlokáció induktor keratinocitákban (Takai és mtsai., 2014).



18. ábra: A TRPV3 aktiválása a p65 transzlokációját okozza a sejtmagba A p65 immunfluoreszcens jelölése NHEK sejtekben a fehérje sejtmagi transzlokációjának kimutatására. A sejteket 30 percen át kezeltük 300 μ M Carvacrollal, 60 μ M EDTA-val, a kettő kombinációjával és pozitív kontrollként a TLR3 aktivátor 20 μ g/ml poly I:C-vel. Inzert: egyidejű magfestés DAPI-val. NK: negatív kontroll.

Eddigi eredményeink azt bizonyítják, hogy a TRPV3 egy funkcionálisan aktív, calcium permeábilis kation-csatorna keratinocitákban, továbbá a $[Ca^{2+}]_{EC}$ eltávolítása EDTA alkalmazásával megszünteti az NF- κ B aktivációját, ezáltal feltételezhető, hogy a TRPV3 aktiváció az előbb említett útvonal beindításához vezet. Ezek a megállapítások együttesen a mellett érvelnek, hogy az NF- κ B jelátviteli útvonal döntő szerepet játszik a TRPV3 aktiválta gyulladásos folyamatokban humán epidermális keratinocitákon.

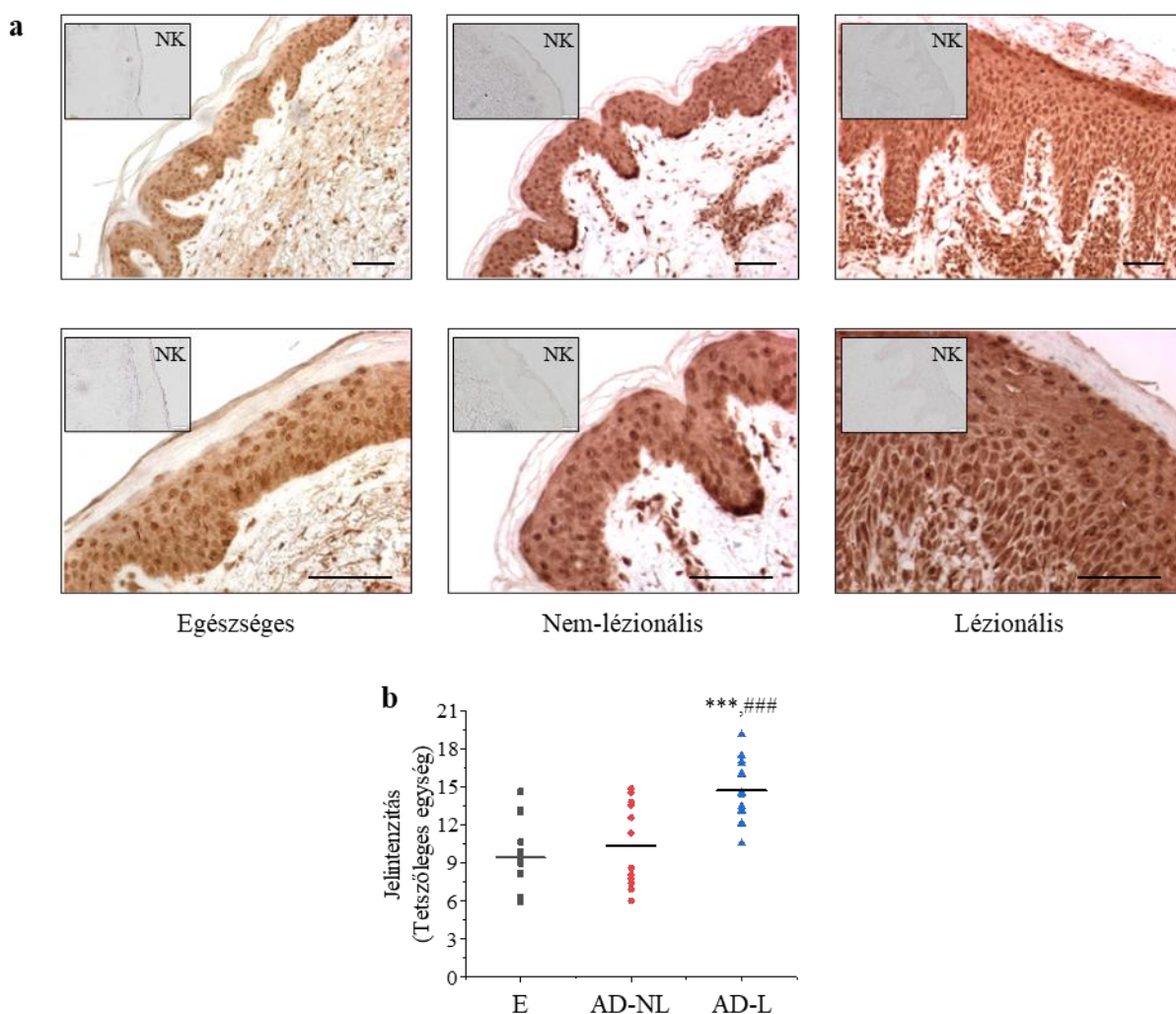
Mivel az NF- κ B útvonaltól ismert, hogy elősegíti a sejtek túlélését keratinocitákban (Qin és mtsai., 1999), eredményeink pedig igazolták, hogy a TRPV3 aktiváció csökkenti a sejtek proliferációját és életképességét (13/a és b ábra), ezért szerettük volna megvizsgálni az NF- κ B útvonal szerepét ezekben a folyamatokban. Kérdésünk megválaszolására megvizsgáltuk, hogy a BAY11-7085 NF- κ B inhibitor hatással van-e korábbi eredményeinkre. Amint az a 19. ábrán is látható, az inhibitor alkalmazása a TRPV3 aktivátor carvacrollal kombinációban tovább csökkentette a sejtek életképességét. Ez arra enged következtetni, hogy a TRPV3 aktivációja több, mint egy jelátviteli útvonalat aktivál, illetve az NF- κ B aktiválása részben ellensúlyozza a carvacrol életképességre gyakorolt negatív hatását.



19. ábra: Az NF- κ B útvonal gátlása a TRPV3 aktiválásával párhuzamosan tovább csökkenti a normál humán epidermális keratinociták (NHEK) életképességét A normál humán epidermális keratinocitákat különböző koncentrációjú TRPV3 aktivátorokkal és a BAY11-7085 NF- κ B inhibitorral kombinációban kezeltük 24 órán keresztül 1,8 mM Ca^{2+} koncentrációjú tápoldatban. Az életképesség meghatározása kolorimetriás MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólium bromid) assay-vel történt. Az értékeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. *: $p < 0,05$ a kezeletlen kontrollhoz képest, #: $p < 0,05$ az ekvimoláris TRPV3 aktivátorral stimulált, NF- κ B inhibitorral kezelt csoporthoz képest. Statisztikai analízis: páros t-póba.

A TRPV3 expressziója szignifikánsan megemelkedett AD-s betegek szövet mintáiban

Miután bebizonyítottuk, hogy a TRPV3 funkcionálisan aktív formában van jelen primer epidermális keratinocitákon, továbbá a csatorna aktivációja proinflammatorikus folyamatokat indukál, kísérleteink következő fázisában a TRPV3 szerepét szeretnénk volna vizsgálni az egyik leggyakoribb gyulladásos bőrbetegségben, az AD-ben. Mindemellett különös hangsúlyt fektettünk nemcsak a lézionális területek vizsgálatára, hanem a betegek nem-lézionális területeit is megvizsgáltuk.



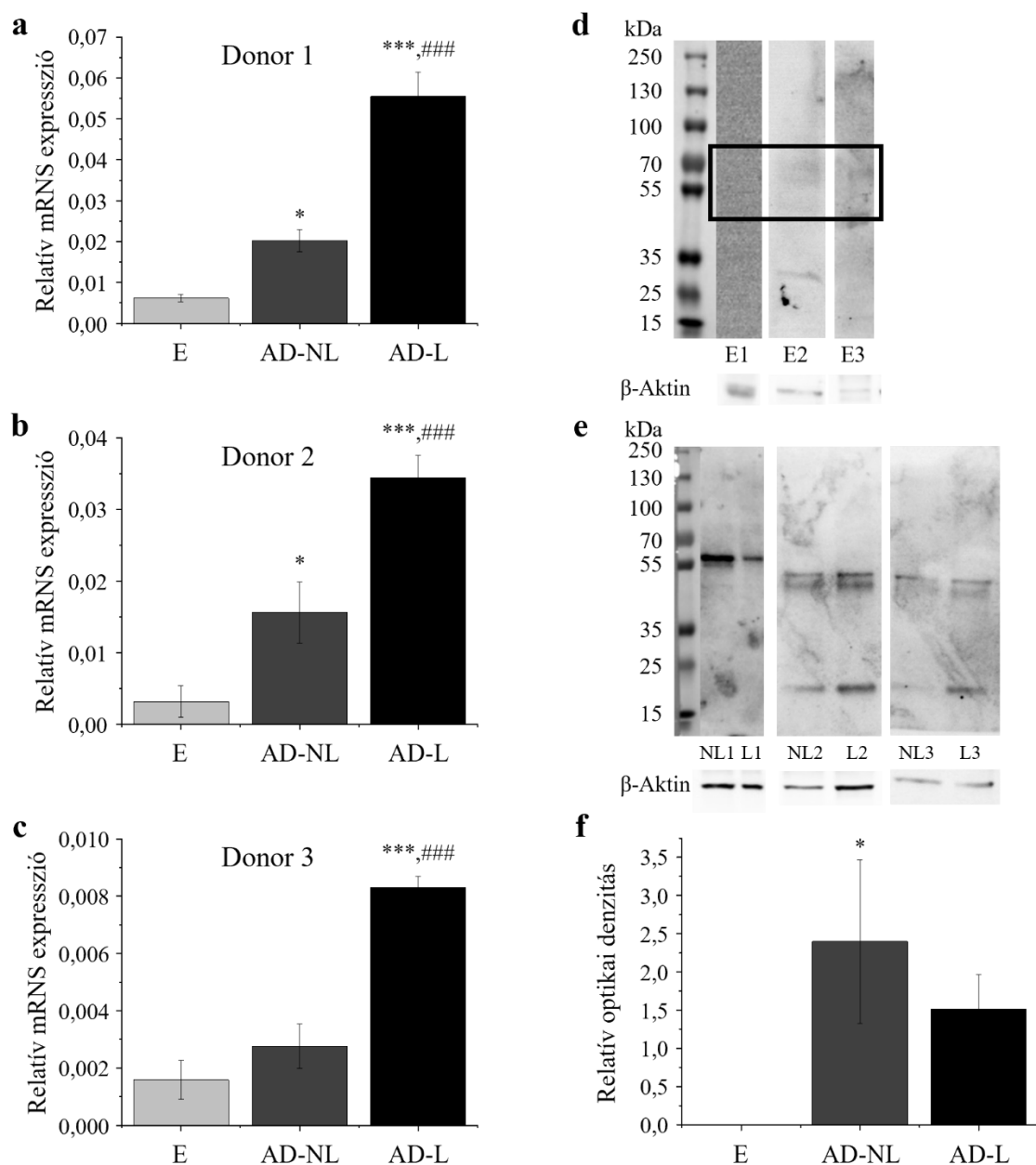
20. ábra: A TRPV3 expressziója szignifikánsan megnövekedett AD-s betegek szövetmintáiban (a) TRPV3-specifikus immunreaktivitás (IR) kimutatása egy-egy reprezentatív egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s bőrmetszeten. Nagyítás: 200x (felső sor) és 400x (alsó sor). Méretvonal felső és alsó soron: 50 μ m. (b) A TRPV3 immunreaktivitás szemikvantitatív elemzése csoportonként 14 szövettani metszeten. Az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel, ***: $p < 0,001$ az egészséges csoporthoz képest, ###: $p < 0,001$ a nem-lézionális csoporthoz képest. NK: negatív kontroll, E: egészséges, AD-NL: AD-s beteg nem-lézionális bőrterülete, AD-L: AD-s beteg lézionális bőrterülete. Statisztikai analízis: Bonferroni post hoc teszt

Először TRPV3 immunfestést végeztünk AD-s betegek (n=14) lézionális (AD-L) és nem-lézionális (AD-NL) bőrterületéről nyert mintáin, valamint egészséges (E) önkéntesek (n=14) punch biopsziával nyert mintáin. A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan azt találtuk (Yamamoto-Kasai és mtsai., 2013; Seo és mtsai. 2020; Larkin és mtsai., 2021), hogy a TRPV3 protein expresszió szignifikánsan magasabb volt a lézionális területeken az egészséges kontrollokhoz képest (**20/a és b ábra**), továbbá új eredmény, hogy a nem-lézionális területekhez képest is magasabb kifejeződést mutatott. Ezen kívül, bár nem szignifikánsan, de a TRPV3 expresszió emelkedő tendenciája volt megfigyelhető a nem-lézionális területen az egészséges kontroll mintákkal összehasonlítva.

A TRPV3 molekuláris vizsgálatok során fokozott expressziót mutat AD-s betegek „epidermális szövetében”

Munkánk során lehetőségünk volt 3 AD-s páciensből érzéstelenítést követően borotva segítségével csupán az epidermális réteg eltávolításával mintát nyernünk, mind a lézionális, mind a nem érintett bőrterületekről, valamint 3 egészséges donortól is. Ezeket a mintákat 3 részre osztottuk: két részt azonnal feldolgoztunk és Western blot, valamint qPCR vizsgálattal kvantitatív fehérje és mRNS szintű expresszió meghatározást végeztünk az „epidermális szövetből”, míg a harmadik részből *in vitro* epidermális keratinocita tenyészeteket készítettünk. Ezt követően a tenyésztett sejteken további molekuláris (Western blot és qPCR) és funkcionális (patch-clamp) vizsgálatokat végeztünk a TRPV3 kifejeződésének pontosabb feltérképezésére.

qPCR vizsgálat során kiderült, hogy a TRPV3 mRNS szintű expressziója mindhárom donor esetén szignifikánsan magasabb volt a lézionális szövetben, az egészséges és a nem-lézionális epidermális szövethez képest egyaránt (**21/a-c ábra**).



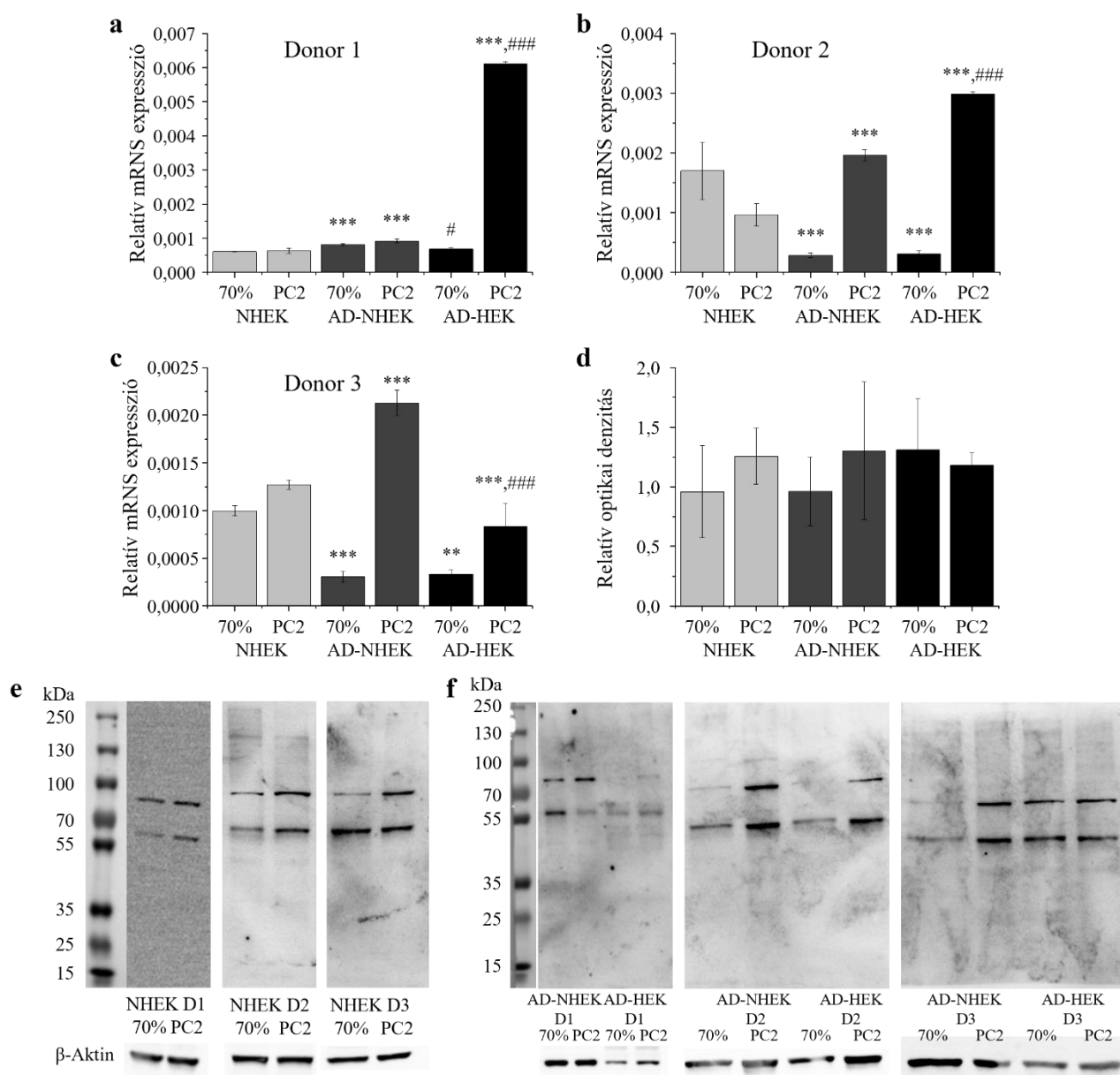
21. ábra: TRPV3 mRNS és fehérje szintű expressziója egészséges és AD-s betegek szövetmintáiban (a-c) A TRPV3 mRNS transzkriptumainak kvantitatív valós idejű PCR analízise egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s bőrszöveten 3 donorból. Az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel. **(d,e)** Western blot analízis. A TRPV3 fehérje expressziót egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s bőrszöveten határoztuk meg 3 donorból. Az egyenlő mennyiségű mintafelvitelt a β -aktin expressziójának meghatározásával értékeltük. **(f)** A TRPV3 sávok optikai denzitását a megfelelő β -aktin jelekre normalizáltuk. Az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ az egészséges csoporthoz képest, ###: $p < 0,001$ a nem-lézionális csoporthoz képest. E: egészséges, AD-NL: AD-s beteg nem-lézionális bőrterülete, AD-L: AD-s beteg lézionális bőrterülete. Statisztikai analízis: Bonferroni post hoc teszt.

Kiemelendő, hogy 2 donor esetén a nem-lézionális szövetben is szignifikánsan magasabb mRNS szintű expresszió látható az egészséges kontrollokhoz képest (**21/a és b ábra**), a 3. esetben pedig emelkedő tendencia volt megfigyelhető (**21/c ábra**). Érdekes módon Western blottal a TRPV3 fehérje szintű expressziója a detekciós szint alatt volt az egészséges donorok esetén (**21/d ábra**). Ezzel szemben, markáns jelet sikerült detektálnunk mindhárom AD-s beteg szövetmintáiból, melyekben a nem-lézionális régiókban szignifikánsan magasabb TRPV3 fehérje szintű expresszió látszott az érintett régiókhoz képest (**21/e-f ábra**). Tudomásunk szerint, ez az első olyan kísérleti eredmény, mely azt mutatja, hogy a TRPV3 nem csak a lézionális, hanem a nem-lézionális epidermiszben is overexpresszálódik.

A TRPV3 sejt szinten is emelkedett expressziót mutat AD-s betegek keratinocitáiban

Új eredményeinket *in vitro* kísérletekkel erősítettük meg, melyekben prekonfluens (70%-os konfluencia) és posztkonfluens (PC2= konfluenciát követő 2. nap) tenyészetekkel dolgoztunk. Érdekes módon, a prekonfluens (proliferáló) kultúrákban 1 donor esetén a TRPV3 mRNS szintű expressziója az egészséges kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb volt az AD-NHEK sejtekben (**22/a ábra**), de az AD-HEK sejtekben nem (**22/a-c ábra**), továbbá a másik 2 donornál mind az AD-NHEK, mind az AD-HEK sejtekben szignifikánsan alacsonyabb mRNS szintű expresszió volt az egészséges keratinocita tenyészetekhez képest (**22/a-c ábra**). Ezzel szemben, jelentős volt a kontraszt a posztkonfluens, differenciált tenyészetekben (melyek sokkal inkább modellezik az *in vivo*-szerű körülményeket az epidermiszben, mint a prekonfluens tenyészetek), miszerint a TRPV3 mRNS szintű expressziója szignifikánsan magasabb volt AD-NHEK sejtekben mindhárom donorban és az AD-HEK donorok 2/3-ában, mint az egészséges keratinocitákban (**22/a-c ábra**). Továbbá 2 donorban a TRPV3 expresszió szignifikánsan magasabb volt a lézionális keratinocitákban, mint a nem-lézionális sejtekben

(22/a és b ábra), míg a 3. donorban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nem-lézionális és egészséges keratinocitákban (22/c ábra).

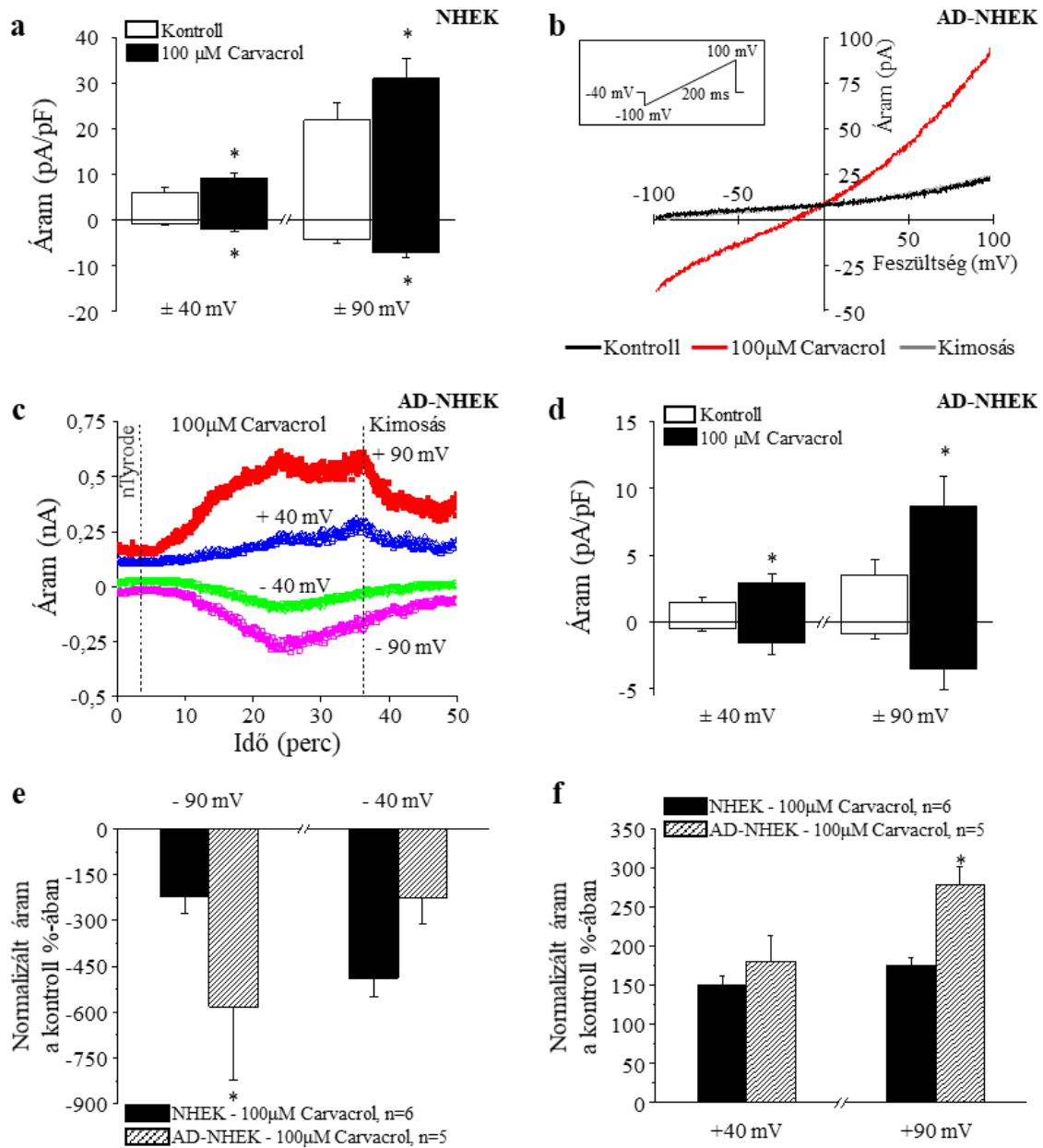


22. ábra: TRPV3 mRNA és fehérje szintű expressziója egészséges és AD-s betegekből izolált keratinocita tenyészeteken (a-c) A TRPV3 mRNA transzkriptumainak kvantitatív valós idejű PCR analízise egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s keratinocita tenyészeteken 3 donorból. Az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel. (d) A TRPV3 sávok optikai denzitását a megfelelő β -aktin jelekre normalizáltuk. Az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel. (e,f) Western blot analízis. A TRPV3 fehérje expressziót egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s keratinocitákon határoztuk meg 3 donorból. Az egyenlő mennyiségű mintafelvitelt a β -aktin expressziójának meghatározásával értékeltük. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ az egészséges csoporthoz képest, ####: $p < 0,001$ a nem-lézionális csoporthoz képest. NHEK: normál humán epidermális keratinocita, AD-NHEK: AD-s beteg nem-lézionális bőrterületéről izolált normál humán epidermális keratinocita, AD-HEK: AD-s beteg lézionális bőrterületéről izolált humán epidermális keratinocita, PC2: 100%-os konfluenciát követő 2. nap. Statisztikai analízis: Bonferroni post hoc teszt.

Érdekes módon, a szövetmintákból kapott Western blot eredményekkel ellentétében, az egészséges epidermális keratinocita tenyészetek jelentős mennyiségben detektálható fehérje szintű TRPV3-at expresszálnak (**22/e ábra**), de még fontosabb, hogy ez az expressziós szint statisztikailag nem mutatott szignifikáns különbséget az AD-s beteg lézionális és nem-lézionális eredetű tenészetektől, függetlenül azok proliferációs (prekonfluens) vagy differenciált (posztkonfluens) állapotától (**22/d-f ábra**).

A TRPV3 funkcionálisan is szignifikáns túlműködést mutat AD-s betegekben

Annak bizonyítására, hogy a TRPV3 funkcionálisan is overexpresszálódik AD-s bőrben, patch-clamp kísérletek elvégzésére törekedtünk egészséges, lézionális és nem lézionális epidermális keratinocitákon. A patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használva, valamint a már korábban ismertetett primer epidermális keratinocitákon kapott eredményeinket - miszerint a TRPV3 agonista carvacrol mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat megnövelte -, jelen vizsgálatainkban is megerősítettük és kiterjesztettük az AD-s tenyészetekre (**23/a ábra**). Sajnálatos módon nem tudtunk stabil áramot létrehozni AD-HEK sejteken (annak ellenére, hogy több mint 150 sejten próbálkoztunk 3 különböző donorból), vélhetően ezen keratinocita sejtek fokozott sérülékenysége miatt (Blume-Peytavi és mtsai., 2016). Azonban a nem-lézionális keratinocitákon az egészséges keratinocitákhoz hasonlóan azt láttuk, hogy mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramok jelentősen és szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövekedtek a TRPV3 agonista 100 μM carvacrol alkalmazása során, amely hatás alapos kimosás után reverzibilisnek bizonyult (**23/b és c ábra**). Az áramokat 4 különböző membránpotenciálon (-90, -40, +40 és +90 mV) mértük és normalizáltuk az aktuális sejtmembrán kapacitásra NHEK (**23/a ábra**) és AD-NHEK (**23/b ábra**) esetén is.



23. ábra: A Carvacrol szignifikánsan magasabb ionáramokat hoz létre AD-s keratinocitákon (a,d) A membrán kapacitásra normált áramok statisztikai elemzése -40 mV (balra lent), $+40$ mV (balra fent), -90 mV (jobbra lent) és $+90$ mV (jobbra fent) feszültségnél kontrollban (üres oszlopok) és $100 \mu\text{M}$ Carvacrol után (fekete oszlopok) NHEK (a) és AD-NHEK (d) sejteken. Átlag $\pm$ SEM, $n=14$ az NHEK és $n=4$ az AD-NHEK esetében. (b) Patch-clamp rámpa protokollal (inset) mért áramok reprezentatív áram-feszültség görbéi kontroll (fekete), $100 \mu\text{M}$ Carvacrol (piros) és kimmás után (szürke) AD-NHEK sejteken. (c) $100 \mu\text{M}$ Carvacrollal kiváltott áramok időfüggése -90 mV (üres lila négyzetek), -40 mV (üres zöld négyzetek), $+40$ mV (üres kék négyzetek) és $+90$ mV (töltött piros négyzetek) feszültségnél. A szaggatott vonalak a kísérleti körülmények változásait mutatják. (e,f) Az átlagértékek az áramok változását mutatják $100 \mu\text{M}$ carvacrol kezelés után. A fekete oszlopok az NHEK, míg a vonalas oszlopok az AD-NHEK-sejteket mutatják. Az áramok a kontroll százalékában jelennek meg, ahol (e) a -90 mV és -40 mV, míg az (f) a $+40$ mV és a $+90$ mV áramokat mutatja. Az értékek átlag $\pm$ SEM, $n=6$ az NHEK és $n=5$ az AD-NHEK esetében. *: $p < 0,05$ a kontroll vagy NHEK csoportokhoz képest. Statisztikai analízis: páros t-próba.

Az áramerősségek statisztikai analízise szignifikáns áramerősséget mutatott mindkét sejttípusban +40 és + 90 mV mellett, míg ez a változás -40 és -90 mV-nál csak az NHEK sejteken volt szignifikáns (valószínűleg a nagyobb mintaszám miatt az NHEK csoportban) **(23/a és d ábra)**. A legfontosabb, hogy a carvacrol által kiváltott normalizált áramok szignifikánsan magasabbak voltak (-90 és +90 mV-on) AD-NHEK sejteken, mint az NHEK sejteken **(23/e és f ábra)**, ami arra utal, hogy a TRPV3 funkcionálisan túlműködést mutat a nem-lézionális sejtekben a primer egészséges keratinocitákhoz képest.

MEGBESZÉLÉS

A tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) egy nem szelektív, kalcium-permeabilis csatorna; elsőként egér epidermális keratinocitákon azonosították és természetes aktivátora a fiziológiás hőtartomány (33-37 °C) (Peier és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2002). A csatorna felfedezésekor az első jellemzői közt megemlíthető, hogy működése más TRPV-csatornákhöz hasonló, vagyis egy komplex celluláris receptor, amit számos endogén és exogén kémiai ágens aktivál (Chung és mtsai., 2004; Hu és mtsai., 2006; Xu és mtsai., 2006; Colton és Zhu, 2007). A legújabb kutatási eredmények kimutatták, hogy a DS-Nh egerek és az Olmsted-szindrómában szenvedő betegek fenotípusa mögött a *Trpv3* gén különböző mutációi állnak. Ez utóbbira a bőr súlyos rendellenességei jellemzők, úgymint palmoplantáris keratoderma, perioroficiális hiperkeratózis, diffúz szőrhiány, kopaszság és viszketés (Asakawa és mtsai., 2006; Lin és mtsai., 2012). Korábbi TRPV3-ról szóló tanulmányok elsősorban egerek megfigyelésére fókuszáltak, melyekben leírták, hogy (i) a TRPV3 „gain-of-function” mutációja magasabb Ca^{2+} beépülést és idegi növekedési faktor termelést mutat a mutáció nélküli DS egerekhez képest (Imura és mtsai., 2007; Yoshioka és mtsai., 2009); (ii) a 2-APB, a TRPV3 ioncsatorna aktivátora már alacsonyabb koncentrációban is aktiválja a DS-Nh egerekből származó keratinocitákat, mint a kontroll keratinocitákat; valamint (iii) a TRPV3 aktiválása TSLP felszabaduláshoz vezet DS-Nh egerekben a kontroll TRPV3 knockout egerekkel összehasonlítva (Yamamoto-Kasai és mtsai., 2013). Kimutatták továbbá, hogy a TRPV3 expressziója megnövekedett AD-s betegek gyulladt (lézionális) keratinocitáiban (Yamamoto-Kasai és mtsai., 2013).

Ezen eredmények alátámasztására, sikeresen azonosítottuk a TRPV3 expresszióját humán epidermiszben, valamint primer, humán epidermális keratinocitákon mind mRNS, mind fehérje szinten (**10. ábra**). További eredményeink igazolták, hogy a TRPV3 funkcionálisan

aktív formában van jelen a keratinocitákon és Ca^{2+} -permeábilis csatornaként működik (**11. és 12. ábra**), hasonlóan a más sejttípusokon (Borbíró és mtsai., 2011; Lee és mtsai., 2016; Morgan és mtsai., 2013; Pires és mtsai., 2015; Somogyi és mtsai., 2015) és egér keratinocitákon kapott eredményekhez (Chung és mtsai., 2004b; Huang és mtsai., 2008; Mandadi és mtsai., 2009). Mivel a kalcium jel növekedése megszűnt az $\text{Ca}^{2+}_{\text{[EC]}}$ hiányában, így valószínűsíthető, hogy a TRPV3 membrán-csatornaként működik. Tudomásunk szerint korábbi tanulmányok még nem számoltak be arról, hogy a TRPV3 kifejeződik és funkcionálisan aktív membráncsatornaként van jelen primer humán epidermális keratinocitákon. A csatorna aktivációja carvacrollal vagy 2-APB-vel nemcsak az $\text{Ca}^{2+}_{\text{[IC]}}$ növekedését váltotta ki, hanem csökkentette a sejtek életképességét és proliferációját apoptózis indukciója révén (**14. és 15. ábra**). Bár egyik aktivátor sem szelektív – a carvacrol aktiválja a TRPA1-et (Xu és mtsai., 2006), míg a 2-APB a TRPV1-et és TRPV2-t is (Colton és Zhu, 2007) – azonban a TRPV3 RNS interferencia általi gécscsendesítése szignifikáns mértékben blokkolta a megfigyelt hatásokat, ez arra utal, hogy a folyamatok dominánsan TRPV3 függőek voltak. Összességében, ezek az eredmények összhangban vannak munkacsoportunk korábbi haj follikulusokon megfigyelt eredményeivel, ahol a TRPV3 aktivációja apoptózist és katagén regressziót indukál. Hasonló hatásokat tapasztaltunk külső gyökérhüvely keratinocitákon is (Borbíró és mtsai., 2011).

Az irodalomban egy jól dokumentált folyamat a keratinociták általi gyulladásos mediátor termelés (Gröne, 2002; Karsak és mtsai., 2007; Oláh és mtsai., 2016), amely összeköti az epidermiszt az általában immunológiailag aktívabb dermális részekkel. Munkánk során sikeresen igazoltuk, hogy a TRPV3 agonisták proinflammatorikus citokinek képződését és felszabadulását indukálták az epidermális keratinocitákon (**16. ábra**).

Egy korábbi tanulmányban egér bőrben már kimutatták az epidermális TRPV3 szerepét az intercelluláris kapcsolatokban (Mandadi és mtsai., 2009), melyben a hőmérséklet emelkedése a keratinocitákból adenoizin-trifoszfát (ATP) felszabadulást, ezt követően pedig

idegvégződés aktivációját eredményezte. Eredményeink kiterjednek az epidermális TRPV3-tól az immunsejtek aktivációját célzó folyamatokig és utalnak az egyik lehetséges mechanizmusra, amellyel a TRPV3 gain-of-function mutációja bőrelváltozásokhoz és viszketéshez vezethetnek, melyek mind a DS-Nh egerekben, mind az Olmsted-szindrómában szenvedő betegekben jellemző tünetek (Asakawa és mtsai., 2006; Yoshioka és mtsai., 2009; Lai-Cheong és mtsai., 2012; Lin és mtsai., 2012; Duchatelet és mtsai., 2014; Agarwala és mtsai., 2016). A legújabb kutatások arról is beszámolnak, hogy a TRPV3 expressziója fokozott AD-ben (Yamamoto-Kasai és mtsai., 2013), valamint égést követő viszketésben szenvedő betegeknél (Yang és mtsai., 2015). A keratinocitákon számos gyulladásos folyamat során a proinflammatorikus mediátortermelés indukciója az NF- κ B aktivációjától és transzlokációjától függ – például a hipertrófiás hegyszövetben TRPC3 aktiváción keresztül (Ishise és mtsai., 2015), UVB által kiváltott gyulladásban (Ali és Sultana, 2012; Ali és mtsai., 2016) és a TGF- β 1 indukált jelátvitelben (Tobar és mtsai., 2010).

Bár a klinikai tünetek és a DS-Nh egér fenotípusa a TRPV3 gain-of-function mutációjával kapcsolható össze, ami egyértelműen amellett szól, hogy a csatorna központi szerepet játszik a bőr homeosztázisában, tudomásunk szerint jelenleg nincs olyan tanulmány, amely a humán TRPV3-csatornát vizsgálná molekuláris szinten. Eredményeink ezt a konkrét hiányt próbálják kiküszöbölni. Összességében, eredményeink azt támasztják alá, hogy a TRPV3-ioncsatorna funkcionálisan aktív formában van jelen humán epidermális keratinocitákon, valamint aktivációjuk csökkenti a sejtek életképességét és proinflammatorikus mediátortermelést indukál az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül. Ráadásul eredményeink további (preklinikai és klinika) vizsgálatokat indíthatnak el, melyek a TRPV3-at célzó, terápiás potenciállal bíró farmakológiai megközelítéseket eredményezhetnek (leginkább olyanokat, melyek az ioncsatorna gátlását és/vagy down-regulációját indukálják) gyulladásos

bőrbetegségek kezelésében, mint például AD-ben vagy allergének, irritáló anyagok vagy más ingerek okozta bőrgyulladásokban.

Miután eredményeink rávilágítottak, hogy a TRPV3-csatorna carvacrollal történő aktivációja szerepet játszik a gyulladásos mediátorok termelésének szabályozásában a humán epidermális keratinocitákon, kísérleteinket kiterjesztettük nem csak egészséges, hanem az egyik leggyakoribb gyulladásos bőrbetegségben, atópiás dermatitiszben betöltött szerepének vizsgálatára.

A carvacrolról leírták, hogy egerekben viszketést vált ki TRPV3-függő módon (Cui és mtsai., 2018). Újabban a pruritogének (TSLP, NGF és PGE2) felszabadulását a keratinocitákból összefüggésbe hozták a TRPV3 hőinger általi aktiválódásával. További jelentős eredmény, hogy megnőtt a felszabaduló mediátorok szintje az AD-s léziókból származó keratinocitákból az egészséges kontrollhoz képest (Seo és mtsai., 2020). Egy újabb tanulmányban a TRPV3 szerepét vizsgálták egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s és pszoriázisos bőrben. RNS szekvenálás segítségével megállapították, hogy a TRPV3 transzkriptumok mindkét bőrbetegség érintett bőrterületében megnövekedtek, míg ezeknél a betegeknél a nem érintett bőrterületeken statisztikailag csak jelentéktelen változások voltak megfigyelhetők. Ugyanebben a kéziratban a szerzők magasabb TRPV3 expressziót találtak a lézionális AD bőrben alátámasztva mások korábbi vizsgálati eredményeit (Larkin és mtsai., 2021).

Jelen eredményeink újszerű megállapításaiból több következtetés is levonható. Valójában munkacsoportunk adja az első bizonyítékot, hogy a TRPV3 - mely a humán epidermisz gyulladáskeltő ioncsatornájának prototípusaként is nevezhető – megnövekedett kifejeződést mutat nemcsak az AD-s betegek lézionális epidermiszében, hanem az egészségesnek tűnő, nem-lézionális epidermiszben is (egészséges bőrrel összehasonlítva), amely a terminális differenciálódás és bizonyos immunfunkciós rendellenességek tekintetében jelentősen eltér a normál bőrtől (**20. ábra**) (Suárez-Fariñas és mtsai., 2011). Az emelkedett

TRPV3 szintek fehérje és mRNS szinten is kimutathatóak voltak nem-lézionális és lézionális AD bőrből (**21. ábra**).

Mint gyakorlatilag minden humán minta esetén és ezen humán mintákból származó primer kultúrákkal végzett vizsgálatban, mi is azt tapasztaltuk, hogy a különböző szöveti mintákon (teljes vastagságú bőr, epidermális szövetminta és primer keratinocita tenyészetek) és az alkalmazott kísérleti módszerekben (immunhisztokémia, Western blot, qPCR) jelentős donorok közötti variabilitás figyelhető meg. Ezért az expressziós analíziseket kiegészítettük funkcionális módszerekkel (patch-clamp technika), amely az egyik legkiválóbb műszeres technológia, amely valódi bizonyítékot nyújthat egy ioncsatorna pontosabb funkciójának feltérképezésében. Talán a legfontosabb eredményünk az volt, hogy agonista által aktivált, TRPV3-csatorna által közvetített ionáramok szignifikánsan megnövekedtek tenyésztett nem-lézionális AD keratinocitákban az egészséges keratinocitákon mért áramokkal összehasonlítva (**23. ábra**).

Eredményeinket összefoglalva, a TRPV3 expressziója megnövekedett nem csak az érintett, hanem a nem érintett AD-s bőrterületeken is, ezáltal értékes preklinikai adatokat szolgáltatnak azokhoz a transzlációs és klinikai tanulmányokhoz, amelyek célja a csatorna módosítása (legnagyobb valószínűséggel gátlása) atópiás dermatitisz valamint esetlegesen más gyulladásos bőrbetegségek kezelésében (Broad és mtsai., 2016).

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink első felében a tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna kifejeződését és gyulladásban betöltött szerepét vizsgáltuk humán epidermális keratinocitákon. Kimutattuk a TRPV3 ioncsatorna expresszióját humán bőrben és primer epidermális keratinocita tenyészetben. Sikeresen igazoltuk, hogy a csatorna Ca^{2+} -permeabilis ioncsatornaként funkcionál; carvacrollal, illetve 2-APB-vel történő aktivációja dózis-függő módon csökkenti az epidermális keratinociták proliferációját és apoptózis révén sejthalált indukál. Mindezen hatások TRPV3 specifikusnak mutatkoztak, mivel a folyamatok kivédhetőnek bizonyultak a TRPV3 specifikus géncsendesítés segítségével. A csatorna rövidtávú aktivációja erős proinflammatorikus választ vált ki, amiért vélhetően az NF- κ B jelátviteli út vonal tehető felelőssé.

Ezt követően arra törekedtünk, hogy meghatározzuk a TRPV3 molekuláris és funkcionális expresszióját AD-s betegek nem-lézionális bőrén, ami a terminális differenciálódás és bizonyos immunfunkciós rendellenességek tekintetében jelentősen eltér az egészséges bőrtől. Vizsgálataink során elsőként bizonyítottuk, hogy a TRPV3 teljes vastagságú bőrben, valamint epidermális szöveti mintákon jelentősen megemelkedett expressziót mutat a nem-lézionális humán AD-s epidermiszben, hasonlóan a lézionális AD mintákhoz. További jelentőséggel bír, hogy patch-clamp technikával is igazoltuk, hogy a TRPV3 funkcionálisan is aktívabb formában expresszálódik a nem-lézionális AD keratinocitákon az egészséges keratinocitákhoz képest, amit a szignifikánsan magasabb (agonistával indukált) TRPV3-specifikus ionáramok igazolnak.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a TRPV3 kiemelkedő szerepet játszik a bőr gyulladásos folyamatainak szabályozásában, ezáltal potenciális terápiás célpont lehet gyulladásos bőrbetegségekben.

SUMMARY

In the first part of our experiments we investigated the expression of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channel and its role in inflammation on human epidermal keratinocytes. We identified TRPV3 expression both on human skin and cultured epidermal keratinocytes. We have successfully demonstrated, that the channel functions as a Ca^{2+} -permeable ion channel; activation with carvacrol and 2-APB, respectively, in dose-dependent manner suppresses proliferation of epidermal keratinocytes and induces cell death through apoptosis. All of these effects were shown to be TRPV3-specific, since TRPV3-specific gene silencing antagonized these actions. Short-term activation of the channel triggers a strong proinflammatory response, presumably dependent on the NF- κ B signaling pathway.

Subsequently, we aimed to determine the molecular and functional expression of TRPV3 in non-lesional skin of AD patients, which markedly distinct from normal skin with respect to terminal differentiation and certain immune function abnormalities. In our studies, we provide the first evidence that the expression of TRPV3 in full-thickness skin and epidermal shave biopsy samples is significantly increased in non-lesional human AD epidermis, similar to lesional AD samples. Of further importance, we also demonstrated by patch-clamp that TRPV3 is expressed in a more functionally active form on non-lesional AD keratinocytes compared to healthy keratinocytes, as evidenced by the significantly higher (induced by agonists) TRPV3-specific ion current.

Our results highlight that TRPV3 plays an important role in the regulation of inflammatory processes of the skin, thereby it could be a potential therapeutic target in inflammatory skin diseases.

IRODALOMJEGYZÉK

- Agarwala, M.K., George, R., Pramanik, R., McGrath, J.A., 2016. Olmsted syndrome in an Indian male with a new *de novo* mutation in *TRPV3*. *Br J Dermatol* 174, 209–211. <https://doi.org/10.1111/bjd.13910>
- Aktar, M.K., Kido-Nakahara, M., Furue, M., Nakahara, T., 2015. Mutual upregulation of endothelin-1 and IL-25 in atopic dermatitis. *Allergy* 70, 846–854. <https://doi.org/10.1111/all.12633>
- Ali, F., Khan, B.A., Sultana, S., 2016. Wedelolactone mitigates UVB induced oxidative stress, inflammation and early tumor promotion events in murine skin: plausible role of NFkB pathway. *European Journal of Pharmacology* 786, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.05.008>
- Ali, F., Sultana, S., 2012. Repeated short-term stress synergizes the ROS signalling through up regulation of NFkB and iNOS expression induced due to combined exposure of trichloroethylene and UVB rays. *Mol Cell Biochem* 360, 133–145. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1051-7>
- Ali, S., Yosipovitch, G., 2013. Skin pH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Acta Derm Venerol* 93, 261–267. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>
- Asakawa, M., Yoshioka, T., Matsutani, T., Hikita, I., Suzuki, M., Oshima, I., Tsukahara, K., Arimura, A., Horikawa, T., Hirasawa, T., Sakata, T., 2006. Association of a Mutation in *TRPV3* with Defective Hair Growth in Rodents. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 2664–2672. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700468>
- Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document], n.d. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.12.002>
- Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C.L., Serova, N., Davis, S., Soboleva, A., 2012. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research* 41, D991–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M., Brandner, J.M., 2016. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of Controlled Release* 242, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.007>

- Benham, C.D., Davis, J.B., Randall, A.D., 2002. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 42, 873–888. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00047-3)
- Blair, N.T., Carvacho, I., Chaudhuri, D., Clapham, D.E., DeCaen, P., Delling, M., Doerner, J.F., Fan, L., Ha, K., Jordt, S.E., Julius, D., Kahle, K.T., Liu, B., McKemy, D., Nilius, B., Oancea, E., Owsianik, G., Riccio, A., Sah, R., Stotz, S.C., Tian, J., Tong, D., Van den Eynde, C., Vriens, J., Wu, L.-J., Xu, H., Yue, L., Zhang, X., Zhu, M.X., 2021. Transient Receptor Potential channels (TRP) in GtoPdb v.2021.3. GtoPdb CITE 2021. <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F78/2021.3>
- Blume-Peytavi, U., Tan, J., Tennstedt, D., Boralevi, F., Fabbrocini, G., Torrelo, A., Soares-Oliveira, R., Haftek, M., Rossi, A. b., Thouvenin, M. d., Mangold, J., Galliano, M. f., Hernandez-Pigeon, H., Aries, M. f., Rouvrais, C., Bessou-Touya, S., Duplan, H., Castex-Rizzi, N., Mengeaud, V., Ferret, P. j., Clouet, E., Saint Aroman, M., Carrasco, C., Coutanceau, C., Guiraud, B., Boyal, S., Herman, A., Delga, H., Biniek, K., Dauskardt, R., 2016. Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 30, 3–56. <https://doi.org/10.1111/jdv.13636>
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., Marchlewicz, M., 2016. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatol Alergol* 33, 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Borbíró, I., Lisztes, E., Tóth, B.I., Czifra, G., Oláh, A., Szöllősi, A.G., Szentandrassy, N., Nánási, P.P., Péter, Z., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T., 2011. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 Inhibits Human Hair Growth. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 1605–1614. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.122>
- Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., Nischt, R., 2013. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *BioMed Research International* 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/179784>
- Broad, L.M., Mogg, A.J., Eberle, E., Tolley, M., Li, D.L., Knopp, K.L., 2016. TRPV3 in Drug Development. *Pharmaceuticals (Basel)* 9, 55. <https://doi.org/10.3390/ph9030055>
- Cao, X., Yang, F., Zheng, J., Wang, K., 2012. Intracellular Proton-mediated Activation of TRPV3 Channels Accounts for the Exfoliation Effect of α -Hydroxyl Acids on Keratinocytes. *J Biol Chem* 287, 25905–25916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364869>

- Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., Julius, D., 1999. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436–441. <https://doi.org/10.1038/18906>
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Cheng, X., Jin, J., Hu, L., Shen, D., Dong, X., Samie, M.A., Knoff, J., Eisinger, B., Liu, M., Huang, S.M., Caterina, M.J., Dempsey, P., Michael, L.E., Dlugosz, A.A., Andrews, N.C., Clapham, D.E., Xu, H., 2010. TRP Channel Regulates EGFR Signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation. *Cell* 141, 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.013>
- Chiu, F.P.-C., Salas-Alanis, J.C., Amaya-Guerra, M., Cepeda-Valdes, R., McGrath, J.A., Hsu, C. -K., 2020. Novel p.Ala675Thr missense mutation in *TRPV3* in Olmsted syndrome. *Clin Exp Dermatol* 45, 796–798. <https://doi.org/10.1111/ced.14228>
- Choi, J.Y., Kim, S.-E., Lee, S.E., Kim, S.-C., 2018. Olmsted Syndrome Caused by a Heterozygous p.Gly568Val Missense Mutation in *TRPV3* Gene. *Yonsei Med J* 59, 341. <https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.2.341>
- Chuang, H., Neuhausser, W.M., Julius, D., 2004. The Super-Cooling Agent Icilin Reveals a Mechanism of Coincidence Detection by a Temperature-Sensitive TRP Channel. *Neuron* 43, 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.038>
- Chung, M.-K., 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel TRPV3. *Journal of Neuroscience* 24, 5177–5182. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0934-04.2004>
- Chung, M.-K., Güler, A.D., Caterina, M.J., 2008. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11, 555–564. <https://doi.org/10.1038/nn.2102>
- Chung, M.-K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., Caterina, M.J., 2004. TRPV3 and TRPV4 Mediate Warmth-evoked Currents in Primary Mouse Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 21569–21575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401872200>
- Chung, M.-K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., Caterina, M.J., 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel TRPV3. *J Neurosci* 24, 5177–5182. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0934-04.2004>
- Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Clapham, D.E., Montell, C., Schultz, G., Julius, D., 2003. International Union of Pharmacology.

- XLIII. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev* 55, 591–596. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.6>
- Colton, C.K., Zhu, M.X., 2007. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate as a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 Channels. *Handb Exp Pharmacol* 173–187. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_10
- Cui, T., Wang, G., Wei, N., Wang, K., 2018. A pivotal role for the activation of TRPV3 channel in itch sensations induced by the natural skin sensitizer carvacrol. *Acta Pharmacol Sin* 39, 331–335. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.152>
- Danso-Abeam, D., Zhang, J., Dooley, J., Staats, K.A., Van Eyck, L., Van Brussel, T., Zaman, S., Hauben, E., Van de Velde, M., Morren, M.-A., Renard, M., Van Geet, C., Schaballie, H., Lambrechts, D., Tao, J., Franckaert, D., Humblet-Baron, S., Meyts, I., Liston, A., 2013. Olmsted syndrome: exploration of the immunological phenotype. *Orphanet J Rare Dis* 8, 79. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-79>
- De Benedetto, A., Rafaels, N.M., McGirt, L.Y., Ivanov, A.I., Georas, S.N., Cheadle, C., Berger, A.E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L.C., Hanifin, J.M., Gallo, R.L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T.H., Leung, D.Y.M., Barnes, K.C., Beck, L.A., 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 773-786.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.018>
- De La Peña, E., Mälkiä, A., Cabedo, H., Belmonte, C., Viana, F., 2005. The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *The Journal of Physiology* 567, 415–426. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086546>
- Deering-Rice, C.E., Mitchell, V.K., Romero, E.G., Abdel Aziz, M.H., Ryskamp, D.A., Križaj, D., Venkat, R.G., Reilly, C.A., 2014. Drofenine: a 2-APB analog with improved selectivity for human TRPV3. *Pharmacology Research & Perspectives* 2, e00062. <https://doi.org/10.1002/prp2.62>
- Del Rosso, J.Q., Levin, J., 2011. The Clinical Relevance of Maintaining the Functional Integrity of the Stratum Corneum in both Healthy and Disease-affected Skin. *J Clin Aesthet Dermatol* 4, 22–42.
- Dobrosi, N., Tóth, B.I., Nagy, G., Dózsa, A., Géczy, T., Nagy, L., Zouboulis, C.C., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T., 2008. Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *The FASEB Journal* 22, 3685–3695. <https://doi.org/10.1096/fj.07-104877>
- doi:10.1016/j.bbadis.2007.03.002 | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document], n.d.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.002>
- doi:10.1016/j.mcn.2006.05.005 | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document], n.d.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.05.005>
- Driskell, R.R., Lichtenberger, B.M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B.D., Charalambous, M., Ferron, S.R., Herault, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A.C., Watt, F.M., 2013. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 504, 277–281. <https://doi.org/10.1038/nature12783>
- Drislane, C., Irvine, A.D., 2020a. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 124, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.10.008>
- Duchatelet, S., Guibbal, L., Veer, S., Fraitag, S., Nitschké, P., Zarhrate, M., Bodemer, C., Hovnanian, A., 2014. Olmsted syndrome with erythromelalgia caused by recessive transient receptor potential vanilloid 3 mutations. *Br J Dermatol* 171, 675–678. <https://doi.org/10.1111/bjd.12951>
- Elias, P.M., Wakefield, J., 2014. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134, 781–791.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.048>
- Epstein, E.H., Munderloh, N.H., 1978. Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis. *Journal of Biological Chemistry* 253, 1336–1337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34870-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34870-6)
- Esaki, H., Ewald, D.A., Ungar, B., Rozenblit, M., Zheng, X., Xu, H., Estrada, Y.D., Peng, X., Mitsui, H., Litman, T., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J.G., Guttman-Yassky, E., 2015. Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.037>
- Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., Biedermann, T., 2018. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends in Immunology* 39, 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.02.004>
- Fjeldborg, K., Pedersen, S.B., Møller, H.J., Christiansen, T., Bennetzen, M., Richelsen, B., 2014. Human Adipose Tissue Macrophages Are Enhanced but Changed to an Anti-Inflammatory Profile in Obesity. *Journal of Immunology Research* 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/309548>
- Fluhr, J.W., Kao, J., Ahn, S.K., Feingold, K.R., Elias, P.M., Jain, M., 2001. Generation of Free Fatty Acids from Phospholipids Regulates Stratum Corneum Acidification and

- Integrity. *Journal of Investigative Dermatology* 117, 44–51. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01399.x>
- Gallo, R.L., Huttner, K.M., 1998. Antimicrobial Peptides: An Emerging Concept in Cutaneous Biology. *Journal of Investigative Dermatology* 111, 739–743. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00361.x>
- Gaudet, R., 2008a. TRP channels entering the structural era. *The Journal of Physiology* 586, 3565–3575. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155812>
- Gaudet, R., 2008b. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst* 4, 372–379. <https://doi.org/10.1039/b801481g>
- Gees, M., Colasoul, B., Nilius, B., 2010. The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca^{2+} Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003962. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003962>
- Gevaert, T., Vriens, J., Segal, A., Everaerts, W., Roskams, T., Talavera, K., Owsianik, G., Liedtke, W., Daelemans, D., Dewachter, I., Van Leuven, F., Voets, T., De Ridder, D., Nilius, B., 2007. Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J. Clin. Invest.* 117, 3453–3462. <https://doi.org/10.1172/JCI31766>
- Gittler, J.K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K.J., Wang, C.Q.F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G., Guttman-Yassky, E., 2012. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130, 1344–1354. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.012>
- Gröne, A., 2002. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00136-8)
- Hamamoto, T., Takumida, M., Hirakawa, K., Takeno, S., Tatsukawa, T., 2008. Localization of transient receptor potential channel vanilloid subfamilies in the mouse larynx. *Acta Oto-Laryngologica* 128, 685–693. <https://doi.org/10.1080/00016480701669489>
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 391, 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007>
- Han, H., Roan, F., Ziegler, S.F., 2017. The atopic march: current insights into skin barrier

- dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. *Immunol Rev* 278, 116–130. <https://doi.org/10.1111/imr.12546>
- Harding, C.R., 2004. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 17, 6–15. <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1001.x>
- Hellström, M., Hellström, S., Engström-Laurent, A., Berthelm, U., 2014. The structure of the basement membrane zone differs between keloids, hypertrophic scars and normal skin: A possible background to an impaired function. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 67, 1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2014.06.014>
- Hu, H.-Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C.K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L.-Y., Wood, J.D., Zhu, M.X., 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Is a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *Journal of Biological Chemistry* 279, 35741–35748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404164200>
- Hu, H.-Z., Xiao, R., Wang, C., Gao, N., Colton, C.K., Wood, J.D., Zhu, M.X., 2006. Potentiation of TRPV3 channel function by unsaturated fatty acids. *J. Cell. Physiol.* 208, 201–212. <https://doi.org/10.1002/jcp.20648>
- Huang, C.-L., 2004. The Transient Receptor Potential Superfamily of Ion Channels. *Journal of the American Society of Nephrology* 15, 1690–1699. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000129115.69395.65>
- Huang, S.M., Lee, H., Chung, M.-K., Park, U., Yu, Y.Y., Bradshaw, H.B., Coulombe, P.A., Walker, J.M., Caterina, M.J., 2008. Overexpressed Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Ion Channels in Skin Keratinocytes Modulate Pain Sensitivity via Prostaglandin E2. *Journal of Neuroscience* 28, 13727–13737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5741-07.2008>
- Imura, K., Yoshioka, T., Hikita, I., Tsukahara, K., Hirasawa, T., Higashino, K., Gahara, Y., Arimura, A., Sakata, T., 2007. Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363, 479–483. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.170>
- Irvine, A.D., McLean, W.H.I., Leung, D.Y.M., 2011. Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *N Engl J Med* 365, 1315–1327. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011040>
- Ishibashi, T., Takumida, M., Akagi, N., Hirakawa, K., Anniko, M., 2008. Expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3, and 4 in mouse inner ear. *Acta Oto-Laryngologica* 128, 1286–1293. <https://doi.org/10.1080/00016480801938958>
- Ishise, H., Larson, B., Hirata, Y., Fujiwara, T., Nishimoto, S., Kubo, T., Matsuda, K.,

- Kanazawa, S., Sotsuka, Y., Fujita, K., Kakibuchi, M., Kawai, K., 2015. Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFkB activation. *Sci Rep* 5, 11620. <https://doi.org/10.1038/srep11620>
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y., 2010. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465, 346–349. <https://doi.org/10.1038/nature09074>
- Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G.S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P.J., Vreeken, R.J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A.P., Bouwstra, J.A., 2012. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* 53, 2755–2766. <https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>
- Jungersted, J.M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J.K., Hellgren, L.I., Jemec, G.B.E., Agner, T., Weidinger, S., 2010. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema: Filaggrin mutations, skin barrier and lipids. *Allergy* 65, 911–918. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x>
- Kang, S.Y., Jung, H.W., Nam, J.H., Kim, W.K., Kang, J.-S., Kim, Y.-H., Cho, C.-W., Cho, C.W., Park, Y.-K., Bae, H.S., 2017. Effects of the Fruit Extract of *Tribulus terrestris* on Skin Inflammation in Mice with Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis through Regulation of Calcium Channels, Orai-1 and TRPV3, and Mast Cell Activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/8312946>
- Karsak, M., Gaffal, E., Date, R., Wang-Eckhardt, L., Rehnelt, J., Petrosino, S., Starowicz, K., Steuder, R., Schlicker, E., Cravatt, B., Mechoulam, R., Buettner, R., Werner, S., Di Marzo, V., Tüting, T., Zimmer, A., 2007. Attenuation of Allergic Contact Dermatitis Through the Endocannabinoid System. *Science* 316, 1494–1497. <https://doi.org/10.1126/science.1142265>
- Kido-Nakahara, M., Furue, M., Ulzii, D., Nakahara, T., 2017. Itch in Atopic Dermatitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 37, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2016.08.007>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lai-Cheong, J.E., Sethuraman, G., Ramam, M., Stone, K., Simpson, M.A., McGrath, J.A., 2012. Recurrent heterozygous missense mutation, p.Gly573Ser, in the TRPV3 gene in

- an Indian boy with sporadic Olmsted syndrome: Missense mutation in TRPV3 in Olmsted syndrome. *British Journal of Dermatology* 167, 440–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11115.x>
- Larkin, C., Chen, W., Szabó, I.L., Shan, C., Dajnoki, Z., Szegedi, A., Buhl, T., Fan, Y., O'Neill, S., Walls, D., Cheng, W., Xiao, S., Wang, J., Meng, J., 2021. Novel insights into the TRPV3-mediated itch in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 147, 1110-1114.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.09.028>
- Lee, H.C., Yoon, S.-Y., Lykke-Hartmann, K., Fissore, R.A., Carvacho, I., 2016. TRPV3 channels mediate Ca²⁺ influx induced by 2-APB in mouse eggs. *Cell Calcium* 59, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.12.001>
- Lee, S.D., Tontonoz, P., 2014. Eosinophils in Fat: Pink Is the New Brown. *Cell* 157, 1249–1250. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.025>
- Lin, Z., Chen, Q., Lee, M., Cao, X., Zhang, J., Ma, D., Chen, L., Hu, X., Wang, H., Wang, X., Zhang, P., Liu, X., Guan, L., Tang, Y., Yang, H., Tu, P., Bu, D., Zhu, X., Wang, K., Li, R., Yang, Y., 2012. Exome Sequencing Reveals Mutations in TRPV3 as a Cause of Olmsted Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 90, 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.006>
- Link, T.M., Park, U., Vonakis, B.M., Raben, D.M., Soloski, M.J., Caterina, M.J., 2010. TRPV2 plays a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol* 11, 232–239. <https://doi.org/10.1038/ni.1842>
- Luger, T., Amagai, M., Dreno, B., Dagnelie, M.-A., Liao, W., Kabashima, K., Schikowski, T., Proksch, E., Elias, P.M., Simon, M., Simpson, E., Grinich, E., Schmuth, M., 2021. Atopic dermatitis: Role of the skin barrier, environment, microbiome, and therapeutic agents. *Journal of Dermatological Science* 102, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2021.04.007>
- Madison, K.C., 2003. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 121, 231–241. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x>
- Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich, A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K., Tominaga, M., 2009. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 458, 1093–1102. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0703-x>
- Mandlik, D.S., Mandlik, S.K., 2021. Atopic dermatitis: new insight into the etiology, pathogenesis, diagnosis and novel treatment strategies. *Immunopharmacology and*

- Immunotoxicology 43, 105–125. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1889583>
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., Julius, D., 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
- McLean, W.H.I., 2016a. Filaggrin failure – from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. *Br J Dermatol* 175, 4–7. <https://doi.org/10.1111/bjd.14997>
- Mergler, S., Garreis, F., Sahlmüller, M., Reinach, P.S., Paulsen, F., Pleyer, U., 2011. Thermosensitive transient receptor potential channels (thermo-TRPs) in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol* 226, 1828–1842. <https://doi.org/10.1002/jcp.22514>
- Mikesh, L.M., Aramadhaka, L.R., Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C., Fox, J.W., 2013. Proteomic anatomy of human skin. *Journal of Proteomics* 84, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.019>
- Miller, L.S., 2008. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol* 24, 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.yadr.2008.09.004>
- Montell, C., Rubin, G.M., 1989. Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., Patapoutian, A., 2005. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science* 307, 1468–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1108609>
- Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., Szallasi, A., 2011. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>
- Morgan, P.J., Hübner, R., Rolfs, A., Frech, M.J., 2013. Spontaneous Calcium Transients in Human Neural Progenitor Cells Mediated by Transient Receptor Potential Channels. *Stem Cells and Development* 22, 2477–2486. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0061>
- Nadler, M.J.S., Hermosura, M.C., Inabe, K., Perraud, A.-L., Zhu, Q., Stokes, A.J., Kurosaki, T., Kinet, J.-P., Penner, R., Scharenberg, A.M., Fleig, A., 2001. LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411, 590–595. <https://doi.org/10.1038/35079092>
- Nagai, H., Takaoka, Y., Sugano, A., Nakamachi, Y., Kawano, S., Nishigori, C., 2017. Identification of a heterozygous p.Gly568Val missense mutation in the *TRPV3* gene in a Japanese patient with Olmsted syndrome: *In silico* analysis of TRPV3. *J Dermatol* 44,

- 1059–1062. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13844>
- Nair, R.P., Duffin, K.C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P.E., Goldgar, D., Gudjonsson, J.E., Li, Y., Tejasvi, T., Feng, B.J., Ruether, A., Schreiber, S., Weichenthal, M., Gladman, D., Rahman, P., Schrodi, S.J., Prahalad, S., Guthery, S.L., Fischer, J., Liao, W., Kwok, P.-Y., Menter, A., Lathrop, G.M., Wise, C.A., Begovich, A.B., Voorhees, J.J., Elder, J.T., Krueger, G.G., Bowcock, A.M., Abecasis, G.R., 2009. Genomewide Scan Reveals Association of Psoriasis with IL-23 and NF- κ B Pathways. *Nat Genet* 41, 199–204. <https://doi.org/10.1038/ng.311>
- Nakahara, T., Kido-Nakahara, M., Tsuji, G., Furue, M., 2021. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 48, 130–139. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15664>
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Narala, S., Chun, K.A., Two, A.M., Yun, T., Shafiq, F., Kotol, P.F., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Latif, H., Kim, J.-N., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, P., Streib, J., Dorrestein, P.C., Grier, A., Gill, S.R., Zengler, K., Hata, T.R., Leung, D.Y.M., Gallo, R.L., 2017. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 9, eaah4680. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680>
- Nam, J.H., Jung, H.W., Chin, Y.-W., Yang, W.-M., Bae, H.S., Kim, W.K., 2017. *Spirodela polyrhiza* extract modulates the activation of atopic dermatitis-related ion channels, Orai1 and TRPV3, and inhibits mast cell degranulation. *Pharmaceutical Biology* 55, 1324–1329. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1300819>
- Naylor, E.C., Watson, R.E.B., Sherratt, M.J., 2011. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.04.011>
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., Chawla, A., 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480, 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature10653>
- Nilius, B., 2007. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg* 162, 244–253.
- Nilius, B., Bíró, T., Owsianik, G., 2014a. TRPV3: time to decipher a poorly understood family member! *The Journal of Physiology* 592, 295–304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.255968>
- Nilius, B., Owsianik, G., 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12, 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>

- Oguchi, M., Kobayasi, T., Asboe-Hansen, G., 1985. Secretion of Type IV Collagen by Keratinocytes of Human Adult. *Journal of Investigative Dermatology* 85, 79–81. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12275360>
- Oh, J., Byrd, A.L., Park, M., Kong, H.H., Segre, J.A., 2016. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell* 165, 854–866. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.008>
- Oh, U., Hwang, S., Kim, D., 1996. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 16, 1659–1667. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-05-01659.1996>
- Oláh, A., Ambrus, L., Nicolussi, S., Gertsch, J., Tubak, V., Kemény, L., Soeberdt, M., Abels, C., Bíró, T., 2016. Inhibition of fatty acid amide hydrolase exerts cutaneous anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Experimental Dermatology* 25, 328–330. <https://doi.org/10.1111/exd.12930>
- Oláh, A., Tóth, B.I., Borbíró, I., Sugawara, K., Szöllösi, A.G., Czifra, G., Pál, B., Ambrus, L., Kloepper, J., Camera, E., Ludovici, M., Picardo, M., Voets, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T., 2014. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J. Clin. Invest.* 124, 3713–3724. <https://doi.org/10.1172/JCI64628>
- Owsianik, G., D’hoedt, D., Voets, T., Nilius, B., 2006. Structure–function relationship of the TRP channel superfamily, in: Amara, S.G., Bamberg, E., Grinstein, S., Hebert, S.C., Jahn, R., Lederer, W.J., Lill, R., Miyajima, A., Murer, H., Offermanns, S., Schultz, G., Schweiger, M. (Eds.), *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 61–90. <https://doi.org/10.1007/s10254-005-0006-0>
- Palmer, C.N.A., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J.D., O’Regan, G.M., Watson, R.M., Cecil, J.E., Bale, S.J., Compton, J.G., DiGiovanna, J.J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C.S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L.B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W.H.I., 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38, 441–446. <https://doi.org/10.1038/ng1767>
- Pavel, A.B., Renert-Yuval, Y., Wu, J., Del Duca, E., Diaz, A., Lefferdink, R., Fang, M.M., Canter, T., Rangel, S.M., Zhang, N., Krueger, J.G., Paller, A.S., Guttman-Yassky, E., 2021. Tape strips from early-onset pediatric atopic dermatitis highlight disease abnormalities in nonlesional skin. *Allergy* 76, 314–325. <https://doi.org/10.1111/all.14490>

- Pedersen, S.F., Owsianik, G., Nilius, B., 2005. TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38, 233–252. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.028>
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002a. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108, 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science* 296, 2046–2049. <https://doi.org/10.1126/science.1073140>
- Perraud, A.-L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.-P., Scharenberg, A.M., 2001. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411, 595–599. <https://doi.org/10.1038/35079100>
- Phelps, C.B., Wang, R.R., Choo, S.S., Gaudet, R., 2010. Differential Regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 Sensitivity through a Conserved Binding Site on the Ankyrin Repeat Domain. *J Biol Chem* 285, 731–740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052548>
- Pires, P.W., Sullivan, M.N., Pritchard, H.A.T., Robinson, J.J., Earley, S., 2015. Unitary TRPV3 channel Ca^{2+} influx events elicit endothelium-dependent dilation of cerebral parenchymal arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 309, H2031–H2041. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00140.2015>
- Pivarcsi, A., 2003. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *International Immunology* 15, 721–730. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg068>
- Pivarcsi, A., Kemény, L., Dobozy, A., 2004. Innate Immune Functions of the Keratinocytes. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 51, 303–310. <https://doi.org/10.1556/AMicr.51.2004.3.8>
- Plasencia, I., Norlén, L., Bagatolli, L.A., 2007. Direct Visualization of Lipid Domains in Human Skin Stratum Corneum's Lipid Membranes: Effect of pH and Temperature. *Biophysical Journal* 93, 3142–3155. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.096164>
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sepehrmanesh, M., Pfeiffer, S., Jensen, J.-M., 2009. Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7, 899–910. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x>

- Qin, J.-Z., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Choubey, D., Diaz, M.O., Nickoloff, B.J., 1999. Role of NF- κ B in the Apoptotic-resistant Phenotype of Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37957–37964. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37957>
- Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., Flores, C.M., 2008. TRPV2 Is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience* 28, 6231–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>
- Qu, Y., Wang, G., Sun, X., Wang, K., 2019. Inhibition of the Warm Temperature–Activated Ca²⁺-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel Attenuates Atopic Dermatitis. *Mol Pharmacol* 96, 393–400. <https://doi.org/10.1124/mol.119.116962>
- Rawlings, A.V., 2010. Recent advances in skin ‘barrier’ research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62, 671–677. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.06.0002>
- Reed, R.K., Lidén, Å., Rubin, K., 2010. Edema and fluid dynamics in connective tissue remodelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.06.023>
- Reed, R.K., Rubin, K., 2010. Transcapillary exchange: role and importance of the interstitial fluid pressure and the extracellular matrix. *Cardiovascular Research* 87, 211–217. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq143>
- Ross, R.A., 2003. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology* 140, 790–801. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705467>
- Rosso, J.D., Zeichner, J., Alexis, A., Cohen, D., Berson, D., 2016. Understanding the Epidermal Barrier in Healthy and Compromised Skin: Clinically Relevant Information for the Dermatology Practitioner. *J Clin Aesthet Dermatol* 9, S2–S8.
- Runnels, L.W., Yue, L., Clapham, D.E., 2001. TRP-PLIK, a Bifunctional Protein with Kinase and Ion Channel Activities. *Science* 291, 1043–1047. <https://doi.org/10.1126/science.1058519>
- Seo, S.H., Kim, S., Kim, S.-E., Chung, S., Lee, S.E., 2020. Enhanced Thermal Sensitivity of TRPV3 in Keratinocytes Underlies Heat-Induced Pruritogen Release and Pruritus in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 140, 2199–2209.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.028>
- Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.-P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K.J., Smart, D., Randall, A.D., Anand, P., Davis, J.B., 2002. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like

- protein. *Nature* 418, 186–190. <https://doi.org/10.1038/nature00894>
- Smith, P.L., Maloney, K.N., Pothen, R.G., Clardy, J., Clapham, D.E., 2006. Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* Activates TRPV4 Channels. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29897–29904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605394200>
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gillet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., Waal-Malefyt, R. de, Bazan, F., Kastelein, R.A., Liu, Y.-J., 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673–680. <https://doi.org/10.1038/ni805>
- Sroka-Tomaszewska, J., Trzeciak, M., 2021. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 4130. <https://doi.org/10.3390/ijms22084130>
- Stienstra, R., Dijk, W., van Beek, L., Jansen, H., Heemskerk, M., Houtkooper, R.H., Denis, S., van Harmelen, V., Willems van Dijk, K., Tack, C.J., Kersten, S., 2014. Mannose-Binding Lectin Is Required for the Effective Clearance of Apoptotic Cells by Adipose Tissue Macrophages During Obesity. *Diabetes* 63, 4143–4153. <https://doi.org/10.2337/db14-0256>
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A., 2003. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112, 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
- Suárez-Fariñas, M., Tintle, S.J., Shemer, A., Chiricozzi, A., Nogales, K., Cardinale, I., Duan, S., Bowcock, A.M., Krueger, J.G., Guttman-Yassky, E., 2011. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, 954-964.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1124>
- Sulk, M., Seeliger, S., Aubert, J., Schwab, V.D., Cevikbas, F., Rivier, M., Nowak, P., Voegel, J.J., Buddenkotte, J., Steinhoff, M., 2012. Distribution and Expression of Non-Neuronal Transient Receptor Potential (TRPV) Ion Channels in Rosacea. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 1253–1262. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.424>
- Sun, X., Qi, H., Wu, H., Qu, Y., Wang, K., 2020. Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of natural verbascoside through selective inhibition of temperature-sensitive Ca²⁺-permeable TRPV3 channel. *Journal of Dermatological Science* 97, 229–231.

- <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.01.004>
- Sun, X.-Y., Sun, L.-L., Qi, H., Gao, Q., Wang, G.-X., Wei, N.-N., Wang, K., 2018. Antipruritic Effect of Natural Coumarin Osthole through Selective Inhibition of Thermosensitive TRPV3 Channel in the Skin. *Mol Pharmacol* 94, 1164–1173. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112466>
- Szegedi, A., 2015. Filaggrin mutations in early- and late-onset atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 172, 320–321. <https://doi.org/10.1111/bjd.13534>
- Szöllősi, A. G., McDonald, I., Szabó, I. L., Meng, J., van den Bogaard, E., & Steinhoff, M. (2019). TLR3 in Chronic Human Itch: A Keratinocyte-Associated Mechanism of Peripheral Itch Sensitization. *The Journal of investigative dermatology*, 139(11), 2393–2396.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.04.018>
- Szöllősi, A.G., Oláh, A., Tóth, I.B., Papp, F., Czifra, G., Panyi, G., Bíró, T., 2013. Transient receptor potential vanilloid-2 mediates the effects of transient heat shock on endocytosis of human monocyte-derived dendritic cells. *FEBS Letters* 587, 1440–1445. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.027>
- Szücs Somogyi, C., Matta, C., Foldvari, Z., Juhász, T., Katona, É., Takács, Á.R., Hajdú, T., Dobrosi, N., Gergely, P., Zákány, R., 2015. Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Ion Channels in Chondrogenic Cells. *Int J Mol Sci* 16, 18412–18438. <https://doi.org/10.3390/ijms160818412>
- Takai, T., Chen, X., Xie, Y., Vu, A.T., Le, T.A., Kinoshita, H., Kawasaki, J., Kamijo, S., Hara, M., Ushio, H., Baba, T., Hiramatsu, K., Ikeda, S., Ogawa, H., Okumura, K., 2014. TSLP Expression Induced via Toll-Like Receptor Pathways in Human Keratinocytes, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 371–387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397925-4.00021-3>
- Terhorst, D., Kalali, B.N., Ollert, M., Ring, J., Mempel, M., 2010. The Role of Toll-Like Receptors in Host Defenses and Their Relevance to Dermatologic Diseases: *American Journal of Clinical Dermatology* 11, 1–10. <https://doi.org/10.2165/11311110-000000000-00000>
- Thyssen, J.P., Kezic, S., 2014. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134, 792–799. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.014>
- Tobar, N., Villar, V., Santibanez, J.F., 2010. ROS-NFκB mediates TGF-β1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem* 340, 195–202. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0418-5>

- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., 1998. The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21, 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)
- Tóth, B.I., Benkő, S., Szöllősi, A.G., Kovács, L., Rajnavölgyi, É., Bíró, T., 2009. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. *FEBS Letters* 583, 1619–1624. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.031>
- Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M.J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J.C., Brough, S.J., Owen, D., Smith, G.D., Randall, A.D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J.B., Geppetti, P., 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5, 546–551. <https://doi.org/10.1038/nn0602-852>
- TRPV2 Is a Component of Osmotically Sensitive Cation Channels in Murine Aortic Myocytes [WWW Document], n.d. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C>
- Tsuji, G., Hashimoto-Hachiya, A., Kiyomatsu-Oda, M., Takemura, M., Ohno, F., Ito, T., Morino-Koga, S., Mitoma, C., Nakahara, T., Uchi, H., Furue, M., 2017. Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell Death Dis* 8, e2931–e2931. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.322>
- Uchida, Kunitoshi, Katsuya Dezaki, Takeshi Yoneshiro, Tatsuo Watanabe, Jun Yamazaki, Masayuki Saito, Toshihiko Yada, Makoto Tominaga, és Yusaku Iwasaki. „Involvement of Thermosensitive TRP Channels in Energy Metabolism”. *The Journal of Physiological Sciences* 67, sz. 5 (2017. szeptember): 549–60. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0552-x>.
- Ueda, T., Yamada, T., Ugawa, S., Ishida, Y., Shimada, S., 2009. TRPV3, a thermosensitive channel is expressed in mouse distal colon epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.143>
- Valdes-Rodriguez, R., Kaushik, S.B., Yosipovitch, G., 2013. Transient receptor potential channels and dermatological disorders. *Curr Top Med Chem* 13, 335–343. <https://doi.org/10.2174/15680266112129990090>
- Vay, L., Gu, C., McNaughton, P.A., 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology* 165, 787–801. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>
- Verdier-Sévrain, S., Bonté, F., 2007. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J*

- Cosmet Dermat 6, 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>
- Veronesi, B., Carter, J.D., Devlin, R.B., Simon, S.A., Oortgiesen, M., 1999. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides* 33, 447–456. <https://doi.org/10.1054/npep.1999.0761>
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., Nilius, B., 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748–754. <https://doi.org/10.1038/nature02732>
- Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B., 2009. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels. *Mol Pharmacol* 75, 1262–1279. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055624>
- Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Götz, F., Peschel, A., Schaller, M., Schitteck, B., 2011. Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 382–390. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.328>
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G., Nilius, B., 2002. Heat-evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 47044–47051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208277200>
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.-C., Wong, J.K., 2016. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology* 25, 92–98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- Wu, L.-J., Sweet, T.-B., Clapham, D.E., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacol Rev* 62, 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>
- Wullaert, A., Bonnet, M.C., Pasparakis, M., 2011. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 21, 146–158. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.175>
- Xiao, R., Tian, J., Tang, J., Zhu, M.X., 2008. The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell Calcium* 43, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.06.004>
- Xu, H., Delling, M., Jun, J.C., Clapham, D.E., 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 9, 628–635. <https://doi.org/10.1038/nn1692>
- Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J.,

- Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P.S., Curtis, R., Clapham, D.E., 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature00882>
- Yamamoto-Kasai, E., Imura, K., Yasui, K., Shichijou, M., Oshima, I., Hirasawa, T., Sakata, T., Yoshioka, T., 2012. TRPV3 as a Therapeutic Target for Itch. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 2109–2112. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.97>
- Yamamoto-Kasai, E., Yasui, K., Shichijo, M., Sakata, T., Yoshioka, T., 2013. Impact of TRPV3 on the development of allergic dermatitis as a dendritic cell modulator. *Exp Dermatol* 22, 820–824. <https://doi.org/10.1111/exd.12273>
- Yang, Y., Cho, S., Choi, M., Choi, Y., Kwak, I., Park, C., Kim, H., 2015. Increased Expression of Three Types of Transient Receptor Potential Channels (TRPA1, TRPV4 and TRPV3) in Burn Scars with Post-burn Pruritus. *Acta Derm Venerol* 95, 20–24. <https://doi.org/10.2340/00015555-1858>
- Yoshioka, T., Imura, K., Asakawa, M., Suzuki, M., Oshima, I., Hirasawa, T., Sakata, T., Horikawa, T., Arimura, A., 2009. Impact of the Gly573Ser Substitution in TRPV3 on the Development of Allergic and Pruritic Dermatitis in Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 714–722. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.245>
- Yosipovitch, G., Berger, T., Fassett, M. s., 2020. Neuroimmune interactions in chronic itch of atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 34, 239–250. <https://doi.org/10.1111/jdv.15973>
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S., Patton, B.L., 2004. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biology* 22, 521–538. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2003.10.006>
- Zhang, H., Sun, X., Qi, H., Ma, Q., Zhou, Q., Wang, W., Wang, K., 2019. Pharmacological Inhibition of the Temperature-Sensitive and Ca²⁺-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel by Natural Forsythoside B Attenuates Pruritus and Cytotoxicity of Keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 368, 21–31. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.254045>
- Zhong, W., Hu, L., Cao, X., Zhao, J., Zhang, X., Lee, M., Wang, H., Zhang, J., Chen, Q., Feng, C., Duo, L., Wang, X., Tang, L., Lin, Z., Yang, Y., 2021. Genotype–Phenotype Correlation of TRPV3-Related Olmsted Syndrome. *Journal of Investigative Dermatology* 141, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.06.035>
- Zipperer, A., Konnerth, M.C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N.A., Slavetinsky, C., Marschal, M., Willmann, M., Kalbacher, H., Schitteck,

B., Brötz-Oesterhelt, H., Grond, S., Peschel, A., Krismer, B., 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 535, 511–516. <https://doi.org/10.1038/nature18634>

KULCSSZAVAK / KEYWORDS

Kulcsszavak:

- tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3)
- epidermális keratinocita
- proinflammatorikus citokinek
- atópiás dermatitisz
- gyulladásos bőrbetegségek

Keywords:

- transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3)
- epidermal keratinocyte
- proinflammatory cytokines
- atopic dermatitis
- inflammatory skin diseases

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek **Prof. Dr. Bíró Tamásnak**, hogy az elmúlt években mindenben támogatott, szakmai tanácsaival és iránymutatásával bevezetett a tudományos életbe.

Külön köszönetet mondok **Prof. Dr. Csernoch László professzor úrnak**, az Élettani Intézet és doktori iskolánk vezetőjének, amiért lehetőséget és teret adott kutatómunkám elvégzéséhez.

Mérhetetlenül hálás vagyok **Dr. Szöllősi Attila Gábornak** az elmúlt évek közös munkájáért és a mindennapos baráti, szakmai és tudományos támogatásáért.

Köszönöm **Dr. Lisztes Erikának, Dr. Oláh Attilának, Dr. Tóth István Baláznak és Dr. Czifra Gabriellának**, hogy magas szintű szakmai tudásukra és baráti tanácsaikra bármikor számíthattam.

Külön köszönettel tartozom egykori közvetlen kollégáimnak és barátaimnak; **Angyal Ágnesnek, Dr. Szabó Imre Lőrincnek, Balogh Norbertnek, Hollósi Erikának** a sok közvetlen segítségükért és baráti szavaikért.

Végezetül köszönöm az **Élettani Intézet valamennyi dolgozójának, PhD és TDK hallgatójának**, akik az évek során segítették munkámat.

Végül, de közel sem utolsó sorban köszönöm a **Családomnak**, kiváltképpen férjemnek, **Dr. Molnár Szabolcsnak** és gyermekeimnek **Molnár Lénának és Molnár Laurának**, hogy mindvégig támogattak és bíztattak munkám során és a végtelen nagy türelmet és odaadást, amit felém nyújtottak az elmúlt évek alatt.

FÜGGELÉK



**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/57/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnárné Vasas Nikolett

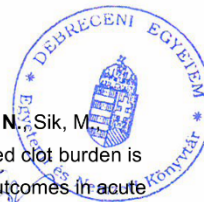
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Molnárné Vasas, N.**, Péntes, Z., Kistamás, K., Nánási, P. P., Molnár, S., Szegedi, A., Szöllősi, A. G., Bíró, T.: Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Expression Is Increased In Non-Lesional Skin Of Atopic Dermatitis Patients.
Exp. Dermatol. [Epub ahead of print], 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14530>
IF: 3.96 (2020)
2. Szöllősi, A. G., **Molnárné Vasas, N.**, Angyal, Á., Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., Béke, G., Líztes, 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

További közlemények

3. Orbán-Kálmándi, R. A., Szegedi, I., Sarkady, F., Fekete, I., Fekete, K., **Molnárné Vasas, N.**, Berényi, E., Csiba, L., Bagoly, Z.: A modified in vitro clot lysis assay predicts outcomes and safety in acute ischemic stroke patients undergoing intravenous thrombolysis.
Sci. Rep. 11 (1), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-92041-1>
IF: 4.379 (2020)
4. Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R. A., Nagy, A. C., Sarkady, F., **Molnárné Vasas, N.**, Sik, M., Láncki, L., Berényi, E., Oláh, L., Crişan, A., Csiba, L., Bagoly, Z.: Decreased clot burden is associated with factor XIII Val34Leu polymorphism and better functional outcomes in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis.
PLoS One. 16 (7), 1-16, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0254253>
IF: 3.24 (2020)





5. Szöllősi, A. G., Gueniche, A., Jammayrac, O., Papp, J., Blanchard, C., **Molnárné Vasas, N.**,
Andrási, M., Juhász, I., Breton, L., Bíró, T.: Bifidobacterium longum extract exerts pro-
differentiating effects on human epidermal keratinocytes, in vitro.
Exp. Dermatol. 26 (1), 92-94, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.13130>
IF: 2.608
6. Máté, G., Kertész, I., Enyedi, K. N., Mező, G., Angyal, J., **Molnárné Vasas, N.**, Kis, A., Szabó, É.,
Emri, M., Bíró, T., Galuska, L., Trencsényi, G.: In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13)
receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer 68Ga-NOTA-c(NGR).
Eur. J. Pharm. Sci. 69, 61-71, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.002>
IF: 3.773

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,25

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,25**

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, 2022.01.24.

