

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Az endocannabinoid rendszer szerepe a bőr biológiai  
folyamatainak szabályozásában**

Dr. Szöllősi Attila Gábor

Témavezető: Dr. Bíró Tamás



**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

Debrecen, 2014

# **Az endocannabinoid rendszer szerepe a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az “elméleti orvostudományok” tudományágban

Írta: Dr. Szöllősi Attila Gábor okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Élettan-Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Csontos Csilla, kandidátus  
Dr. Ivanics Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet  
2014. szeptember 17. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora  
Dr. Bay Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László  
tagok: Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna  
Dr. Bay Péter, PhD  
Dr. Csontos Csilla, kandidátus  
Dr. Ivanics Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A  
épület” tanterme  
2014. szeptember 17. 13:00 óra

## Bevezetés

### *Az endocannabinoid rendszer (ECS)*

Az endocannabinoid rendszert (ECS) a *Cannabis sativa* növény hatásaiért felelős specifikus természetes anyagok (úgynevezett cannabinoidok) vizsgálata nyomán fedezték fel. A cannabinoid vegyületek kémiai vizsgálatát a fő pszichoaktív komponens, a (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 1964-ben Mechaoulam munkacsoportja általi izolálása indította el. Az első cannabinoidok által specifikusan aktivált receptort, a CB1-t, 1988-ban azonosították patkány agyból. A következő nagyobb mérföldkő a második (CB2-nek nevezett) cannabinoid receptor felfedezése volt HL-60 sejteken, melyet ezután a lép marginális zónájában található macrophágokon leírtak, majd végül egy egér lépsejt-cDNS könyvtárból azonosítottak. Bár eredetileg úgy tartották, hogy ezen klasszikus cannabinoid receptorok csak bizonyos jól meghatározott szövetekben expresszálódnak (a CB1 esetében a központi idegrendszerben, míg a CB2 esetében nem-neuronális szövetekben), mára egyértelművé vált, hogy mindkét receptor számos sejtfeleségen kifejeződik.

Az első cannabinoid receptorok molekuláris azonosítása nyomán a növényi-eredetű cannabinoidok endogén előforduló megfelelőinek kutatása is megindult. Az első két ilyen arachidonsav-származék endocannabinoidot, az N-arachidonoil etanolamint (anandamid vagy AEA) és 2-arachidonoilglicerolt (2-AG) három éven belül izolálták. Bár általános szerkezetük és funkciójuk hasonló, a szintézisük és lebontásuk biokémiai lépései, illetve receptor-affinitásuk is merőben különböző. Az AEA szintézisét nagyrészt az N-acil foszfatidiletanolamin-specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD) végzi, míg a 2-AG döntően a foszfolipáz-C és diacil-glicerol-lipáz (DAGL)  $\alpha$  és  $\beta$  aktivitásának eredményeként termelődik. Ezen endocannabinoidok inaktivációja különálló lebontó enzimek közreműködését igényli; a folyamatot az AEA esetében a

zsírsavamid-hidroláz (FAAH) , míg a 2-AG esetében a monoacilglicerol lipáz (MAGL) enzimek végzik. Mivel mindkét endocannabinoid, habár eltérő affinitással, képes a CB1 és CB2 receptorokhoz kötődni, a korai kutatások felcserélhetőnek tartották őket a szinaptikus szignalizáció modulálásában. Több mint két évtizednyi tudományos eredmény ugyanakkor egyértelműen bebizonyította, hogy az AEA és 2-AG funkciója korántsem azonos.

Bár az AEA és 2-AG a két legelterjedtebben vizsgált endocannabinoid, egyéb endogén ligandok is rendelkeznek bizonyos cannabinoid-szerű hatásokkal. Így az „endocannabinoid” megnevezés alatt egy egyre növekvő molekula-családot értünk, melynek tagjai például: a palmitoiletanolamid (PEA), az oleamid, a 2-arachidonoilglicerol éter, a virodhamin és a lizofoszfatidil inositol (LPI). Ezen endocannabinoidok nagy része nem csupán a klasszikus cannabinoid receptorokat aktiválja, hanem számos egyéb molekulát is; ezzel kiterjesztve az ECS receptor-arszenálját további metabotróp (pl. GPR18, GPR55, GPR119), ionotróp (pl. termoszenzitív tranziens receptor potenciál [TRP] csatornák) és nukleáris (pl. peroxiszóma proliferátor-aktiválta [PPAR]) receptorokra.

A GPR18 és GPR119 novel metabotróp receptorokat G-protein kapcsolt receptorok széles spektrumú vizsgálata, illetve a humán genom adatbázis bioinformatikai elemzése nyomán fedezték fel. Bár egyik receptor sem mutat jelentős homológiát a klasszikus cannabinoid receptorokkal, funkcionalitásukat elemző újabb kutatások alátámasztják azon hipotézist, hogy cannabinoid ligandok által aktiválhatóak. A GPR18, mely számos szövetben kifejeződik, valószínűleg azonos a korábban feltételezett „abnormális cannabidiol (CBD) receptor”-al, mely számos kardiovaszkuláris hatásban, valamint mikroglia, endothelium és glioma sejtek migrációnak szabályozásában vesz részt. A GPR119-et a cannabinoid receptorok csoportjához sorolták; kimutatták, hogy a metabolikus homeosztázis és energia háztartás szabályozásában vesz részt az

enteroendokrin sejtek incretin-függő inzulin- és glukagon-szerű peptid 1 felszabadulásának szabályozása révén.

A GPR55, melyet először *in silico* analitís során fedeztek fel, számos cannabinoidot köt nagy affinitással, beleértve a HU210 és JWH015 szintetikus cannabinoidokat; a 2-AG és LPI endocannabinoidokat; az AM251 és rimonobant CB1 antagonistákat; valamint a CBD és THC fitocannabinoidokat. Mivel a receptor farmakológiája meglehetősen összetett, a valós endogén ligand ezidáig ismeretlen. Ennek ellenére számos (pato)fiziológiai folyamat köthető a GPR55-höz; többek között feltételezik szabályozó szerepét a kardiovaszkuláris rendszerben, a fájdalomérzésben, a gyulladásban, az energiaháztartásban és a csontanyagcserében. Ezen túl a sejtproliferációban és a daganatképződésben is szerepet játszik, mivel a receptor fehérje és mRNS expressziója a tumorok agresszivitásának mértékével korrelál.

Bár az endocannabinoid ligandok többnyire metabotróp receptorokat aktiválnak, az ECS-hez ionotróp receptorok is tartoznak; névszerint a termoszenzitív TRP csatornák. Ezen nem-specifikus kationcsatornák által alkotott szupercsalád hat alcsaládba osztható: kanonikus (TRPC), vanilloid (TRPV), melasztatin (TRPM), policisztin (TRPP), mukolipin (TRPML) és ankirin (TRPA) csatornák.

Az ECS és TRP csatornák közötti kapcsolat először a TRPV1 ion csatorna és az ECS-hez tartozó receptorok közötti funkcionális és anatómiai hasonlóságok nyomán merült fel. A TRPV1 ioncsatorna első endogén ligandjaként a klasszikus endocannabinoid AEA-ot azonosították. A TRP csatornákra a második legismertebb endocannabinoid, a 2-AG több tanulmány szerint nincs hatással. Ugyanakkor kimutatták, hogy a 2-AG microvaszkuláris endothel sejteken  $Ca^{2+}$  felszabadulást okoz, illetve C6 glióma sejteken kiváltott anti-proliferatív hatását a TRPV1 antagonistá capsazepine (CPZ) képes volt kivédeni. Ezidáig nem tisztázott ugyanakkor, hogy ezen hatás hátterében a 2-AG

TRPV1-et aktiválni képes diacil-glicerokká való konverziója, avagy a CPZ eddig nem ismert egyéb receptorra kifejtett hatása áll.

A cannabinoidok a fentiekén túl a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (PPAR) családba tartozó nukleáris receptorok aktiválásra is képesek. Ezidáig a PPAR $\alpha$  és PPAR $\gamma$  fehérjékről bizonyosodott be, hogy aktiválhatóak különféle cannabinoid ligandok, úgymint a növényi-eredetű THC és az endocannabinoid AEA által. Ezt alátámasztva a FAAH enzim gátlása (mely az AEA és PEA szintek emelkedését okozza) PPAR $\alpha$  antagonistá által kivédhető módon okozott anti-inflammatorikus hatásokat *in vivo*.

### ***Az ECS szerepe a bőrben***

A bőr fő feladatának hagyományosan a külvilággal szembeni passzív fiziko-kémiai barrier képzést tartották. Az újabb kutatási eredmények ugyanakkor egyértelműen kimutatták, hogy ezen túlmenően a bőr és a bőr függelékek aktív neuro-immuno-endokrin szövetként is funkcionálnak. Ezen kutatások keretében az egyik ilyen újonnan felfedezett szabályozó rendszer az ECS.

A klasszikus cannabinoid receptorok a humán epidermisz differenciáltabb sejtjein (a stratum granulosum és spinosum keratinocitáin) fejeződnek ki a legnagyobb mértékben, mely felveti szerepüket ezen sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában. Ennek megfelelően mind növényi, mind szintetikus CB agonisták adagolása gátolta az immortalizált keratinociták proliferációját *in vitro* (bár ezen hatás CB1 és CB2 függetlennek bizonyult). Munkacsoportunk ugyakkor azt publikálta, hogy az AEA jelentősen és dózisfüggő módon sejthalált okozott humán keratinocitákon *in vitro*, míg *in situ* proliferáció-gátlást és apoptózist indukált az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció megnövelése révén. Ezen hatások létrejöttéhez a sejteken kifejeződő CB1 receptor és az ugyancsak jelen lévő TRPV1 csatornák szekvenciális aktivációja (CB1 $\rightarrow$ TRPV1 $\rightarrow$ Ca<sup>2+</sup>) szükséges.

Az epidermális sejtek differenciálódásában az AEA egyéb szereppel is bír, mivel a lokálisan termelt AEA csökkentette a cytokeratin CK1, CK5, involucrin és transzglutamináz-5 transzkripcióját. A barrier funkció visszatérésének sebessége is eltérőnek adódott a CB1 és CB2 knockout (KO) egerekben; a CB1 KO egerek esetében a barrier funkció lassabban, míg CB2 KO egerekben gyorsabban tért vissza.

Az ionotróp cannabinoid receptorok (hőérzékes TRP csatornák), mint  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilis csatornák, jelentős mértékben modulálják a különféle bőr sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisát, mely egyaránt szabályozza a proliferáció, differenciálódás és mediátor termelés folyamatait. A capsaicin, illetve hősokk kezelés ( $43^{\circ}\text{C}$ , 1 óráig) intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  növekményt eredményezett, mely a TRPV1 antagonistá CPZ jelenléte mellett nem alakult ki. Ez bizonyítja, hogy a csatorna valóban funkcionálisan expresszálódik ezen a sejteken.

A többi ionotróp cannabinoid receptor vonatkozásában a meleg-érzékes TRPV4, valamint a hideg-érzékes TRPA1 és TRPM8 aktiválása is gyorsította a barrier-funkció visszatérését egerekben. A TRPA1 csatorna aktivitása emellett egér kontakt-dermatitis modellben fokozta a fülvastagodás mértékét és a dendritikus sejtek migrációját is, míg *in vitro* modellben interleukin (IL)-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  termelést indukált.

Az ECS (kiváltképp a CB2 receptor) a veleszületett és szerzett immunitás számos aspektusát befolyásolja, főként anti-inflammatorikus folyamatok serkentése révén. A bőr immunsejtjein betöltött szerepéről ugyanakkor meglehetősen kevés adat áll rendelkezésre. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a monocitából differenciált éretlen (iDC) és érett dendritikus sejteken (mDC) is kifejeződik a TRPV1. Érdekes módon a hosszú-távú capsaicin kezelés, az egér modelleken tapasztaltakkal ellentétben, önmagában nem indukálta a monociták ezirányú differenciálódását, illetve az éretlen dendritikus sejtek érését sem. A capsaicin még magas koncentrációban alkalmazva sem befolyásolta a sejtek életképességét, illetve nem indukált sem apoptotikus, sem nekrotikus sejthalált.

Ezen felül a TRPV1 csatorna aktiválódása iDC-k és mDC-k számos funkcióját gátolta, úgymint a fagocitózist és a gyulladosos-mediátor termelést.

### ***Célok***

Amint azt fent bemutattuk, az ECS egy rendkívül összetett szignalizációs rendszer, mind felépítését, mind más hírvivő rendszerekkel való interakcióit tekintve. A rendszer ezen felül a szervezet számos fiziológiai folyamatában tölt be fontos szabályzó szerepet. Munkacsoportunk egyik fő kutatási területe az ECS szerepének tisztázása a bőr élettani folyamataiban. Ezen kutatásaink részeként, a jelen tézisben bemutatott munka során, egyrészt az ekkrin verejtékmirigyen kifejtett endocannabinoid hatásokat tanulmányoztuk, hiszen korábban kimutattuk, hogy az ECS rendkívül fontos szereppel bír a faggyúmirigyek biológiai folyamatainak szabályozásában. Másrésztől célunk volt a hőérzékeny TRP csatornák DC-eken betöltött szerepét további tisztázása. Mivel keratinocitákon más munkacsoportok bebizonyították, hogy a TRPV1 fontos szereppel bír a hősokk hatásainak közvetítésében, ezért jelen kísérleteinkben a DC-ken vizsgáltuk a hősokk hatását.

Az ekkrin verejtékmirigyből származtatott NCL-SG3 epitheliális sejteken specifikus céljaink ennek megfelelően a következők voltak:

- Az endocannabinoidok hatásának vizsgálata a sejtek
  - Életképességére, apoptotikus és nekrotikus folyamataira
  - Differenciálódására
  - Szekretoros aktivitására
- Az ECS tagjainak expressziójának vizsgálata
- A feltételezett endocannabinoid hatások háttérben álló jelátviteli útvonalak feltérképezése

Ezen túlmenően humán monocita-eredetű DC-eken célunk volt:

- A termoszenzitív TRP csatornák expressziójának vizsgálata

- A hősök hatásának tisztázása iDC-k endocitotikus aktivitására
- A hősök feltételezett hatásainak háttérben álló TRP csatornák feltérképezése

## **Anyagok és Módszerek**

### ***NCL-SG3 sejt kultúrák***

A humán ekkrin verejtékmirigy-eredetű NCL-SG3 sejteket William's Medium E tápoldatban tenyésztettük, melyet 5 % foetalis borjú szérummal, 10 µg/ml inzulin-transzferrin-szelénium keverékkel, 20 ng/ml epidermális növekedési faktorról, 2 mM L-glutaminnal, 10 ng/ml hidrocortisonnal és antibiotikus keverékkel egészítettünk ki. A sejteket 80-90%-os konfluenciánál passzáltuk a konfluencia-indukált differenciálódás elkerülése végett.

### ***DC sejt kultúrák***

A monomorfonukleáris sejtek izolálása trombocita mentes buffy coat Ficoll grádiensen való szeparálásával történt, melyből ezt követően CD14-ellenes mágneses gyönggyel konjugált antitestekkel, immunomágneses szeparálással monocitákat izoláltunk. A monocitákat öt napig IL-4 és GM-CSF-el kiegészített AIMV médiumban tenyésztettük a DC-ek differenciálódásához (mely iDC-et eredményezett). mDC-k generálásához a sejteken lévő tenyésztő médiumot egy napra "pro-inflammatórikus citokin koktéllal" kiegészített AIMV médiumra cseréltük, mely tartalmazott 80 ng/ml GM-CSF-t, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ -t, 5 ng/ml IL-1 $\beta$ -t, 20 ng/ml IL-6-t, és 1 µg/ml PGE2-t. A sejtek 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó környezetben tenyésztettük. Minden kísérletet legalább három független donoron elvégeztük.

### ***Hősokk kezelés és az endocitotikus aktivitás mérése***

A hősokk kezelt DC-eket egy órán keresztül 43°C-on inkubáltuk, míg a kontroll sejteket 37°C-on tartottuk. Az endocitotikus aktivitást ezt követően FITC-konjugált dextrans segítségével követtük nyomon (1 mg/ml FITC-dextrán 37°C-on a hősokk kezelés után további egy óráig). A sejteket ezután háromszor mostuk hideg PBS-el, majd a fluoreszcencia FACScan flow citométerrel történő meghatározásáig jégen tartottuk. A sejteket a hősokk kezelés előtt 15 percig előinkubáltuk CPZ-vel vagy HC067047-et (TRPV4 antagonist), vagy a releváns vivőanyaggal (dimetilszulfoxid mindkét anyag esetén).

### ***A citotoxicitás (nekrózis) vizsgálata***

A nekrotikus sejthalál vizsgálatát a sejtekből felszabaduló glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) mértékével illetve a Sytox Green festék intenzitásának változásával követtük nyomon a gyártó által javasolt instrukciók alapján. A sejteket (10 000 sejt/lyuk az NCL-SG3, 200 000 sejt/lyuk a dendritikus sejtek esetében) 96 lyukú fekete-falú/átlátszó aljú tenyésztő edényekben tenyésztettük kezelési csoportonként négy lyukban, és különféle anyagokkal 24-48 óráig kezeltük (NCL-SG3 sejtek esetében) vagy a fent leírt módon hősokk kezelésnek vetettük alá. A fluoreszcens jelet ezután Flexstation 3 fluoreszcens image plate reader készülék (FLIPR) segítségével 545 nm-es excitációs és 590 nm-es emissziós hullámhosszon határoztuk meg a G6PD felszabadulás esetében, míg 490 nm-es excitációs és 520 nm-es emissziós hullámhosszt alkalmaztunk a Sytox Green jelölés esetében.

### ***Az apoptózis vizsgálata***

Az iDC-k apoptózisát „Mitochondrial Membrane Potential Apoptosis Kit with Mitotracker™ Red & Annexin-V Alexa Fluor® 488 – for Flow Cytometry” kit segítségével határoztuk meg a gyártó protokolljának megfelelően. A sejteket

hősokek kezelésnek vetettük alá a korábban leírt módon, majd kettős jelölést alkalmaztunk MitoTracker Red/Alexa Fluor® 488 annexin-V reagensek segítségével. A jelölt sejteket FACScan flow citométerrel analizáltuk 490 nm-es excitációs, és 530 nm-es (MitoTracker Red) illetve 585 nm-es (Alexa Fluor® 488 annexin-V) emissziós hullámhosszon.

Az NCL-SG3 sejtek apoptózist két másik technikával határoztuk meg. A mitokondriális membránpotenciál nyomonkövetésére MitoProbe™ DiIC1(5) Assay Kit-et, míg a proapoptotikus kaszpázok aktivitást a Poly Caspases Detection Kit-el mutattuk ki. A sejteket (10 000 sejt/lyuk) 96 lyukú fekete-falú/átlátszó aljú tenyésztő edényekben tenyésztettük kezelési csoportonként négy lyukban, és különféle anyagokkal 24-48 óráig kezeltük. A sejteket ezután a gyártó protokolljának megfelelően jelöltük, majd a fluoreszcenciát 630 nm-es excitációs, és 670 nm-es emissziós hullámhosszon határoztuk meg a MitoProbe™ DiIC1(5) Assay Kit esetében és 490 nm-es excitációs, és 520 nm-es emissziós hullámhosszon a Poly Caspases Detection Kit esetében FLIPR készüléken.

### ***Az élő sejtek számának meghatározása***

A sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztettük és számukat MTT alapú kolorimetriás assay segítségével határoztuk meg. A sejtekről a tápoldatot eltávolítottuk, és MTT oldattal inkubáltuk. Ezután a képződött formazán kristályokat izopropanolban oldott sósavban feloldottuk, majd a koncentrációt kolorimetriás úton 550 nm-en mértük. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával.

### ***A proliferáció meghatározása***

A sejtek proliferációját CyQuant Cell Proliferation Assay Kit segítségével, a gyártó által ajánlott protokoll alkalmazásával határoztuk meg. A sejteket

(10 000 sejt/lyuk) 96 lyukú fekete-falú/átlátszó aljú tenyésztő edényekben tenyésztettük kezelési csoportonként négy lyukban, majd különféle anyagokkal 24-48 óráig kezeltük. A jelölés után a fluoreszcenciát 490 nm-es excitációs, és 520 nm-es emissziós hullámhosszon határoztuk meg FLIPR készüléken.

### ***Endocannabinoid szintek meghatározása***

A konfluens NCL-SG3 sejteket 0,5 ml 7 ng 2H4-AEA-ot tartalmazó jéghideg metanol:Tris puffer (50 mM, pH 8) 1:1 arányú elegyében homogenizáltuk. Kémiai tisztítás és visszaoldást követően a mintákat folyékony kromatográfia/sorban kapcsolt tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá. Az endocannabinoidok folyékony kromatográfias elválasztását 32°C-on végeztük. Az MSD-t (LS model) atmoszférikus nyomás kémiai ionizációra (APCI) és specifikus-ion-monitorozásra állítottuk, AEA esetében 348 m/z, 2H4-AEA esetében 352 m/z, míg 2-AG esetében 379 m/z értékkel. A spray-kamra beállításai az alábbi paraméterekkel jellemezhető: vaporizáló 400°C, gáz hőmérséklet 350°C, szárító gáz 5 l/perc és nebulizáló gázként 60 psig nyomású nitrogént alkalmaztunk. A kalibrációhoz szintetikus AEA és 2-AG-t használtunk. A mintákban található AEA és 2-AG mennyiségét inverz lineáris regresszióval állítottuk meg a standard görbékből.

### ***Az intracelluláris lipidek kvantitatív meghatározása***

A sejteket (10 000 sejt/lyuk) 96 lyukú fekete-falú/átlátszó aljú tenyésztő edényekben tenyésztettük kezelési csoportonként négy lyukban, és különféle anyagokkal 24 óráig kezeltük. A felülúszók eltávolítása után 100 µl 1 µg/ml Nile Red festéket tartalmazó PBS-t adtunk a lyukakhoz, majd 20 perc 37°C-os inkubáció után a fluoreszcenciát FLIPR készüléken határoztuk meg. A poláros lipidek meghatározásához 485 nm-es excitációs és 565 nm-es emissziós, míg a

neutrális lipidek meghatározásához 540 nm-es excitációs és 620 nm-es hullámhosszt alkalmaztunk. Az eredményeket a kontroll csoporton mért relatív fluoreszcens egységek százalékában adtuk meg.

### ***Immuncitokémia***

A monocitákat üveg fedőlemezre szélesztettük, majd a ***DC sejt-kultúrák*** alfejezetben leírt módon iDC-ké differenciáltattuk. 5 perces acetonos fixálást követően a sejteket 0,1% Triton-X-100-at tartalmazó PBS-sel permealizáltuk. PBS-el történő mosás után a nem-specifikus kötőhelyek elfedését 1% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-el végeztük. Ezt követően a sejteket TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 és TRPM8 (minden esetben 1:200-as hígításban) elleni antitestekkel inkubáltuk egy órán át, majd fluoreszcens mikroszkópiához FITC-konjugált másodlagos antitesttel tettük láthatóvá a keresett fehérjéket. Háromszoros mosási lépést követően DAPI festékkel jelöltük a sejtmagokat, majd a metszeteket Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük.

### ***Western blot***

A sejtlizátumokból azonos proteintartalmú mintákat készítettünk, majd SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk 100 V konstans feszültségen. Az így elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) transzferáltuk, majd a membránokat CB1, CB2, TRPV1, TRPV2 és TRPV4 ellenes elsődleges antitestekkel (1:500 arányú hígításban) egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Következő lépésben kecskében termeltetett nyúl-ellenes torma peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel jelöltük a membránokat, majd kemilumineszcens szubsztrát kit segítségével tettük láthatóvá az immunjeleket, melyek detektálására LAS-3000 Intelligent Dark Box készüléket használtuk. Az optikai denzitást Image Pro Plus szoftver segítségével határoztuk meg. Az

egyenletes mintafelvétel igazolására anti-aktin, illetve anti-citokróm-C jelölést alkalmaztunk.

### ***RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció***

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagens felhasználásával izoláltuk. A teljes RNS 1 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk AMV reverz transzkriptázt és random primert felhasználva. A cDNS-ből kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció (Q-PCR) segítségével mutattuk ki a vizsgált specifikus transzkripteket, TaqMan primerek és próbák valamint TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol alkalmazásával. A génextpresszió relatív mennyiségét a  $\Delta$ CT módszer segítségével határoztuk meg.

### ***RNS interferencia (RNSi)***

A sejteket iDC-k esetében a tenyésztés második napján, míg NCL-SG3 sejteknél az 50-70%-os konfluencia elérésekor transzfektáltuk TRPV csatornákra, illetve CB receptorokra specifikus kis interferáló RNS-sel és Lipofectamine 2000 Transzfekciós Reagenssel. Kontrollként RNAi Negatív Kontroll Duplexeket használtunk (scrambled RNAi). Az RNAi-által okozott fehérje expresszió csökkenést NCL-SG3 sejtek esetében a transzfekciót követően naponta, míg iDC-ken a harmadik napon ellenőriztük Western blot segítségével (lásd *Western blot* alfejezetben). Az immunreaktív sávok OD-át a  $\beta$ -aktin jelre normalizáltuk, és a scrambled RNAi-kezelt sejtek értékére normalva fejeztük ki.

### ***Patch clamp mérések***

A standard teljes-sejtes patch clamp technikát feszültség-clamp üzemmódban alkalmaztuk. Az iDC-eket perfundáló EC oldat hőmérsékletét 37

illetve 45°C-on tartottuk, míg a sejteken lévő oldatot 37°C-on tartottuk egy fűthető Petri-csésze segítségével. A hőkezelést előmelegített oldat adagolásával alkalmaztuk, a sejteken lévő hőmérsékletet pedig a közelükben elhelyezett thermisztorral monitoroztuk. A perfúziót gravitációs-áramlási rendszerrel tartottuk fent. RR, CPZ és HC067047 kezelésnél a releváns antagonistákat tartalmazó előfűtött oldatokat tartalmazó oldatokra váltottuk a perfúziót.

### ***Immunoprecipitáció***

A sejteket 1 ml radioimmunoprecipitációs pufferbe arattuk, majd szonikálással feltártuk. Az immunoprecipitációhoz a mintákhoz 5 µl TRPV2 ellenes antitestet adtunk, majd 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk folyamatos rotáció mellett. Másnap 5 percig 4°C-on 15 000 g-vel centrifugáltuk a mintákat, majd a pellett háromszori mosását követően SDS-PAGE mintapufferben forraltuk 100°C-on 10 percig. Az így előállított mintákon Western blot analízist hajtottunk végre (lásd *Western blot* alfejezetben).

### ***Statisztikai analízis***

Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szint mellett kétmintás párosítatlan t-próbát alkalmaztunk.

## Eredmények

### **1. Az ECS szerepe a verejtékmirigyek biológiájában**

#### ***Az endocannabinoidok apoptózis-dominált sejthalált okoznak a verejtékmirigy sejteken***

A verejtékmirigy sejtekkel összefüggésben elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a „klasszikus” endocannabinoidok (AEA és 2-AG) befolyásolják-e az NCL-SG3 verejtékmirigy eredetű sejtek életciklusát. Kolorimetriás MTT és fluoreszcens CyQuant assay segítségével megállapítottuk, hogy mindkét endocannabinoid dóziszfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét és proliferációját. Kvantitatív fluoreszcens méréseinknek köszönhetően arra is fény derült, hogy alkalmazásuk mitokondriális depolarizációhoz, valamint a pro-apoptotikus kaszpázok aktiválódásához vezetett, mely eredmények apoptotikus folyamatok felléptére utaltak. A nekrozis/citotoxicitás két, egymást kiegészítő vizsgálómódszerét alkalmazva azt is kimutattuk, hogy a 2-AG legnagyobb koncentrációi mindemellett jelentősen fokozták a G6PD felszabadulást és a sejtekben történő Sytox Green felhalmozódást is. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy az endocannabinoidok csökkentették a proliferációt és apoptózis-dominált sejthalált okoztak humán verejtékmirigy sejteken.

#### ***Az endocannabinoidok befolyásolják egyes citoskeletális fehérjék kifejeződését és az NCL-SG3 sejtek lipidtermelését***

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy az endocannabinoidok részt vesznek-e a differenciálódás szabályozásában a verejtékmirigy sejteken. Tekintve, hogy ezen sejtek differenciálódásának pontos karakterizálására vizsgálatainkat megelőzően még nem került sor, kísérleteink során különféle epitheliális „differenciációs markerek” (bizonyos CK-ok, illetve az involucrin, a filaggrin és a lorikrin) kifejeződését vizsgáltuk meg NCL-SG3 sejteken. Érdekes

módon bizonyos CK-ok (CK7, 14, 18 és 19) a pre-konfluens, proliferáló kultúrákban, míg a CK8, az involukrin, a filaggrin és a lorikrin a poszt-konfluens (azaz vélhetőleg differenciáltabb) tenyészetekben mutattak magasabb expressziót.

A következőkben az AEA és a 2-AG hatását vizsgáltuk meg ezen markerek kifejeződésére. Ennek során pre-konfluens (30-40%) NCL-SG3 sejteket kezeltünk 10-10  $\mu$ M AEA-dal és 2-AG-lal 48 órán keresztül, majd a fenti markerek expresszióját kvantitatív, valósídejű PCR-ral követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a poszt-konfluens tenyészetekre jellemző markerek (CK8, involukrin, filaggrin és lorikrin) kifejeződése szignifikánsan megnőtt a két endocannabinoid hatására, míg egyes, a proliferáló sejtekre jellemző markerek expressziója csökkent (2-AG: CK7 és CK14; AEA: CK14).

A korábbiakban kimutattuk, hogy az endocannabinoidok jelentősen fokozzák a humán sebociták lipidtermelését. Mivel a verejtékmirigyek epiteliális sejtjeiről ismert, hogy számos lipid szintézisére képesek, megvizsgáltuk, hogy az endocannabinoidok miként befolyásolják az NCL-SG3 sejtek lipidtermelését. Szemi-quantitatív Oil Red-O-jelölés és kvantitatív Nile Red-alapú fluoreszcens mérés segítségével megállapítottuk, hogy mindkét endocannabinoid már 24 órás kezelést követően jelentősen és dóziszfüggő módon fokozta a neutrális (de nem a poláros) lipidek termelését. A neutrális lipidek alapvetően az intracellulárisan raktározott, „de novo” szintetizált lipideket jelentik; így eredményeink arra utalnak, hogy az endocannabinoid-kezelés a verejték összetételének módosításával alapjaiban befolyásolhatja a humán ekkrin verejtékmirigy sejtek szekretoros aktivitását.

#### ***Az ECS számos tagja kifejeződik az NCL-SG3 sejtekben***

Mind az AEA-ról, mind a 2-AG-ról ismert, hogy képesek metabotróp és ionotróp cannabinoid receptorok aktiválására; így a lehetséges célpontok azonosításához QPCR és Western blot analízist végeztünk. Megállapítottuk, hogy a CB1 és a CB2 receptorok egyaránt kifejeződnek mRNS és fehérje

szinten is a verejtékmirigy sejteken; a CB1 a poszt-konfluens, differenciáltabb, míg a CB2 a pre-konfluens, kevésbé differenciált tényészetek esetén mutatott magasabb expressziót. Ezen eredmények ismételtén azt sugallták, hogy a cannabinoidok szerepet játszhatnak a humán verejtékmirigy-eredetű sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában.

Tekintve, hogy a bőr számos sejtfeleségéről ismert, hogy endocannabinoidokat termelnek, kollaborációs partnerünk segítségével megvizsgáltuk, hogy a verejtékmirigyek epiteliális sejtjei szintén lehetnek-e forrásai ezeknek a lipidmediátoroknak. Tömegspektrometria segítségével megállapítottuk, hogy az NCL-SG3 verejtékmirigy eredetű sejtek valóban termelik az alapvető endocannabinoidokat (AEA, 2-AG), ám azok mennyisége jócskán elmarad az egyéb bőr eredetű sejtek esetén tapasztaltakól (1 millió sejtenként 15 fmol AEA, illetve 0,2 pmol 2-AG; míg SZ95 sebociták esetén ugyanez az arány 160 fmol-nak és 4,2 pmol-nak adódott).

Ezen eredmények alapján a következőkben az endocannabinoidok metabolizmusában részt vevő enzimek kifejeződését vizsgáltuk meg. QPCR segítségével megállapítottuk, hogy nemcsak a szintetizáló (NAPE-PLD, DAGL $\alpha$  és  $-\beta$ ), hanem a lebontó (FAAH és MAGL) enzimek is jelen vannak a sejtekben. Kimutattuk azt is, hogy az expresszió nagysága konfluencia-függő változásokat mutat, ami újabb érv amellet, hogy az ECS-nek szerepe lehet ezen sejtek proliferációjának és differenciálódásának a szabályozásában.

### ***Az endocannabinoidok hatásai a klasszikus metabotróp receptoroktól és a TRP csatornáktól független útvonalon alakulnak ki***

Miután kimutattuk, hogy az endocannabinoidok (i) főként apoptotikus sejthalált okoznak; (ii) fokozzák a differenciációra jellemző markerek kifejeződését; és (iii) fokozzák a sejtek szekréciós aktivitását, a következőkben megvizsgáltuk a sejtek által expresszált cannabinoid receptorok részvételét a fenti folyamatokban. A klasszikus, metabotróp CB1 és CB2 cannabinoid receptorok sejtnövekedésben, túlélésben, illetve a szekretoros aktivitás

szabályozásában játszott szerepének vizsgálatához antagonistákat és RNSi technikát alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy a CB1 és a CB2 gátlószerei, valamint ezen receptorok RNSi technikával történő tranziens, szelektív „géncsendesítése” nem volt képes kivédeni az endocannabinoidok anti-proliferatív és differenciálódást elősegítő hatását. Mindezen eredmények arra utaltak, hogy a humán verejékmirigyek epiteliális sejtjein az endocannabinoidok hatásai a CB1 és CB2 receptoroktól függetlenül alakulnak ki.

Minthogy a verejékmirigyek sejtjei ionotróp cannabinoid receptorokként is emlegetett TRP csatornákat is expresszálnak, azt is megvizsgáltuk, hogy az AEA és a 2-AG hatásainak háttérében állhat-e  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás. Eredményeink szerint egyik endocannabinoid sem okozott változást az intracelluláris kalcium koncentrációban. Emellett azt is kimutattuk, hogy sem az „általános” TRP csatorna gátlószert ruténium vörös, sem pedig az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció csökkentése nem befolyásolta az endocannabinoidok anti-proliferatív, illetve lipidtermelést fokozó hatását. Mindent egybevetve úgy tűnik tehát, hogy a cannabinoidok hatásait a humán verejékmirigyek epiteliális sejtjein nem a fenti metabotróp és ionotróp cannabinoid receptorok közvetítik.

### ***Az endocannabinoidok aktiválják a MAPK-útvonalat az NCL-SG3 sejtekben***

Habár az endocannabinoidok által aktivált receptor(ok) azonosítására tett erőfeszítéseinket sajnálatos módon nem koronázta siker, kísérleteinkben továbbra is célunk volt, hogy felderítsük, milyen lehetséges intracelluláris jelpályák állhatnak a hatások kialakulásának háttérében. A cannabinoidokról ismert, hogy számos jelátviteli útvonalat aktiválhatnak; ezért farmakológiai inhibitorok segítségével megvizsgáltuk a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád, a protein kináz C (PKC) izoenzimek és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3K) lehetséges szerepét. Megállapítottuk, hogy a vizsgált inhibitorok közül a MAPK-t gátló PD098059 kivédte az AEA és a 2-AG hatásait, míg a

többi enzimrendszer gátlószere hatástalannak bizonyult. Kimutattuk azt is, hogy az endocannabinoidok az Erk1/2 (p42/44) MAPK tranziens foszforilációját okozták, amely hatás szintén kivédhető volt PD098059 alkalmazásával. Mindenezen eredmények arra utalnak, hogy a MAPK kaszkádnak kiemelt jelentősége van az endocannabinoidok humán verejtékmirigyek epiteliális sejtjein kifejtett hatásainak közvetítésében.

## **2. A TRP csatornák szerepe a DC-ek biológiájában**

### ***A DC-ek számos termoszenzitív TRP csatornát expresszálnak***

Kísérleteink kezdetén a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a hőérékeny TRP csatornák expresszióját monocita-eredetű DC-eken. QPCR segítségével kimutattuk, hogy a monociták, az iDC-ek és az mDC-ek egyaránt kifejezik a TRPV1, a TRPV2 és a TRPV4 mRNS-ét, mégpedig a differenciálódásuk előrehaladásával egyre nagyobb mértékben. A csatornák protein szintű expresszióját szintén sikerült kimutatnunk Western blot, illetve az iDC-ek esetében immuncitokémia segítségével is. Érdekes módon a TRPV3, a TRPM8 és a TRPA1 kifejeződése egyik módszerrel sem érte el a detekciós küszöböt.

### ***A hősokk TRPV1-független módon csökkenti az endocitózist***

Annak eldöntésére, hogy a monocita-eredetű DC-eken a hősokk a kapszaicinnal történő TRPV1 aktivációhoz hasonló hatásokat vált-e ki, megvizsgáltuk a hősokk hatását a legfontosabb iDC funkciók egyikére, az endocitózisra. Megállapítottuk, hogy (korábbi adatainkkal jó összhangban) a rövidtávú hősokk (43°C 1 órán keresztül) csökkentette az iDC-ek endocitotikus aktivitását, anélkül, hogy közben jelentős apoptotikus vagy nekrotikus folyamatokat indított volna el. Bár az alkalmazott hőmérséklet elméletileg megfelelő a TRPV1 aktiválásához (és irodalmi adatok alapján keratinocitákon a TRPV1 közvetíti a hősokk biológiai hatásait), meglepő módon a TRPV1 gátlása CPZ-nel nem befolyásolta az endocitotikus aktivitás hősokkot követő csökkenését. Ezzel megegyező módon a TRPV1 RNSi-mediált, sikeres szelektív

„géncsendesítése” sem volt hatással a folyamatra. A TRPV4-specifikus antagonistá HC 06047, illetve a TRPV4 „géncsendesítése” úgyszintén hatástalannak bizonyult. Ezzel szöges ellentétben a (specifikus antagonistá hiányában elvégzett) TRPV2-szelektív „knockdown” szignifikáns módon kivédte a hősokek hatását.

### ***A hősokek feltehetően TRPV2-mediált membránáramokat indukál***

Minthogy a TRPV2 alapvető jelentőségűnek tűnt a hősokek hatásainak közvetítésében iDC-eken, a következőkben patch-clamp technika segítségével ezen molekula funkcionálisát vettük gőrcső alá. Egy „házilag” elkészített, termosztálható patch-clamp rendszer segítségével megállapítottuk, hogy a sejtek 43°C fölé történő melegítése jelentős membránáramok kialakulásához vezet. Ez az áram reverzibilisen kivédhető volt az általános TRPV antagonistá RR-sel, ami arra utal, hogy a fentebb említett TRP csatornák fontos szerepet játszhatnak a kialakításában. A fentiekkel jó összhangban a TRPV1 és TRPV4 kombinált farmakológiai gátlása nem befolyásolta jelentősen a kialakult áramot. A TRPV2 szelektív „géncsendesítése” ugyanakkor gyakorlatilag teljes mértékben megszüntette azt. Mindezek alapján úgy tűnt tehát, hogy a TRPV2 kulcsfontosságú szereplő a hősokek hatásainak közvetítésében.

### ***A TRPV2 heteromer komplexeket formál a TRPV1 és TRPV4 csatornákkal***

Az előző eredmény, mely szerint a TRPV2 felelős a hő-aktivált áram kialakulásáért, meglehetősen váratlan volt, tekintve, hogy a csatorna aktivációs küszöbe irodalmi adatok alapján a magasabb hőmérsékleti tartományokba esik. Néhány nemrégiben publikált adat azonban magyarázatot kínál a jelenségre. Korábban már említett tanulmányukban Cheng és mtsai. (2007) rámutattak, hogy heterológ expressziós rendszerekben az egyes TRP csatornák nemcsak homo-, hanem heteromereket is kialakíthatnak, aholis ez utóbbi komplexek a „tisztá” homomerekhez képest „átmeneti” kapuzási sajátságokat mutatnak. Ezen

érdekes eredményen felbuzdulva immunprecipitációt végeztünk azzal a céllal, hogy megállapítsuk, vajon a TRPV csatornák iDC-eken is kialakíthatnak-e „vegyes” komplexeket. Megállapítottuk, hogy a TRPV2-precipitátum TRPV1-re és TRPV4-re is pozitívan jelölődött, ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy a humán DC-eken TRPV2-TRPV1, illetve TRPV2-TRPV4 heteromerek is jelen lehetnek.

## Diszkusszió

Amint arról a Bevezetésben már részletesen szó esett, az elmúlt évek eredményei egyértelműen igazolták, hogy az ECS egyike a legfontosabb szabályozó rendszereknek, mely az emberi test jószereivel valamennyi szervrendszerének homeosztatiszikus működésére hatást gyakorol. Legnagyobb neuroendokrin szervünk, a bőr vonatkozásában munkacsoportunk és mások munkája nyomán a közelmúltban fény derült arra, hogy a lokálisan termelődő endocannabinoidok, változatos receptor-mediált jelátviteli útvonalakat aktiválva, kulcsszerepet játszanak az epidermisz és a bőrfüggelékek biológiai folyamatainak (növekedés, programozott sejthalál vagy túlélés, differenciáció, lipidszintézis, illetve gyulladáshoz/immunfolyamatok) szabályozásában.

### *Az ECS szerepet játszik a humán verejtékmirigyek biológiai folyamatainak szabályozásában*

A bőr ECS-ének mélyebb megismerésére irányuló törekvéseink részeként kísérleteink első felében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a klasszikus endocannabinoidok (AEA, 2-AG) humán verejtékmirigy eredetű NCL-SG3 sejtekre gyakorolt hatásait. Eredményeink alapján ezek az anyagok gátolják a proliferációt, sejthalált indukálnak, és fokozzák ezen sejtek lipidszintézisét. Ezen adatok alátámasztani látszanak az elképzelést, mely szerint a humán

verejtékmirigyek, a bőr neuroendokrin rendszerének fontos tagjaiként, specifikus endocannabinoid hatások célpontjai lehetnek.

Tekintve, hogy a verejtékmirigy sejtek differenciációs programja ez idő szerint részleteiben még nem ismert, a folyamat nyomonkövetésére megvizsgáltuk számos, ezen sejtekben expresszálandó, és a bőr epitheliális elemeinek differenciálódásában szerepet játszó citoskeletonális fehérje (CK-ok, involucrin, filaggrin, lorikrin) kifejeződési mintázatát. Ennek során elsőként igazoltuk, hogy ezen differenciációs markerek expressziós szintje a verejtékmirigy sejtek proliferációs állapotának függvényében változik, azaz különbözik a proliferáló és a konfluencia-indukálta növekedésgátláson átesett tenyészetek esetében. Megfigyeltük, hogy ezen markerek verejtékmirigy sejtek, valamint a humán epidermális keratinociták esetén tapasztalható expressziós mintázata rendkívül hasonló: az involucrin, a filaggrin és a lorikrin expressziója magasabb a poszt-konfluens (azaz differenciáltabb) tenyészetekben.

Miután meghatároztuk, hogy melyek a verejtékmirigy sejtek differenciáltsági állapotát megfelelően nyomon követő markerek, megvizsgáltuk, hogy az endocannabinoid kezelések miként befolyásolják az expressziójukat. Az AEA és a 2-AG jelentősen fokozta a korábban említett, poszt-konfluens állapotra jellemző markerek kifejeződését, és egyszersmind csökkentették bizonyos, a proliferáló sejtekre jellemző gének átíródását. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az endocannabinoidok amellet, hogy szerepet játszanak a verejtékmirigy sejtek növekedésének és programozott sejthalálának szabályozásában, egyszersmind azok differenciálódását is indukálják.

Érdekes módon ezek a hatások a klasszikus, metabotróp CB1 és CB2 receptoroktól független útvonalon keresztül alakultak ki, hiszen a receptorok farmakológiai gátlása és szelektív „géncsendesítése” sem befolyásolta őket. Kimutattuk azt is, hogy az NCL-SG3 sejtek ionotróp cannabinoid receptorokat (azaz egyes, kalciumpermeábilis TRP csatornákat) is kifejeznek, azonban AEA és 2-AG kezelés hatására sem fokozódott a sejtek intracelluláris kalcium

koncentrációja. Habár az endocannabinoid hatások háttérében álló receptor(ok) azonosítására tett erőfeszítéseinket sajnálatos módon nem koronázta siker, azt sikerült bebizonyítanunk, hogy az AEA és a 2-AG is aktiválja a MAPK kaszkádot, mely – szemben a PI-3K és PKC rendszerekkel – fontos szerepet játszik a vizsgált sejtválaszok kialakításában.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az endocannabinoidok CB1 receptor függő módon gátolják a szőrszál növekedését, és a CB2 receptor aktiválásával proapoptotikus hatásokat és fokozott lipidtermelést váltanak ki a humán faggyúmirigy eredetű sebocitákon. Jelen kutatásaink ezt a képet tették teljesebbé azzal, hogy igazolták, a verejtékmirigy sejtek szintén célpontjai lehetnek az endocannabinoidoknak, hiszen az AEA és a 2-AG gátolja a sejtek proliferációját, programozott sejthalált indukál, és fokozza a sejtek lipidtermelését, valamint differenciálódását egy CB1/2 receptor-független jelátviteli mechanizmus révén. Mindezen ECS-nek tulajdonítható és az egyéb bőrfüggelékeken (hajfollikulusokon, illetve faggyúmirigyeken) leírtakhoz képest részben eltérő mechanizmussal megvalósuló hatások egyértelműen rávilágítanak az ECS sejtípus-függő és (minden valószínűség szerint) receptor-szelektív szabályozó szerepének fontosságára a humán bőrben.

### ***A TRPV2 fontos szereppel bír a hősokek hatásainak közvetítésében humán DC-eken***

Kísérleteink második szakaszában kimutattuk, hogy a TRPV1, TRPV2 és TRPV4 termoszenzitív TRP csatornák kifejeződnek a humán monocitákon, valamint a belőlük differenciáltotott iDC-ken és mDC-ken. Ezen felül eredményeink szerint a rövid hősokek (43°C 1 óráig) csökkentette a sejtek endocitotikus aktivitását (nekrózis illetve apoptózis indukálása nélkül). Érdekes módon - habár epidermális keratinocitákon a hősokek kezelés altiválta a TRPV1-et - t, humán iDC-ken csupán a TRPV2 csatorna géncsendesítése volt képes kivédeni a hősokek hatását (a TRPV1 illetve TRPV4 csatornák farmakológiai

gátlása, valamint RNSi technológiával történő géncsendesítése nem befolyásolta azt). Ezzel jó összhangban a hő által aktivált erőteljes membrán-áramot kizárólag a TRPV2 specifikus géncsendesítése védte ki, míg a TRPV1 és TRPV4 csatornák aktivitásának befolyásolása nem járt semmilyen hatással.

A fenti adatok azt sugallják, hogy a hősokk hatását humán DC-eken a TRPV2 ion csatornák közvetítik. Irodalmi adatok alapján a TRPV2 különféle immunsejteken számos funkcióval bír. Humán HMC-1 hízósejt sejtvonalon kimutatták, hogy a TRPV2 központi szerepet játszik a sejtek mechanikai, hő és vörös-lézer okozta degranulációjának folyamatában. Egér makrofágokon a csatorna aktiválódása meghatározó jelentőségű a fagocitózis, a részecske-kötődés és a bakteriális lipopoliszacharid által kiváltott citokintermelés folyamatainak szabályozásában. Patkányokban a TRPV2 ion csatornákat makrofágokban, Langerhans sejteken és DC-ken is leírták, bár funkciójukról jelenleg nem rendelkezünk információval. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TRPV2 ioncsatornák kulcsfontosságú szereppel bírnak számos immunsejten.

A TRPV2 csatorna hőaktivációs küszöbe az irodalmi adatok alapján 52°C; ugyanakkor eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a 43°C-os hősokk hatásának közvetítésében központi szereppel bírhat. Ezen jelenségre több magyarázat is felmerül. i) A TRPV2 aktivációs küszöbét heterológ expressziós rendszerekben, valamint szenzoros neuronokon írták le először. Mivel nem rendelkezünk pontos információval a TRPV2 csatorna biofizikai tulajdonságairól nem-neuronális sejteken, nem kizárt, hogy azok eltérőek a szenzoros neuronokon találhatóéktól. Azaz elképzelhető, hogy a DC-eken expresszált TRPV2 alacsonyabb hőmérsékleti tartományban aktiválódik. Ilyen jellegű összefüggést a TRPV1 vonatkozásában már korábban leírtak, hiszen a csatornát aktiváló bizonyos farmakológiai anyagok eltérő szenzitivitással, illetve affinitással rendelkeznek neuronokon és nem-neuronális sejteken. ii) Másrésztől újabb heterológ expressziós rendszereken végzett kísérletek egyértelműen bebizonyították, hogy a TRPV csatornák heteromereket alkotva is

létrehozhatnak ioncsatornákat. Ezen heteromerek hőaktivációs küszöbe a jelenlévő alegységek monomer formáinak köztes értékének adódott. Saját kísérleteinkben sikeresen bizonyítottuk, hogy a TRPV2 immunprecipitátuma TRPV1 és TRPV4 antitestekkel is pozitívan festődött, mely eredményünk azt sugallja, hogy a TRPV2 csatorna TRPV2-TRPV1 és TRPV2-TRPV4 heteromerizációs kombinációkban is kifejeződik humán DC-en. Mindemellett úgy tűnik, hogy a TRPV2 a „legaktívabb” tag, mivel a TRPV2 expresszió a legnagyobb mennyiségben kifejeződő TRPV csatorna a humán DC-en, illetve a receptor szintjének siRNS-el történő géncsendesítése teljes mértékben megakadályozta a hőszók hatásait.

Bár további biofizikai és biokémiai kutatások szükségesek a DC-en expresszált termoszenzitív TRP csatornák molekuláris összerendeződésének és kapuzási tulajdonságainak tisztázására, itt bemutatott eredményeink alapján a TRPV2 központi szereppel bír a hőszók hatásainak közvetítésében.

### ***Perspektívák***

A Disszertációban bemutatott, valamint korábban publikált pre-klinikai kutatásai eredményeink alapján további klinikai vizsgálatok indokoltak a humán bőr ECS-ét célzó terápiás beavatkozások hatékonyságának tisztázására számos bőrbetegség kezelésében. A humán verejtékmirigyen a bőr endocannabinoid tónusát növelő beavatkozások (akár endocannabinoidok exogén bejuttatása, akár szintézisük serkentése, akár lebontásuk gátlása révén) sikeresen alkalmazhatók lehetnek bizonyos nem-kívánt sejtszaporulattal járó kórképekben (pl. jó- és rosszindulatú tumorokban). Humán DC-en az ECS és TRP csatornák modulátorai, a sejtek funkciójának befolyásolása révén, hatékony eszközök lehetnek a bőr immun folyamatainak szabályozásában. Munkacsoportunk korábban hasonló beavatkozásokat javasolt a pilosebaceous egység növekedési és gyulladáshos kórképeiben (pl. szőrnövekedési problémákban, acne vulgaris). Végezetül ipari és szociális szempontból is fontos lehet a túlzott verejték-

termelés befolyásolása az endocannabinoid-kapcsolt szignalizáció aktivitásának módosítása révén, mely így a kozmetikai ipar számára is vonzó célpontot képez.

## Összefoglalás

A bőr funkcióit feltáró széleskörű kutatásai keretében jelenlegi munkánkban célunk az endocannabinoid rendszer (ECS) vizsgálata volt humán verejtékmirigy sejteken és monocita-eredetű dendritikus sejteken (DC).

Eredményeink szerint a humán ekkrin verejtékmirigyből származtatott NCL-SG3 sejtvonalon sikerrel azonosítottuk az ECS legtöbb elemét (endocannabinoidok, receptorok, az endocannabinoidokat szintetizáló és lebontó enzimek). Bebizonyosodott az is, hogy az endocannabinoid kezelés dóziszfüggő módon csökkentette a sejtek proliferációját, apoptózist indukált, megváltoztatta bizonyos citoskeletális proteinek (pl. citokeratinok) expressziós mintázatát és fokozta a sejtek lipid szintézisét. Érdekes módon ezen hatások nem az ECS-hez tartozó klasszikus metabotróp receptorokon, illetve ionotróp TRP csatornákon keresztül valósultak meg. Ugyanakkor az endocannabinoidok szelektíven aktiválták a mitogén-aktivált protein kináz másodlagos hírvivő útvonalat. Humán monocita-eredetű DC-en célunk a hőszokk hatásainak tisztázása volt, illetve az ezen hatások közvetítésben szerepet játszó termoszenzitív TRP csatornák feltérképezése. Kimutattuk, hogy a hőszokk gátolja az iDC sejtek endocitotikus aktivitását, illetve specifikus áramkomponenst indukál, mely hatást a TRPV2 géncsendesítése teljes mértékben kivédte.

Összességében, pre-klinikai vizsgálataink azt sugallják, hogy a bőr ECS-ének célzott befolyásolása számos humán bőrbetegség kezelésében nyújthat ígéretes új terápiás lehetőséget (pl. verejtékmirigy-eredetű tumorok, gyulladás, túlzott verejtékezés és a bőrfüggelék egyéb betegségei).



Iktatószám: DEENKÉTK/137/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Szöllősi Attila Gábor

Neptun kód: HOZ6P4

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Mtmt azonosító: 10034498

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szöllősi, A.G.**, Oláh, A., Tóth, I.B., Papp, F., Czifra, G., Panyi, G., Bíró, T.: Transient receptor potential vanilloid-2 mediates the effects of transient heat shock on endocytosis of human monocyte-derived dendritic cells.  
*FEBS Lett.* 587 (9), 1440-1445, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.027>  
IF:3.582 (2012)
2. Czifra, G., **Szöllősi, A.G.**, Tóth, I.B., Demaude, J., Bouez, C., Breton, L., Bíró, T.:  
Endocannabinoids Regulate Growth and Survival of Human Eccrine Sweat Gland-Derived Epithelial Cells.  
*J. Invest. Dermatol.* 132 (8), 1967-1976, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.118>  
IF:6.193





### További Közlemények

3. Tóth, I.B., Oláh, A., **Szőllősi, A.G.**, Bíró, T.: TRP channels in the skin.  
*Br. J. Pharmacol.* 171 (10), 2568-2581, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12569>  
IF:5.067 (2012)
4. Gáspár, K., Kukova, G., Bunemann, E., Buhren, B.A., Sonkoly, E., **Szőllősi, A.G.**, Muller, A., Savinko, T., Lauerma, A.I., Alenius, H., Kemény, L., Dieu-Nosjean, M., Stander, S., Fischer, J.W., Ruzicka, T., Zlotnik, A., Szegedi, A., Homey, B.: The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation.  
*J. Dermatol. Sci.* 71, 12-21, 2013.  
IF:3.52 (2012)
5. Géczy, T., Oláh, A., Tóth, I.B., Czifra, G., **Szőllősi, A.G.**, Szabó, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.: Protein Kinase C Isoforms Have Differential Roles in the Regulation of Human Sebocyte Biology.  
*J. Invest. Dermatol.* 132 (8), 1988-1997, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.94>  
IF:6.193
6. Oláh, A., **Szőllősi, A.G.**, Bíró, T.: The channel physiology of the skin.  
*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 163, 65-131, 2012.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1007%2F112\\_2012\\_7](http://dx.doi.org/10.1007%2F112_2012_7)  
IF:1
7. Vízkeleti, L., Ecsedi, S., Rákossy, Z., Bégány, Á., Emri, G., Tóth, R., Orosz, A., **Szőllősi, A.G.**, Méhes, G., Ádány, R., Balázs, M.: Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma.  
*Front Biosci (Elite Ed).* E4 (1), 1802-1812, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2741/501>
8. Borbíró, I., Lisztes, E., Tóth, I.B., Czifra, G., Oláh, A., **Szőllősi, A.G.**, Szentandrassy, N., Nánási, P.P., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth.  
*J. Invest. Dermatol.* 131 (8), 1605-1614, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.122>  
IF:6.314



9. Tóth, I.B., Oláh, A., **Szöllősi, A.G.**, Czifra, G., Bíró, T.: "Sebocytes' makeup": Novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands.  
*Pflugers Arch.* 461 (6), 593-606, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-011-0941-6>  
IF:4.463
10. Tóth, I.B., Dobrosi, N., Dajnoki, A., Czifra, G., Oláh, A., **Szöllősi, A.G.**, Juhász, I., Sugawara, K., Paus, R., Bíró, T.: Endocannabinoids Modulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Survival via the Sequential Engagement of Cannabinoid Receptor-1 and Transient Receptor Potential Vanilloid-1.  
*J. Invest. Dermatol.* 131 (5), 1095-1104, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.421>  
IF:6.314
11. Lázár, V., Ecsedi, S., **Szöllősi, A.G.**, Tóth, R., Vízkeleti, L., Rákossy, Z., Bégány, Á., Ádány, R., Balázs, M.: Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma.  
*Mod. Pathol.* 22 (10), 1367-1378, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2009.109>  
IF:4.406
12. Tóth, I.B., Benkő, S., **Szöllősi, A.G.**, Kovács, L., Rajnavölgyi, É., Bíró, T.: Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells.  
*FEBS Lett.* 583 (10), 1619-1624, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.031>  
IF:3.541

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 50.593**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9.775**

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

Debrecen, 2014.06.06