

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Az endocannabinoid rendszer szerepe humán bőr eredetű
sejtek biológiai folyamatainak szabályozásában**

Dobrosi Nóra

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

**Az endocannabinoid rendszer szerepe humán bőr eredetű sejtek biológiai
folyamatainak szabályozásában**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dobrosi Nóra

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

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Benkő Ilona, Ph.D.

Dr. Sántha Péter, Ph.D.

A doktori szigorlat helye, ideje: Biofizika Tanszék, 2011. április 29. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Dr. Benyó Zoltán, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Dr. Benyó Zoltán, az MTA doktora

Dr. Benkő Ilona, Ph.D.

Dr. Sántha Péter, Ph.D.

A védés helye és ideje:

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, 1. Belklinika
tanterme; 2011. április 29. 13 óra

BEVEZETÉS

Eleinte a cannabinoid rendszer létezéséről csak a vadvadkender (*Cannabis sativa*) pszichoaktív alkotója, a (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol révén voltak elképzeléseink. Az intenzív kutatások eredményeként kiderült ugyanakkor, hogy maga az emberi szervezet is termel cannabinoid vegyületeket. A cannabinoidokkal végzett vizsgálatok emellett receptor mediálta mechanizmusra utaltak, és ez igazolódott is az 1990-es évek elején, amikor két cannabinoid receptort (CB1 és CB2) azonosítottak. Az 1-es típusú cannabinoid receptort először a központi idegrendszerben, míg a 2-es típusút az immunrendszerben írták le. Idővel azonban kiderült, hogy a receptorok ezen lokalizációja nem ilyen egyértelmű. Az endocannabinoid rendszer működését és aktivitását azóta már számos szövetben, szervben – így többek között a bőrben is – leírták.

Laboratóriumunk korábbi kísérletei során kimutatta a rendszer bizonyos tagjainak – cannabinoid receptorok, endocannabinoidok (anandamid, 2-arachidonoil-glicerol) – funkcionális jelenlétét a szőrtüsző különféle elemeiben. Mások igazolták továbbá a bőr számos függelékének, többek között a faggyúmirigy sebocytáinak, valamint az epidermis sejteinek CB1 és CB2 immunpozitivitását. Ezidáig ugyanakkor nem sikerült tisztázni sem a pilosebaceous egység másik tagján, sem az epidermális keratinocytákon a rendszer szerepét. Mivel a faggyúmirigy sebocytái, valamint az epidermális keratinocyták kóros működése olyan nagy prevalenciájú kórképek kialakulásában bír meghatározó jelentőséggel, mint pl. az acne vulgaris, ezért kísérleteinkben ezen két sejtípust vizsgálva elemeztük az endocannabinoid rendszer szerepét a bőr biológiai folyamatainak (növekedés, differenciálódás, túlélés, zsírtermelés) szabályozásában.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A cannabinoidok

A cannabinoidok a *Cannabis sativa* növényben található természetes anyagok csoportja, valamint ezek szintetikus megfelelői vagy metabolitjai. A *Cannabis sativa* több mint 420 különböző kémiai összetevőt tartalmaz, amelyek közül a legfontosabbak: a főként pszichoaktív hatásáról ismert $(-)\text{-}\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol $((-)\text{-}\Delta^9\text{-THC})$, a cannabidiol (CBD) és a cannabinol (CBN).

Az elsőként felfedezett és leginkább kutatások középpontjában álló endogén cannabinoid az N-arachidonoyl-ethanolamide, másnéven anandamid (AEA). Az arachidonsav (AA) származék AEA kémiaiilag az eicosanoidok közé tartozó, 22 szénatomból álló vegyület, amely *in vivo* egy membránlipid-prekursorból, az N-arachidonoil-foszfatidol-etanol-amidból (NAPE) képződik. Ugyancsak az eicosanoidok családjába tartozik a 2-AG (2-arachidonoyl glycerol), ami a diacyl-glycerolból (DAG) képződik a DAG-lipáz segítségével. Az endocannabinoidok nem rendelkeznek raktárakkal, hanem a „szükségletnek” megfelelő ütemben termelődnek és szabadulnak fel. Az extracelluláris térben lévő endocannabinoidokat egy szelektív „uptake” mechanizmus, az úgynevezett anandamid membrántranszporter (AMT) keletkezésüket követően eltávolítja, hogy aztán a sejtekben zsírsavamid-hidroláz (FAAH) vagy a 2-AG esetében monoacylglycerol-lipáz (MAG-lipáz) segítségével metabolizálódjanak. Az eredetileg endocannabinoidként leírt AEA endovanilloid vegyületként is ismert, azaz a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) közvetlen aktivációjára is képes; sőt, a TRPV1 aktivációja (például kapszaicinnel) AEA felszabadulását váltja ki szenzoros neuronokon. A szintetikus cannabinoidok köre is egyre bővül a cannabinoid rendszer vizsgálatának középpontba kerülésével. Ide tartoznak a kísérleteink során is használt CB1 agonista *arachidonoyl-2-chloro-ethylamide* (ACEA), valamint a CB2 agonista JWH-015.

Cannabinoid receptorok

Az 1-es típusú cannabinoid receptort (CB1) először a központi idegrendszerben írták le. Egyebek mellett szabályozó szerepet tölt be a szinaptikus folyamatokban, a memóriában és a motoros tanulásban. A 473 aminosavból álló, 60 kDa tömegű molekula szerkezetileg a 7-transzmembrán (7-TM) fehérjék közé tartozik. A CB1 G-protein mediált jelátvitellel működő, metabotróp receptor, mely az adenilát-cikláz (AC) gátlásával csökkenti a cAMP szintet, ezzel gátolja a protein kináz A-t (PKA), és így különböző fehérjék foszforilációját csökkenti. A receptorhoz feltehetőleg nem csupán inhibitorikus G-protein kapcsolódhat, így a cAMP koncentrációja attól függően változik a sejtben, hogy milyen típusú G-protein aktiválódik. A G-proteinek aktivációjának hatására a membránban különböző Ca^{2+} -és K^{+} -csatornák is megnyílhatnak, emellett a receptor stimulálása a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) szignalizációs útvonalon keresztül génexpressziós változásokat is elindíthat.

A 2-es típusú cannabinoid receptor (CB2) elsősorban az immunrendszer sejtjeiben és a hemopoetikus rendszerben (lép, thymus, tonsillák, T- és B sejtek) expresszálódik. A protein 360 aminosavból áll és 44%-os homológiát mutat a CB1 receptorral, míg a két receptor transzmembrán régiójában 68%-os a homológia. A CB2 hatását, hasonlóan a CB1-hez, G-proteinen keresztül fejti ki: az AC gátlásával csökkenti a cAMP szintet. Emellett képes a MAPK stimulálására is. Leírták, hogy a CB2 stimulálása az Erk kaszkád aktivációján keresztül génexpressziós változásokat is okozhat. Igen jellemző, hogy a receptorhoz kötődő agonista függvényében ugyanazon receptor aktivációja különböző jelátvivő rendszerek aktiválódásához vezethet. Fontos emellett hangsúlyozni, hogy a farmakológiai vizsgálatok szerint a két ismert receptor más receptorok aktiválására – pl. egyéb TRP-csatornák, peroxisóma proliferátor aktiválta receptorok (PPAR) – is képes.

A cannabinoid rendszer a bőrben

Kimutatták, hogy mindkét receptor jelentős mértékben fejeződik ki a humán bőrben előforduló számos sejttypusban (pl. epidermális keratinocyták, szőrtüsző epitheliális sejtjei, faggyúmirigy sebocytái, mastocyták). Megállapították emellett, hogy mind a HaCaT („Human Adult skin keratinocytes, low Ca^{2+} , elevated Temperature”), mind az NHEK („Normal Human Epidermal Keratinocyte”) sejtek tartalmazzák az AEA metabolizmusában szerepet játszó enzimeket, valamint képesek az endocannabinoidok szintézisére is. Az is bebizonyosodott, hogy a receptorok stimulálása a bőrben lezajló olyan folyamatokra is hatással van mint pl. a tumorigenesis, a fájdalom, a viszketés vagy éppen a haj- és szőrszál növekedése. Laboratóriumunk korábban a CB1 receptor funkcionális jelenlétét igazolta a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában: az endo- és exocannabinoidok – valószínűleg CB1 mediálta útvonalon keresztül – csökkentik a szőrszál elongációját és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukálnak a humán szőrtüszőben.

A faggyúmirigy és az azt alkotó sebocyták modellje: az SZ95 sejt vonal

A faggyúmirigy (glandula sebacea) a bőr dermisében található holokrin elválasztású mirigy, mely általában a szőrtüszővel együtt, úgynevezett pilosebaceous egységet képezve, helyezkedik el. A faggyúmirigy nem csupán egy evolúciós maradvány, hanem számos parakrin, endokrin és immunológiai funkciójával döntően hozzájárul a bőr normál homeosztatikus működésének kialakításához, és résztvesz azok szabályozásában is. A faggyú (sebum) neutrális lipidekben gazdag váladék, melyet a faggyúmirigy sejtjei, a sebocyták termelnek. A sebocyták megváltozott proliferációs és differenciációs képessége számos bőrbetegség (mint például a rosacea, a seborrhoea vagy az acne) kialakulásában játszhat központi szerepet.

A humán faggyúmirigy sejtek *in vitro* modellje az SZ95 sebocyta sejtvonal, mely bizonyítottan megőrizte a sebocyták jellemző fenotípusát; így például a differenciálódás során történő méretnövekedést és a citoplazmában nagy mennyiségben felhalmozódó lipidcseppek jelenlétét. Az immortalizált SZ95 sejtekkel végzett *in vitro* kísérletek során sikerült fényt deríteni például arra, hogy a sejtek terminális differenciálódását kísérő lipidfelhalmozódás kialakulásában a sejtmagban elhelyezkedő PPAR-oknak is fontos szerepük van. Kimutatták azt is, hogy a sebocyták differenciálódása a PPAR ligandok mellett AA-val is indukálható, minek hatására fokozódik a lipidek felhalmozódása és a sejtek apoptózisa. Az AA lipid természetű gyulladásos mediátorok, valamint proinflammatorikus citokinek termelődését is képes fokozni az SZ95 sejtekben, és e folyamatok szabályozásában a PPAR-ok szintén szerepet játszhatnak.

A humán epidermális keratinocyták és modelljük: a HaCaT sejtvonal

A keratinocyták a bőr legkülső rétegében, az epidermisben elhelyezkedő sejtek, melyek feladata a külső környezet és a test belső része közötti olyan fiziko-kémiai barrier kialakítása. A keratinocyták folyamatosan proliferálnak, majd differenciálódnak, és kialakítják az epidermis jellemző rétegeit. A keratinocyták *in vivo* és *in vitro* körülmények között is képesek például számos citokin és növekedési faktor termelésére bizonyos ingerek (pl. UV-sugárzás, tumor promóterek) hatására. A felszabadult anyagok bizonyos sejteket (pl. neutrophil granulocyták, memória T-sejtek) aktiválhatnak, így a keratinocyták fontos szerepet játszanak a bőrbe került kórokozók és antigének által kiváltott immunválasz kialakításában. Emellett megfelelő receptorhoz kötődve jelátviteli útvonalakat (pl. tirozin-kináz) indíthatnak be, melyek egymással kapcsolódva bonyolult hálózatokat alkothatnak. A NHEK sejtek a primer tenyészetükben beinduló differenciálódás során az apoptotikus folyamatoknak köszönhetően gyorsan elhalnak. Ezért vált szükségessé olyan sejtvonal megalkotása, ami *in vitro* jó modellje az NHEK sejtfolyamatainak, ugyanakkor hosszútávon

tenyésztethető, illetve fenntartható. Az e célból létrehozott sejtvonal neve a HaCaT tenyészet.

Célkitűzések

A vizsgálatok során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- ❖ A humán faggyúmirigyekhez hasonlóan kifejeződik-e a CB1 és/vagy a CB2 receptor az SZ95 sebocytákon?
- ❖ Hogyan befolyásolják az endocannabinoidok a sebocyták olyan alapvető biológiai folyamatait, mint az életképesség, a proliferáció és a differenciálódás (faggyútermelés)?
- ❖ Mely receptor(ok) közvetítésével fejtik ki celluláris hatásukat az endocannabinoidok?
- ❖ Milyen jelátviteli útvonalak/génexpressziós változások közvetíthetik az endocannabinoidok hatásait?

Kísérleteink második felében az AEA humán epidermális keratinocyták életfolyamataira gyakorolt szabályozó szerepét vizsgáltuk *in vitro* és *in situ* körülmények között. A vizsgálatok során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- ❖ Hogyan befolyásolja az AEA a primer NHEK, illetve az azok modelljéül szolgáló immortalizált HaCaT keratinocyták alapvető életfolyamatait?
- ❖ Az AEA *in situ* körülmények között is képes kifejteni celluláris hatásait?
- ❖ Mely receptor(ok) közvetítésével, illetve milyen jelátviteli útvonalakon keresztül fejt ki hatásait az AEA?

A fenti kérdésekre kombinált farmakológiai eljárások és molekuláris biológiai technikák felhasználásával végzett kísérleteinkben kerestük a válaszokat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Az SZ95 sejteket megfelelően kiegészített Sebomed Basal Medium-ban, az NHEK keratinocytákat EpiLife szérummentes keratinocytá médiumban, míg a HaCaT keratinocytákat Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban tenyésztettük. A tenyésztést 5% CO₂ tartalmú légtérben, 37 °C-on végeztük.

Immuncitokémia, immunhisztokémia

A sejteket acetonos fixálást követően az adott primer antitestekkel egy éjszakán át 4°C-on, a fluoreszcein-izothiociáttal (FITC) konjugált másodlagos antitesttel pedig 60 percen keresztül inkubáltunk 37°C-on. A sejtmagot 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) fluoreszcens magfestővel tettük láthatóvá a fluoreszcens mikroszkópban. Negatív kontrollként azokat a megfestett fedőlemezeinket használtuk, melyeken az antitesteket szintetikus blokkoló peptiddel együtt alkalmaztuk.

A CB1 és CB2 humán faggyúmirigyben történő kimutatására szolgáló szövetminták plasztikai sebészeti beavatkozásokból származtak a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával. 4%-os formalinos fixálást követően a paraffinba ágyazott szövetdarabokból 4 µm-es metszeteket készítettünk. A deparaffinálást, majd az antigénfeltárást követően (8 mM TrisHCl puffer), a szövetben előforduló endogén peroxidázokat peroxidáz blokkoló oldattal, míg a nem specifikus kötőhelyeket Protein Block szérummentes reagenssel blokkoltuk. A metszeteket az elsődleges CB1-és CB2-ellenes antitesttel egy éjszakán át, majd másnap nyúl ellen kecskében termeltetett EnVision+®-nel 30 percen keresztül inkubáltuk. A peroxidáz-aktivitás kimutatására diamino-benzidint (DAB), míg magfestésre Mayer-féle hematoxilint használtunk. Negatív kontrollként az elsődleges antitestet

szintetikus blokkoló peptiddel inkubáltuk. A metszetekről Nikon Eclipse E600 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket.

Az epidermális keratinocyták *in situ* vizsgálatát kollaborációs partnereink végezték. A humán bőrből származó tenyészetekben a proliferáló és az apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására a Ki-67/TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) kettős festést alkalmaztak. Az eljárás során az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker immunhisztokémiai kimutatása ad felvilágosítást, az apoptotizáló sejtek megjelenítése pedig a DNS-fragmentáció során keletkezett szabad 3' végek jelölésén alapul.

Western blot

A homogenizált minták proteintartalmának meghatározását követően SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk, majd a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt a szabad kötőhelyek blokkolását követően a megfelelő primer antitesttel inkubáltuk. A TRPV1 kivételével (melyet HRP-konjugált IgG-vel fedtünk) a membránokat EnVision+®-nel inkubáltuk, majd az immunjeleket kemilumineszcens kit segítségével tettük láthatóvá; a jelintenzitást az optikai denzitás meghatározásával számszerűsítettük szoftver segítségével.

Szemi-kvantitatív reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A CB1, CB2 és TRPV1 mRNS szintű meghatározására Trizol segítségével teljes RNS-t izoláltunk, majd a specifikus primerek és enzimek felhasználásával reverz transzkripciót végeztünk GeneAmp® PCR System 2400 DNA Thermal Cycler segítségével. A termékeket ethidium-bromidot tartalmazó 1,5%-os agaróz gélen választottuk el, majd UV-fény alatt tettük láthatóvá. Az analízist Image Pro Plus 4.5.0 szoftver segítségével végeztük.

Kvantitatív valós idejű PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt. A relatív expressziókat a belső kontroll expressziójára normalizálva, a ΔCT módszert alkalmazva adtuk meg.

A sejtek életképességének meghatározása

A viabilitás vizsgálatokor kolorimetriás MTT assay-t alkalmaztunk: a sárga színű metilthiazol-tetrazólium (MTT) por az élő sejtek mitokondriumaiban a mitokondriális dehidrogenázok hatására lila színű formazán kristállyá alakul át a tetrazólium gyűrű hasítása során. A megfelelő farmakonok különböző koncentrációival kezelt sejtekben keletkező formazán kristályokat „MTT szolubilizáló oldatban” feloldottuk, koncentrációjukat pedig kolorimetriás úton határoztuk meg 550 nm-en. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg.

Az apoptotikus folyamatok vizsgálata

A pro-apoptotikus kaszpázok aktivitásának fluorimetriás mérésén alapul a Poly Caspases Detection Kit. A karboxi-fluoreszcein csoporttal (FAM) ellátott reagens a sejtmembránon áthatolva kovalens kötést képes kialakítani az aktiválódott kaszpáz aktív centrumával, ami fluoreszcenciaintenzitás változásával jár. FlexStation³⁸⁴ II FLuorescence Image microPlate Reader (FLIPR) segítségével 490 nm-en gerjesztve, 530 nm-en detektáltuk a fluoreszcenciaintenzitást.

Apoptózis további vizsgálatára használt Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit elve azon alapul, hogy az apoptotikus sejtek membránján a foszfatidil-szerin externalizálódik, így a hozzá specifikusan kötődő fluoreszcensen jelölt annexint mérni tudjuk. A fluoreszcenciaintenzitást 490 nm-

es hullámhosszon gerjesztve és 520 nm-en detektálva mértük FLIPR segítségével.

A mitokondriális membránpotenciál csökkenés (mint apoptózis marker) detektálására a MitoProbe™ DiI_{C1}(5) Assay Kitet használtuk. A festék a mitokondriális membránpotenciál nagyságának függvényében akumulálódik a sejtek mitokondriumában, ezért a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk; a jeleket 630 nm-es hullámhosszon gerjesztve és 670 nm-en detektálva mértük FLIPR segítségével.

A citotoxicitás/sejtnekrózis vizsgálata

Az akut (24 órás) kezelés citotoxikus hatásának vizsgálata a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) enzim felszabadulásának mérésével történt. A sejthalál mértékét egy kétlépéses enzimátikus folyamat segítségével határoztuk meg, melynek során a resazurin redukcióján keresztül narancs-fluoreszcens resorufin képződött. A keletkező resorufin mennyiségét FLIPR segítségével, 545 nm excitációs és 590 nm emisszós hullámhossz mellett detektáltuk. A hosszútávú kezelések esetleges citotoxikus hatását SYTOX Green jelöléssel vizsgáltuk. A festék csak a dezintegrálódott plazma-, illetve magmembránon keresztül képes bejutni a sejtmagba, ahol azután a duplaszálú DNS-hez kötődik.

Az SZ95 sebocyták esetében az apoptotikus és nekrotikus sejtpopulációk arányát annexin V – propidium jodid kettős festéssel egyidejűleg is vizsgálhattuk. A sejteket a tripszinezést és festést követően FACS-pufferben szuszpendáltuk, majd a fluoreszcencia intenzitást Coulter Epics XL áramlási citométer segítségével mértük. Az adatok kiértékelését a WinMDI 2.8 számítógépes program segítségével végeztük.

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása

A sebocyták lipidtartalmának szemikvantitatív vizsgálatára a sejteket Oil-Red O festésnek vetettük alá. A paraformaldehiddel fixált sejteket Oil-Red O

oldattal (60%-os izopropanolban oldva) jelöltük, majd a sejtmagot Mayer-féle hematoxilinnel festettük.

A kvantitatív vizsgálatokhoz fluoreszcens Nile Red jelölést alkalmaztunk. Az eltérő gerjesztési és detektálási hullámhosszok miatt (neutrális lipidek: excitáció 485 nm-en, emisszió 565 nm-en; poláros lipidek: excitáció 540 nm-en, emisszió 620 nm-en) lehetőségünk nyílt a kétféle lipidtartalom egymás melletti detektálására. A sebocyták a differenciálódás során lipideket halmoznak fel a cytoplazmában, így a poláros lipideket belső kontrollként használhattuk, hiszen felhalmozódásuk leginkább a sejtszám növekedésével korrelált.

RNS interferencia (siRNS)

A sejteket 40 nM humán TRPV1, valamint CB1 és CB2 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens segítségével. Kontrollként a sejteket Stealth RNAi Negative Control duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk (scrambled siRNS).

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

A sejteket 5 μ M kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM) inkubáltuk 37°C-on, majd a azokat invertáló fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk. Kísérleteink során a sejteket folyamatosan Tyrode oldatban mostuk. A vizsgált anyagokat a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. A $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadossal (F_{340}/F_{380}) jellemeztük.

Statisztikai analízis

Adataink feldolgozásához Origin Pro Plus 6.0 szoftvert használtunk, eredményeinket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. Az átlagok különbségét páros *t*-próbával, független mintás *t*-próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), valamint Bonferoni és Dunett post-hoc tesztekkel vizsgáltuk. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

1. Kísérletek humán sebocytákon

Humán faggyúmirigyben a CB1 és a CB2, míg SZ95 sebocytákon csupán a CB2 fejeződik ki

Kísérleteink során *in situ* humán faggyúmirigy sejtjeiben markáns CB1 és CB2 immunpozitivitást tapasztaltunk: a CB1 expressziója főként a faggyúmirigy perifériáján elhelyezkedő differenciálatlan sejtekre, míg a CB2 receptor jelenléte inkább a centrálisan elhelyezkedő sejtekre, illetve azok membránjára volt jellemző. Az SZ95 sebocytákon immuncitokémiával, Western blot technikával, valamint RT-PCR módszerrel csupán a CB2 receptor erőteljes expresszióját tapasztaltuk, míg a CB1 jelenlétét nem sikerült igazolnunk.

Az SZ95 sebocyták endocannabinoidokat termelnek

A sebocyták endogén cannabinoid tartalmának meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy a sejtek jelentős mennyiségű AEA-ot ($66,7 \pm 10$ fmol/mg szövet) és 2-AG-t ($6,2 \pm 1$ pmol/mg szövet) tartalmaznak. Ez a mennyiség összevethető a korábban leírt, különböző bőrterületeken talált endocannabinoid koncentrációkkal.

Az endocannabinoidok fokozzák az SZ95 sebocyták lipidszintézisét és apoptózist indukálnak

A továbbiakban az endocannabinoid rendszer lehetséges funkcionális szerepének vizsgálatát tűztük ki célul a sebocyták olyan alapvető sejtfolymataiban, mint a lipidtermelés, a differenciálódás és a sejtproliferáció. A sebocytákat endocannabinoidokkal (AEA, 2-AG) kezelve azt tapasztaltuk, hogy kontrollhoz képest mindkét anyag hatására jelentősen megnőtt a lipidcseppek száma, illetve azok mérete. A lipidek akkumulációját kvantitatív módon is megvizsgálva bebizonyosodott, hogy mind az AEA, mind pedig a 2-AG dóziszfüggő módon, a kontrollhoz viszonyítva legalább kétszeresére fokozta a differenciálódást jelző neutrális lipidek termelődését.

Megállapítottuk továbbá, hogy az endocannabinoidok dózistól függően, jelentősen lecsökkentették az élő sejtek számát is. A jelenség hátterében álló folyamatokat elemezve kimutattuk, hogy az AEA és a 2-AG jelentősen lecsökkentették a mitokondriális membránpotenciál értékét (apoptózis), míg a legmagasabb alkalmazott koncentrációjuk emellett már jelentős SYTOX Green akkumulációt és G6PD-felszabadulást is kiváltott (nekrózis). Ezen eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az endocannabinoidok jórészt apoptózist, míg nagyobb koncentrációkban alkalmazva apoptózist és/vagy nekrozist indukáltak az SZ95 sebocytákban.

Az AEA CB2-mediált úton fejti ki hatását

Ismert, hogy az AEA a CB1 és CB2 mellett a TRPV1 csatorna agonistája is, mely molekula jelenlétét laboratóriumunk korábban sikerrel igazolta SZ95 sebocytákon. Hogy kiderítsük, melyik receptor közvetítésével fejti ki az AEA a hatását, CB1, CB2 és TRPV1 specifikus antagonisták (rendre AM-251, AM-630 és I-RTX) jelenlétében is elvégeztük fent bemutatott kísérleteinket. Mind a CB1, mind a TRPV1 gátlása hatástalannak bizonyult; ezzel szemben a CB2 specifikus antagonisták AM-630 képes volt kivédeni az AEA lipidakkumulációt stimuláló

hatását. Kimutattuk azt is, hogy az AM-630 nemcsak az AEA indukálta lipidszintézist gátolta, hanem annak sejtszámcsökkentő és apoptózist indukáló hatását is. Ezzel jó összhangban megállapítottuk, hogy a CB2 specifikus agonista JWH-015 az AEA-dal megegyező hatást produkált, míg a szintetikus, CB1-receptor specifikus agonista ACEA nem változtatta meg a sejtek zsírtermelését.

Ezt követően siRNS technikát alkalmazva is megvizsgáltuk a CB2 szerepét az AEA lipidszintézist fokozó hatásában. A CB2 „csendesített” sebocytákat vizsgálva kimutattuk, hogy ezen sejtek bazális lipidtermelése lényegesen alacsonyabb volt, mint a kezeletlen kontrollé vagy a „scrambled” RNS-sel kezelt sejteké. Amint az várható volt, a CB1 siRNS-sel transzfektált sejtek lipidtartalmában nem tapasztaltunk változást. Ezen túlmenően az is bebizonyosodott, hogy CB2 géncsendesített sebocytákban az endocannabinoidok nem tudta kifejteni lipidtermelést fokozó hatását. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a CB2 jelentős szerepet játszik az endocannabinoidok által kifejtett celluláris hatások kialakulásában.

Az AEA celluláris hatásának kifejlődésében a MAPK útvonal is részt vesz

Számos sejttípus esetén leírták már, hogy az aktív cannabinoid receptorok több intracelluláris útvonalat is aktiválhatnak, ilyen például a protein kináz C (PKC), a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) vagy a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) útvonal; ezért a továbbiakban a CB2-mediált jelátviteli útvonal alkotóit próbáltuk feltérképezni a humán SZ95 sebocytákban.

Az AEA lipidtermelődést fokozó hatását nem tudtuk kivédeni sem a PKC inhibitor GF109203X-al, sem pedig a PI3K-t gátló wortmanninnal. Ezzel szemben a MAPK inhibitor PD098059 szignifikánsan csökkentette az anandamid hatását. A MAPK útvonal részvételét támasztották alá Western blottal kapott eredményeink is, miszerint az AEA és a 2-AG a MAPK Erk-1/2 jelentős, átmeneti foszforilációját váltotta ki SZ95 sebocytákban. Ezek alapján

feltételezhető, hogy a CB2-mediált sejtfolyamatokban a MAPK útvonal aktiválódása is szerepet játszhat humán sebocyták esetén.

Az endocannabinoidok fokozzák a lipidszintézis szabályozásában szerepet játszó gének expresszióját

Végezetül megvizsgáltuk az endocannabinoidok hatását a lipidtermelés szabályozásában kulcsfontosságú PPAR-ok (PPAR α , PPAR δ és PPAR γ), valamint újonnan leírt célgénjeik – a COX2 (Cyclooxygenase-2), az ADRP (Adipose differentiation-related protein), valamint a PGAR (PPAR γ -regulated angiopoietin-related protein) – expressziójára. Kvantitatív valós idejű PCR segítségével megállapítottuk, hogy mind az AEA, mind a 2-AG 24 óra elteltével (mely időn belül hatékonyan stimulálták a sejtek lipidszintézisét is) jelentősen fokozta a PPAR δ és γ génexpresszióját a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A PPAR α gén szintjét 24 óra elteltével csak a 2-AG volt képes szignifikánsan megemelni. A további vizsgált géneknél (COX-2, ADRP, PGAR) már 12 óra elteltével drámaian, mintegy 10-15-szörösére fokozódott a génexpresszió mértéke, ami ugyancsak a PPAR γ endocannabinoidok általi aktiválódását támasztja alá. Mindez arra utal, hogy az endocannabinoidok faggyútermelést fokozó hatásában szerepet játszik a lipidszintézist pozitívan reguláló gének expressziójának fokozása. Ezen eredményünket az is megerősítette, hogy az SZ95 sebocytákon a PPAR γ szelektív inhibitor, a GW9662 képes volt csökkenteni az anandamid lipogén hatását.

Mindezen eredményeink az sugallják, hogy a humán faggyúmirigy sebocytáiban termelődő endocannabinoidok, feltehetően a CB2–MAPK–PPAR jeltáviteli útvonal beindítása révén, meghatározó szereppel bírnak a sejtek lipidtermelésének és növekedésének szabályozásában.

2. Kísérletek humán epidermális keratinocytákon

A humán epidermális keratinocyták egyaránt expresszálják a CB1-et, a CB2-t és a TRPV1-et

A korábbi irodalmi adatokkal megegyezően, valamint laboratóriumunk eredményeit megerősítve immuncitokémiával, Western blot technikával, valamint RT-PCR és kvantitatív „valós idejű” PCR módszerekkel azonosítottuk a CB receptorok (CB1 és CB2) és az „ionotróp AEA receptor” TRPV1 jelenlétét NHEK és HaCaT keratinocytákon.

Az AEA csökkenti a sejtek életképességét és apoptózist indukál in vitro

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az endocannabinoid AEA hogyan befolyásolja a keratinocyták növekedését és túlélését. Megállapítottuk, hogy az AEA dózisfüggő módon csökkentette az NHEK és a HaCaT keratinocyták életképességét és egyben proliferációját. Kimutattuk azt is, hogy az AEA dózis-függő módon apoptózist (lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált, fokozta az annexin-V pozitív sejtek számát, aktiválta a proapoptotikus kaszpázokat), míg nagy koncentrációban nekrozist (fokozta a halott sejtekből felszabaduló G6PD mennyiségét, valamint az integritásukat veszített sejtek nukleáris DNS-ét festő fluoreszcens SYTOX Green festék akkumulációját) indukált.

A humán bőrben az AEA in situ is kifejti antiproliferatív és proapoptotikus hatásait („skin organ culture” technika)

Eredményeink megerősítésére kollaborációs partnereinkkel humán fejbőrből készített, szérummentes közegben tartott „skin organ culture” tenyészeteken is vizsgáltuk a proliferáló, illetve apoptotikus sejtek arányát AEA jelenlétében. Ki67-TUNEL kettős festést alkalmazva sikerült alátámasztanunk eddigi eredményeinket: azaz 30 μ M AEA alkalmazásakor a proliferáló, Ki67+

sejtek száma lecsökkent, míg az apoptotikus, TUNEL+ sejtek száma jelentősen megnőtt a 14 napos vizsgálat során.

Az AEA celluláris hatásait a CB1 és a TRPV1 közvetíti

Ezt követően a jelenségek háttérében lezajló jelátviteli mechanizmusok vizsgálatával folytattuk kísérleteinket. CB1, CB2 és TRPV1 specifikus antagonistákat alkalmazva kimutattuk, hogy a CB1 antagonista AM-251 és TRPV1 antagonista CPZ és I-RTX képes volt kivédeni az AEA életképességet csökkentő és sejthalált indukáló hatását, míg a CB2 receptort gátló AM-630 hatástalannak bizonyult. A CB1 és a TRPV1 antagonista együttes alkalmazása nem volt additív az AEA hatásának kivédése szempontjából.

Mivel a TRPV1 funkcionális Ca^{2+} -csatornaként működik, megvizsgáltuk a Ca^{2+} szerepét az AEA hatásának kifejlődésében is. Eredményeink szerint a csökkentett Ca^{2+} -koncentrációjú közegben az AEA (normál Ca^{2+} -szint mellett tapasztalt) gátló hatása elmaradt, mely jelenség felveti a TRPV1, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna szerepét az AEA hatásának kifejlődésében (a csökkentett Ca^{2+} -szint önmagában nem befolyásolta a sejtek életképességét). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a CB1 mellett a TRPV1 is szerepet játszhat az AEA által kifejtett, fent említett hatásokban.

Vizsgálataink során siRNS technikát is alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy a CB1 és TRPV1 géncsendesítése szignifikánsan fokozta a sejtek életképességét. Kimutattuk azt is, hogy ezen sejteken az AEA nem tudta kifejteni fentebb tapasztalt celluláris hatásait. A farmakológiai vizsgálatok eredményeihez hasonlóan a CB1 és a TRPV1 együttes géncsendesítése ezuttal sem bizonyult additívnak. Ezen eredményeink tovább erősítették azt a felvetést, miszerintszerint a receptorok konstitutív aktivitása gátolja az epidermális keratinocyták növekedését és proliferációját.

Az AEA celluláris hatásait feltehetően egy szekvenciálisan aktiválódó jelátviteli mechanizmus ($CB1 \rightarrow TRPV1 \rightarrow Ca^{2+}$ -beáramlás) mediálja humán keratinocytákban

Mivel a farmakológiai és siRNS kísérletek során sem láttuk jelét a $CB1$ és a $TRPV1$ gátlás additivitásának, ezért felmerült, hogy az AEA nem egyszerre, hanem időben egymás után aktiválja a receptorokat. Ennek tisztázása érdekében további kísérleteket végeztünk. Mivel a $TRPV1$ funkcionális Ca^{2+} csatornaként működik a HaCaT keratinocytákon, fura 2-AM Ca^{2+} -érzékeny festék segítségével optikai úton mértük az anandamid hatására a sejteken az $[Ca^{2+}]_{IC}$ -ban bekövetkező változásokat. Pozitív kontrollként a $TRPV1$ specifikus agonista CAPS-t használtuk, ami bizonyítottan fokozza a humán epidermális keratinocyták $[Ca^{2+}]_{IC}$ -ját.

Az „akutan” alkalmazott AEA dóziszfüggően megnövelte a sejtek $[Ca^{2+}]_{IC}$ -ját; ez az amplitúdó-emelkedés a kontrollként alkalmazott $TRPV1$ specifikus 10 μM CAPS amplitúdójával közel azonos nagyságú volt. Ez a hasonlóság ugyanakkor nem volt elmondható a két anyag hatásának kinetikájáról: míg a CAPS gyorsan, rövid idő alatt okozott tranziens Ca^{2+} -koncentráció emelkedést, addig az AEA jóval hosszabb idő alatt tudta csak kifejteni hatását. Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy az AEA „akut” alkalmazásakor kiváltott tranziens kialakulása kivédhető-e az eddig alkalmazott antagonistákkal. Megállapítottuk, hogy az AEA által indukált Ca^{2+} -tranziensek egyaránt gátolhatók voltak a $CB1$ antagonistá AM-251, valamint a $TRPV1$ antagonistá I-RTX és CPZ alkalmazásával, továbbá az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentésével. Kimutattuk azt is, hogy a $CB1$ and $TRPV1$ inhibitorok együttes alkalmazása ismételten nem váltott ki additív hatást. Ezen eredményeink arra utaltak, hogy a $CB1$ mellett a $TRPV1$, mint funkcionális Ca^{2+} -csatorna, is szerepet játszik az AEA hatásának kialakításában.

Habár mindkét receptor antagonistája kivédte az AEA által létrehozott Ca^{2+} -tranzien kialakulását, a $CB1$ és a $TRPV1$ gátlás kinetikája jelentősen

különbözött egymástól. Azaz, míg a TRPV1 antagonisták adagolásakor nem változott a hatás kialakulásához szükséges idő (TTP), addig a CB1 gátlás hatására az amplitúdó csökkenése mellett a tranziens kialakulásához szükséges idő is jelentősen (mintegy 200%-kal) megemelkedett. Végezetül (várakozásainknak megfelelően) bebizonyosodott, hogy a CAPS hatását jelentős mértékben meggátolta a TRPV1 antagonista CPZ és I-RTX, valamint az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése, ugyanakkor nem befolyásolta a CB1 antagonista AM-251 alkalmazása.

Mindezen eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy az AEA keratinocita proliferációt gátló és sejthalált indukáló hatását feltehetően egy szekvenciálisan aktiválódó és egymással szoros kapcsolatban álló jelátviteli láncolat (CB1 $\rightarrow$ TRPV1 $\rightarrow$ Ca^{2+} -beáramlás) beindításán keresztül fejt ki.

MEGBESZÉLÉS

A humán SZ95 sebocyták funkcionális, konstitutív aktivitással bíró endocannabinoid rendszerrel rendelkeznek

A bőr és függelékeinek biológiáját elemző kísérleteinkben kutatócsoportunk korábban sikerrel mutatta ki a funkcionális endocannabinoid rendszer kifejeződését a humán szőrtüszőben. Az azzal funkcionális egységet képező faggyúmirigyek esetén ugyanakkor keveset tudtunk a cannabinoid rendszer jelenlétéről, illetve annak funkciójáról. Elsősorban ezért választottuk kísérleteink első felének alanyául a faggyúmirigyet, illetve az abból származtatott SZ95 sebocyta sejtvonalat.

Először a humán faggyúmirigy CB1 és CB2 expressziós mintázatát vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. Ständer és munkatársainak eredményeit laboratóriumunk is alátámasztotta, miszerint mindkét receptor

megtalálható a humán faggyúmirigyekben *in situ*. Ugyanezt már nem mondhatjuk el a faggyúmirigyből származó immortalizált SZ95 sejtvonalról: immuncitokémiával, valamint Western blot technikával igazoltuk a CB2 receptor jelenlétét a sebocytákon, míg a CB1 expressziója nem volt megfigyelhető. RT-PCR-technikával végzett mRNS szintű vizsgálataink során szintén csak a CB2 receptort sikerült kimutatnunk.

Kollaborációs partnereink emellett kimutatták, hogy az SZ95 sebocyták képesek az AEA és a 2-AG termelésére (AEA esetében $66,7 \pm 10$ fmol/mg; 2-AG esetében $6,2 \pm 1$ pmol/mg). Ez a mennyiség összevethető volt a korábban leírt, különböző állati bőrterületeken talált endocannabinoid koncentrációkkal (patkány talp- és egér fülmintákban), viszont mintegy 10-szeres mennyiségben meghaladják a laboratóriumunk által a humán follikulusokban leírt koncentrációkat (6,6-11,2 fmol/mg szövet anandamid; 0,3 fmol/mg szövet 2-AG).

Megvizsgáltuk azt is, hogy a cannabinoidok befolyásolják-e a sebocyták differenciálódását jelző neutrális lipidek szintézisét. Azt tapasztaltuk, hogy az AEA- és a 2-AG-kezelés hatására jelentősen fokozódott a sejtekben a lipidszintézis. A vegyületek emellett csökkentették a sebocyták életképességét is, melynek hátterében főként az apoptotikus folyamatok beindulása állt.

Irodalmi adatok szerint az AEA celluláris hatásait a CB1, CB2 és/vagy TRPV1 mediálta útvonalon keresztül hozza létre (azaz mind endocannabinoid, mind „endovanilloid” funkciókkal rendelkezhet). Ezen kívül laboratóriumunk munkáinak köszönhetően már azt is tudtuk, hogy a TRPV1 megtalálható az SZ95 sebocytákon; ezért munkánk fontos lépése volt meghatározni azt, hogy az endocannabinoidok mely receptor(ok)on fejtik ki hatásukat. Az AEA sejtszámcsökkentő és apoptózist indukáló hatását kivédte a CB2 specifikus antagonist, ugyanakkor a CB1 és a TRPV1 gátlása hatástalannak bizonyult. Szintetikus agonistákkal végzett kísérleteink ugyancsak a CB2 receptor funkcionális jelenlétét támasztották alá.

Feltételezhető volt tehát, hogy az AEA hatásait kizárólag a CB2 aktivációján keresztül fejtette ki. Ezt az elképzelést erősítették a CB-géncsendesítés során kapott eredményeink is, miszerint az AEA a CB2-géncsendesített sejteken hatástalannak bizonyult. Megfigyeltük azt is, hogy a CB2 siRNS-sel kezelt sejtek alap faggyútermelése lényegesen alacsonyabb volt, mint a nem transzfektált kontroll sejteké. Ezen eredményünk arra utal, hogy az SZ95 sebocyták lipidszintézist szabályozó jelátviteli mechanizmusában az endocannabinoid rendszer (konkrétan a CB2) funkcionális szereppel bír.

Kísérleteink során megvizsgáltuk azokat az intracelluláris jelátviteli útvonalakat (PKC, MAPK, PI3K) is, melyekről korábban leírták, hogy résztvehetnek az endocannabinoid szignalizáció mechanizmusában. Munkánk során bebizonyosodott, hogy a sebocyták CB2-mediált folyamataiban a MAPK útvonal aktiválódása is szerepet játszik. Az intracelluláris jelátviteli útvonal további potenciális tagjait kutatva a különböző PPAR-ok szerepét elemeztük. Korábbi kísérletes adatok arra utaltak, hogy az endocannabinoidok egyaránt lehetnek a PPAR-ok aktivátorai is. A PPAR-okról ismert, hogy a lipidmetabolizmus fontos regulátorai, sőt irodalmi adatokból azt is tudjuk, hogy a receptorcsalád tagjai szerepet játszanak a sebocyták lipidtermelésének szabályozásában is. Kísérleteink során kapott eredményeink arra utalnak, hogy az endocannabinoidok lipidakkumulációt fokozó hatásában szerepet játszhat a lipidszintézist pozitívan reguláló gének expressziójának aktiválása.

A faggyúmirigy a bőr homeosztázis szabályozásának egyik kulcsszereplője. A homeosztatis viszonyok felborulása számos kórállapot kialakulásához vezethet; ilyen például az egyik legnagyobb prevalenciájú bőrbetegség, az acne vulgaris. Az acne komplex etiológiájú gyulladásos kórkép, melynek patogenezisében egyaránt szerepet játszik a keratinocyták hiperproliferációja miatt létrejövő comedoképződés, a sebocyták fokozott és megváltozott összetételű lipidtermelése (seborrhoea), valamint patogén mikroorganizmusok (pl. *Propionibacterium acne*) elszaporodása. Mivel az acne kialakulásának egyik

első lépése a fokozott faggyútermelés, így feltételezhető, hogy a faggyúmirigyek endocannabinoid rendszerének kóros túlműködése szerepet játszhat a betegség patogenezisében. Így kísérleteink során szerzett adataink – reményeink szerint – kiterjedt klinikai kutatásokat indíthatnak el, melyek feltárhatják, hogy a vegyületek miként használhatók nemcsak az acne, hanem más, a faggyúmirigy zavarával (akár túlműködésről, akár alulműködésről legyen szó) társuló bőrbetegségek kezelésében is.

Az AEA humán keratinocytaikon kifejtett hatását a CB1 és a TRPV1 egymást követő aktivációja közvetíti

A disszertáció második felében bemutatott munkánk során bebizonyítottuk, hogy a humán epidermális keratinocytaikon – *in situ* és *in vitro* egyaránt – az AEA gátolta a humán keratinocytaik proliferációját, miközben apoptózist indukált.

Kísérleteink során – korábbi irodalmi adatokat alátámasztva – laboratóriumunk is kimutatta NHEK és a HaCaT keratinocytaikon a TRPV1 mellett a CB1 és a CB2 jelenlétét is. Farmakológiai vizsgálataink során ezt követően azt tapasztaltuk, hogy az AEA mind az NHEK sejtek, mind a HaCaT keratinocytaik életképességét csökkentette és sejthalált indukált, valamint, hogy ezen hatások nagymértékben függtek a sejtekbe beáramló Ca^{2+} mennyiségétől. Kollaborációs partnereink humán bőr túlélő szervkultúrában végzett kísérletei alátámasztották *in vitro* sejteken kapott kísérleti eredményeinket; kimutatták, hogy AEA hatására *in situ* is csökkent a keratinocytaik proliferációja és nőtt az apoptotikus sejtek aránya.

Funkcionális vizsgálati eredményeink azt az hipotézist vetették fel, miszerint az AEA az epidermális keratinocytaikon egy összehangolt, meghatározott sorrendű és szekvenciálisan aktiválódó $\text{CB1} \rightarrow \text{TRPV1} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ -beáramlás jelátviteli útvonalat indít be.

A modell valódiságát számos kísérletes eredményünk támasztotta alá:

- (i) Az AEA sejtszámot csökkentő, apoptózist indukáló, valamint $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t növelő hatását CB1 és TRPV1 antagonisták, az $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése, valamint a CB1 és TRPV1 receptorok siRNS-mediálta lecsendesítése egyaránt kivédte.
- (ii) Érdekes módon a CB1 és a TRPV1 specifikus siRNS próbák, illetve a CB1 és a TRPV1 antagonisták együttes alkalmazása nem váltott ki additív hatást, ami azt sugallja, hogy az AEA nem „ko-aktiválta” a CB1 és TRPV1 molekulákat.
- (iii) A receptorok aktiválódásának időbeli sorrendjét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az AEA – szemben az azonnali Ca^{2+} -beáramlást kiváltó „direkt” TRPV1 agonista CAPS hatásával – csak jóval hosszabb idő eltelte után emelte meg az $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t. Habár nem zárható ki, hogy az AEA lassabb hatása a molekula korábban leírt nagyobb lipofilicitásának volt köszönhető, eredményeik arra utalnak, hogy az AEA nem közvetlenül aktiválta a TRPV1-et, hanem eddig fel nem tárt szignalizációs útvonal(ak) beindítása révén.
- (iv) Ezt a feltételezést – miszerint a TRPV1 aktivációjához vezető, az AEA által beindított „upstream” mechanizmusok között első helyen szerepel a CB1 aktivációja – az is bizonyítja, hogy habár a CB1 és TRPV1 antagonisták egyaránt csökkentették az AEA által beindított Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját, csak a CB1 antagonista növelte meg Ca^{2+} -tranziensek TTP értékeit (míg a TRPV1 „csatorna-antagonistái”, melyek nem befolyásolják a CB1 aktivitását, nem váltottak ki hasonló hatásokat).
- (v) Végezetül azon eredményünk, miszerint a TRPV1 agonista CAPS Ca^{2+} -beáramlást indukáló hatását kizárólag a TRPV1 antagonisták és a $[Ca^{2+}]_{EC}$ csökkentése védte csak ki, míg a CB1 gátlása nem befolyásolta azt arra utal, hogy az AEA nem egy „fordított sorrendű” $AEA \rightarrow TRPV1 \rightarrow CB1 \rightarrow Ca^{2+}$ -beáramlás mechanizmust indít be humán keratinocytákon.

Korábbi irodalmi adatokkal jó összhangban kísérleteink során mi is kimutattuk a CB2 receptor kifejeződését a humán epidermális keratinocytákon. Molekuláris biológiai kísérleteinkben ugyanakkor bebizonyosodott, hogy habár

az AEA ennek a receptornak is jól ismert agonistája, a CB2 feltehetően nem játszik szerepet ezen sejtek AEA-indukált sejtválaszainak kialakításában. Feltételezhető tehát, hogy a CB2 funkcionális szerepét a keratinocyták „életében” más folyamatok területén töltheti be. Erre utalnak korábbi kísérletes adatok is; kimutatták például, hogy a CB2 aktiváció hatására az epidermális keratinocytákból endogén opioidok (pl. β -endorfin) szabadulnak fel, melyek ezt követően a primer afferens neuronok μ -opioid receptorain keresztül antinociceptív hatást váltanak ki. Bebizonyodott az is, hogy a CB2-mediált szignalizáció jelentős szereppel bír különböző állatmodellekben létrehozott bőrgyulladás (dermatitis) folyamatainak szabályozásában is.

Az epidermális keratinocytákon végzett kísérleteink eredményei potenciális klinikai jelentőséggel is bírnak. Mivel a CB1 és a TRPV1 antagonisták, valamint a specifikus siRNS próbák kivédtek az AEA proliferációt gátló és sejthalált indukáló hatását, kísérletes eredményeink szerint ezen újonnan felfedezett, feltehetően endogén módon aktív endocannabinoid-receptor-csatorna mechanizmus folyamatosan „kontroll alatt tartja” a sejtek növekedését, azaz véd a hiperproliferáció ellen. Ezen feltevésünket erősít(het)i Casanova és munkatársai (2003) korábbi eredményei, miszerint a cannabinoid receptorok stimulálása apoptózist indukált epidermális tumorsejtekben. Úgy tűnik tehát, hogy a bőr „finoman hangolt” endocannabinoid „tónusa” – melyet a folyamatosan vagy az igényeknek megfelelően „on-demand” termelődő endocannabinoidok állítanak be – nemcsak a bőrfüggelékek növekedésének, a faggyúmirigy zsírtermelésének, valamint a bőr immunfolyamatainak szabályozásában vesz részt, hanem mélyreható módon képes az epidermális folyamatok befolyásolására is.

Természetesen további kísérletek szükségeltetnek a fent bemutatott új mechanizmus *in vivo* relevanciájának megítéléséhez. Szisztematikus analízisre vár továbbá azon kérdés megválaszolása is, miszerint a bőr endocannabinoid rendszerének kóros működése szerepet játszik-e különféle dermatózisok – pl.

krónikus hiperproliferatív bőrbetegségek, viszketéssel járó kórképek, a bőr gyulladásos megbetegedései – pathogenezisében. Végezetül, reményeink szerint, kísérleteink folytatásaként olyan vizsgálatok indulnak el, melyek feltárják a bőr endocannabinoid rendszerének célzott farmakológiai manipulálásában rejlő lehetőségeket olyan nagy prevalenciájú, gyakran igen súlyos kórképek kezelésében, mint pl. a pikkelysömör vagy a bőr eredetű rosszindulatú daganatok.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben az endocannabinoid rendszer szerepét vizsgáltuk a humán bőr epidermalis keratinocytái és a faggyúmirigy-eredetű sebocyták alapvető biológiai folyamatainak szabályozásában. Laboratóriumunk korábban igazolta az endocannabinoid rendszer jelenlétét a szőrtüsző különféle elemeiben. Kísérleteink első részében a pilosebaceous egység másik tagján, a faggyúmirigy sebocytáin vizsgáltuk a rendszer funkcionális jelenlétét. A faggyúmirigyhez hasonlóan az immortalizált SZ95 sebocytákon is igazoltuk a CB2 receptor jelenlétét, azonban a CB1 receptor expressziója a sejtvonalon nem volt megfigyelhető. Kollaborációs partnereink sikerrel igazolták, hogy az SZ95 sebocyták endocannabinoid AEA-ot és 2-AG-t termelnek. Kimutattuk továbbá, hogy az endocannabinoidok jelentős mértékben és dózis-függő módon fokozták a sejtek lipidtermelését, valamint főként apoptózis következtében létrejövő sejthalált indukáltak. Az endocannabinoidok emellett a lipid homeosztázisban kulcsfontosságú szerepet betöltő PPAR magreceptor családba tartozó PPAR δ és - γ expresszióját, illetve a PPAR γ célgének kifejeződését is jelentős mértékben fokozta. Bebizonyosodott továbbá, hogy a fenti CB2 receptor-mediált sejtfolyamatokban a MAPK útvonal aktiválódása is szerepet játszhat. Mivel a

CB2 „géncsendesített” sebocyták bazális lipidtermelése alacsonyabb volt, mint a kezeletlen kontroll sejteké, kísérletes eredményeink egy új, CB2-kapcsolt, feltehetően konstitutíven aktív, endocannabinoid-szabályozott jelátviteli mechanizmus szerepére utalnak a humán sebocyták lipidszintézisének és túlélésének szabályozásában.

A CB1-et, a CB2-t és a TRPV1-et is expresszáló epidermális eredetű NHEK és HaCaT sejteken, valamint humán bőr túlélő szervkultúrán végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy az endocannabinoid AEA *in vitro* és *in situ* gátolta a sejtek proliferációját, miközben $[Ca^{2+}]_{IC}$ növekedéssel járó sejthalált indukált. Bemutattuk azt is, hogy ezen sejtfolyamatok egy új, feltehetően endogén módon aktív szignalizációs mechanizmus beindítása révén valósultak meg, mely magában foglalja a metabotróp CB1 és az ionotróp cannabinoid receptor TRPV1 szekvenciális aktiválódását. Reményeink szerint, kísérleteink folytatásaként olyan vizsgálatok indulnak el, melyek feltárják a bőr endocannabinoid rendszerének célzott farmakológiai manipulálásában rejlő lehetőségeket olyan nagy prevalenciájú, gyakran igen súlyos kórképek kezelésében, mint pl. a pikkelysömör vagy a bőr eredetű rosszindulatú daganatok.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények:

Dobrosi N, Tóth BI, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Kovács L, Bíró T. (2008): Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* 22(10), 3685-3695. **IF:7,049**

Tóth BI, **Dobrosi N**, Dajnoki A, Czifra G, Attila Oláh, Attila G. Szöllősi, István Juhász, Koji Sugawara, Paus R, Bíró T. (2010): Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential-1. *J Invest Dermatol.* (*Epub ahead of print*) doi: 10.1038/jid.2010.421. **IF:5,543**

További in extenso közlemények:

Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, **Dobrosi N**, Géczy T, Paus R. (2007): TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1772(8), 1004-1021. **IF:4,041**

Sárközi S, Almássy J, Lukács B, **Dobrosi N**, Nagy G, Jóna I. (2007): Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *J Muscle Res Cell Motil.* 28(2-3), 167-174. **IF:1,731**

Galajda Z, Balla J, Szentmiklósi AJ, Bíró T, Czifra G, **Dobrosi N**, Cseppentő Á, Patonay L, Röszer T, Balla G, Popescu LM, Lekli I, Tósaki Á. (2010): Histamine and H₁-histamine receptors faster venous circulation. *J. Cell. Mol. Med.* (*Epub ahead of print*) doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01254.x. **IF: 5,228**

Kumulatív IF: 23,592