

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A bőr barrier egyes aspektusainak vizsgálata**

**Ádám-Nagy Dorottya**

**Témavezető: Dr. Oláh Attila**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1 A humán bőr.....	8
2.1.1 Az epidermisz: keratinociták és a barrier funkció .....	9
2.1.2 A faggyúmirigyek és a szebociták biológiája, a lipidbarrier .....	13
2.1.3 A bőr barrierert érintő leggyakoribb betegségek, a pszoriázis és az atópiás dermatitisz rövid ismertetése.....	17
2.2 A tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatorna szupercsalád .....	20
2.2.1 A TRPM alcsalád és a TRPM5.....	22
2.2.2 A TRP csatornák a humán bőrben .....	24
2.3 Az antidepresszáns fluoxetin (FX) bőrgyógyászati repozicionálása.....	29
3. Célkitűzés.....	31
4. Anyagok és módszerek .....	32
4.1 A kísérletek során használt kezelőanyagok .....	32
4.2 Sejtkultúrák, sejtenyésztés .....	33
4.2.1 SZ95 humán immortalizált szebociták.....	33
4.2.2 A HaCaT humán immortalizált epidermális keratinocita sejtvonal.....	34
4.2.3 Primer normál humán epidermális keratinociták (NHEK).....	36
4.3 Rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellben végzett kísérletek .....	38
4.3.1 A rekonstruált epidermisz-ekvivalens modell létrehozása .....	39
4.3.2 Mintaelőkészítés .....	42
4.3.3 Hematoxilin-eozin (HE) festés .....	43
4.3.4 Keratin 1 (K1) és keratin 10 (K10) jelölés .....	44
4.3.5 Ki-67 jelölés .....	46
4.3.6 Lucifer Yellow festékpenetrációs assay.....	47
4.4 RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	49
4.5 Szelektív géncsendesítés kis interferáló RNS segítségével (siRNS transzfekció) ..	51
4.6 Western blot.....	52
4.7 RNS szekvenálás .....	55
4.8 A citokin-felszabadulás vizsgálata (ELISA) .....	57
4.9 Foszfokináz array.....	58

4.10	<i>Az életképesség vizsgálat (MTT-assay)</i> .....	59
4.11	<i>Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása (Nile Red jelölés)</i> .....	60
4.12	<i>A proliferáció vizsgálata (CyQUANT-assay)</i> .....	61
4.13	<i>Az intracelluláris ionhomeosztázis vizsgálata</i> .....	61
4.13.1	<i>Fluoreszcens Ca<sup>2+</sup>-mérés (Fura-2 AM jelölés)</i> .....	61
4.13.2	<i>Fluoreszcens Na<sup>+</sup>-mérés (SBFI AM jelölés)</i> .....	64
4.14	<i>A HaCaT keratinociták elektromos impedanciájának valós idejű mérése</i> .....	64
4.15	<i>Statisztikai analízis</i> .....	67
5.	<i>Eredmények</i> .....	68
5.1	<i>A TRPM5 antagonista TPPO TRPM5-független módon fokozza a sebociták lipogenezisét és befolyásolja az immunfenotípusukat is</i> .....	68
5.1.1	<i>A TRPM5 kifejeződése megkérdőjelezhető SZ95 sebocitákon</i> .....	68
5.1.2	<i>A TRPM5 antagonista TPPO fokozza a humán sebociták lipogenezisét és befolyásolja a sejtek immunfenotípusát</i> .....	76
5.1.3	<i>Az Akt és az EGFR aktiválása részt vesz a TPPO lipogén hatásának közvetítésében</i> .....	81
5.1.4	<i>A TPPO által indukált IL-6 up-reguláció független a lipogén Akt-jelátviteltől, és valószínűleg az EGFR és a p38α MAPK útvonalak közvetítik</i> .....	87
5.1.5	<i>Az RNS-Seq elemzés eredményei arra utalnak, hogy a TPPO jelentősen befolyásolja a humán sebociták immunfenotípusát, és hatással van számos potenciálisan „akne-releváns” célgén kifejeződésére</i> .....	88
5.2	<i>A fluoxetin (FX) hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 μM) antiproliferatív hatást fejt ki humán epidermális keratinocitákon</i> .....	93
5.2.1	<i>A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja gátolja az epidermális keratinociták proliferációját</i> .....	93
5.2.2	<i>A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja nem befolyásolja jelentősen a humán epidermális keratinociták differenciálódását és barrierképző képességét</i> .....	96
6.	<i>Megbeszélés</i> .....	105
7.	<i>Összegzés</i> .....	119
8.	<i>Summary</i> .....	120
9.	<i>Irodalomjegyzék</i> .....	121
10.	<i>Tárgyszavak</i> .....	137
11.	<i>Key words</i> .....	137
12.	<i>Köszönetnyilvánítás</i> .....	138
13.	<i>Saját közlemények jegyzéke</i> .....	140

## Rövidítések jegyzéke

45S5RNS	18S riboszomális RNS
ABC	avidin-biotin komplex
ABCA1	ATP-kötő kazetta transzporter A1
AD	atópiás dermatitisz
AEC	3-amino-9-etil karbazol kromogén
AMP	antimikrobiális peptid
BCA	bicinkoninsav
BSA	szarvasmarha szérumalbumin
ctrl	kontroll
DAB	diamino-benzidin kromogén
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DGAT2	diacilglicerin O-aciltranszferáz 2
DM	differenciációs médium
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DMP	2,5-dimetilpirazin
DMSO	dimetil-szulfoxid
dNTP	deoxinukleozid-trifoszfát
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ETOH	abszolút etanol
FBS	magzati szarvasmarha szérum
FX	fluoxetin
HE	hematoxin-eozin
Hept	2-heptanon
hrEGF	humán rekombináns epidermális növekedési faktor
HKGS	„Human Keratinocyte Growth Supplement”, a keratinociták növekedését segítő készítmény
HRP	tormaperoxidáz
HSP27	hősokk protein 27
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor-1
IGF-1R	inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor
IL	interleukin
K1	keratin 1
K10	keratin 10
LY	Lucifer Yellow
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium bromid
n.s.	nem szignifikáns
Nefl	neflamapimod
NHEK	normál humán epidermális keratinocita
OCLN	okkludin

OD	optikai denzitás
p38 $\alpha$ MAPK	p38 $\alpha$ mitogén-aktivált protein kináz
PBS	foszfátbufferelt sóoldat
PBST	Tween20 <sup>®</sup> detergenssel kiegészített foszfátbufferelt sóoldat
Pen/Strep	penicillin-sztreptomycin keverék
p(I:C)	poliinozin-policitidilsav
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PM	proliferációs médium
PPIA	ciklofillin A (peptidil-prolil izomeráz A)
RNS-Seq	RNS/transzkriptom szekvenálás
RT buffer	reverz transzkripció puffer
SCR	„scrambled” RNS konstrukt; a szelektív géncsendesítés során alkalmazott kontroll, mely homológiát semmilyen ismert mRNS-sel sem mutat
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
siRNS	a szelektív géncsendesítés során alkalmazott kis interferáló RNS konstrukt
SSRI	szelektív szerotoninvisszavétel-gátló szer
TBS	Tris pufferelt sóoldat
TBST	Tris pufferelt sóoldat Tween20-szal kiegészítve
TEER	transzepiteliális elektromos ellenállás
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumornekrózis faktor
TPPO	trifenilfoszfin-oxid
TRP	tranzien receptorpotenciálú kationcsatorna
TRPA	a TRP csatornák „ankirin” alcsaládja
TRPC	a TRP csatornák „kanonikus/klasszikus” alcsaládja
TRPM	a TRP csatornák „melasztatin” alcsaládja
TRPML	a TRP csatornák „mukolipin” alcsaládja
TRPN	a TRP csatornák „no mechanoreceptor potencial C” alcsaládja
TRPP	a TRP csatornák „policisztin” alcsaládja
TRPV	a TRP csatornák „vanilloid” alcsaládja
TSLP	thymic stromal lymphopietin
Tyr	tyrphostin AG 1478

# 1. Bevezetés

A bőr az emberi test egyik legnagyobb szerve, hiszen a testtömeg közel ötödét teszi ki, azonban nem csak kültakaróként szolgál: szervezetünk első védvonalát jelenti összetett barrier funkciójának köszönhetően. A bőrrétegek különböző sejttípusai – köztük az általunk is vizsgált epidermális keratinociták és a faggyúmirigyek sejtjei, a szebociták – az immunrendszerrel együttműködve komplex védelmet jelentenek a külső behatásokkal, környezeti fizikai- és kémiai ártalmakkal, patogén mikrobákkal szemben, együttesen fizikai-kémia, mikrobiológiai és immunológiai barriert képeznek. Ha ennek a soktényezős rendszernek a szerkezeti vagy funkcionális épsége sérül, akkor az különböző összetett patomechanizmusú kórképek, úgynevezett „barrier betegségek” kialakulásához vezethet, mint például a pikkelysömör vagy az atópiás dermatitisz.

Munkacsoportunk fő érdeklődési köre a bőr (pato)fiziológiai folyamatainak vizsgálata. Munkánk során kiemelt szerepet kapnak a bőr sejtjeit érintő folyamatok, a barrierben bekövetkező változások, melyek különböző gyulladással, viszketéssel, bőrszárazsággal vagy fokozott faggyútermeléssel járó bőrgyógyászati kórképek megjelenéséért felelősek.

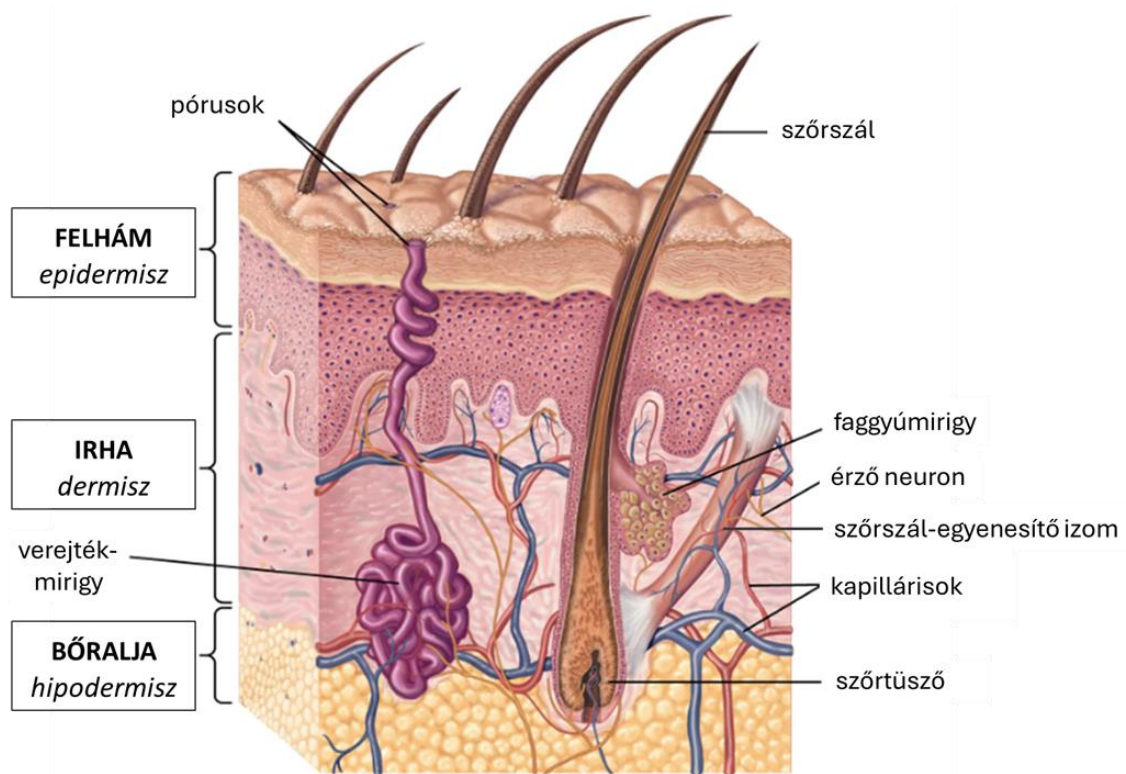
Kutatócsoportunk munkája során többször a középpontba kerültek a bőrben található tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatornák, többek között annak igazolása is a laboratóriumunkhoz kötődik, hogy a hőérzékeny TRPV1, -2 és -4 ioncsatornák kifejeződnek humán szebocitákon. Az értekezést megalapozó egyik kutatásunk alapjául egy nemrégiben megjelent tanulmány szolgált, melyben leírták, hogy a csatorna szupercsalád egyik tagja, a TRPM5 ígéretes terápiás célpont lehet a nemkívánt szőrnövekedéssel járó kórképek esetében. A publikáció alapján felmerült a kérdés, hogy a csatornát célzó kezelés milyen hatással lehet a szebociták biológiai folyamatira és kell-e esetleges faggyúmirigyek érintő mellékhatásokkal számolni, így célul tűztük ki a TRPM5 kifejeződésének és funkcionális szerepének felderítését humán szebocitákon.

Az értekezést megalapozó második közlemény alapjául szolgáló kísérleteinkben egy korábbi projektet folytattunk, és egy sokoldalú, szelektív szerotoninviszavétel-gátló szer, a fluoxetin (FX) hatásait vizsgáltuk a humán epidermális keratinocitákon. A közelmúltban publikált eredményeink azt mutatták, hogy a FX, melyet a klinikumban hosszú évek óta alkalmaznak antidepresszánsként, 14  $\mu\text{M}$ -ban alkalmazva csökkenti a poliinozin-policitidilsav [p(I:C)] által kiváltott gyulladásos választ és az endotelinfelszabadulást humán epidermális keratinocitákban a foszfoinozid-3-kináz (PI3K)-útvonal közvetett gátlásán keresztül. Mivel a PI3K-útvonalnak nemcsak a gyulladásos válaszok közvetítésében van szerepe, hanem a proliferáció pozitív regulátora is, így kísérleteinkben célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a FX hatékony gyulladásgátló koncentrációja (14  $\mu\text{M}$ ) milyen hatással van a humán epidermális keratinociták proliferációjára, differenciálódására és barrierformálási képességére.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 A humán bőr

A bőr (**1. ábra**) az emberi test egyik legnagyobb szerve, hiszen a testtömeg 15-20%-t teszi ki, azonban nem csak kültakaróként szolgál, a bőrrétegek különböző sejtípusai komplex rendszert alkotva számos összetett feladatot látnak el. A bőr legkülső rétege a felhám, azaz epidermisz, amit négy sejtípus épít fel: a keratinociták, a Langerhans-sejtek, a melanociták és a Merkel-féle sejtek. Az epidermisz jellegzetes rétegelt mintázatot mutat, melyet a felszín felé haladó, terminálisan differenciálódó majd apoptotizáló keratinociták alakítanak ki.



**1. ábra**

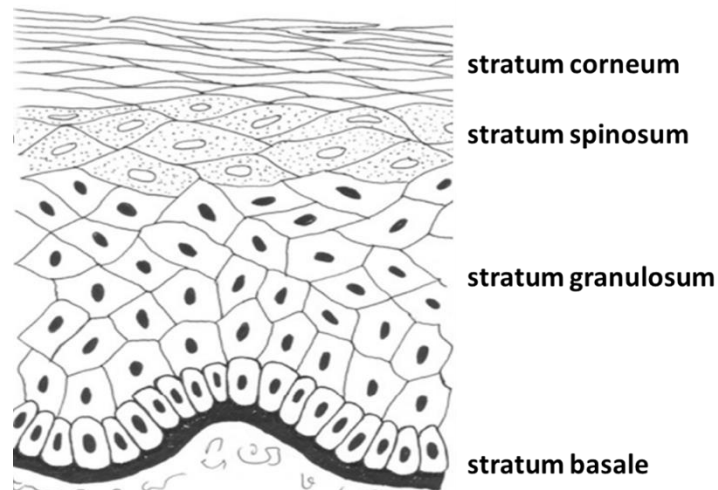
**A humán bőr felépítése<sup>1</sup> (módosított ábra)**

A középső réteg az irha vagy dermisz, egy laza rostos kötőszöveti réteg, mely mechanikai támaszt ad a bőrnek. Itt találhatóak meg a különböző epidermisz eredetű bőrfüggelékek, mint a szőrtüsző, a faggyúmirigy és a verejtékmirigy.<sup>2</sup> A szőrtüsző és a

faggyúmirigy a szőrszál-egyenesítő izommal kiegészülve egy fontos funkcionális egységet alkotnak, melyet pilosebáceus egységnek nevezünk.<sup>3</sup> A legbelső réteg a bőralja, amit hipodermisznek (illetve szubkutisznak) is neveznek, itt főleg adipociták találhatóak, melyek egyéenként és testtájonként is eltérő vastagságú zsírszövetet alkotnak<sup>2</sup>. A bőr komplex szerkezetének és összetételének köszönhetően többféle funkciót is ellát, így szenzoros, motoros, endokrin, exokrin, transzport és hőszabályozó szerepet is betölt.<sup>4</sup> Amit viszont nagyon fontos kiemelni, az a barrier funkció: a bőr összetett védvonalat képez a külső behatásokkal, környezeti fizikai és kémiai ártalmakkal, patogén mikrobákkal szemben, fizikai-kémia, mikrobiológiai és immunológiai barrierként funkcionál. Ennek a védelmi rendszernek a szerkezeti és funkcionális épsége nélkülözhetetlen. Ha megsérül, például az epidermális keratinociták differenciációjában zavar történik, akkor az hozzájárul különböző összetett patomechanizmusú kórképek, mint például pikkelysömör vagy atópiás dermatitisz kialakulásához.<sup>5</sup>

### 2.1.1 Az epidermisz: keratinociták és a barrier funkció

A barrier kialakításának kulcsszereplői a keratinociták, melyek az epidermisz legbelső rétegében történő proliferációjukat követően a felszín felé migrálnak, és a differenciációs folyamat során változó morfológiájukkal jellegzetes rétegelt mintázatot adnak a felhámnak: a belső réteg a *stratum basale*, majd a külvilág felé haladva ezt követi a *stratum spinosum*, a *stratum granulosum*, majd a sejtek magjukat elvesztve korneocitákká alakulva létrehozzák a legkülső réteget, amit *stratum corneum*nak nevezünk<sup>2</sup> (2. ábra).



**2. ábra**  
*Az epidermisz szerkezeti felépítése (módosított ábra)<sup>6</sup>*

A keratinociták differenciációjának fő szabályozója a kalcium szignalizáció *in vivo* és *in vitro* is.<sup>7</sup> Már 1980-ban leírták, hogy az egerek hámsejtjeinek a differenciációját a kalcium indukálja,<sup>8</sup> és ezt nem sokkal később humán sejtekben is megerősítették.<sup>9</sup>

A szigorúan szabályozott differenciáció során (mely végül a sejtmag elvesztéséhez és apoptózishoz vezet) a keratinociták különféle proteinek fejeznek ki, melyek a folyamat adott fázisára jellemzőek, így ezek számunkra hasznos állapotjelző markerek.<sup>10,11</sup> A *stratum basale* hámsejtjeire jellemző a keratin (K) 5 és 14 termelése, majd a differenciáció kezdetétől, aminek első lépéseként a sejtek a *stratum spinosumba* migrálnak, itt pedig a K1 és a K10 mellett involucrint is kezdenek expresszálni. A *stratum granulosumra* a keratohialin granulomokba csomagolt lorikrin és profilaggrin (melyből később filaggrin képződik) jelenléte a jellemző.<sup>12</sup> A filaggrinnak a bőr vízháztartásában is szerepe van, bomlása során keletkező aminosavakból természetes hidratáló faktorok szintetizálódnak, melyek higroszkópos tulajdonságaiknak köszönhetően biztosítják az epidermisz megfelelő vízvisszatartását.<sup>13</sup>

A folyamat során képződő fehérjék és egyéb intermedier filamentumok biztosítják az epidermisz felsőbb rétegeinek stabilitását, és többféle sejt-sejt kapcsolat kialakításában is részt vesznek: hozzájárulnak a mechanikai támaszt adó dezmoszómák, korneodezmoszómák, adherens kapcsolatok és tight junction-ök létrejöttéhez, melyek nélkülözhetetlen alapját képezik a bőr barrier fizikai szerkezetének.<sup>14,15</sup> A tight junction kialakításának fontos alappillére – a klaudinok mellett – az okkludin (OCLN), mely fehérjét szintén a keratinociták differenciáltsági állapotát jellemző markerként alkalmazunk a kutatásban.<sup>16</sup>

A *stratum corneumot* a kutatók gyakran a „tégla és habarcs” modellel jellemzik. A metaforában a téglák a magjukat veszett keratinociták, azaz a korneociták, melyeket ellenálló, nem vízdékony fehérjeburok („cornified envelope”) vesz körül (ezt főleg lorikrin, involucrin, kis prolinban gazdag fehérjék és filaggrin alkotják); a habarcsot pedig a sejtek közötti epidermális lipidek képezik.<sup>6,15</sup> Ezen lipidek a keratinociták differenciálódása során képződnek majd lamelláris testekben tárolódnak és enzimatikus emésztést követően excitózissal a *stratum corneum* elérése előtt kijutnak a sejtekből. A folyamatosan termelődő ceramidok, koleszterin, szabadzsírsavak és egyéb lipidek, a faggyúmirigy által termelt, felszínre jutó faggyúval kiegészülve, nemcsak a korneocitákat stabilizálják, hanem további szigetelést és fizikai védelmet is nyújtanak a bőrnek.<sup>14,15,17</sup> A keratinociták mindezek mellett folytonos cserélődésükkel és leválásukkal megnehezítik, hogy a különböző patogén mikroorganizmusok tartós telepeket hozzanak létre a bőr felszínén, ezzel is hozzájárulva az összetett barrier rendszerhez.<sup>4</sup>

A bőr kémiai védelmének része a homeosztatikus, enyhén savas pH fenntartása. Ezt egészíti ki a keratinociták és a szebociták által termelt antimikrobiális peptidek és lipidek jelenléte, melyek a kémiai védelmen túl különböző összetett komplex gyulladáso- és immunfolyamatokban is részt vesznek.<sup>13,18,19</sup>

A barrierfunkció másik fontos pillére a már részben említett mikrobiológiai és immunológiai védelem. A bőr, akárcsak más szervek, összetett baktériumflórával rendelkezik, ennek része többek között a *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*; korábbi nevén *Propionibacterium acnes*), a *Staphylococcus epidermidis*, a *Streptococcus mitis* és a *Corynebacterium spp.*<sup>20,21</sup> A kapcsolat szimbiotikusnak is mondható, hiszen ezek a baktériumok bakteriocineket, azaz bakteriális antimikrobiális peptideket termelnek, melyek antibakteriális hatásúak más törzsekre nézve.<sup>19</sup> A kommenzális baktériumok, kifejezetten a *Staphylococcusok*, képesek a keratinociták antimikrobiális peptid termelését is indukálni, illetve különböző szignalizációs útvonalak aktiválásán keresztül befolyásolják a sejtek immunválaszát, fejlesztve és hatékonyabbá téve ezzel a patogénekre adott válaszreakciót.<sup>21</sup> Ráadásul a barrier megerősítésében is szerepük lehet: a *S. aureus*-ból származó peptidoglikán és a mintázatfelismerő toll-like receptor (TLR)-2 szintetikus agonistái fokozzák a *tight junction* fehérjék, köztük a kladin-1, -23 és az OCLN expresszióját humán keratinocitákban.<sup>22</sup>

Az immunológiai védelemhez a különböző immunkompetens sejteken túl a bőr többi sejtje is hozzájárul, hisz gyakorlatilag minden sejt típusában termelődnek citokinek, kemokinek, valamint egyéb gyulladásos mediátorok.<sup>23</sup> A keratinociták a bőr „őrszemeiként” működnek. Számos mintázatfelismerő receptort, köztük TLR-t expresszálnak (a sejt felszínen a TLR1, -2, -4, -5 és -6 fejeződik ki, az endoszómákban pedig a TLR3, -7 és -9), melyek a környezetből érkező veszélyszignálokra reagálnak.<sup>23,24</sup> Emellett a hámsejtek többek között TSLP-t („thymic stromal lymphopoietin”), tumornekrózis faktor (TNF)- $\alpha$ -t és különböző interleukinokat (IL) szabadítanak fel.<sup>25</sup> A termelt antimikrobiális peptidek, mint például az LL-37 és a  $\beta$ -defenzinek, nemcsak antimikrobiális hatásukkal járulnak hozzá a védelemhez, hanem immunmoduláló hatást is kifejtenek azáltal, hogy befolyásolják a citokin- és kemokintermelést is.<sup>26,27</sup>

Az említett TLR-ok fontos szerepet vállalnak a bőr barrier fenntartásában, hiszen aktivációjuk nemcsak a gyulladáshoz vezető citokinek és az antimikrobiális peptidok felszabadulását eredményezi, hanem mediátorokon keresztül a viszketés kialakulásához is hozzájárulnak, amely egy jellemző tünet a barrier károsodásával járó bőrbetegségekben, például az atópiás dermatitiszben is.<sup>28</sup> A hámsejtek mintázatfelismerő receptorai között kiemelt jelentőségű a TLR3. Ennek p(I:C)-vel történő aktiválása olyan keratinocita eredetű viszketésmédiátorok felszabadulásához vezet, mint az endotelin-1 és a TSLP.<sup>29-31</sup> A folyamat ráadásul a receptor expressziójára is visszahat, a kifejeződésének fokozódásához vezet, így a mediátorok megjelenésével együtt ez is szerepet játszik a viszketés-vakarás („*itch-scratch cycle*”) ördögi körének kialakításához és fenntartásához.<sup>29</sup>

### 2.1.2 A faggyúmirigyek és a szebociták biológiája, a lipidbarrier

A faggyúmirigyek a bőr dermiszében elhelyezkedő lipidszintézisre specializálódott holokrin mirigyek. A tenyér és a talp kivételével a test minden részén megtalálhatóak. A legkoncentráltabban a hajas fejbőrön és az arcon helyezkednek el, ahol akár négyzetcentiméterenként 400-900 mirigy is előfordulhat. Nagyrésztük a pilosebáceus egységek részeként a szőrtüszőkkel és szőrszál-egyenesítő izmokkal alkot funkcionális komplexet, de vannak szabad faggyúmirigyek is, melyek jellemzően a homlokon, az arcon, a szemhéjon és az ajkak körül találhatóak. A faggyúmirigyek sejtjei a szebociták, melyek a szébum, azaz a faggyú termeléséért felelősek.<sup>2,32,33</sup>

A faggyúmirigyek a bálnák és a disznódelfinfélék kivételével<sup>34</sup> a legtöbb emlősfajban megtalálhatóak. A termelt faggyú védi az állatokat a szőr túlzott átázása, így a hővesztés ellen,<sup>35</sup> illetve specializált faggyúmirigyek-szerű struktúrák – mint például a rágcsálók prepucciális mirigyei – a bennük lévő feromonokkal a kommunikációban és a területjelölésben játszanak szerepet.<sup>36</sup> Az ember fejlődése során ezek a funkciók fokozatosan

jelentőségüket veszítették és elkoptak, így a humán faggyú fontosságát hosszú időn át megkérdőjelezték a kutatók, olyannyira, hogy Albert M. Kligman akne kutatással foglalkozó bőrgyógyász 1963-ban egy publikációjában úgy fogalmazott, hogy „*Mivel a szőr feleslegessé vált, a faggyúmirigy szó szerint munka nélkül marad. Ez egy élő kövület, amelynek van múltja, de nincs jövője.*”, így azt gondolhatnánk, hogy a faggyú termelése valóban csak egy evolúciós maradvány.<sup>37</sup> Azonban ma már tudjuk, hogy a faggyúmirigy és a szébum (a már korábban említett epidermális lipidekkel karöltve) szerves részei a bőr barrier és az immunrendszer komplex működésének, és számos egyéb fontos szereppel is bírnak.<sup>38-41</sup> Ennek a védelmi funkciónak betöltésére jó példa a különböző kórokozók elleni védelemben fontos „savköpeny”, aminek a kialakításához a faggyúmirigyek által termelt zsírsavak is hozzájárulnak.<sup>42</sup> Ezen túlmenően a faggyúmirigyek immunológiai szerepét jól mutatja az is, hogy a bennük gazdag, illetve szegény bőrrégiók számos immunológiai különbséget mutatnak. Egy 2017-ben megjelent átfogó tanulmány alapján a faggyúmirigyben gazdag területeken fokozott bizonyos kemokinek (CCL2, -3, -19, -20, -23 és -24) és antimikrobiális peptidek (S100A7, -8, -9, lipokalin,  $\beta$ -defenzin-2) expressziója és jelentős  $T_h17/IL-17$  dominancia mutatható ki a faggyúmirigyben szegény régiókhöz viszonyítva.<sup>43</sup>

A faggyúmirigyekben a differenciálódó, majd apoptózison áteső sebociták három szakaszra osztható érési folyamaton mennek keresztül, mely során a sejtek a mirigy szélső területeitől a belseje felé haladnak. A legkülső, perifériás zónában a kicsi, mitotikusan aktív sejtek találhatóak, majd a mirigy közepe felé haladva kialakítják az érési zónát, ahol elvesztik mitotikus aktivitásukat. A differenciáció előrehaladtával a sejtek fokozatosan felhalmozzák a lipideket és térfogatnövekedésen mennek keresztül. Utolsó lépésként a nekrotikus zónába érve a sejtek dezintegrálódnak, a terminálisan differenciálódott

szebociták szétesnek, és kiürítik tartalmukat (mely ekkora már teljesen kitölti őket). A szekréta és a sejtörmelék együttesen képezik a faggyút, ami végül a bőr felszínére kerül.<sup>33</sup>

A holokrin szekrécióval képződő faggyú döntően neutrális lipideket tartalmaz. Az ember esetében (megjelenési arányuk alapján csökkenő sorrendben) trigliceridből, viaszészterekből, szabad zsírsavakból, szkvalénból, koleszterin-észterekből és koleszterinből áll. A szkvalén és a viaszészterek kifejezetten különlegessé teszik ezt az összetételt, hiszen ezek csak a faggyúban találhatóak meg, máshol a szervezetünkben nem.<sup>44</sup>

A bőr védelmében már életünk legelején is fontos szerepe van a faggyúmirigyeknek, hiszen a *vernix caseosa*-t, azaz a magzatmázat termelik, mely megvédi a magzat bőrét a magzatvíztől.<sup>45</sup> Egyedi összetételének köszönhetően a faggyúnak több fronton is szerepe van a bőr barrier fenntartásában,<sup>38,39</sup> melyből jelenleg csak szemléltetésként néhány kerül kiemelésre. A viaszészterek (melyek mennyisége korrelál a szebociták differenciáltsági állapotával)<sup>46,47</sup> hosszú szénláncú, erősen hidrofób molekulák. A többi lipidhez képest ellenállóbbak az oxidációval, a hidrolízissel és a termolízissel szemben; szerkezetüknek köszönhetően pedig egyfajta gátként bezárják a bőr belső nedvességtartalmát és megakadályozzák a kiszáradását, így védve a bőrt a dehidratáció és a felázás ellen is.<sup>46-48</sup> A szkvalén jelenléte az UV-sugárzás elleni védelemben segít, mivel képes megakadályozni a reaktív oxigénradikálok kialakulását,<sup>49</sup> sőt, a faggyú E-vitamint is tartalmaz, mely szintén antioxidáns hatású.<sup>50</sup> Ezen túl a faggyúmirigyek hozzájárulnak a bőr független perifériás endokrin funkcióihoz is:<sup>51</sup> a szteroidszintézishez szükséges összes enzimet kifejezik,<sup>52</sup> szabályozzák a helyi androgénszintézist,<sup>53</sup> expresszálják a D-vitamin receptorát és a D-vitamint metabolizáló enzimeket,<sup>54</sup> és szerepük van a hormonálisan indukált bőröregezési folyamatokban is.<sup>55</sup>

Fontos ismét megemlíteni, hogy a szebociták is termelnek antimikrobiális peptideket és lipideket, melyek különösen hatékonyak bizonyos baktériumok (például a *Staphylococcus*

*aureus*, a *Pseudomonas aeruginosa*, az *Escherichia coli* és a *C. acnes*) ellen.<sup>18,39</sup> A szebociták immunkompetens mivoltát és az immunológiai védelemben játszott szerepét az is alátámasztja, hogy több patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptort (pl. CD14, TLR2, -4 és -6) is expresszálnak,<sup>56</sup> és a gyulladásos folyamatokban is részt vesznek. Képesek különböző gyulladásos citokinek termelésére: *in vivo* és *in vitro* is leírták az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 (CXCL8) és TNF $\alpha$  expresszióját szebocitákon.<sup>39</sup>

Ha faggyúmirigyekről beszélünk, említést kell tenni a hozzájuk kapcsolható leggyakoribb kórképről, az *ance vulgaris*-ről, azaz a pattanásosságról. Az akne nagy prevalenciájú betegség. Előfordulása pubertáskorban a leggyakoribb, a serdülők 85%-át érinti. Az életkor előrehaladtával előfordulása csökken, de számos felnőtt is küzd a pattanásossággal.<sup>57</sup> Patogenezise összetett (és a mai napig sem tisztázott teljesen), és négy fő tényező határozza meg: a szeborrea, a gyulladás, a faggyúmirigy kivezetőcsövének hiperkeratinizációja és egyes *C. acnes* baktériumtörzsek elszaporodása, melyek egy egymást erősítő ördögi kört formálnak.<sup>58</sup> A folyamat kezdetén valamilyen oknál fogva a faggyú összetétele és mennyisége megváltozik, szeborrea alakul ki, ami elősegíti az infundibuláris hiperkeratózist, ami komedó kialakulásához vezet, ami az akne kialakulásának első lépése. A felgyülemlett faggyúban elszaporodhatnak a *C. acnes* baktériumok, ami az immunválasz stimulálásával kóros gyulladásos folyamatok kialakulásához vezet, végül pedig a lokális NF- $\kappa$ B és IL-1 $\alpha$  megjelenésén keresztül hozzájárul a kivezetőcső további hiperkeratinizációjához, illetve a lipidtermelés további fokozódásához.<sup>59,60</sup> Kezelését tekintve több lehetőség is a rendelkezésünkre áll. Az elsőként bevetendő szerek a topikálisan alkalmazható készítmények, mint például a benzoil-peroxid és a különféle retinoid analógok. Ezt sok esetben kiegészítik orális antibiotikum terápiával, azonban a leghatásosabb anti-akne szer az izotretinoin, melynek használata súlyos lehetséges mellékhatásai miatt komoly körültekintést igényel.<sup>61,62</sup>

A szebociták és a kapcsolódó betegségek tanulmányozásának komoly korlátja, hogy nehezen hozható létre belőlük primer sejt kultúra, melynek fő oka az, hogy nagy számú humán donorra van szükség a rendszeres, megfelelő mennyiségű minta kinyeréséhez, ráadásul a primer szebociták sérülékenyek és csak korlátozott ideig, néhány passzázsig tarthatók tenyészetben.<sup>40</sup> Léteznek állatmodellek is (például a hörcsög fül faggyúmirigy modell<sup>63</sup> vagy az egér fitymamirigy modell,<sup>64</sup> illetve fellelhető spontán mutálódott aszébiás egér modell<sup>65</sup> is), amik bizonyos kísérletek elvégzésére alkalmasak, viszont számos, szinte kizárólag az embert érintő bőrbetegség (az aknét is ideértve) nem modellezhető velük. A megoldást egy immortalizált szebocita sejtvonal hozta el 1995-ben, amikor Christos C. Zouboulis és munkatársai létrehozták az általunk is használt SZ95 sejtvonalat, ami kiváló *in vitro* modellje a humán szebocitáknak, hiszen stabilan tartja a primer sejtek fenotípusos és funkcionális jellemzőit.<sup>66</sup> Ezt még később más, lényegesen ritkábban használt szebocita sejtvonalak (SEB-1,<sup>52</sup> Seb-E6E7<sup>67</sup>) is követték.

### *2.1.3 A bőr barrieret érintő leggyakoribb betegségek, a pszoriázis és az atópiás dermatitisz rövid ismertetése*

A bőr barrier diszfunkciójával társuló talán legismertebb és legtöbb embert érintő két betegség a pszoriázis, azaz a pikkelysömör, illetve az ekcémaként is ismert atópiás dermatitisz. Jelen alfejezet célja a két kórkép érintőleges bemutatására mellett az, hogy felhívja a figyelmet arra, hogy ezek a betegségek ugyan az életet közvetlenül nem veszélyeztetik, azonban a bennük szenvedők mindennapjait jelentősen megnehezítik,<sup>68,69,70</sup> így a modern kísérletes bőrgyógyászat egyik fontos célja, hogy kezelésükre kedvező mellékhatásprofilú terápiás lehetőségeket derítsen fel.

A pszoriázis (**3. ábra**) egy igen gyakori, krónikus gyulladással járó kórkép, mely a populáció 2%-át érinti.<sup>71</sup> Több formája is ismert, melyek közül a leggyakrabban előforduló

típus a plakkos pikkelysömör.<sup>72</sup> Elnevezését a legszembetűnőbb tünetéről kapta: vörös, viszkető, száraz, jól körülhatárolható foltok jellemezik, melyeket vastag fehér vagy ezüstös „pikkelyek” fednek. Ezek a plakkok leggyakrabban a fejbőrön, a könyökön a térdén és a hát lumboszakrális régiójában jelennek meg, azonban súlyos esetben szinte az egész testet beboríthatják.<sup>73</sup> Kialakulásában több tényező együttesen játszik szerepet, így genetikai- és környezeti tényezők is hatással vannak a betegség kialakulására és a fellángolások gyakoriságára.<sup>74,75</sup>



**3. ábra**  
***A pikkelysömör jellegzetes bőrtünete***<sup>76</sup>

Pontos patogenezise jelenleg is ismeretlen, de feltehetően a forrása a bőr veleszületett immunrendszerének abnormalitása, melyben a  $T_h$  sejtek (túlsúlyban  $T_h1$ ,  $T_h17$ ,  $T_h22$ ) fokozott működése és egy összetett és fokozott aktivitású kemokin és citokin rendszer (kifejezetten jellemzőek a IL-22, IL-17, IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$ ) olyan jelátviteli útvonalak aktiválásához vezet, mely felelősek a keratinociták rendellenes differenciálódásáért.<sup>77,78</sup>

Mivel a folyamat során a keratinociták proliferációs és differenciációs folyamata is sérül, az éretlen keratinociták felhalmozódnak, ezzel hiper- és parakeratózist okozva, ráadásul a bazális keratinociták mitotikus rátája is fokozódik, ami akantózishoz vezet.<sup>73</sup> A léziókban a faggyúmirigyek száma és mérete is csökken, továbbá az egyedi hámsejtek sem differenciálódnak megfelelően a pikkelysömör által érintett bőrterületeken.<sup>79,80</sup>

Az atópiás dermatitisz (**4. ábra**) immunregulációs zavarral és a bőr barrier diszfunkciójával jellemezhető komplex kórkép. Kialakulásában a genetikai hajlam, a filaggrin gén mutációja és környezeti tényezők is közrejátszanak.<sup>81,82</sup> Igen heterogén megjelenésű kórkép, melyet általában erősen viszkető, eritémás, gyulladt, hámló, esetenként hólyagos, váladékozó bőrterületek jellemeznek.<sup>83</sup> Leggyakrabban az első tünetek már csecsemőkorban megjelennek; szakirodalmi adatok szerint a gyerekek akár 30%-át is érintheti a betegség, de felnőttek esetében is 10% körüli az előfordulása.<sup>84</sup>



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

**4. ábra**  
**Atópiás dermatitisz mellkason**<sup>85</sup>

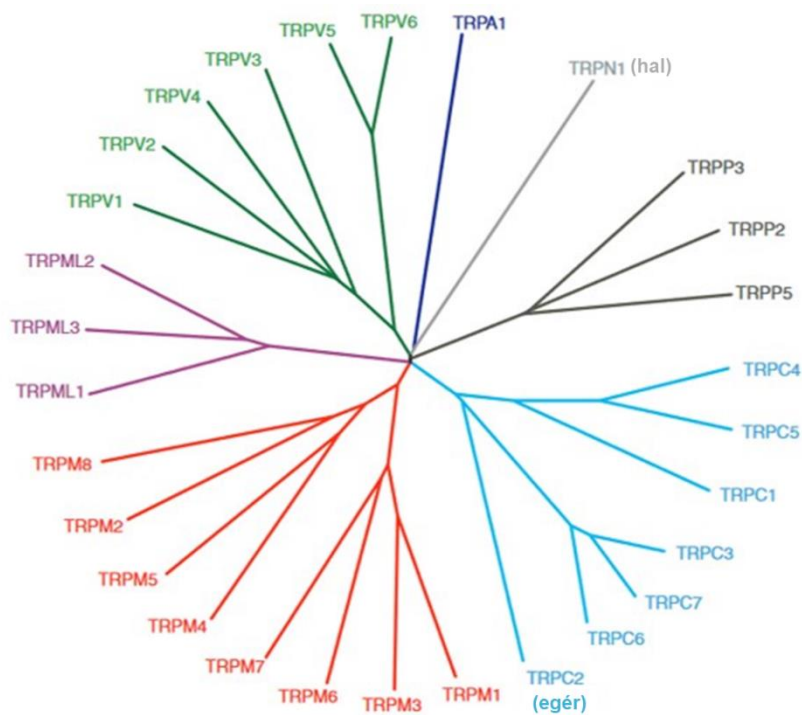
Az atópiás dermatitist a bőr barrier komplex zavar jellemzi. Arról, hogy mi a „baj forrása”, arról két hipotézis létezik, az egyik alapján az immunrendszer regulációs zavara, a másik szerint a fizikai barrier sérülése (pl. filaggrin mutáció) indítja el a további folyamatokat.<sup>86</sup> Összetettségét jellemzi, hogy számos fronton sérül a barrier: az immunválasz a  $T_H2$ - $T_H22$  irányába tolódik el (melyet leginkább IL-4, IL-10, IL-13, illetve IL-22 fokozott megjelenése kísér),<sup>83</sup> melyhez a keratinociták differenciációjának zavara, a csökkent antimikrobiális peptid termelés, fokozott vízvesztés,<sup>81</sup> emelkedett bőr pH,<sup>87</sup> a mikrobióta zavara<sup>88</sup> és a lipidbarrier károsodása<sup>89</sup> is társul.

## 2.2 A tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatorna szupercsalád

A tranziens receptorpotenciálú (TRP) ioncsatornák leírt története 1969-ben kezdődött, amikor Cosens és Manning a *Drosophila melanogaster*, azaz az ecetmuslica fotoreceptorait kutatva felfedezte, hogy a vizsgált egyedek egy csoportja eltérően reagál a folyamatosan alkalmazott fényingerre, ezzel rendellenes eletroretinogram-választ adva. A mutáns rovarok a vad típustól eltérően átmeneti, tranziens potenciálváltozással reagáltak.<sup>90</sup> Az eltérésért a felelős gént ez alapján tranziens receptorpotenciálnak, *trp*-nek nevezték el, az általa kódolt fehérjét pedig még két évtizeden át homály fedte, míg 1989-ben a gént pontosabban megismerve megállapították, hogy a kódolt TRP fehérje szerkezete és funkciója alapján egy ioncsatorna lehet.<sup>91</sup> A humán TRP csatornák felfedezése – elnevezésük arra utal, hogy szerkezeti- és szekvencia hasonlóságot mutatnak az ecetmuslicánál leírt TRP fehérjékkel – 1995-ben kezdődött a TRPC1 leírásával,<sup>92</sup> kaput nyitva ezzel egy addig felfedezetlen ioncsatorna szupercsalád megismeréséhez.

A szupercsalád tagjai kifejeződnek élesztőkben, férgekben, ecetmuslicákban és gerincesekben, így például az egerekben és az emberben is.<sup>93</sup> A gerincesek TRP-csatornáit szerkezeti és szekvenciahomológiájuk alapján 7 alcsaládra oszthatjuk: klasszikus vagy kanonikus (TRPC), melyek a legnagyobb hasonlóságot mutatják a *Drosophila trp* csatornájával;<sup>92</sup> vanilloid (TRPV), mely alcsalád nevét az először felfedezett tagjáról, a vanilloid receptor 1-ről kapta, amit a vanilloid-szerű vegyületek, így a kapszaicin is képes aktiválni;<sup>94</sup> melasztatin (TRPM), melynek első tagjának génjét melanómákból klónozták;<sup>95</sup> ankirin (TRPA), mely alcsalád egyetlen ismert tagja, a TRPA1 az N-terminálisán számos ankirin ismétlődést tartalmaz;<sup>96</sup> policisztin (TRPP), ezek mutációi egy autoszomális domináns policisztás vesebetegséget okoznak;<sup>97</sup> mukolipin (TRPML), nevét a IV. típusú mukolipidózis néven ismert lizoszomális tárolási betegségben betöltött szerepe miatt kapta;<sup>98</sup> és a „no mechanoreceptor potencial C” (NOMPC vagy TRPN), melyet eddig

gerincesek közül egyedül zebrahalban tudtak kimutatni<sup>99</sup>. Az emlősökben expresszáldó alcsaládok jelenlegi tudásunk szerint összesen 28 csatornát ölelnek fel. Ebből egy, a TRPC2, emberben és emberszabásúakban is pszeudogén, így a fehérje nem expresszáldik<sup>100</sup> (5. *ábra*).



**5. ábra**  
*A TRP csatornák filogenetikai fája<sup>101</sup> (módosított ábra)*

A TRP csatornák 6 transzmembrán doménből épülnek fel, emellett citoszolikus amino és karboxi végződéseket tartalmaznak, melyek hossza alcsaládonként eltérő, ezen túl pedig különböző szerkezeti és funkcionális egységek határozzák meg a csatornák egyedi tulajdonságait.<sup>102</sup> Homo-, illetve heterotetramer formában funkcionális, nem-szelektív, többnyire  $\text{Ca}^{2+}$ -ra permeábilis kationcsatornákat képeznek, de vannak kivételek. A teljesség igénye nélkül például a TRPM3 a  $\text{Ca}^{2+}$  mellett a  $\text{Mn}^{2+}$ -ra<sup>103</sup>; a TRPM7 a számos divalens kation között fízológias és toxikus fémionok, így például a  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , a  $\text{Mn}^{2+}$ , a  $\text{Ba}^{2+}$ , a

Sr<sup>2+</sup>, a Ni<sup>2+</sup> és Cd<sup>2+</sup> számára is átjárható;<sup>104</sup> míg TRPM5 csak monovalens kationokat enged át.<sup>105</sup>

A csatornák többsége a plazmamembránban lokalizálódik, de vannak, melyek intracelluláris membránokban (is) megtalálhatóak, így a lizoszómákban, endoszómákban vagy az endoplazmatikus retikulumban fejeződnek ki.<sup>106</sup>

A TRP-k egy heterogén, változatos funkciókkal rendelkező csoportot alkotnak, így élettani szerepük részletezése messze túlnyúlna a jelen disszertáció keretein. Általánosságban elmondható, hogy ingerlékeny és nem-ingerlékeny szövetek számos sejttípusában expresszálódnak. Részt vesznek többek között szenzoros funkciók ellátásában (például ízérezékelés, szaglás, nocicepció, feromonjelzés, hőérezékelés), ozmotikus folyamatokban, izomkontrakcióban és a vazomotoros szabályozásban is.<sup>101</sup>

### 2.2.1 A TRPM alcsalád és a TRPM5

Ahogy az már korábban említésre került, a TRP csatornák melasztatin alcsaládjá az alcsalád elsőként azonosított tagjáról, a TRPM1-ről kapta nevét, melynek génjét melanómákból klónozták.<sup>95</sup> A TRPM1-et később tumorszuppresszorként és a metasztatikus melanomák potenciális prognosztikai markereként azonosították.<sup>107</sup> Az idetartozó 8 ioncsatornát 5 csoportba sorolhatjuk az aminosav-szekvenciájuk alapján: ezek a TRPM1/TRPM3, a TRPM4/TRPM5, illetve a TRPM6/TRPM7 párok, valamint a különálló „csoportokat” képező TRPM2 és TRPM8.<sup>108</sup>

A melasztatin alcsaládot multifunkcionális kationcsatornák alkotják változatos fiziológiai jellemzőkkel, az egyes tagok több izoformában is kifejeződhetnek. Az alternatív mRNS-splicing jelentősen befolyásolja a csatornák biofizikai jellemzőit, akár funkcionálisan nem aktív változatokat is eredményezhet.<sup>109</sup> Az alcsalád három tagja, a TRPM2, a TRPM6 és a TRPM7 esetében fontos kiemelni, hogy úgynevezett „chanzyme”-

ként is működnek, azaz enzimatis aktivitásuk is van a C-terminális doménjüknek köszönhetően, így a TRPM2 ADP-ribóz-pirofoszfátázként, míg a TRPM6 és -7 csatornák atipikus protein-kinázként is funkcionálhatnak.<sup>110</sup>

A TRPM5 egy  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált ioncsatorna, ami  $\text{Ca}^{2+}$ -ra nem permeábilis, csak a monovalens kationok ( $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$ ) számára átjárható<sup>105</sup>. Több TRP csatornához hasonlóan a TRPM5 is termoszenzitív, hőaktivált csatorna; esetében már a 15 és 35 °C közötti tartományban is fokozott aktivitást mutattak ki.<sup>111</sup> Multimodalitását mutatja, hogy a hőmérsékleten túl aktivitását a feszültség, foszfinozidok és a pH változása is szabályozza.<sup>112</sup> A csatornának fontos szerepe van az ízlelésben és más kemoszenzoros jelátvitelben is, valamint része annak a kaszkádnak, ami a G-fehérjével kapcsolt receptorok keserű, édes vagy umami ízmolekulák általi aktiválásával kezdődik.<sup>113</sup>

Érdekes itt megjegyezni, hogy a termoszenzitivitásának és az említett ízek érzékelésében betöltött szerepének köszönhetően a TRPM5-nek a „hétköznapi tudományban” is funkciója van, mivel részben ez a csatorna felelős azért, hogy az olvadt fagyalt édesebb ízű, a hideg sör kevésbé keserű, és ezért ajánlott például az édes fehér borokat 10-12 °C-ra hűtve fogyasztani, hiszen így nem csak az édes íz fog dominálni bennük, hanem a savak és egyéb jellegjegyek is érezhetővé válnak.

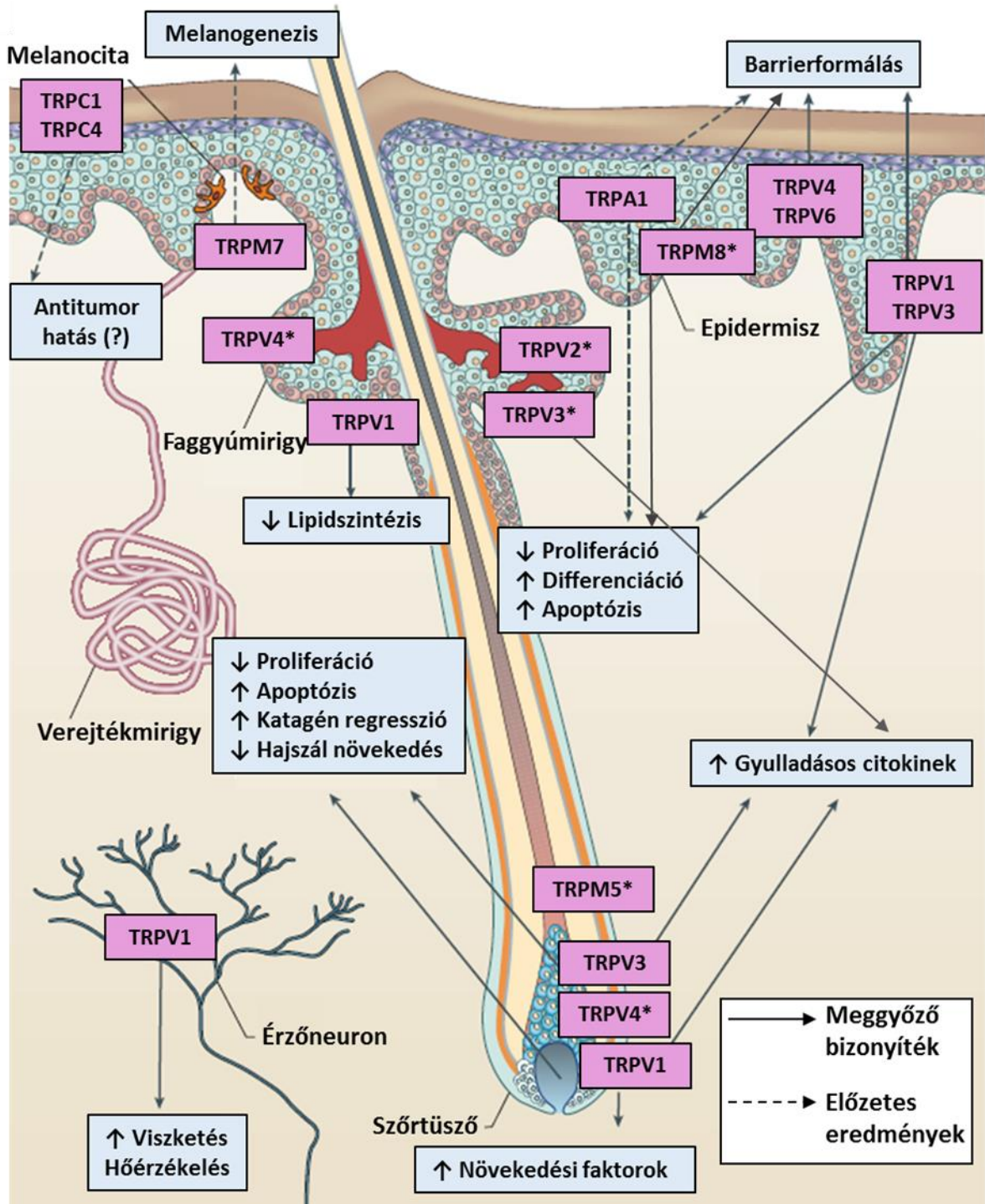
Az ízlelőbimbókon túl a TRPM5 kifejeződik a légzőrendszerben, a szaglórendszer kemoszenzoros sejtjein, az emésztőrendszerben,<sup>112</sup> megtalálható a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben is, ahol az inzulinszekréció egyik regulátora,<sup>114</sup> illetve a csatorna aktivitása a humán hajciklusra is hatással van (lásd később).<sup>115</sup>

A TRPM5 csatorna általánosan használt és általunk is alkalmazott modulátorai az antagonistá trifenilfoszfín-oxid (TPPO),<sup>116</sup> valamint az aktivátor 2-heptanon (Hept) és a 2,5-dimetilpirazin (DMP). Utóbbi kettő a hím egerek feromonjai közt is megtalálhatóak,<sup>117</sup> de élelmiszeradalékként és illatanyagként is használják őket: a Hept parfümök, illatosítók és

tisztítószerként felelhet például a gyümölcsös, banános illatért,<sup>118</sup> míg a DMP-t diós, csokoládés, kissé földes aromája miatt gyakran burgonyacsipszekben alkalmazzák.<sup>119</sup> A TPPO nagy mennyiségben keletkezik különböző vegyszerek, gyógyszerek, vitaminok ipari előállításánál, azonban további felhasználása korlátozott. Elsősorban vegyületek kristályosításához használják fel, de így is több ezer tonna kerül kidobásra vegyipari hulladékként.<sup>120, 121</sup> A TPPO kevés felhasználási lehetősége közül az egyik, hogy túlhevülés elleni bevonatként alkalmazzák különböző adathordozókban. Érdekesség, hogy ez az a vegyület, amit „kiszagolnak” az elektronikai eszközök felkutatására kiképzett speciális K9-es kutyák.<sup>122</sup>

### 2.2.2 *A TRP csatornák a humán bőrben*

A TRP csatornák a bőr és függelékeinek számos sejtípusában kifejeződnek, így a keratinocitákban, szebocitákban, melanocitákban, az érző neuronokban és a szőrtüszőkben is. Szerepük a bőrben összetett és szerteágazó, a csatornák hatással lehetnek többek között a keratinocita proliferációra és differenciációra, a barrierformálásra, a szebociták lipidtermelésére, gyulladáshoz vezető folyamatokra és a szőr növekedésére (**6. ábra**).



6. ábra

**TRP csatornák szerepe a bőrben (módosított ábra)<sup>123</sup>**

Az eredeti ábra kiegészítésre került (csillaggal jelölve): a TRPM5 és a TRPV4 expresszálódik szórtüszőkön,<sup>115,124</sup> a TRPV2,<sup>125</sup> a TRPV3<sup>126</sup> és a TRPV4<sup>125</sup> kifejeződik a faggyúmirigyeken, az epidermális TRPM8 szerepe pedig bizonyítást nyert.<sup>127</sup>

Rendellenes működésük krónikus fájdalmat, viszketést, sebgyógyulási zavarokat eredményezhet, vitiligo, alopecia, különböző dermatitiszek és daganatos megbetegedések,

valamint egyéb kórképek kialakulásához is vezethet,<sup>128</sup> így nem meglepő, hogy az elmúlt években a TRP csatornákra potenciális gyógyszercélpontokként tekintenek, számos kutatás vizsgálja őket hatás/mellékhatás szempontból.<sup>123,129,130</sup> Jelen értekezés kereti nem teszik lehetővé az összes bőrben kifejeződő TRP csatorna részletezését, rövid bemutatásuk diverz szerepük szemléltetését tűzte ki célul.

Jelenlegi tudásunk szerint az epidermális keratinocitákban a TRPV1,<sup>131</sup> a TRPV2,<sup>132</sup> a TRPV3,<sup>133</sup> a TRPV4,<sup>134</sup> a TRPV6,<sup>135</sup> a TRPC6,<sup>136</sup> a TRPA1,<sup>137</sup> a TRPM4<sup>138</sup> és a TRPM8 egyik izoformája<sup>139</sup> expresszálódik. A hámsejtek TRP csatornái közül a TRPV3 szerepe a leginkább részletezett a szakirodalomban, amihez talán az is hozzájárul, hogy az ioncsatorna családból ez volt az első, aminek a jelenlétét leírták a humán keratinocitákon.<sup>133</sup> A csatorna aktiválását követő  $Ca^{2+}$ -áram az epidermális növekedési faktor receptorhoz (EGFR) kapcsolódó szignalizáción keresztül befolyásolja a keratinociták terminális differenciációját.<sup>140</sup> Aktiválása emellett gátlóan hat a sejtek proliferációjára, sejthalált indukál, és NF- $\kappa$ B-függő módon serkenti különböző gyulladáscitokinek termelését.<sup>141</sup> Igazolást nyert az is, hogy a csatornának szerepe van az igen ritka Olmsted-szindróma kialakulásában, melyet hiperkeratózis, parakeratózis, haj-, illetve szőrvesztés és viszketés jellemez, valamint jellegzetes palmoplantáris keratoderma kíséri.<sup>142</sup> A TRPV3 ezen kívül még egyéb viszketéssel és gyulladással járó dermatózisok, mint például az atópiás dermatitisz kialakulásához is hozzájárul.<sup>143</sup>

Az epidermisz egy másik sejttípusában, a melanocitákban is számos TRP csatorna jelenik meg, melyek változatosan szabályozzák a sejtek működését, például a TRPV1 aktiválása a melaninszintézis csökkenését eredményezi,<sup>144</sup> míg a TRPA1 UV-sugárzás hatására fokozza azt,<sup>145</sup> TRPV4 aktivációja pedig nekrozist és apoptozist okoz.<sup>146</sup> A TRPM alcsalád több tagja is kifejeződik a melanocitákban; ilyenek a már többször említett melanóma prognosztikai és diagnosztikai marker TRPM1<sup>95</sup> mellett a TRPM2 és a TRPM8,

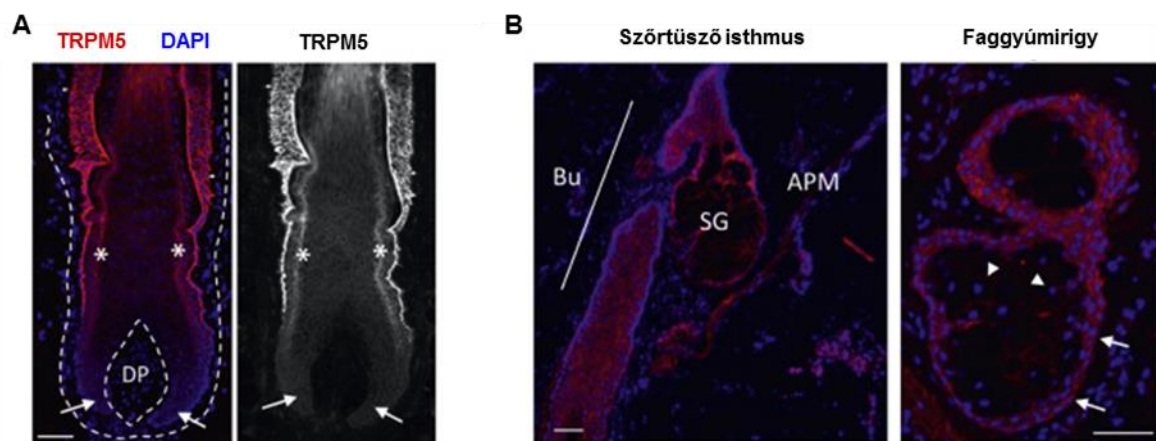
melyek aktivációja a melanociták apoptózisát indukálhatja melanómában, míg a TRPM7-nek protektív szerepet tulajdonítanak.<sup>147</sup>

Munkacsoportunk már korábban is foglalkozott a szebociták és a TRP csatornák kapcsolatának kutatásával. Ennek során a TRPV1,<sup>125,148-150</sup> a TRPV2,<sup>125</sup> a TRPV3<sup>126</sup> és a TRPV4<sup>125</sup> expresszióját sikerült igazolni, valamint kimutattuk, hogy a TRPA1 és a TRPM8 mRNS-szintű expressziója a detekciós küszöb alatti értéket mutat az SZ95 humán szebocitákon.<sup>125</sup> A kifejeződő TRP csatornák közül a TRPV2 funkcionális szerepe egyelőre ismeretlen, a TRPV1, a TRPV3 és a TRPV4 viszont a faggyúlipid-termelés negatív szabályozói.<sup>151</sup> a TRPV1 és a TRPV3 aktiválása mind a homeosztatikus, mind az arachidonsavval (AA) kiváltott, aknét modellező lipidszintézist képes csökkenteni.<sup>126,148</sup> Érdekes módon a TRPV4 esetében ez a hatás a bazális lipidtermelés estében nem érvényesül, de az aknét modellező kóros faggyúlipid-termelésre a másik két csatornához hasonlóan gátlóan hat, és csökkenti a szebociták proliferációját is.<sup>125</sup> A fentiekén túl a TRP csatornák a szebociták immunfenotípusára is hatással vannak. A TRPV1 aktivátor kapszaicin csökkenti az IL-1 $\beta$  felszabadulását,<sup>148</sup> míg a TRPV3 aktivátor karvakrol (részben TRPV3-független módon) több kulcsfontosságú gyulladáscitokin kifejeződését (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) és felszabadulását (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) is fokozta.<sup>126</sup>

TRP csatornák a piloszebáceus egység másik tagján, a szőrtüszőkön is kifejeződnek. Nem kis részben munkacsoportunk korábbi tagjainak erőfeszítései nyomán az elmúlt években fény derült arra, hogy a TRPV1,<sup>152</sup> a TRPV3<sup>153</sup> és a TRPV4<sup>124,154</sup> a szőrnövekedés fontos negatív szabályozói. A közelmúltban pedig kollaborátoraink tollából megjelent egy publikáció, mely eredményei megalapozták a jelen disszertációban is összegzett egyik kutatást: Mardaryev és munkatársai a TRPM5 szerepét vizsgálták a humán szőrtüszőkben.<sup>115</sup>

Kísérleteik során megállapították, hogy a TRPM5 kifejeződik a humán a szőrtüszőkön és homeosztatikus aktivitása szerepet játszik a hajciklus növekvő (anagén) fázisának

fenntartásában, mivel mind a csatorna siRNS-mediált csendesítése, mind a csatorna farmakológiai gátlása TPPO-val elősegítette a katagén fázisba történő korai átmenetet.<sup>115</sup> Ebből levonható az a következtetés, hogy a TRPM5 ígéretes terápiás célpont lehet a nemkívánt szőrnövekedéssel, illetve akaratlan szőrvesztéssel járó kórképek kezelése során. A publikációban közzétett immunfluoreszcens képek (7. *ábra*) alapján azt láthatjuk, hogy a faggyúmirigyek perifériás sejtjei is TRPM5-pozitivitást mutatnak, így felmerült, hogy a TRPM5-öt célzó terápiás beavatkozások során faggyúmirigyekhez kötődő mellékhatások is jelentkezhetnek, ezért a jelen értekezést megalapozó egyik közlemény alapjául szolgáló kísérleteinkben a TRPM5 kifejeződését és az elérhető TRPM5 modulátorok hatásait vizsgáltuk meg humán szőrcitákon.



**7. ábra**

***A TRPM5 expresszió látható a humán szőrtüszőkön, és a faggyúmirigyek perifériás sejtjei is TRPM5-pozitivitást mutatnak (módosított ábra)<sup>115</sup>***

**(A)** A szőrtüszőben immunfluoreszcens jelölést követően erős TRPM5-expresszió (piros) látható a külső gyökérhüvely területén (nyílhegyek), és gyengébb kifejeződés figyelhető meg a hajmátrixban (nyilak), illetve a belső gyökérhüvelyben (csillagok), míg a folliculáris mezenchimában (dermális papilla [DP] és kötőszöveti hüvely) nem észlelhető specifikus jel. **(B)** TRPM5 immunpozitivitás látható a szőrtüsző isthmusban és a faggyúmirigyben is. A faggyúmirigyek esetében a bazális sejtekben (nyílak) magasabb TRPM5 expresszió észlelhető, mint a differenciált sejtekben (nyílhegyek). **APM:** musculus arrector pili; **Bu:** „bulge” („dudor”) régió; **DP:** dermális papilla; **SG:** faggyúmirigy.

### 2.3 Az antidepresszáns fluoxetin (FX) bőrgyógyászati repozicionálása

A fluoxetin (FX) egy igen elterjedt szelektív szerotoninvisszavétel-gátló szer (SSRI), melyet 1988 óta alkalmaznak antidepresszáns gyógyszerként.<sup>155</sup> A major depressziós epizódok kezelése mellett indikációi között szerepel még az obszesszív-kompulzív zavar és a bulimia is,<sup>156</sup> azonban az évek alatt számos más jótékony hatására is fény derült, mely felveti más, a „megszokottól” eltérő területeken, akár a bőrgyógyászatban való alkalmazásának lehetőségét is. Egy gyógyszer repozicionálása nem egyedülálló dolog;<sup>157</sup> erre jó példa az egyre szélesebb körben ismertté váló minoxidil, melyet legtöbbször hajhullás elleni szerként ismernek, hiszen topikálisan alkalmazva igazoltan hatásos az androgén alopecia kezelésére, azonban eredetileg vérnyomáscsökkentőként jegyezték.<sup>157</sup>

A FX „nem konvencionális”, a dermatológiában is releváns hatásairól számos tanulmány jelent meg; ezek alapján a FX képes fokozni a melanintermelést,<sup>158</sup> a mikrodisszektált emberi szőrtüszők repigmentációját is elősegíti,<sup>159</sup> sőt, topikálisan alkalmazva a sebgyógyulásra is pozitív hatással van, melyet diabéteszes egereknél,<sup>160</sup> emberek esetében pedig fertőzött sebekenél<sup>161</sup> igazoltak. Ezeken túlmenően számos esetben bizonyítást nyert, hogy a FX gyulladáscsökkentő<sup>162-165</sup> és a viszketéscsillapító<sup>166,167</sup> hatást is képes kiváltani. Itt fontos megemlíteni, hogy ez utóbbi hatások valószínűleg függetlenek a klasszikus, szerotoninergerg útvonaltól; közvetítésükben leginkább az NLRP3 (NOD-, LRR- és pirin domént tartalmazó protein 3) inflammoszóma aktiváció,<sup>168</sup> az indukálható nitrogén-oxid-szintáz által kiváltott NO-felszabadulás és a ciklooxygenáz-2-mediált prosztaglandin E2 termelés valószínűleg glikogén-szintáz-kináz [GSK]-3 $\beta$ -függő gátlása,<sup>169</sup> illetve a PI3K útvonal modulálása játszhatnak közvetítő szerepet.<sup>170-173</sup>

A fentiek miatt munkacsoportunkat is foglalkoztatni kezdte a FX lehetséges bőrgyógyászati felhasználásának témaköre. Közelmúltban publikált kísérleteink során a FX a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációjának (14  $\mu$ M) a hatásait vizsgáltuk tenyésztett

humán epidermális keratinocitákon. Megállapítottuk, hogy ebben a koncentrációban a FX a PI3K-út vonal közvetett gátlásával jelentősen csökkenti a TLR3 aktivátor p(I:C) által indukált gyulladási reakciót és az endogén viszketésmédiátor endotelin felszabadulását.<sup>30</sup> Ismert, hogy a PI3K jelátvitel a gyulladási folyamatok szabályozása<sup>174,175</sup> mellett az epidermális keratinociták proliferációját is fokozza,<sup>176</sup> ami alapján felmerült annak a lehetősége, hogy a FX hosszabb távú alkalmazása során anti-proliferatív hatást fejthet ki a humán hámsejteken, és a proliferációs/differenciációs egyensúly megváltoztatásával hatással lehet a hámsejtérés folyamatára, valamint az epidermális barrier felépülésére is. Ezek a gondolatok további kísérletekre sarkalltak minket, melyek eredményeként végül megszületett a jelen disszertáció alapját képező második publikáció.

A FX mellékhatásprofilja viszonylag kedvezőnek mondható (az SSRI-k csoportjába tartozó szerek közül az egyik legnagyobb biztonsággal alkalmazható),<sup>177</sup> ezért a fentiek fényében egy már idézett tanulmány címét követve mi is feltettük a kérdést: „*Megtaníthatjuk a régi gyógyszereket új trükkökre?*”.<sup>157</sup> Jelen tudásunk alapján a válasz igen, a szakirodalmi adatok és eredményeink is arra utalnak, hogy érdemes további kutatásokat folytatni a FX terápiás felhasználásának más területekre való kiterjesztésének érdekében.

### 3. Célkitűzés

A fentiekben kifejtett saját és irodalmi adatok és korábbi eredményeink alapján a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Kifejeződik-e a TRPM5 funkcionálisan aktív formában a humán sebocitákon?
2. Milyen hatással vannak a TRPM5 modulátorok a humán sebociták biológiai folyamataira?
3. A FX ígéretes, gyulladáscsökkentő koncentrációja (14  $\mu\text{M}$ ) milyen hatással van a human epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára?

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 A kísérletek során használt kezelőanyagok

Munkánk során alkalmazott anyagokat az **1. táblázat** tartalmazza. Első lépésként a kezelőanyagokból ezerszeres töménységű törzsoldatot készítettünk a gyártó által javasolt oldószerben, ezt követően az elkészült oldatokat fénytől védve, -20 °C-on tároltunk.

#### 1. táblázat

##### A kísérleteink során alkalmazott kezelőanyagok összefoglalása

NÉV (RÖVIDÍTÉS)	LEÍRÁS	OLDÓSZER*	KAT. SZÁM; GYÁRTÓ
<b>2,5-dimetilpirazin (DMP)</b>	TRPM5 agonista	PBS	W327204; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<b>fluoxetin (FX)</b>	SSRI, antidepresszáns	DMSO	0927; Tocris Bioscience (Bristol, Egyesült Királyság)
<b>GSK1016790A</b>	TRPV4 agonista	DMSO	G0798; Sigma-Aldrich
<b>GSK690693</b>	Akt inhibitor	DMSO	4144; Tocris Bioscience
<b>2-heptanon (Hept)</b>	TRPM5 agonista	PBS	8187110100; Sigma-Aldrich
<b>J2</b>	HSP27 inhibitor	DMSO	HY-124653; MedChem (Sollentuna, Svédország)
<b>neflamapimod (Nefl)</b>	p38 MAPK inhibitor	DMSO	HY-10328; MedChem
<b>trifenilfoszfin-oxid (TPPO)</b>	TRPM5 antagonist	DMSO	T84603; Sigma-Aldrich
<b>tyrphostin AG 1478 (Tyr)</b>	EGFR antagonist	ETOH	T4182; Sigma-Aldrich
<b>AG1024</b>	IGF-1R antagonist	DMSO	HY-10253; MedChem

#### \*\*Oldószer:

- **PBS:** foszfátpufferelt sóoldat; 115 mM NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4 (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- **DMSO:** dimetil-szulfoxid (kat. szám: 34869; Sigma-Aldrich)
- **ETOH:** abszolút etanol (kat. szám: 1001901000; Scharlab Magyarország Kft., Debrecen, Magyarország)

A sejtek kezelésekor az ezerszeres hígítás közvetlenül a tápoldatban történt.

Kísérleteink során mindig „oldószer kontrollal” dolgoztunk, azaz a kontroll csoporthoz

hozzáadtuk az aktuálisan vizsgált anyag(ok) oldószerét is ezerszeres hígításban, ezzel kizárva az oldószerek esetleges aspecifikus hatásának lehetőségét.

## 4.2 Sejtkultúrák, sejtenyésztés

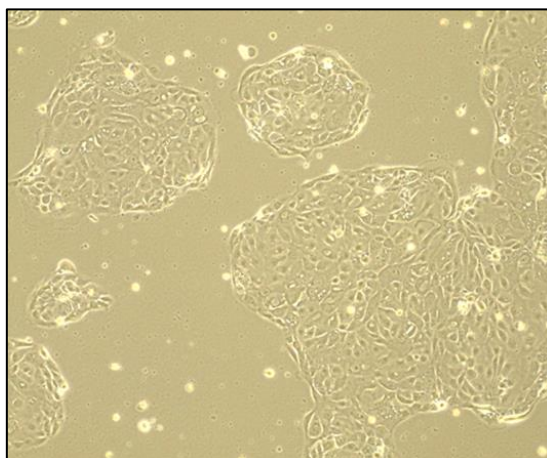
### 4.2.1 SZ95 humán immortalizált sebociták

A humán faggyúmirigysejtek vizsgálatában az egyik legszélesebb körben használt immortalizált sejtvonal az SZ95 (8. *ábra*), melyet Christos C. Zouboulis és munkatársai hoztak létre. Az általunk is alkalmazott SZ95 sejtek (*a felhasználását lehetővé tevő anyagátadási szerződés száma: SZ95-A 236-1*) egy 87 éves nő arcbőrének faggyúmirigyéből származnak, a transzfekeciót egy olyan PBR-322 alapú plazmival végezték, amely a Simian vírus (SV)-40 nagy T antigénjének kódoló régióját tartalmazta.<sup>66</sup>

Az SZ95 sebociták tenyésztése során a Sebomed Basal Medium<sup>®</sup> (kat. szám: F8205-500 ml; Merck KGaA, Darmstadt, Németország) tápoldatot használtuk, melyet az alábbiakkal egészítettünk ki: 10 V/V% hővel inaktivált magzati borjú szérum (FBS; kat. szám: 10500-064; Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA), 1 mM CaCl<sub>2</sub> (kat. szám: C7902; Sigma-Aldrich), 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktor (hrEGF; kat. szám: E9644; Sigma-Aldrich), 1,12 µg/ml amfotericin B (kat. szám: 15290018; Gibco) 1:500 arányú MycoZap<sup>™</sup> Plus-CL (kat. szám: VZA-2012; Lonza, Basel, Svájc). A sejteket 37 °C-os, pársított, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú inkubátorban tenyésztettük, kétnaponta tápoldatot cseréltünk rajtuk. A konfluencia-indukált differenciálódás megelőzésére a sebocitákat 60-70%-os konfluencia elérésénél passzáltuk.

A *Mycoplasma* fertőzés kizárásához a sejtkultúrákat MycoStrip<sup>™</sup> Mycoplasma Detection Kit (kat. szám: rep-mys-10; Invivogen, San Diego, Kalifornia, USA) felhasználásával ellenőriztük; az eredmény minden esetben negatív lett. *Az SZ95 sebociták*

tenyésztését Arany József, Nyitrai Tamara, Barotáné Kovács Mónika, Pető Orsolya, Tolvaj Beatrix és Ádám-Nagy Dorottya végezte.



**8. ábra**  
**SZ95 tenyészet (saját kép)**  
*100× nagyítás, fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel.*

#### 4.2.2 A HaCaT humán immortalizált epidermális keratinocita sejtvonat

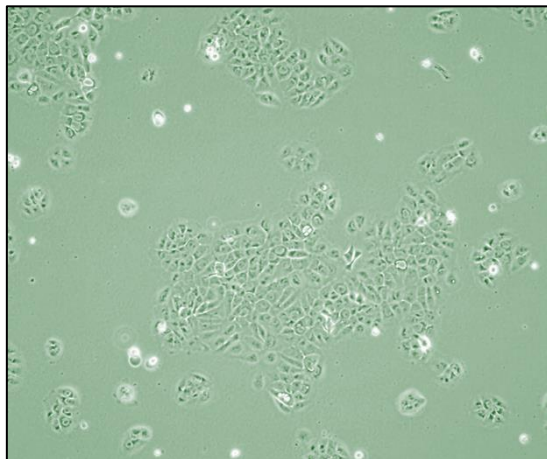
Kísérleteink során a bőrgyógyászati kutatásokban széles körben alkalmazott humán immortalizált epidermális keratinocita sejtvonalat, a HaCaT-ot használtuk (**9. ábra**). A HaCaT egy humán felnőtt bőrből származó, spontán transzformálódott aneuploid sejtvonat, mely megőrizte teljes epidermális differenciálódási képességét,<sup>178,179</sup> ráadásul a sejtek lipidösszetétele, melynek fontos szerepe van a barrierformálásban, szinte teljesen azonos a primer keratinocitákéhoz.<sup>180</sup>

A HaCaT keratinociták tenyésztése alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmú (végső  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció  $\approx 250 \mu\text{M}$ ) Dulbecco's Modified Eagle Medium-ban, azaz DMEM-ben (kat. szám: 21068028; Gibco, Thermo Fisher Scientific) történt. A tápoldatot az alábbiakkal egészítettük ki: 10 V/V% hőinaktivált FBS (kat. szám: 10500-064; Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1:500 arányú MycoZap™ Plus-CL (kat. szám: VZA-2012; Lonza) és 1:100 arányú L-glutamin (GlutaMAX™; kat. szám: 35050061; Gibco, Thermo Fisher Scientific). A sejteket 37 °C-

os, párasított, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú inkubátorban tenyésztettük, kétnaponta tápoldatot cseréltünk rajtuk, majd 70-80%-os konfluencia elérésénél passzáltuk.

Bizonyos kísérleteink során, mikor a sejtek elérték a 100%-os konfluenciát, a differenciáció indukálásához egy másik, magasabb Ca<sup>2+</sup>-tartalmú DMEM-et (kat. szám: 31966021; Gibco, Thermo Fisher Scientific) használtunk tápoldatként, melyhez 10 V/V% hőinaktivált FBS-t és 1:500 arányú MycoZap™ Plus-CL-t adtunk kiegészítésként. A médium végső Ca<sup>2+</sup> koncentrációja ebben az esetben ≈1.86 mM volt. A differenciációra gyakorolt hatások vizsgálatát célzó kísérleteinkben a kezelésekre a konfluencia elérése után, a differenciációt elősegítő tápoldatban került sor.

A *Mycoplasma* fertőzés kizárásához a sejt kultúrákat a már említett MycoStrip™ Mycoplasma Detection Kit (kat. szám: rep-mys-10; Invivogen) felhasználásával ellenőriztük; az eredmény minden esetben negatív lett. *A HaCaT keratinociták tenyésztését Volascsekné Dr. Tóth Kinga Fanni, Barotáné Kovács Mónika és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*



**9. ábra**  
**HaCaT tenyészet (saját kép)**  
*100× nagyítás, fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel.*

#### 4.2.3 *Primer normál humán epidermális keratinociták (NHEK)*

A primer humán epidermális keratinocitákat (NHEK) bőrgyógyászati szempontból egészséges felnőttek egyéb okból elvégzett sebészeti beavatkozása során eltávolított bőrdarabokból izoláltuk. A bőr eltávolítása előtt az önkéntes donorok megfelelő tájékoztatását követően írásos beleegyezésüket adták a minták kutatási célra történő felhasználásához. A kísérletekre a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és a Nemzeti Népegészségügyi Központ jóváhagyásával (azonosítók: 61566-5/2021/EÜIG, DE RKEB/IKEB 4988-2018), a Helsink Deklaráció irányelveinek betartása mellett került sor.

A bőrmintát az eltávolítást követően az izolálásig 4 °C-on, minimum 1 órán keresztül az úgynevezett „transzport médiumban” tároltuk: DMEM-et (kat. szám: 21068028; Gibco, Thermo Fisher Scientific) egészítettünk ki 1%-os Pen/Strep oldattal (a penicillin végső koncentrációja: 100 IU/ml; a sztreptomycin végső koncentrációja: 100 µg/ml; kat. szám: 15140122; Gibco, Thermo Fisher Scientific) és amfotericin B-vel (végkoncentráció: 0,5 µg/ml; kat. szám: 15290026; Gibco, Thermo Fisher Scientific). Az izolálás első napján a minták előkészítése és enzimatis emésztése zajlott, mely során a szubkután zsírszövetet eltávolítottuk, a mintákat feldaraboltuk kb. 6-10 mm-es darabokra, majd 0,25%-os tripszinbe (kat. szám: 27250018; Gibco - Thermo Fisher Scientific) helyezve inkubáltuk őket 20 órán keresztül 4 °C-on. Ezt követően csipesszel eltávolítottuk az epidermiszt, majd megkapartuk a minták felszínét, meglazítva ezzel a bazális réteg sejtjeit. Az enzimatis emésztést pár ml szérum vagy szérumot is tartalmazó tápoldat hozzáadásával állítottuk le, majd a proliferációt elősegítő Green's médium (300 ml DMEM [kat. szám: 31966021; Gibco, Thermo Fisher Scientific], 150 ml HAM's F12 Nutrient Mix [kat. szám: 21765037; Gibco, Thermo Fisher Scientific], 50 ml FBS [kat. szám: 10500-064; Gibco, Thermo Fisher Scientific], 5 ml Pen/Strep oldat [kat.szám:15140-122; Gibco, Thermo Fisher Scientific], 5 ml 4,86 mg/ml

adenin [kat. szám: A2786; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA], 0,5 ml 5 mg/ml inzulin [kat. szám: I9278; Sigma-Aldrich], 1 ml 0,2 mg/ml hidrokortizon [kat. szám: H0888; Sigma-Aldrich], 0,5 ml 1,36 µg/ml trijód-tironin [kat. szám: T2877; Sigma-Aldrich], 0,5 ml 10<sup>-7</sup> M koleratoxin [kat. szám: C8052; Sigma-Aldrich] és 10 µg/ml hEGF [kat. szám: E9644; Sigma-Aldrich]) segítségével összegyűjtöttük a lekapart epidermisz darabokat és keratinocitákat, majd erősen vortexeltük az oldatot. A sejtszuszpenziót 100 µm pórusméretű steril szűrő (kat. szám: 22363549; Gibco, Thermo Fisher Scientific) használatával elválasztottuk a törmeléktől, majd a szűrt szuszpenziót centrifugáltuk. Az így kapott sejtekhez friss Green's médiumot adtunk, majd arányosan szétosztva, kb. 50.000 sejt/ml denzitásban, T75-ös tenyésztőedényekbe helyeztük őket (0. passzázs). A tenyésztőedényeket 3 napig nem mozgattuk, majd a sejtek letapadását követően, jellemzően az izolálás utáni 5. napon, a tápoldatot EpiLife-ra (kat. szám: MEPI500CA; Gibco, Thermo Fisher Scientific) cseréltük, melyet antibiotikum nélküli HKGS kittel („Human Keratinocyte Growing Supplement”, azaz humán keratinociták növekedését segítő készítmény; kat. szám: S001K; Gibco, Thermo Fisher Scientific; a kit tartalma és azok végkoncentrációja a tápoldatban: 0,2 V/V % szarvasmarha hipofízis kivonat; 0,01 µg/ml humán rekombináns inzulinszerű növekedési faktor-1; 0,18 µg/ml hidrokortizon; 5 µg/ml szarvasmarha transferrin; 0,2 ng/ml hrEGF) egészítettünk ki. A differenciáció indukálásához magasabb Ca<sup>2+</sup>-tartalmú (1,8 mM) EpiLife-ot használtunk. A sejteket 37 °C-os, párasított, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú inkubátorban tenyésztettük, kétnaponta tápoldatot cseréltünk rajtuk, majd 60-70%-os konfluencia elérésénél passzáztuk. Mivel primer sejtekről van szó, kísérleteinkhez 4. passzázsszám alatti keratinocitákat használtunk. A donorokra vonatkozó adatok a **2. táblázatban** találhatóak. *A sejtek izolálását és tenyésztését Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

**2. táblázat**  
**Az NHEK donorok adatai**

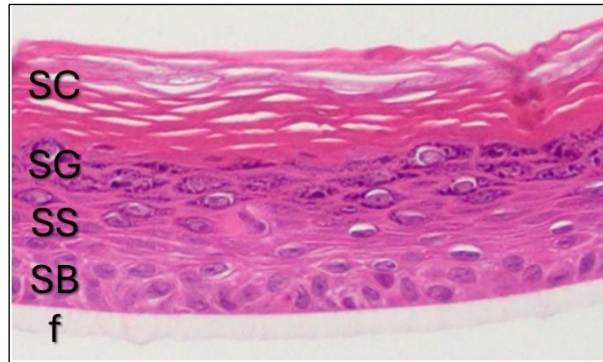
AZONOSÍTÓ	NEM	KOR (ÉV)	RÉGIÓ	PASSZÁZSSZÁM	SZÍNKÓD*
24-01	férfi	75	has	2	
24-02	férfi	ismeretlen	has	2	
24-06	férfi	69	has	2	

\*A színek jelölik az eredmény ábrákon az adott donorhoz tartozó adatpontokat.

### 4.3 Rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellben végzett kísérletek

Kísérleteink során egy „*in vivo-szerű*” modellt is alkalmaztunk, a 3D humán rekonstruált epidermisz-ekvivalenst, mely lehetővé teszi primer keratinociták felhasználásával egy háromdimenziós szerkezetű, a humán bőr epidermális rétegéhez nagymértékben hasonlító rendszer létrehozását, melyre az egyszerűség kedvéért leginkább „3D modellként” vagy „epidermisz-ekvivalensként” hivatkozunk.<sup>181,182</sup>

A humán keratinociták háromdimenziós levegő-folyadék határfelületen történő speciális tenyésztésével teljesen rétegződött epidermisz modell hozható létre, melyben megtalálhatóak a felhám főbb rétegei, a *stratum basale*, a *stratum spinosum*, a *stratum granulosum* és a *stratum corneum* (10. ábra). A sztratifikáció és a kornifikáció lehetővé teszi a differenciálódási folyamatok és az epidermális barrier funkcionális vizsgálatát és különböző bőrbetegségek modellezését.<sup>182</sup>



**10. ábra**

*A humán epidermisz-ekvivalens modell rétegei (saját kép)*

*Hematoxilin-eozin festés, 300× nagyítás (SC: stratum corneum; SG: stratum granulosum; SS: stratum spinosum; SB: stratum basale, f: a transzwell-filter).*

#### 4.3.1 A rekonstruált epidermisz-ekvivalens modell létrehozása

A 3D rekonstruált epidermális ekvivalensek létrehozásához szükséges bőrmintákat a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartása mellett Radboudumc (Radboud University Medical Center, Nijmegen, Hollandia) Bőrgyógyászati Tanszéke biztosította. Az anonimizált mintákból a primer keratinociták izolálását standardizált protokolljuk<sup>182,183</sup> alapján a Radboudumc prof. dr. Ellen van den Bogaard által vezetett „*Innovative Experimental and Translational Dermatology*” kutatócsoport munkatársai végezték.

A 3D modellhez használt primer keratinociták izolálásához a sejtek proliferációját segítő médiumot használtak, melynek összetevői a következők: 300 ml magas glükóz tartalmú DMEM (kat. szám: D6546; Sigma-Aldrich), 150 ml Ham's F12 és 50 ml FBS (kat. szám: SH30071.03; GE Healthcare Life Sciences), mely kiegészítésre került 4 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin-sztreptomycin, 24,3 µg/ml adenin, 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 1,36 ng/ml trijód-tironin és  $10^{-11}$  IU/ml koleratoxin hozzáadásával.

A bőrből 6 mm átmérőjű, teljes vastagságú darabokat vágtak ki biopsziás körkés segítségével, és a mintákat 4 órán keresztül, 4 °C-on antibiotikus/antimikotikus tápoldatba helyezték (a fent említett DMEM, kiegészítve 1:100 arányú gentamicinnel [kat. szám: G1397; Sigma-Aldrich] és egy másik, 1:1000 arányú antibiotikum/antimikotikum

tartalmú oldattal is [ez a keverék tartalmaz penicillint, sztreptomicint és amfotericin B-t; kat. szám: A5955; Sigma-Aldrich]). Ezt 0,25%-os tripszines emésztés követte egy éjszakán át, 4 °C-on, majd az enzimátikus reakciót FBS hozzáadásával állították le. A keratinociták kinyeréséhez a mintákról csipesszel lehúzták az epidermiszt, és megkaparták a biopsziák felszínét, majd a tápoldatban összegyűjtött szuszpenziót 100 µm pórusméretű sejtszűrővel szűrték és centrifugálást követően 50.000 sejt/cm<sup>2</sup> denzitásban „feeder” sejtekre szélesztették. „Feeder”, azaz sejtek letapadást segítő sejtréteggént γ-sugárzással kezelt 3T3-J2 sejteket alkalmaztak. Két nap elteltével, amikor a keratinociták letapadtak, a tápoldatot 10 ng/ml epidermális növekedési faktorról kiegészített növekedést segítő médiumra cserélték. A 95%-os konfluencia elérésekor a 0,25%-os tripszinnel történő enzimátikus emésztés során a 3T3-J2 sejtek eltávolításra kerültek, a visszamaradó keratinocitákat pedig 10% DMSO tartalmú tápoldatban lefagyasztva, -70 °C-on tárolták a felhasználásig.

A 3D modell tenyésztéséhez minden esetben 0 passzázsszámú primer keratinocitákat használtunk (3. táblázat).

### 3. táblázat

#### *A rekonstruált epidermisz-ekvivalensek létrehozásához használt primer keratinociták adatai*

AZONOSÍTÓ	NEM	KOR (ÉV)	RÉGIÓ	PASSZÁZSSZÁM	SZÍNKÓD*
KC-36	anonimizált adatok			0	
KC-37	anonimizált adatok			0	
KC-38	anonimizált adatok			0	

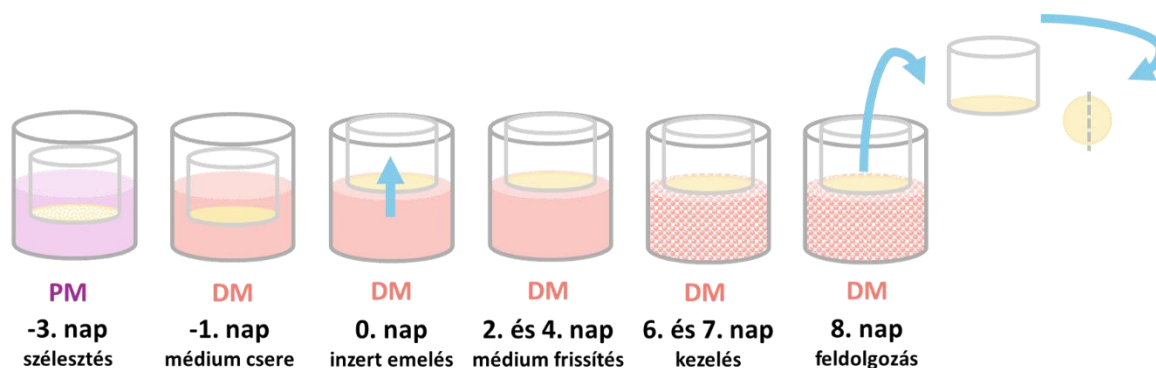
\*A színkódok jelölik az eredmény ábrákon az adott donorhoz tartozó adatpontokat.

A 3D modellek létrehozásához 0,4 µm pórusméretű inzer/24-well plate rendszert (kat. szám: 141002; Thermo Fisher Scientific) használtunk, melyek filter felületét előkezeltek patkányfark I-es típusú kollagénnel (kat. szám: C3867; Sigma-Aldrich). A kollagént 100 µg/ml koncentrációra hígítottuk hideg PBS-ben, majd 1 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk a

lemezeket. Ezt követően a felesleges oldatot óvatosan eltávolítottuk az inzertekből, és a felületet hideg PBS-sel mostuk.

A primer keratinocitákat 150.000 sejt/well sűrűségben szélesztettük az inzertek filterére „proliferációs médium” (CnT-Prime Epithelial Culture Medium; kat. szám: CnT-PR; CELLnTEC, Bern, Svájc), felhasználásával, és így tenyésztettük 2 napig (-3. és -2. nap), ez idő alatt konfluens keratinocita monoréteg alakult ki. A -1. napon a tápoldatot „differenciációs médiumra” cseréltük (60% CnT-Prime 3D Barrier Culture Medium, [kat. szám: CnT-PR-3D; CELLnTEC] kiegészítve 40% DMEM-mel, [kat. szám: D6546; Gibco, Thermo Scientific]).

A 0. napon az inzerteket levegő-folyadék határfelületre emeltük, és a sejtek felszínéről eltávolítottuk a tápoldatot, elősegítve ezzel a differenciáció és az epidermisz rétegződésének folyamatát. A sejteket ezután a folyamat végéig (8. nap) differenciációs tápoldatban tenyésztettük, és a médiumot minden második nap frissre cseréltük. A szükséges kezelések a 6. és 7. napon történtek. A folyamatot az átláthatóság érdekében a **11. ábra** foglalja össze. *A 3D rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellek létrehozását és feldolgozását Ádám-Nagy Dorottya végezte dr. Hanna Niehues és prof. dr. Ellen van den Bogaard felügyeletével. A kísérletekre prof. dr. Ellen van den Bogaard laboratóriumában került sor.*

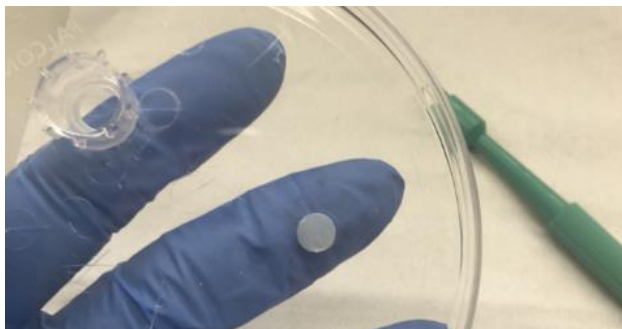


### 11. ábra

*A rekonstruált epidermisz-ekvivalens modell létrehozásának lépései (saját ábra)  
(PM: proliferációs médium; DM: differenciációs médium).*

#### 4.3.2 Mintaelőkészítés

A tápoldatból eltávolított inzertek közepéből 6 mm-es biopsziás körkés segítségével mintákat (a filter réteggel együtt) metszettünk (12. ), melyeket ezt követően szikével elfeleztünk a további felhasználáshoz.



**12. ábra**  
*A rekonstruált epidermisz-ekvivalens modell mintaelőkészítés első lépése, az eltávolított inzertekből kivágott 6 mm-es biopszia (saját felvétel).*

A felezett mintákat 4%-os pufferelt formalinba (kat. szám.: 9713.5000; VWR Chemicals) helyeztük a fixáláshoz, dehidráltuk, paraffináltuk majd paraffinba (kat. szám: LEIC8889502004; Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) ágyasztuk. A beágyazást megelőző szövettelőkészítési protokoll lépéseit a **4. táblázat** foglalja össze. A paraffinos blokkokból később 6 µm-es metszeteket készítettünk a további vizsgálatokhoz.

**4. táblázat**  
*A szövettelőkészítés lépései humán epidermisz-ekvivalens modell esetében*

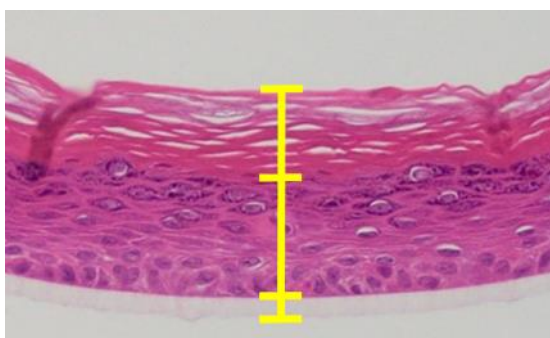
LÉPÉS	HASZNÁLT ANYAG	IDŐTARTAM
1.	4% pufferelt formalin	1 óra
2.	70%-os etanol	1 óra
3.	80%-os etanol	1 óra
4.	90%-os etanol	1 óra
5.	96%-os etanol	1 óra
6.	abszolút etanol	1 óra
7.	abszolút etanol	1 óra
8.	Neo-Clear*	1 óra
9.	Neo-Clear*	1 óra
10.	Neo-Clear*	1 óra
11.	Paraffin	1 óra
12.	Paraffin	1 óra
13.	Paraffin**	1 óra

\*A Neo-Clear™ (kat. szám: 109843; Sigma-Aldrich) és alternatívái a szövettani rutinban használt xilol helyettesítésére szolgálnak; kevésbé párolog és kevésbé ártalmas.

\*\*Beágyazásig a mintákat az utolsó paraffinban tároltuk.

### 4.3.3 Hematoxilin-eozin (HE) festés

A paraffinos metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk: háromszor 5 percig inkubáltuk a mintákat xilol helyettesítőben, majd a leszálló alkoholsor következett, melyet desztillált vízzel zártunk, ezeket szintén 5-5 percig alkalmaztuk. A sejtmagok megjelenítésére a metszeteket 5 percre Mayer-féle hematoxilinbe (kat. szám: MHS16; Sigma-Aldrich) helyeztük, a kékes-lilás színt 5-10 perces csapvizes mosással értük el. Desztillált vizes öblítést követően a lemezeket eozinba (kat. szám: HT110216; Sigma-Aldrich) merítettük, ezzel a citoplazmát rózsaszínre festve, végül a folyamatot desztillált vizes mosással, majd víztelenítéssel zártuk, és glicerin-zselatinnal (kat. szám: GG1; Sigma-Aldrich) lefedtük a metszeteket. A metszetek fotózása Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokió, Japán) fénymikroszkóppal történt.



**13. ábra**

***A HE festett metszeteken végzett rétegvastagág-mérés (saját ábra)***

*Az epidermisz-ekvivalens modellek 6  $\mu\text{m}$ -es paraffinos metszetein HE festést végeztünk, 300 $\times$  eredeti nagyítású felvételeken lemértük 5 véletlenszerűen választott területen az összes réteg vastagságát és az élő sejtes rétegeket, a stratum corneum vastagságát az összes réteg és az élő sejtes rétegek vastagsága közötti különbségként számoltuk ki, minden adatot a transzwell-filter vastagságára normalizálva adtuk meg.*

Az összes réteg vastagságát és az élő sejtes rétegek (*stratum basale*, *stratum spinosum* és *stratum granulosum*) vastagságát az *ImageJ 1.51j8* szoftver (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével lemértük 5 véletlenszerűen választott területen, míg a *stratum corneum* vastagságát az összes réteg és az élő sejtes rétegek vastagsága közötti

különbséggként számoltuk ki (**13. ábra**). Minden mérést 300×-os eredeti nagyítással készült képek felhasználásával végeztünk, minden adatot a transzwell-filterek vastagságára normalizáltunk. *A HE festést és a képanalízist Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

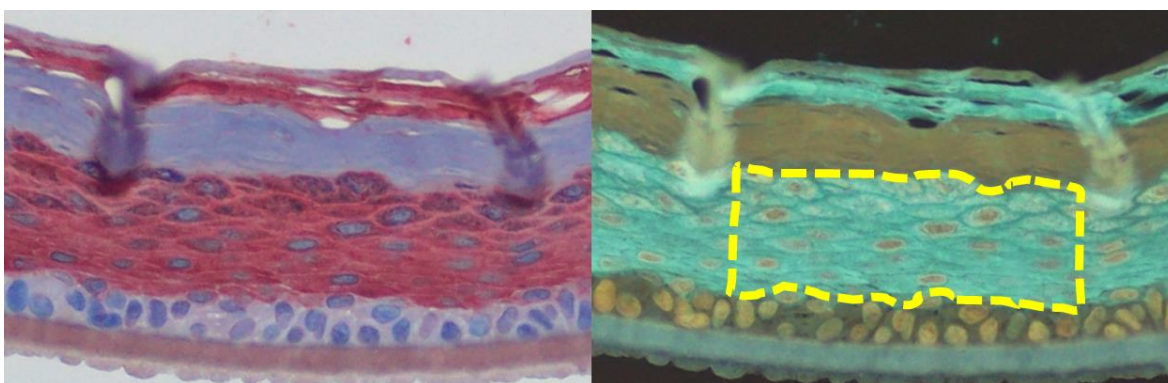
#### 4.3.4 Keratin 1 (K1) és keratin 10 (K10) jelölés

Első lépésként a paraffinos metszeteket deparaffináltuk és a HE festésénél leírtakkal azonos módon rehidráltuk, majd a hő-indukált antigénfeltárás következett, mely során mikrohullámú sütőben a metszeteket citrát pufferbe (10 mM, pH 6; kat. szám: C9999; Sigma-Aldrich) helyezve 750 W-on 10 percig melegítettük, figyelve arra, hogy a puffer ne forrjon fel. A metszeteket a pufferben hagytuk kihűlni, majd háromszor 5 percig PBS-ben mostuk őket. Ezt követően a lemezeket 15 percre 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oldatba (kat. szám: 23619,264; VWR International; PBS-ben hígítva) tettük, hogy blokkoljuk az endogén peroxidáz enzim aktivitását. Ezt ismét háromszor 5 perces PBS-es mosás követte, majd normál kecske szérummal blokkolást végeztünk (5% szérum, PBS-ben hígítva; kat. szám: B11-035; PAA Laboratories, Cölbe, Németország) 15 percig szobahőmérsékleten.

A metszeteket elsődleges antitesttel inkubáltuk: a K1-antitestet (egér monoklonális antitest; kat. szám: NB100-2756; Novus Biologicals, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) 1:200 arányban, míg a K10-antitestet (tengerimalac poliklonális antitest; kat. szám: GP-K10; Progen Biotechnik, Heidelberg, Németország) 1:100 arányban alkalmaztuk, az antitesteket (elsődlegeseket és későbbiekben a másodlagosokat is) minden esetben 1% szarvasmarha szérumalbumint (BSA; kat. szám: PM-T1725; BioSera, Cholet, Franciaország) tartalmazó PBS-ben hígítottuk. Az inkubáció 4 °C-on történt egy éjszakán keresztül. A következő napon a lemezeket ismét háromszor 5 percig PBS-ben mostuk. A K1-antitesttel kezelt mintákat 1:200 hígítású, biotin-konjugált másodlagos antitesttel (kecskében egér immunglobulin Fc szegmens ellen termeltetett; kat. szám: E0433; Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA)

inkubáltuk 60 percig szobahőmérsékleten, majd a HRP-konjugációhoz az ABC-módszert használtuk, mely során, avidin/biotin alapú peroxidáz reagenst (Vectastain Elite ABC-HRP Kit, kat. szám: PK-6100; Vector Laboratories, Newark, CA, USA) alkalmaztunk a gyártó leírásának megfelelően. A K10 jelölt mintákat 1:100 arányban hígított HRP-konjugált másodlagos antitesttel (kecskében tengerimalac immunglobulin Fc szegmens ellen termeltetett; kat. szám: sc-2903; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA) 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A peroxidáz aktivitást a K1 és K10 metszetek esetében is 3-amino-9-etil karbazol (AEC) kromogén (AEC Staining Kit; kat. szám: AEC101; Sigma-Aldrich) segítségével mutattuk ki a gyártói protokollt követve. A metszeteket háromszor 5 percig PBS-ben mostuk, majd végezetül a sejtmagokat Mayer-féle hematoxilinnel festettük. A metszetek fotózása Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokió, Japán) fénymikroszkóppal történt.



**14. ábra**

***A K1- és K10-jelölt minták szemikvantitatív immunhisztomorfometriai elemzése (saját ábra)***

*Az epidermisz-ekvivalens modellek 6  $\mu$ m-es paraffinos metszetein K1 és K10-jelölést végeztünk. A 300 $\times$  eredeti nagytású felvételeken a képek inverzióját követően minden látómezőben megmértük a relatív pixelintenzitást az epidermisz összes élő szuprabazális rétegére kiterjedő területen.*

A K1 és K10 expressziójának szemikvantitatív immunhisztomorfometriai elemzése az eredeti 300 $\times$  nagytású képeken zajlott *ImageJ 1.51j8* (NIH) szoftver segítségével. A képek inverzióját követően minden látómezőben megmértük a relatív pixelintenzitást az

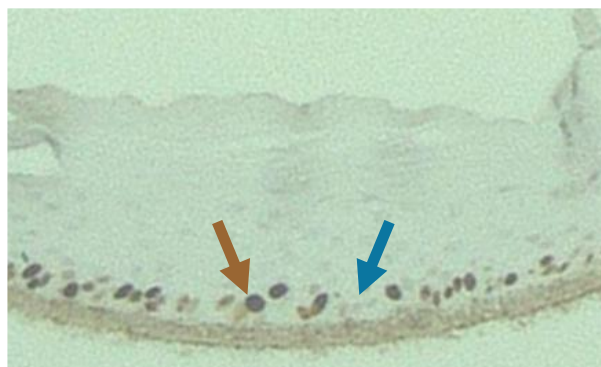
epidermisz összes élő szuprabazális rétegeire kiterjedő területen (**14. ábra**). A K1 és K10 jelölést Ádám-Nagy Dorottya, a kiértékelést dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.

#### 4.3.5 Ki-67 jelölés

Deparaffinálást, rehidrációt és desztillált vizes öblítést követően a metszeteket 2 percig antigénfeltárásnak vetettük alá, ami kukta felhasználásával, túlnyomáson történt citrát pufferben (11 mM, pH 6). Ezt ismét desztillált vizes öblítés követte, majd az endogén peroxidáz aktivitás blokkolásával folytatódott a folyamat, mely 3%-os hidrogén-peroxid oldatban történ 10 percig, szobahőmérsékleten. Újabb desztillált vizes öblítés következett, majd tris alapú mosópufferrel mostuk a metszeteket 5 percig (TBS, „Tris Buffered Saline”; 50 mM Tris [kat. szám: T1378; Sigma-Aldrich], 150 mM NaCl [kat. szám: 27800.291; VWR International]; pH 7,4). Ezt követően Ki-67 elsődleges antitesttel (egér monoklonális antitest, klón: MIB-1; kat. szám: M7240; Dako, Agilent) 30 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk a lemezeket. Az antitestet 1:150 arányban alkalmaztuk, a hígítás 1%-os BSA (kat. szám: PM-T1725; BioSera) tartalmú TBS-ben történt.

A primer antitest inkubációt háromszor 3 perces TBS pufferes öblítés követte. A másodlagos antitest kit (EnVision FLEX Mini Kit; kat. szám: K8023, Dako, Agilent) formájában állt a rendelkezésünkre, mely kecskében egér, valamint nyúl immunglobulin Fc szegmens ellen termeltetett és HRP-vel konjugált polimer alapú detektáló reagenst tartalmazott. Ezzel a reagenssel a mintákat 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk, melyet ismét háromszor 3 perces TBS pufferes öblítés követett, ezzel eltávolítva a be nem kötődött antitesteket. Az antitest kötés vizualizálásához 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogént alkalmaztuk 7 percig, ami szintén az előbb említett kit része. A DAB a HRP-vel katalitikus reakcióba lépve barna színű festődést ad a Ki-67+ sejtmagoknak. A reakció sikerességét mikroszkóp alatt ellenőriztük, a folyamatot desztillált vizes mosással

állítottuk le. Utolsó lépésként hematoxilinnel magfestést végeztünk. A metszetek fotózása Keyence VHX-970F (Keyence Corporation, Oszaka, Japán) digitális mikroszkóppal történt.



**15. ábra**

**Ki67 festés rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellen (saját felvétel)**

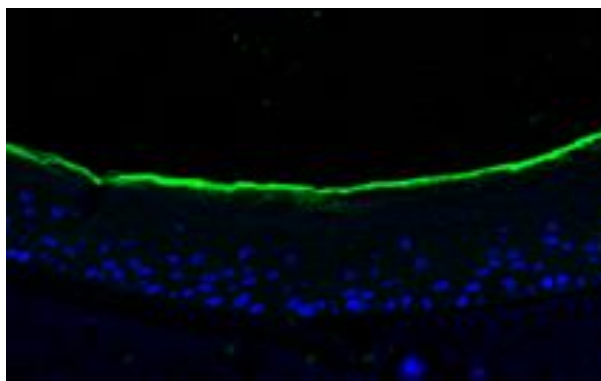
Ki-67 jelölés, reprezentatív ábra. 300×-os eredeti nagyítás; a kiértékelés során a bazális réteg minden sejtjét megszámoltuk. **Barna nyíl:** tipikus Ki-67+ sejtmag. **Kék nyíl:** tipikus Ki-67- sejtmag.

A kiértékelés során a bazális rétegben lévő összes sejtmagot megszámoltuk *ImageJ 1.51j8* szoftver (NIH) segítségével (**15. ábra**), majd ezt követően kiszámítottuk a Ki-67+ sejtmagok arányát. A Ki-67 jelölést dr. Pór Ágnes, a kiértékelést dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.

#### 4.3.6 Lucifer Yellow festékpentrációs assay

Rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellen a barrierformálás és a *tight junction*-ök épségének vizsgálatára Lucifer Yellow (LY) alapú festékpentrációs assay-t, úgynevezett „*outside-in*”,<sup>184</sup> azaz „kintről befelé” technikát alkalmaztunk (**16. ábra**).

A LY egy hidrofil vegyület, mely topikálisan alkalmazva ép barrier esetén a *stratum corneumon* nem tud áthatolni, azonban a sérült fizikai védvonalon keresztül képes a bőr mélyebb rétegibe is bejutni, a festék fluoreszcens tulajdonságának köszönhetően így vizualizálhatjuk, hogy egy kísérlet során alkalmazott kezelések milyen hatással vannak az epidermális barrierre.<sup>184–186</sup>



**16. ábra**

***Lucifer Yellow festékpentrációs assay rekonstruált epidermisz-ekvivalens modellen (saját felvétel)***

*Lucifer Yellow (LY) jelölés, reprezentatív ábra. 300×-os eredeti nagyítás; a LY: **zölddel**, a DAPI-val jelölt sejtmagok **kékkel** megjelenítve.*

A 3D modellek LY-jelölése az utolsó, 8. napon történt, a minták begyűjtése előtt. Egy steril üvegcilindert helyeztünk az inzerterekbe a sejtréteg felszínére, ebbe pipettáztuk bele a 25 µl 1 mM-os vízben hígított LY-t (kat. szám: L0259; Sigma-Aldrich), majd ügyelve a fényvédelemre, 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk a tenyészeteket.

A LY oldat és a cilinderek eltávolítását követően a mintákat a korábbiakhoz hasonlóan paraffinba ágyasztuk. A vizsgálat során 6 µm-es paraffinos metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk, a sejtmagokat 2 percig alkalmazott 1 µg/ml koncentrációjú DAPI-val jelöltük (4',6-diamidino-2-fenilindol; kat. szám: MBD0015-5ML; Sigma-Aldrich). A lemezeket végül PBS-ben mostuk háromszor 5 percig, a fedéshez pedig fluoreszcens vizsgálatokkal kompatibilis Fluoromount médiummal fedtük le (kat. szám: F4680-25ML; Sigma-Aldrich).

A fluoreszcensen jelölt metszetek vizualizálásához konfokális mikroszkópot (Zeiss LSM 880 Airyscan; Zeiss, Oberkochen, Németország) és a hozzá tartozó *Zen 3.5 Blue* szoftvert használtuk. Az excitációs hullámhossz a LY esetében 488 nm, a DAPI esetében 405 nm volt, míg az emisszióhoz a választott filter a LY-nál 479-663 nm, a DAPI-nál 410-469 nm volt. *A LY jelölést Ádám-Nagy Dorottya végezte, a képeket dr. Szabó László készítette.*

#### 4.4 RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A sejteket génexpressziós vizsgálatához minden esetben 500.000 sejt/35 mm-es Petri csésze denzitásban szélesztettük. Az adott kísérlethez szükséges kezelést követően, illetve a megfelelő kezelési idő leteltével a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket 500 µl TRIzol reagensben (kat. szám: AM9738; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) gyűjtöttük össze, a mintákat pedig felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A teljes RNS kivonásához a TRIzol-os sejtekhez először kloroformot (kat. szám: 372978-11; Sigma-Aldrich) adtunk, erősen vortexeltük, majd 13.000/perc fordulatszámon, 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk őket, különválasztva ezzel az RNS-t tartalmazó vizes fázist. Az RNS extrakcióhoz a felső, vizes fázist átmértük egy tiszta csőbe és izopropanollal (kat. szám: I9516-500ml; Sigma-Aldrich) egészítettük ki. Centrifugálás (10 perc, 13.000/perc fordulatszám, 4 °C) előtt ismét erősen vortexeltük, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 percig. A kapott pelletről először eltávolítottuk az izopropanolt, majd 75%-os etanollal (kat. szám: 20821296; VWR) mostuk és ismét centrifugáltuk (10 perc, 13.000/perc fordulatszám, 4 °C) a mintákat. Az izolált RNS-t ezután szárítottuk, majd 20 µl nukleáz mentes vízben (kat. szám: 1039480; Qiagen, Hilden, Németország) feloldottuk, és -80 °C-on tároltuk a következő lépésig.

A cDNS-sé történő átírást az RNS minták koncentrációjának és tisztaságának ellenőrzése előzte meg, amihez NanoDrop-1000 spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A reverz transzkripcióhoz előre meghatározott, egységes koncentrációra hígítottuk az RNS mintákat, majd a gyártó protokollja alapján DNáz kezelést (DNase I, Amplification Grade; kat. szám: 18068015; Invitrogen) alkalmaztunk a genomi DNS szennyezés eliminálására. A reakcióelegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 50 mM EDTA (kat. szám: 324503; Merck Millipore, Burlington, MA, USA) hozzáadását követően 75 °C-on tartottuk őket további 10 percig. A folyamat utolsó szakaszában High

Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor-t (kat. szám: 4374967; Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) használva a gyártói protokollnak megfelelően a mintáinkat az alábbiakkal egészítettük ki: 10× RT puffer, dNTP mix, 10× random primer, reverz transzkriptáz, RNáz inhibitor és nukleáz mentes víz. Az elegyet ismét inkubáltuk: 25 °C-on 10 percig; 37 °C-on 120 percig, majd 85 °C-on 5 percig, így végül kísérletenként egységes koncentrációjú RNS-ből kiindulva 20 µl végtérfogatú cDNS-t kaptunk.

Az mRNS-szintű expressziót valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) 5' TaqMan™ Gene Expression Assay-k (kat. szám: 4331182; Applied Biosystems) és a TaqMan™ Gene Expression Master Mix (kat. szám: 4369016; Applied Biosystems) használatával a gyártói protokollt követve vizsgáltuk, a detektáláshoz Roche LightCycler 480 System (Roche, Basel, Svájc) készüléket használtunk. A kísérleteink során használt TaqMan assay-k azonosítóit a **5. táblázat** foglalja össze.

### 5. táblázat

#### Az RT-qPCR vizsgálatok során alkalmazott TaqMan-assay-k

RÖVIDÍTÉS	NÉV	KÓD
ABCA1	ATP-kötő kazetta transzporter 1	Hs01059101_m1
DGAT2	diacilglicerín O-aciltranszferáz 2	Hs01045913_m1
IL-1 $\alpha$	interleukin-1 $\alpha$	Hs00174092_m1
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$	Hs00174097_m1
IL-6	interleukin-6	Hs00985639_m1
IL-8/CXCL8	interleukin-8	Hs00174103_m1
K1	keratin 1	Hs00196158_m1
K10	keratin 10	Hs00166289_m1
OCLN	okkludin	Hs00170162_m1
PPIA	peptidil-prolil izomeráz A (ciklofillin A)	Hs99999904_m1
RNA 45S5	18S riboszomális RNS	Hs03928985_g1
TRPM5	tranziens receptorpotenciálú melaszatin 5	Hs00175822_m1
TRPM5	tranziens receptorpotenciálú melaszatin 5	Hs05060590_s1

A mintákat három technikai ismétléssel vittük fel a 384 lyukú lemezekre (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white, Roche, Bazel, Svájc). Belső kontrollként a ciklofillin A (peptidil-prolil izomeráz A, PPIA) vagy a 18S riboszomális RNS (RNS 45S)

génexpresszióját határoztuk meg. Az egyes gének relatív expresszióját a  $\Delta$ CT módszert alkalmazva ezen háztartási gének génexpressziójának értékeire normalizálva vagy esetenként a  $\Delta\Delta$ CT módszert követve, előbb a háztartási gén, majd a kontrollcsoport relatív expressziójára normalizálva, átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. *Az RT-qPCR-hoz kapcsolódó kísérleteket Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### *4.5 Szelektív géncsendesítés kis interferáló RNS segítségével (siRNS transzfekeció)*

A szelektív géncsendesítéshez az SZ95 sebecitákat 5 darab, 150 mm átmérőjű Petri-csészében tenyésztettük, majd a következő napon tápoldatukat szérummentes Opti-MEM<sup>®</sup> médiumra (kat. szám: 31985-070; Gibco, Thermo Fisher Scientific) cseréltük, és ebben végeztük az siRNS transzfekeciót Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX transzfekeciós reagens (kat. szám: 13778150; Thermo Fisher Scientific) segítségével. Három tenyészetet külön, eltérő humán TRPM5-öt vagy EGFR-t célzó siRNS oligonukleotiddal transzfekektáltunk (Stealth RNAi, a TRPM5 konstruktok azonosítói: HSS120989, HSS120990 és HSS179077, az EGFR konstruktok azonosítói: HSS103114, HSS103116, HSS176346; kat. szám: 1299001; Thermo Fisher Scientific) a megfelelő gén kifejeződésének szelektív csökkentésére. Az EGFR esetében a konstruktok hatékonyságát, illetve a géncsendesítés dinamikáját egy előkísérlet során ellenőrizve azt tapasztaltuk, hogy a fent felsorolt három konstruktk közül a HSS103116 azonosítójú bizonyult a leghatékonyabbnak, az EGFR expresszió pedig a transzfekeciót követő 4. napon volt legalacsonyabb, így további kísérleteink során ezt a konstruktkot használtuk, kísérleteinket pedig a transzfekeciót követ 4. napon kezdtük. A transzfekeció sikerességének ellenőrzéséhez duplaszálú, közepes GC arányú siRNS konstruktktal (Stealth RNAi Negative Control Med GC; kat. szám: 12935300; Invitrogen) kezelt, úgynevezett „scrambled” kontroll (SCR) tenyészeteket is készítettünk.

A géncsendesítés Opti-MEM<sup>®</sup> médiumban hígított, 1:200 arányú Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX-ot és 40 nM koncentrációjú specifikus kis interferáló RNS-t vagy SCR negatív kontroll oldatot tartalmazó közegben történt, melyben a sejteket 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A kísérlet során készítettünk egy teljesen kezeletlen, nem transzfektált tenyészetet is, melyet üres Opti-MEM<sup>®</sup>-ben inkubáltunk. Ezt követően a szebocitákat passzáltuk, mely során az oldatot a tenyésztéshez is használt Sebomedre cseréltük. A csendesítés hatékonyságát fehérjeszinten, western blottal ellenőriztük. *A szelektív géncsendesítést Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.6 Western blot

A fehérjeminták előállításához a szebocitákat 10 ml tápoldatban, 100 mm-es Petri-csészékben tenyésztettük. A kísérleteinkhez prekonfluens, azaz aktívan proliferáló és posztkonfluens, azaz spontán differenciálódott kultúrákat alkalmaztunk; a kiindulási sejtszám tenyésztőedényenként minden esetben 1.000.000 sejt volt. A prekonfluens mintákat a szélesztés utáni napon, a posztkonfluenseket a megfelelő állapot elérésekor arattuk le (hideg PBS-ben történő mosást követően) 60 µl proteáz inhibitor koktéll (1:100 hígításban; kat. szám: P8340-5 ml; Sigma-Aldrich) és PhosSTOP<sup>™</sup> (1 tableta/10 ml; [kat. szám: 4906837001; Roche, Basel, Svájc]) tartalmú lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; [kat. szám: No. 28811.285; VWR International], 150 mM NaCl [kat. szám: 27800.291; VWR International], 1 (V/V)% Triton<sup>™</sup> X-100 [kat. szám: X100-500ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA], 1 (V/V)% IGEPAL<sup>®</sup> CA-630 [kat. szám: No. I3021-50ML; Sigma-Aldrich], nátrium-deoxikolát [500 mg 100 ml-ben; kat. szám: I3021-50ML; Sigma-Aldrich] ioncserélt vízben). A mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk, majd kiolvasztást követően a feldolgozás első lépéseként ultrahangos feltárást végeztünk rajtuk. A szonikálást követően a proteinmeghatározáshoz módosított BCA (azaz bicinkoninsav alapú) tesztet alkalmaztunk

(Pierce™ BCA Protein Assay Kit; kat. szám: 1859078; Pierce, Rockford, IL, USA), majd minták fehérjetartalmát 1 µg/µl-re állítottuk be ioncserélt víz és nátrium-dodecil-szulfát (SDS) alapú mintapuffer (10 V/V% glicerin [kat. szám: G9012, Sigma-Aldrich], 2 V/V% SDS [kat. szám: L3777; Sigma-Aldrich], 62 mM Tris [kat. szám: T1378; Sigma-Aldrich], 20 mM ditiotritol [kat. szám: D9779; Sigma-Aldrich], 0,002 V/V% brómfenolkék [kat. szám: 1081220005; Merck] és 5 V/V% β-merkaptotanol [kat. szám: 444203, Millipore, Merck]) hozzáadásával, és 10 percig forraltuk őket 100 °C-on. Későbbi felhasználás esetén a fehérjéket -20 °C-on tároltuk.

A fehérjék szétválasztásához poliakrilamid gélelektroforézist használtunk, ami során 10%-os Mini-Protean® TGX™ előregyártott fehérje gélre (kat. szám: 4561033; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) vagy 4-15%-os Mini-Protean® TGX™ előregyártott fehérje gélre (kat. szám: 4561084; Bio-Rad) sávonként azonos mennyiségű (20 µg) mintát vittünk fel. A gélekben lévő mintákat ezt követően nitrocellulóz membránra (Trans-Blot Turbo Midi 0,2 µm Nitrocellulose Transfer Pack; kat. szám: 1704159; Bio-Rad) transzferáltuk Trans-Blot Turbo™ System (Bio-Rad) segítségével 18 percen keresztül, 2,5 A áramerősséget és 25 V feszültséget alkalmazva. A transzferálás sikerességéről kékfestéssel győződünk meg. A géleket a festő oldatban (Imperial Protein Stain; kat. szám: 24615; Thermo Fisher Scientific) 1 órán keresztül rázatva inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd desztillált vízzel öblítettük, a folyamat végére a gélben esetlegesen visszamaradt fehérjéket a festék kékre színezte.

A membránokat blokkolást követően (2,5% tejpor és 2,5% BSA [kat. szám: PM-T1725; BioSera, Cholet, Franciaország] tartalmú TBST-ben rázatva (50 mM Tris, 0,1 (V/V)% TWEEN® 20 [kat. szám: P7949; Sigma-Aldrich], 150 mM NaCl [kat. szám: 27800.291; VWR International] pH 7,4), 1 órán keresztül szobahőmérsékleten) egy éjszakán át 4 °C-on TRPM5 vagy EGFR specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk, melyet 0,5% tejpor és 0,5% BSA tartalmú TBST-ben hígítottunk a gyártó által ajánlott koncentrációra.

Munkánk során két különböző TRPM5-specifikus antitestet is teszteltünk. A Mardaryev és munkatársai által használt antitest (kat. szám: ACC-045; Alomone Labs Ltd., Jeruzsálem, Izrael)<sup>115</sup> esetén a hígítás: 1:200 arányú volt, míg a másik antitestet (kat. szám.: ab154788; Abcam) 1:5000 arányú hígításban alkalmaztuk. Az EGFR csendesítés esetén egér monoklonális EGFR-specifikus antitestet (kat. szám: sc-373746; Santa Cruz Biotechnology) alkalmaztunk 1:500 hígításban a már említett 0,5% tejpor és 0,5% BSA tartalmú TBST-ben.

Másnap a membránokat mostuk (háromszor 10 percig TBST-ben), majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk torma-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestet (1:10000 hígítású kecskében termeltetett nyúl immunglobulin Fc szegmens-specifikus antitest [kat. szám: G21234; Thermo Fisher Scientific] vagy 1:5000 hígítású kecskében termeltetett egér immunglobulin Fc szegmens-specifikus antitest [kat. szám: 170 6516; Bio-Rad]) tartalmazó 0,5% tejpor és 0,5% BSA alapú TBST-ben. Ezt ismét mosási lépések követték (háromszor 10 percig TBST-ben, majd további 10 percig TBS-ben).

Az immunreaktív sávok megjelenítéséhez kemilumineszcens SuperSignal™ West Pico PLUS (kat. szám: 34580; Thermo Fisher Scientific), illetve SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kitet (kat. szám: 34096; Thermo Fisher Scientific) használtunk; az előhívás KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, Kodak, Tokió, Japán) készülékben történt *Kodak MI 4.0.5* (Eastman Kodak Company) szoftver segítségével.

Az siRNS transzfekciókat követő western blotok során úgynevezett „loading” kontrollt is alkalmaztunk, annak ellenőrzésére, hogy azonos mennyiségű fehérje került-e felvitelre. Ehhez az antitesteket 0,2 M NaOH (kat. szám: 06203-1KG; Sigma-Aldrich) segítségével eltávolítottuk, majd a membránokat nyúlban termeltetett anti-β-aktin antitesttel (1:10.000; 0,5% tejpor és 0,5% TBST-ben hígítva) inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. A folyamatot a már említett, HRP-konjugált, kecskében termeltetett, nyúl immunglobulin Fc

szegmens elleni másodlagos antitesttel folytattuk. A további lépések és az előhívási módszer is megegyezik a korábban leírtakkal.

Az Alomone gyártmányú TRPM5 specifikus antitest specificitását a gyártó által ajánlott blokkoló peptiddel (hígítás: 1:100; kat. szám: BLP-CC045; Alomone Labs Ltd) ellenőriztük. A folyamat során az egyik membránt csak az elsődleges antitesttel, míg ezzel párhuzamosan a másik membránt az antitest és a blokkoló peptid keverékével (a gyártó ajánlása alapján 1 µg antitest-1 µg peptidet arányban) inkubáltuk a korábban leírtakkal azonos módon.

Amikor szükséges volt, az előhíváskor rögzített jelek szemikvantitatív denzitometriás elemzését az *ImageJ 1.51j8* szoftver (NIH) segítségével végeztük el. A *western blotot* Arany József és Ádám-Nagy Dorottya végezte.

#### 4.7 RNS szekvenálás

Az SZ95 sebocitákat 35 mm-es Petri-csészékben szélesztettük (500.000 sejt/1,5 ml tápoldat). A szükséges kezeléseket másnap elvégeztük, és 24 óra elteltével eltávolítva a felülúszót, 500 µl TRI reagens (kat. szám: AM9738; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával összegyűjtöttük a sejteket. A HaCaT keratinociták esetében is 500.000 sejt/35 mm-es Petri-csésze denzitásban szélesztettük a sejteket alacsony  $Ca^{2+}$  tartalmú DMEM-ben (1,5 ml/tenyésztőedény), majd a prekonfluens, azaz aktívan proliferáló tenyészeteket másnap TRI reagensben learattuk, míg a posztkonfluens minták esetén mikroszkóppal ellenőriztük a teljes konfluencia elérését. Ezt követően a tápoldatot magas  $Ca^{2+}$  tartalmú DMEM-re cseréltük, és a szükséges kezeléseket is ebben a tápoldatban végeztük el, majd 24 óra múlva ezeket a sejteket is begyűjtöttük. A teljes RNS izolálása az „*RNS tisztítás, reverz transzkripció és kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)*” alfejezetben leírtakkal azonos módon történt. A kísérleteket 3 biológiai ismétléssel végeztük.

A globális transzkriptom adatok gyűjtéséhez nagy áteresztőképességű mRNS-szekvenálási elemzést végeztünk Illumina szekvenáló platformon. A teljes RNS minták minőségének ellenőrzése Agilent BioAnalyzer-rel történt Eukaryotic Total RNA Nano Kit (kat. szám: 5067-1511; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével, a gyártó protokollját követve. Az mRNS könyvtár készítése során csak olyan mintákat használtunk fel, amelyek RNS integritási száma (RIN értéke) >7 volt.

A könyvtárakat a teljes RNS-ből Ultra II RNA Sample Prep kit (kat. szám: E7775S; New England BioLabs; Ipswich, MA, USA) alkalmazásával készítettük el a gyártó protokollja alapján. Ezt követően a könyvtárakat Illumina NextSeq 500 készülékkel (Illumina, SanDiego, CA, USA) szekvenáltuk, a leolvasás egy irányból történt, a hossza 75 bp volt.

#### *Az RNS-Seq-adatok elemzése*

Első lépésként a nyers szekvenálási adatokat (fastq) a HISAT2 illesztő programmal a GRCh38 humán referencia genomra térképeztük és BAM fájlokat hoztunk létre. A további elemzést a StrandNGS szoftverrel ([www.strand-ngs.com](http://www.strand-ngs.com)) végeztük. A BAM fájlokat importáltuk, a normalizálás és a kvantifikálás StrandNGS programba integrált DESeq algoritmussal történt. A kezelések hatására differenciáltan expresszálódó gének listáit moderált T-teszt alkalmazásával határoztuk meg, szignifikáns változásnak azt tekintettük ahol a  $P$  érték < 0,05 teljesült. Az RNS-Seq-elemzés nyers adatai az NCBI SRA adatbázisában, az alábbi linkeken érhetők el:

HaCaT: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA1122410>;

SZ95: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1037731>.

#### *Főkomponens analízis*

A különböző kezelési csoportok génexpressziós mintázatának összevetésére, a különbségek felfedésére főkomponens elemzést alkalmaztunk a StrandNGS szoftver

segítségével. Az analízis a mintáinkat két tengely mentén helyezte el, az 1. főkomponens, mely a minták közötti összes különbség 85,7%-át, és a 2. főkomponens mentén, mely a minták közötti összes különbség 10,2 %-át jelenti, ezzel segítve a kezelések által okozott különbségek és hasonlóságok megértését.

#### *Jelátviteli útvonalak elemzése*

A *CytoScape v3.4* szoftver és a *ClueGo v2.3.5.* alkalmazással együttes használatával azonosításra kerültek a GO (Gene Ontology) adatbázis alapján a felülreprezentált gének. A differenciáltan expresszált gének listájának és a GO biológiai folyamatok adatbázisának felhasználásával kétoldalas hipergeometriai tesztet végeztünk a Bonferroni „*step down*” korrekcióval.

*Az RNS mintákat Volascsekné dr. Tóth Kinga Fanni és Ádám-Nagy Dorottya készítette elő. A szekvenálást és az adatok kiértékelését dr. Póliska Szilárd végezte.*

#### *4.8 A citokin-fel szabadulás vizsgálata (ELISA)*

A sejtekből történő IL-6 és IL-8 (CXCL8) felszabadulás detektálásához ELISA technikát alkalmaztunk. A méréshez a felülúszókat a megfelelő kezelés elvégzése után 3 és 24 óra elteltével gyűjtöttük be, és a felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mintákat. A citokin felszabadulás vizsgálatát a BD OptEIA Kit (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA; kat. számok: 555220 és 555244) segítségével végeztük a gyártói protokollt követve. A gyártó által biztosított standardokat és a mintákat is két technikai ismétléssel vittük fel a lemezekre, majd FlexStation 3 készülék segítségével (Molecular Devices) 450 nm-en abszorbancia mérést végeztünk. A standard sor mért abszorbancia és ismert koncentráció értékeinek felhasználásával *GraphPad Prism 9.3.1.* szoftver „*third order polynomial (cubic)*” illesztés segítségével, a standard görbe meghatározását követően megkaptuk a mintáink IL-6, illetve

IL-8 citokintartalmát, melyeket átlag $\pm$ SD formában ábrázoltunk. *A kísérleteket Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.9 Foszfokináz array

A foszfokináz array egy nitrocellulóz membrán alapú szendvics immunoassay, mely megfelelő szűrőmódszer a kezelések által befolyásolt releváns biológiai útvonalak felfedésére. Az általunk is használt membránra 39 különböző elfogó antitest van duplikáltan rögzítve, melyek a mintában jelen lévő specifikus célfehérjékhez kötődnek, így egy mintából egyszerre több fehérje foszforilációjának és ezzel együtt a szignálmolekulák aktivációjának kimutatása is lehetséges.

A foszfokináz array-hez a Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit-et (kat szám: ARY003C; Bio-Techne R&D Systems) használtuk a gyártó protokolljának megfelelően. Kísérleteink során a sejteket 100 mm-es Petri-csészékbe szélesztettünk 5.000.000 sejt/Petri-csésze denzitásban. A követő napon a sejteket 10, 30 és 60 percig 300  $\mu$ M TPPO-val vagy oldószerrel (10 perc) kezeltük, majd begyűjtöttük a sejteket a kitben lévő lízis puffer segítségével. A minták fehérjetartalmát a *Western blot* alfejezetben leírtak szerint határoztuk meg. A membránokat azonos mennyiségű fehérjével inkubáltuk (334  $\mu$ g 334  $\mu$ l-ben), a kísérletet a gyártó leírásának megfelelően végeztük, egyedül az előhívás folyamatában tértünk el, mely a western blotnál leírtakhoz hasonlóan történt. A kemilumineszcens jeleket Chemi Reagent Mix segítségével vizualizáltuk KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, Kodak) segítségével. A kapott szignálokat, melyek denzitása arányos a foszforilációval, szemikvantitatív denzitometriás elemzés alá vetettük *ImageJ 1.51j8* szoftverrel (National Institutes of Health). Az egyes membránokon lévő negatív referencia pontok átlag denzitását háttérintenzitásnak tekintettük, ezeket kivontuk a nyers értékekből, majd a kapott eredményeket a kontrollra

normalizáltuk és  $\geq 1,3$ -szoros növekedést tekintettük releváns változásnak. *A foszfokináz array-t Arany József és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.10 Az életképesség vizsgálat (MTT-assay)

A kísérleteink során alkalmazott anyagok különböző koncentrációinak a sejtek életképességére gyakorolt hatásának ellenőrzésére MTT-assay-t végeztünk. Az assay közvetett információt ad az élő sejtek számról: a detektált abszorbancia érték arányos a mitokondriális enzimaktivitással. Az életképes sejtek enzimeit a sárga színű metiltiazol-tetrazólium-bromid tetrazólium gyűrűjét hasítva vízben oldhatatlan formában kristályokat képeznek,<sup>187</sup> ezeket a sejtekkel együtt feloldva homogén lila oldatot kapunk.

Az MTT-assay-hez 20.000 sejt/well denzitásban szélesztettünk szebocitákat 96 lyukú lemezekre, majd elvégeztünk a szükséges kezeléseket. 24, illetve 48 óra elteltével eltávolítottunk a felülúszót a sejtekről, és 100  $\mu$ l/well MTT oldatot mértünk rájuk. Az alkalmazott 0,5 mg/ml koncentrációjú oldathoz az MTT port (kat. szám: ab146345; Abcam, Cambridge, UK) PBS-ben oldottuk fel. Ezt követően a lemezeket 37 °C-ra helyeztük, és 2,5 órán keresztül inkubáltuk, majd eltávolítottuk a sárga színű oldatot, ekkor akár szemmel is láthatóak voltak a wellék alján a formazán kristályok miatt lilára színeződött sejtek. Ezt követően 100  $\mu$ l/well MTT szolubilizáló oldat (81% 2-propanol, 9% 1 M-os HCl, 10% Triton-X 100; mind Sigma-Aldrich) hozzáadásával, szobahőmérsékleten történő rázatással feloldottuk a kristályokat, és a kapott homogén oldat abszorbanciáját 565 nm-en FlexStation 3 készülék segítségével (Molecular Devices) mértük le. Eredményeinket a kontroll értékre normalizálva, átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. *A sejtek életképességének vizsgálatát Nyitrai Tamara, Pető Orsolya és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.11 Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása (Nile Red jelölés)

A szebociták intracelluláris lipidtartalmát fluoreszcens Nile Red jelöléssel határoztuk meg. A Nile Red festék vizes közegben nem fluoreszkál, lipofil közegben viszont fluoreszcenssé válik és eltérő spektrális tulajdonságokat mutat attól függően, hogy poláros vagy neutrális lipidek közé kerül. Ezen sajátosságok teszik lehetővé, hogy ugyanazon szebocita mintából elkülöníthessük a két csoportba tartozó lipideket,<sup>188</sup> és segítségével különböző információt nyerjünk a sejtekről: a poláros membránlipidek fluoreszcencia intenzitása a sejtszámmal arányos, míg a neutrális, azaz termelt faggyúlipidek által adott jel a szebociták differenciáltsági állapotát tükrözi.<sup>32,189</sup>

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározásához az SZ95 szebocitákat 20.000 sejt/well denzitásban szélesztettünk fekete falú, átlátszó aljú, 96 lyukú lemezekre (kat. szám: 655090; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország), majd elvégeztünk a szükséges kezeléseket. A megfelelő kezelési időt követően a felülúszót eltávolítottuk a sejtekről, és helyére minden wellbe 100 µl Nile Red munkaoldatot mértünk. Az alkalmazott Nile Red (kat. szám: N3013; Sigma-Aldrich) oldatot az etanolban (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) oldott 1 mg/ml-es törzsoldatból készítettük el oly módon, hogy PBS-ben ezerszeresére hígítottuk. Ezt 30 perc inkubáció követte 37 °C-on, majd a wellék fluoreszcencia intenzitását FlexStation 3 (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA) segítségével mértük két hullámhossz pár alkalmazásával. A neutrális lipideket 485 nm-es excitációs és 565 nm-es emissziós hullámhosszon, míg a polárosakat 540 nm-es excitációs és 620 nm-es emissziós hullámhosszon detektáltuk. A mérést „well scan” módban végeztük, azaz minden wellben 9 ponton történt az intenzitásértékek rögzítése, amivel csökkenthető volt a sejtcsoportok esetleges egyenetlen eloszlásából adódó szórás. Eredményeinket hullámhossz páronként a kontroll értékre normalizálva, átlag±SD formában adtuk meg. *A Nile Red jelölést Nyitrai Tamara, Pető Orsolya és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.12 A proliferáció vizsgálata (CyQUANT-assay)

A HaCaT és NHEK proliferációjának vizsgálatára CyQUANT assay-t (CyQUANT™ Cell Proliferation Assay Kit; kat. szám: C7026; Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk, mely során egy DNS-hez kötődő fluoreszcens festék segítségével meghatározhatjuk annak mennyiségét, így közvetlen információt kaphatunk a sejtszámról.<sup>190</sup> Fluoreszcens mérés lévén, ez esetben is a fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezekre (Greiner Bio-One) szélesztettük a sejteket. Proliferációs vizsgálatainkhoz a sejteket 20.000 sejt/well denzitásban szélesztettünk. Elvégeztük a szükséges kezeléseket, majd a kezelési idő (24, 48, illetve 72 óra) leteltével eltávolítottuk a felülúszót a wellkből, mostuk a sejteket PBS-sel, és -80 °C-ra helyeztük a plateket legalább egy éjszakára, ezzel is elősegítve a sejtek permeabilizálását, mely szükséges a fluoreszcens festék interkalációjához. Az assay elvégzéséhez a lemezeket szobahőmérsékleten kiolvastottuk, majd a gyártói protokollnak megfelelően DMSO-ban oldott, PBS-ben hígított, 200 µl-t CyQUANT oldatot mértünk a wellkebe. Ezt 4 perc inkubáció követte fénytől védve, 37 °C-on. A fluoreszcens jel intenzitását FlexStation 3 (Molecular Devices) készülékkel, 480 nm-es excitációs és 520 nm-es emissziós hullámhosszt alkalmazva, „well scan” módban, wellenként kilenc ponton detektáltuk. A kapott eredményeket a kontroll értékre normalizálva, átlag±SD formában adtuk meg. *A CyQUANT-assay-eket Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.13 Az intracelluláris ionhomeosztázis vizsgálata

##### 4.13.1 Fluoreszcens $Ca^{2+}$ -mérés (Fura-2 AM jelölés)

A SZ95 szebociták intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció változását ratiometrikus kalcium érzékeny fluoreszcens festék, Fura-2 AM (kat. szám: F1221; Invitrogen) felhasználásával követtük nyomon. Az indikátor a hozzákapcsolt AM, azaz acetoxi-metilészter csoport

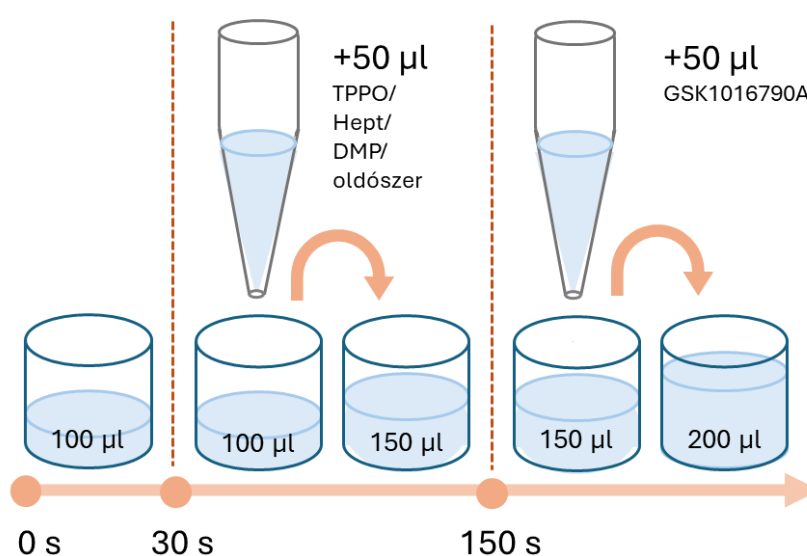
segítségével képes átjutni a sejtmembránon, az intracelluláris térben nem-specifikus észterázok lehasítják az AM csoportot, így a Fura-2 nem tud kijutni a sejt belsejéből, de képes a szabad  $\text{Ca}^{2+}$  megkötésére, mellyel megváltozik a fluoreszcencia intenzitása, amit a megfelelő hullámhosszokon detektálhatunk.<sup>191</sup>

A kalcium-kötött Fura-2 molekula optimális excitációs hullámhossza 340 nm, míg a szabad festékmolekuláé 380 nm, az emissziós hullámhossz mindkét esetben 510 nm, így a detektált fluoreszcencia intenzitások hányadosának ( $F_{340}/F_{380}$ ) felhasználásával következtetni lehet a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változására.

A mérést megelőző napon a sejteket 20.000 sejt/well denzitásban szélesztettük fekete falú, átlátszó aljú 96 lyukú lemezekre (Greiner Bio-One), majd másnap a letapadt sejtekről eltávolítottuk a tenyésztőmédiomot, és mostuk őket wellenként 100  $\mu\text{l}$  Hank oldattal. A Hank oldat összetétele a következő: 136,8 mM NaCl (kat. szám 27800.291; VWR International), 5,4 mM KCl (kat. szám: P4504; Sigma-Aldrich), 0,34 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (kat. szám: 204855000; Acros Organics, Thermo Fisher Scientific), 0,44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (kat. szám: 4243; Sigma-Aldrich), 0,81 mM  $\text{MgSO}_4$  (kat. szám: M2773; Sigma-Aldrich), 1,26 mM  $\text{CaCl}_2$  (kat. szám: C7902; Sigma-Aldrich), 5,56 mM glükóz (kat. szám: G5767; Sigma-Aldrich), 4,17 mM  $\text{NaHCO}_3$  (kat. szám: 31437; Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (kat. szám: H3375; Sigma-Aldrich); pH 7,2), majd a kész oldatot 1% BSA-val (szarvasmarha szérumalbumin; kat. szám: 0332; VWR International), 2,5 mM probeneciddel (kat. szám: P8761; Sigma-Aldrich) egészítettük ki. A sejteket ezt követően Hank oldatban hígított 2  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú Fura-2 AM hozzáadásával inkubáltuk 37 °C-on 30 percig, ezalatt előkészítettük az úgynevezett „*compound plate*”-et, amiből a sejtek kezelése automatizáltan történt (a megfelelő végkoncentrációk eléréséhez természetesen számításba vettük az anyagok hígulását). Töltésüket követően a sebocitákat kétszer mostuk Hank oldattal, majd

a wellenként 100  $\mu\text{l}$ -t mértünk rájuk az oldatból. A fluoreszcencia intenzitást detektálását és közben a kezelőanyagok bemérését a FlexStation 3 (Molecular Devices) készülék végezte.

A mérés 37 °C-on, három lépésben zajlott (**17. ábra**), az első 30 másodpercben az alapvonalat detektáltuk, ez mutatja meg a sejtek nyugalmi  $\text{Ca}^{2+}$  szintjét. A második lépésben automatizáltan bemérésre kerültek a kezelőanyagok (TPPO, Hept vagy DMP; végkoncentrációjuk 300  $\mu\text{M}$ ) a megfelelő wellékbe, míg a kontroll csoport welljeihez oldószert adtunk azonos térfogatban. A hatást a 150. másodpercig mértük.



**17. ábra**

**A  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció-változás mérésének lépései (saját ábra)**

Munkacsoportunk a korábbiakban kimutatta, hogy a szebociták kifejezik a TRPV4  $\text{Ca}^{2+}$ -ra permeábilis csatornát.<sup>125</sup> Annak vizsgálatára, hogy a TRPM5 moduláció közvetve befolyásolja-e a TRPV4-en keresztül történő  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást, a mérés utolsó lépéseként egy ultrapotens TRPV4 agonistát (GSK1016790A; kat. szám: G0798, Sigma-Aldrich) adtunk a mérőoldathoz 50 nM végkoncentrációban.<sup>192</sup> A GSK1016790A ezen koncentrációja megnöveli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt, de nem telíti a festéket, így egyaránt lehetővé teszi a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel csökkenésének és esetleges további emelkedésének a megfigyelését.

Eredményeinket  $F_{340}/F_{380}$  formában ábrázoltuk. A  $Ca^{2+}$ -jelek mérését *Ádám-Nagy Dorottya* végezte.

#### 4.13.2 *Fluoreszcens $Na^+$ -mérés (SBFI AM jelölés)*

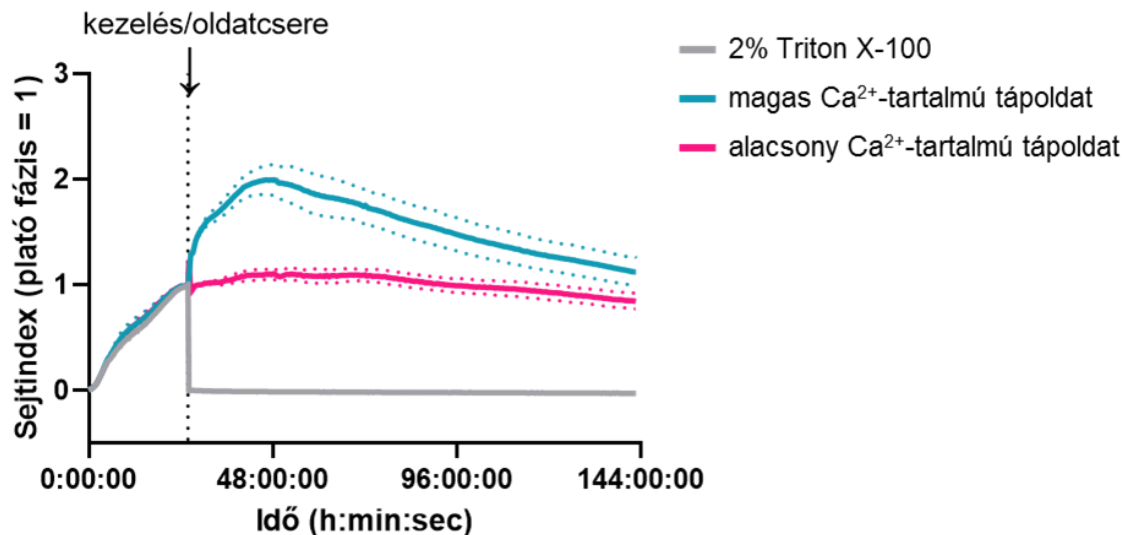
Az SZ95 szebociták tenyésztése és kísérletre való előkészítése a fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -mérésnél leírtaknak megfelelően történt az intracelluláris  $Na^+$ -homeosztázis vizsgálat esetében is. A sejteket 10  $\mu$ M SBFI AM-mel (kat. szám: ab142800; Abcam), egy  $Na^+$ -érzékeny fluoreszcens festékkel jelöltük, melyet Hank oldatban hígítottunk a megfelelő koncentrációra. A tenyészeteket wellenként 100  $\mu$ l festékoldattal 37 °C-on 40 percig inkubáltuk. A sejteket ez esetben is kétszer mostuk, és 100  $\mu$ l Hank oldat hozzáadása után indítottuk a mérést a FlexStation 3 készülékben. A fluoreszcens jelet 37 °C-on, 340 nm-es és 380 nm-es gerjesztési hullámhosszokon, valamint 500 nm-es detektálási hullámhosszon mértük. Az első 30 másodpercben ismét az alapvonalat rögzítettük, majd bemérésre kerültek a tesztelendő modulátorok, míg a kontroll tenyészetek azonos térfogatú oldószert kaptak. Eredményeinket  $F_{340}/F_{380}$  formában ábrázoltuk. A  $Na^+$ -homeosztázis vizsgálatát *Ádám-Nagy Dorottya* végezte.

#### 4.14 *A HaCaT keratinociták elektromos impedanciájának valós idejű mérése*

A TEER, azaz transzepiteliális elektromos ellenállás („transepithelial electrical resistance”) mérése egy széles körben elfogadott kvantitatív technika a sejtek barrierformáló képességének, illetve a tight junction-ök integritásának vizsgálatára sejtes modellekben.<sup>193</sup> Az általunk használt TEER mérés valós időben, a sejtek károsítása nélkül végezhető, impedancia, azaz a váltakozó árammal szembeni ellenállás meghatározásán alapuló módszer.

A mérés során egy speciális plate-re szélesztjük a sejteket: minden wellben két darab arany elektród található. A tápoldat vezető közegként viselkedik, így elektromos ingerlést (22 mV) követően elektronok jutnak a negatív elektródból a pozitívba. A letapadó és egymással szoros kapcsolatokat kialakító sejtek ezt az elektronáramlást akadályozzák, mely folyamat az impedancia valós idejű mérésével követhető nyomon.<sup>194</sup>

A letapadó sejtek által okozott impedancia változását a sejtindex („*cell index*”; CI) nevű paraméterrel jellemezhetjük,<sup>194</sup> melynek változását egy előzetes kísérletünk jól szemlélteti (**18. ábra**). Az alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú tápoldatban szélesztett HaCaT keratinociták esetében az első néhány órában (azaz amikor a sejtek leülepednek, majd letapadnak a wellék aljára) hirtelen CI emelkedés figyelhető meg. Ezt a CI fokozatos, de folyamatos növekedése követi, amit a sejtek proliferációja okoz, mely végül a konfluencia elérésekor egy platófázishoz érkezőnk. Amennyiben a sejtek a platófázis elérése utáni oldatcsere során továbbra is alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú tápoldatot kaptak, a CI értéke nem növekedett tovább (**18. ábra**). Akkor azonban, amikor a sejteket a konfluencia elérésekor magas  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú oldat segítségével differenciáltattuk, a CI jelentős emelkedését figyelhettünk meg (**18. ábra**), ami a sejtközötti kapcsolat differenciáció-indukálta megerősödésére utal. A sejtek felválása, illetve halála esetén a CI hirtelen csökkenése következik be, melyet az említett előzetes kísérlet során detergens kezeléssel (Triton X-100) váltottunk ki (**18. ábra**).



**18. ábra**

***A sejtindex alakulása a valós idejű impedancia mérés során***

Reprezentatív ábra, előzetes kísérlet. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg, N=3-6 biológiai ismétlés. A HaCaT keratinocitákat 10.000 sejt/well denzitásban, alacsony Ca<sup>2+</sup>-tartalmú tápoldatban szélesztettük. A sejtindex (CI) a szélesztést követő első pár órában a sejtek letapadásával meredeken emelkedett, majd a proliferáció következtében egy fokozatos, lassabb növekedés volt megfigyelhető, melyet a teljes konfluencia eléréskor egy platófázis követett (az egyes wellék nyers impedancia értékeit minden esetben a platófázis kezelés előtti utolsó impedancia értékére normáltuk). A platófázist követő oldatcsere során a sejtek egy csoportja továbbra is alacsony Ca<sup>2+</sup>-tartalmú tápoldatban maradt (rózsaszín), míg egy csoportjuk médiumát magas Ca<sup>2+</sup>-tartalmúra cseréltük (kék). Utóbbi esetben jelentős differenciáció indukálta jelfokozódás volt megfigyelhető. A 2% Triton X-100 kezelés (szürke) lényegében feloldotta a sejteket, ami szinte a csak tápoldatot tartalmazó wellék szintjére csökkentette vissza az impedanciát.

A HaCaT sejtréteg elektromos impedanciájának valós idejű nyomonkövetését az xCELLigence rendszer segítségével végeztük (Agilent xCELLigence RTCA DP System with RTCA Software version 1.2; Santa Clara, CA, USA). A mintavételezés 15 percnként történt, a háttérkorrekciót a „vak mérés” adatai alapján végeztük, mely során minden well impedanciája 100  $\mu$ l sejtmentes, alacsony Ca<sup>2+</sup> tartalmú DMEM tápoldatban lett

meghatározva. A „vak mérését” követően a sejteket 10.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük a lemezre, 200 µl alacsony Ca<sup>2+</sup> tartalmú DMEM-ben. A teljes konfluencia elérésekor, azaz amikor impedancia mérése platófázist mutatott, a tápoldatot differenciálódást indukáló, magas Ca<sup>2+</sup> tartalmú DMEM-ra cseréltük, mely vagy 14 µM FX-t vagy azonos térfogatú oldószert (DMSO-t) tartalmazott.

A mérés végén az adatokat wellenként a kezelés előtti utolsó impedanciaértékre normalizáltuk, melyeket 1-nek tekintettünk. *A sejtek előkészítését Ádám-Nagy Dorottya, a mérést dr. Váradi Judit végezte. A kiértékelést dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

#### 4.15 Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését és ábrázolását GraphPad Prism 10.1.0 (316), illetve 10.2.3 (403) (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA) szoftverrel végeztük. Ha szükséges volt, a kiugró értékek azonosítása ROUT teszttel (Q=1%) történt. A minta méretétől függően az adatok eloszlását Anderson-Darling vagy Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Adataink összevetésére normál eloszlás esetén kétoldalú, párosítatlan *t*-tesztet (páros összehasonlítások) vagy egyutas ANOVA-t, majd Šidák-féle vagy Dunnett-féle *post hoc* tesztet (többszörös összehasonlítások) végeztünk, nem normál eloszlás esetén kétoldalú Mann-Whitney tesztet (páros összehasonlítások) vagy Kruskal-Wallis-tesztet, majd Dunn-féle *post hoc* tesztet (többszörös összehasonlítások) alkalmaztunk. A **7. táblázatban** látható adatok elemzéséhez Fisher-féle egzakt tesztet használtunk. Szignifikáns különbségnek minden esetben a  $P < 0,05$  értékeket tekintettünk. *A statisztikai analízist és az ábrák elkészítését dr. Oláh Attila és Ádám-Nagy Dorottya végezte.*

## 5. Eredmények

### 5.1 A TRPM5 antagonistá TPPO TRPM5-független módon fokozza a szebociták lipogenezisét és befolyásolja az immunfenotípusukat is

Az Irodalmi áttekintésben bemutatott szakirodalmi adatokra alapozva a humán SZ95 szebocitákon folytatott kísérleteinket a TRPM5 expressziójának vizsgálatával kezdtük, majd a TRPM5-antagonista TPPO biológiai hatásának felderítésével folytattuk.

#### 5.1.1 A TRPM5 kifejeződése megkérdőjelezhető SZ95 szebocitákon

Kísérleteink kezdetén a prekonfluens, azaz aktívan proliferáló és posztkonfluens, azaz spontán differenciálódott szebociták segítségével meg akartunk bizonyosodni a TRPM5 faggyúmirigysejteken való jelenlétéről. Vizsgálatainkat mRNS szinten kezdtük RT-qPCR segítségével. Bár két különböző TRPM5-specifikus TaqMan-próbát is alkalmaztunk, az ioncsatorna mRNS-szintű expresszióját minden esetben a detekciós küszöb körülnek vagy az alattinak találtuk (minden vizsgált minta esetében a Ct értékek felettiéek voltak; **6. táblázat**).

Az expressziós vizsgálatot fehérje szinten folytattuk western blot technikával, először ugyanannak az antitestnek a felhasználásával, amit Mardaryev és munkatársai használtak a már említett publikációban.<sup>115</sup> A kísérlet során a TRPM5-ellenes antitest mellett egy specifikus blokkoló peptidet is alkalmaztunk (**19. ábra**). Ez a kísérlet több, nemspecifikusnak tűnő sávot eredményezett, melyek többsége eltűnt, amikor az antitestet a blokkoló peptiddel együtt inkubáltuk. A megfigyelhető sávok egyike sem a gyártó által előrejelzett molekulatömegnél (nagyjából 100, illetve 72 kDa-os magasságban) jelent meg, azonban gyenge jelölődés volt látható az UniProt adatbázis által megadott molekulatömeg

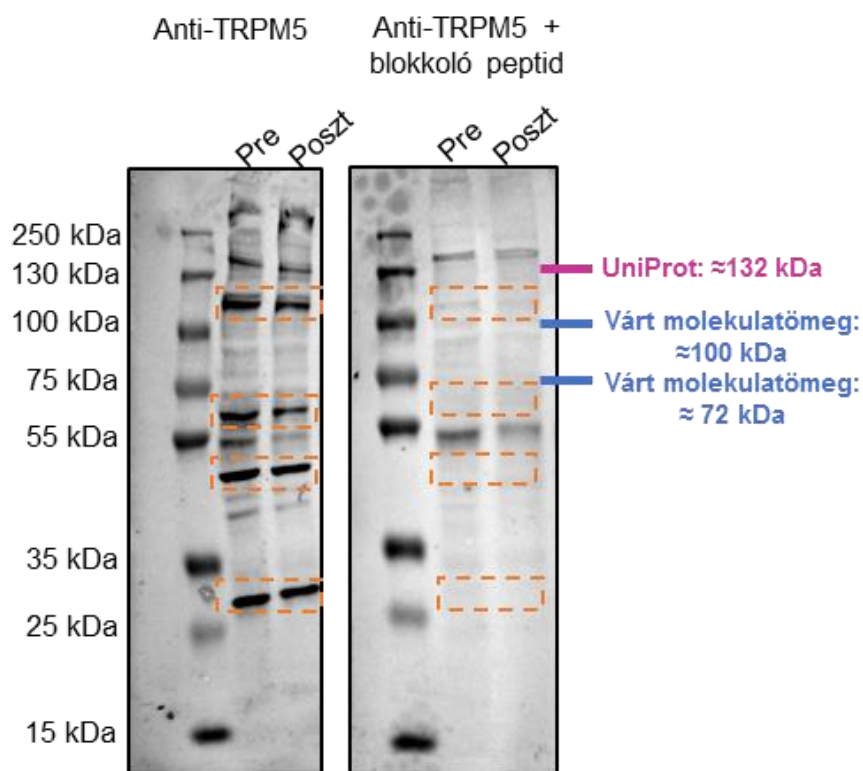
( $\approx 132$  kDa)<sup>195</sup> felett valamivel, ez utóbbi sáv viszont nem tűnt el a blokkoló peptid hatására (19. ábra).

### 6. táblázat

#### *A két különböző TRPM5-specifikus TaqMan-próbával elvégzett RT-qPCR*

*A TRPM5 és egy belső kontroll (PPIA) mRNS-szintű expressziója (nyers RT-qPCR Ct adatok pre- és posztkonfluens szebocita tenyészetekből). A mintához tartozó három sorban a technikai ismétlések láthatók. A detektálás 50 ciklusig zajlott. Azok a wellek, melyekben az 50. ciklusig sem detektáltunk jelet, piros háttérrel vannak kiemelve.*

MINTA	1. KÍSÉRLET		2. KÍSÉRLET	
	PPIA	TRPM5	PPIA	TRPM5
	Hs99999904_m1	Hs00175822_m1	Hs99999904_m1	Hs05060590_s1
Prekonfluens 1. minta	19,07	40,63	18,91	41,2
	19,05		18,99	41,95
	19,25		19,01	
Prekonfluens 2. minta	19,1	41,64	19,14	
	19,17		19,17	41,4
	19,22		19,18	
Prekonfluens 3. minta	19,33	41,5	18,88	41,17
	19,29	41,4	19,02	
	19,49	41,32	19,11	40,37
Prekonfluens 4. minta	19,15		19,54	
	18,92		19,53	
	19,13		19,53	
Prekonfluens 5. minta	19,33		19,01	
	19,38	41,33	19,26	
	19,3		19,15	41,28
Prekonfluens 6. minta	19,38		19,6	
	19,49	41,2	19,39	42,23
	19,27		19,5	
Posztkonfluens 1. minta	19,47		19,77	
	19,52		19,86	
	19,58		19,67	41,3
Posztkonfluens 2. minta	19,73		19,84	
	19,69		19,87	
	19,67		19,76	45
Posztkonfluens 3. minta	19,4		21,11	
	19,72		21,05	
	19,7		21,04	
Posztkonfluens 4. minta	19,92	41,28	20,13	
	19,94	42,07	20,06	
	19,37	40,89	20,18	40,17
Posztkonfluens 5. minta	19,8		20,17	
	19,87		20,19	
	19,83		20,15	
Posztkonfluens 6. minta	19,4		19,78	
	19,55		19,77	
	19,53		19,74	

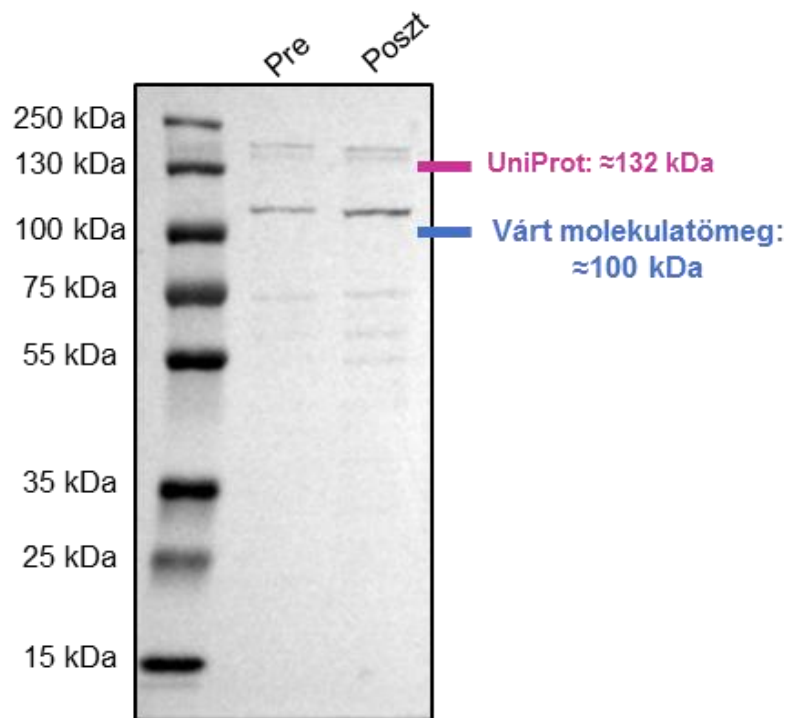


**19. ábra**

***A Mardaryev és munkatársai által alkalmazott TRPM5-specifikus primer antitesttel<sup>115</sup> végzett analízis megkérdőjelezhető jelölődést mutat a humán szebocitákban (western blot)***

*Western blot. Az SZ95 humán szebocitákat prekonfluens (nem differenciált, aktívan proliferáló) és posztkonfluens (spontán differenciálódó) stádiumban arattuk le, a TRPM5 kimutatására a Mardaryev és munkatársai által használt primer antitestet alkalmaztuk (Alomone; kat szám: ACC-045).<sup>115</sup> Az elemzés több sávot eredményezett, amelyek többsége (de nem mind) eltűnt, amikor az antitestet egy specifikus blokkoló peptiddel előinkubáltuk (narancssárgával bekeretezve), azonban egyik sáv sem az előrejelzett molekulatömegnél (kb. 100 és kb. 72 kDa; kékkel jelölve) jelent meg. Érdekes módon egy gyenge sáv megjelent valamivel 130 kDa felett (azaz az UniProt adatbázis által előrejelzett molekulatömeg<sup>195</sup> körül; rózsaszínnel jelölve); ez a sáv azonban nem tűnt el a blokkoló peptiddel történő előinkubálást követően. **Pre:** prekonfluens kultúra; **Poszt:** posztkonfluens kultúra.*

Mivel a fenti kísérlet során több, nagy valószínűséggel nem specifikus sávot figyeltünk meg, a következőkben egy másik TRPM5-ellenes antitestet is kipróbáltunk. Ebben az esetben a western blot specifikusabbnak látszó sávokat eredményezett (**20. ábra**), azonban az immunpozitivitás nem a gyártó által prediktált molekulatömegnél (≈100 kDa) jelentkezett, hanem magasabb molekulatömegnél (≈110 kDa magasságában).

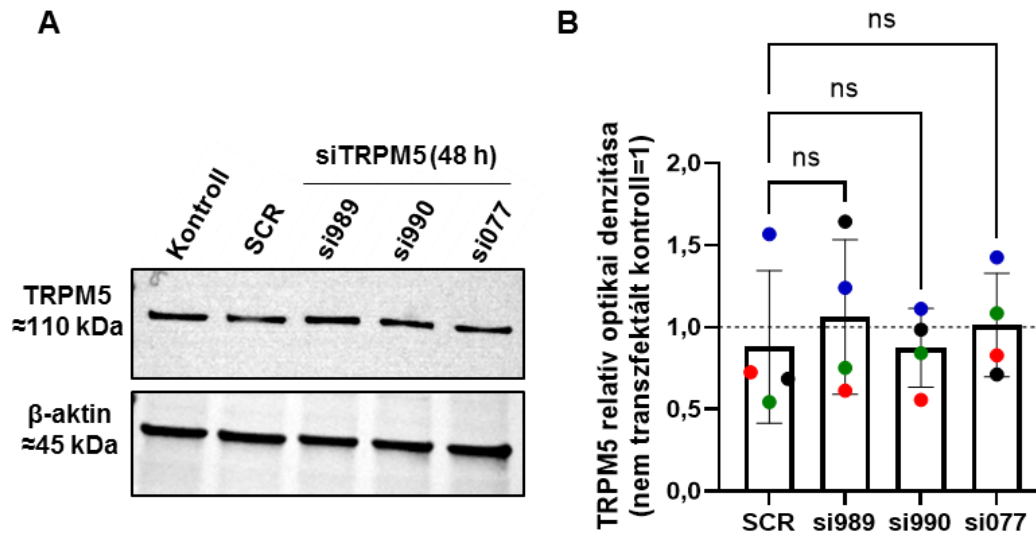


**20. ábra**

***A TRPM5 kifejeződése megkérdőjelezhető humán szebocitákon (western blot)***

*Western blot. Az SZ95 szebocitákat prekonfluens (nem differenciált, aktívan proliferáló) és posztkonfluens (spontán differenciáló) stádiumban arattuk le. A TRPM5 kimutatására ezúttal egy másik elsődleges antitestet alkalmaztunk (Abcam, kat. szám: ab154788). A legerősebb sáv ≈110 kDa magasságában látszik, azonban a TRPM5 molekulatömege az UniProt adatbázis szerint<sup>195</sup> kb. 132 kDa (rózsaszínnel jelölve), a gyártó pedig a TRPM5-specifikus sáv megjelenését kb. 100 kDa-ra prediktálta (kézzel jelölve). **Pre:** prekonfluens kultúra; **Poszt:** posztkonfluens kultúra.*

Ebben az esetben a sávok specificitását – blokkoló peptid hiányában – siRNS transzfekcióval ellenőriztük (21. ábra/A). A kísérlet során TRPM5-specifikus siRNS konstrukttal transzfektáltuk a szebocitákat, és ahogy az ábrán is látszik, a három konstrukttal egyike sem volt hatékony a western blot sávok relatív optikai denzitásának csökkentésében a scrambled (SCR) kontrollhoz viszonyítva (21. ábra/B).

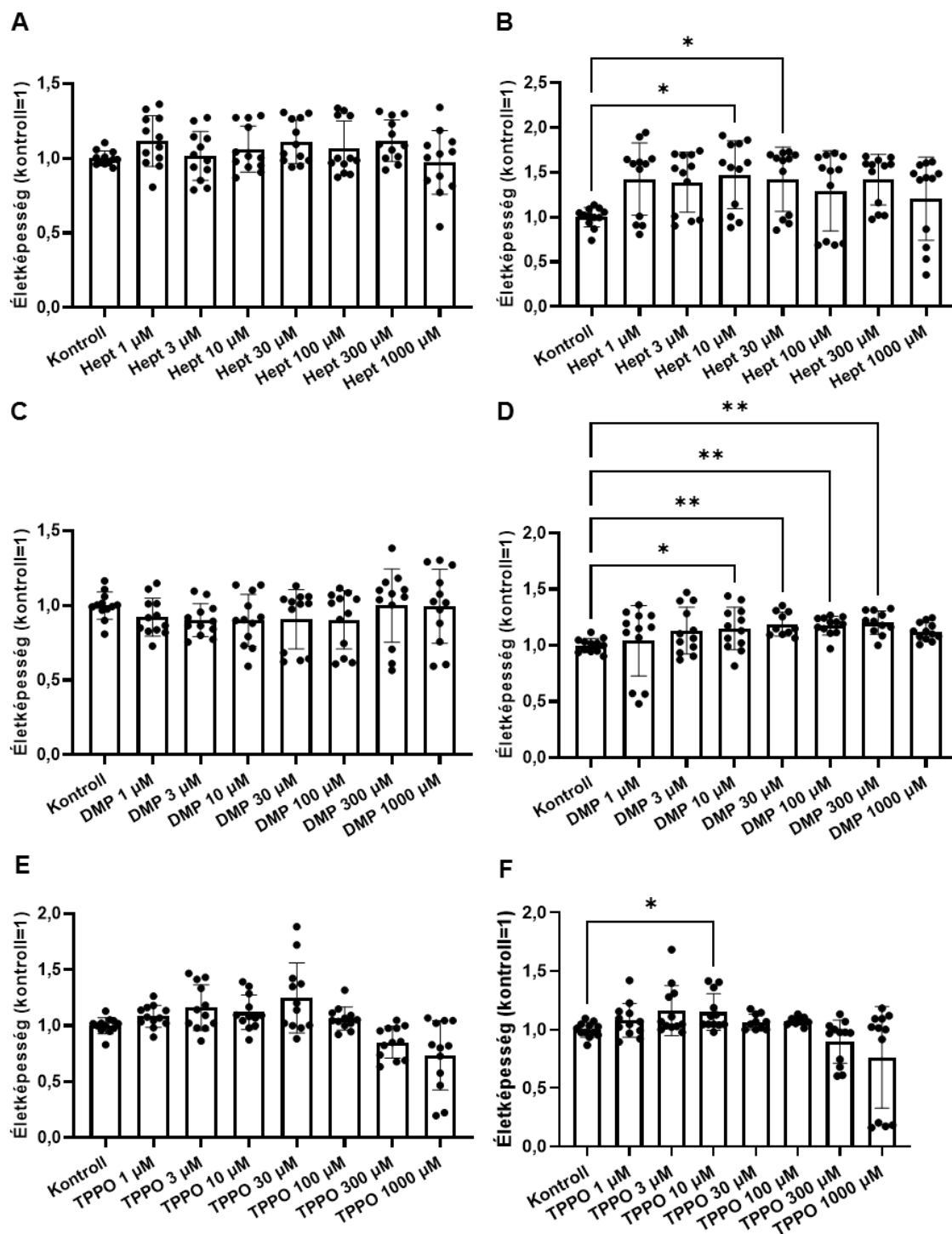


21. ábra

**A TRPM5 kifejeződése megkérdőjelezhető humán szebocitákon  
(siRNS-mediált szelektív géncsendesítés)**

A TRPM5 siRNS-mediált szelektív géncsendesítése. A szebocita mintákat 48 órával a transzfecció után gyűjtöttük be. Az „A” panelen a TRPM5 és a  $\beta$ -aktin (loading kontroll) reprezentatív western blotja, míg a „B” panelen a western blot optikai denzitometriás elemzésének eredményei láthatóak. A három TRPM5-specifikus konstrukt egyike sem volt hatékony a western blot sávok relatív optikai denzitásának csökkentésében a scrambled kontrollhoz viszonyítva. A nem transzfecciózott kontroll tenyészetek átlaga 1 (szaggatott vonal).  $N=4$  (független transzfeccióból származó biológiai ismétlés; minden szín egy független kísérlet adatait jelöli), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg (ns: nem szignifikáns; **kontroll**: nem transzfecciózott kontroll; **SCR**: scrambled kontroll; **si989/si990/si077**: TRPM5-specifikus siRNS-konstruktok).

Mivel az eddigi eredmények alapján megkérdőjelezhető a jelölések specificitása, az expressziós kísérleteink utolsó lépéseként megvizsgáltuk a TRPM5 funkcionális aktivitását is a szebocitákon. Ahogy már az *Irodalmi áttekintésben* is említésre került, a TRPM5 ioncsatorna monovalens kationokra permeábilis, így a funkcionális vizsgálat során először azt teszteltük, hogyan hatnak a TRPM5 modulátorok a sejtek  $\text{Na}^+$  homeosztázisára, melyhez SBFI AM-et, egy  $\text{Na}^+$ -érzékeny fluoreszcens festéket használtunk. Ehhez először ellenőriztük MTT-assay segítségével, hogy a modulátorok hogyan befolyásolják a szebociták életképességét, így kiválaszthattuk a legmagasabb nem citotoxikus koncentrációkat a további munkához.



22. ábra

*300 μM-ig mindhárom TRPM5 modulátor alkalmazható a citotoxicitás veszélye nélkül 24 és 48 órás kezelések során (MTT-assay)*

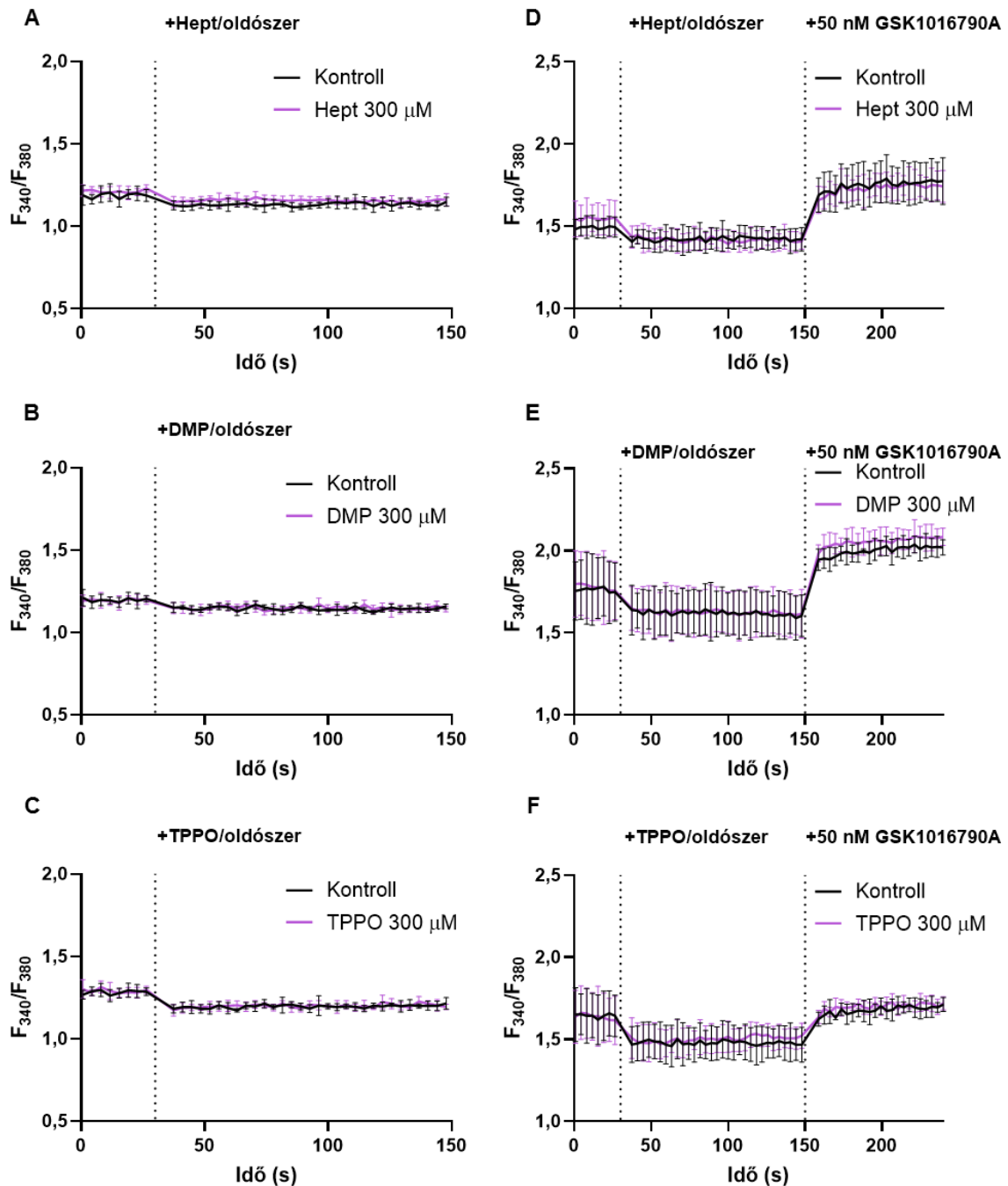
*MTT-assay. Az SZ95 sebocitákat a TRPM5 modulátorok különböző koncentrációival kezeltük 24 (A, C és E) vagy 48 órán át (B, D és F). Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=10-12 (biológiai ismétlés), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \*P<0,05; \*\*P<0,01 a jelzésnek megfelelően (DMP: 2,5-dimetil-pirazin; Hept: 2-heptanon; TPPO: trifenilfoszfín-oxid).*

A viabilitási vizsgálat során kimutattuk, hogy 1000  $\mu\text{M}$  koncentrációig sem az aktivátorok (DMP és Hept), sem az antagonisták TPPO nem volt negatív hatással az SZ95 sebociták életképességére (**22. ábra**).

Az MTT-assay alapján így kiválasztottunk egy magas, de biztosan nem citotoxikus koncentrációt, mellyel elvégeztük a SBFI AM-alapú  $\text{Na}^+$ -homeosztázis vizsgálatot: ez a koncentráció mindhárom modulátor esetében 300  $\mu\text{M}$  volt. Ahogy a **23. ábra/A-C** paneljén is látszik, sem az aktivátorok, sem az antagonisták nem okoztak mérhető változást a sebociták intracelluláris  $\text{Na}^+$ -szintjében.

A viszonylag magas (millimoláris nagyságrendű) intracelluláris  $\text{Na}^+$  koncentráció miatt az SBFI AM és a hozzá hasonló fluoreszcens festéken alapuló módszerek nem eléggé érzékenyek, hogy a kis mértékű változásokat is megfelelően tükrözzék, ezért a TRPM5 funkcionális kifejeződését közvetett módon is ellenőriztük Fura-2 AM alapú fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  méréssel.

Fontos kiemelni, hogy a TRPM5 önmagában nem permeábilis a  $\text{Ca}^{2+}$ -ra, de 37 °C-on megfigyelhető a csatorna spontán aktivitása, mely egy depolarizáló  $\text{Na}^+$ -háttéráram kialakulásához vezet, melyet a csatorna aktivátorai fokozhatnak, gátlószerei pedig csökkenthetnek. Amennyiben ezek a depolarizáló háttéráramok jelen vannak, csökkenthetik a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás hajtóerejét, így a TRPM5 aktivitásának modulálása hatással lehet a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeábilis csatornák megnyílása által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -jelekre. A közvetett funkcionális vizsgálat során így azt figyeltük meg, hogy ezt a hipotetikus,  $\text{Na}^+$  által dominált háttéráramot a TRPM5 modulálása hogyan befolyásolja, és ez milyen hatással van az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint változására, azaz a TRPM5 antagonisták képesek-e csökkenteni a depolarizáló hatást és ezzel a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet növelni, illetve az aktivátorok tudják-e a depolarizáló  $\text{Na}^+$  áramot tovább fokozni, és ezzel csökkenteni a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált.



23. ábra

*A TRPM5 modulátorok nem befolyásolják a szebociták  $Na^+$ - és  $Ca^{2+}$ -homeosztázisát*

*SBF1 AM-alapú fluoreszcens  $Na^+$ -mérés (A-C) és Fura-2 AM-alapú fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -mérés (D-F). A szaggatott függőleges vonalak a jelzett kezeléseket jelölik. Minden esetben oldószer kontrollt alkalmaztunk. A  $Ca^{2+}$ -mérések esetében a tenyészetek egy specifikus TRPV4 agonistával (GSK1016790A; 50 nM) egy második kezelést is kaptak.  $N=6$  (biológiai ismétlés), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg (DMP: 2,5-dimetil-pirazin; GSK1016790A: specifikus TRPV4 agonista; Hept: 2-heptanon; TPPO: trifenilfoszfín-oxid; TRPV: tranziens receptorpotenciálú ioncsatorna vanilloid alcsalád).*

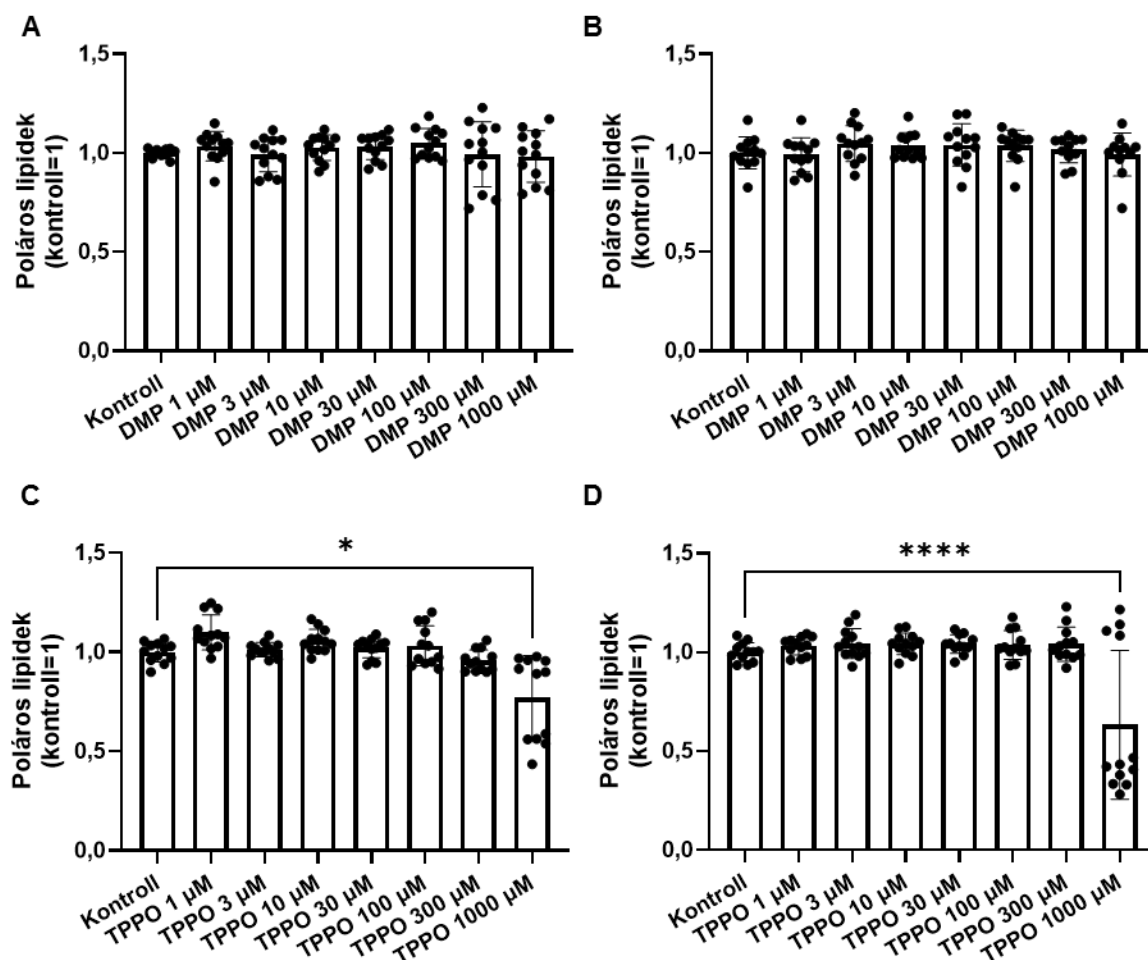
Mivel a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot áteresztő TRPV4 csatorna magas szinten fejeződik ki és funkcionálisan aktív szebocitákon,<sup>125</sup> így ebben a kísérletben ismét kezeltük a sejteket a TRPM5 modulátorokkal (vagy térfogatazonos oldószerrel), ezt követően pedig egy ultrapotens, szelektív TRPV4 agonistát (GSK1016790A; 50 nM)<sup>192</sup> adtunk hozzá a rendszerhez. Az 50 nM-os koncentrációt korábbi tapasztalatainkra alapozva választottuk, mivel jól reprodukálható  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált eredményezett, mely nem telítette a fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny festéket, így a jelek növekedése és csökkenése egyaránt nyomon követhető volt. A Fura-2 AM-mel végzett kísérlet során azt láttuk, hogy egyik TRPM5-modulátor sem befolyásolta a specifikus TRPV4-agonista GSK1016790A által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást, mely eredmény összhangban van az intracelluláris  $\text{Na}^+$ -szint mérések esetén észleltekkkel **(23. ábra/D-F)**.

A funkcionalitást célzó ionmérési vizsgálatok, a RT-qPCR, a western blot és az siRNS mediált transzfekció együttesen azt igazolják, hogy a szőrtüszőkkel ellentétben<sup>115</sup> a humán szebociták nem fejeznek ki funkcionálisan aktív TRPM5-öt, illetve ha expresszálják is, a modulátorok nem képesek mérhető mértékben befolyásolni a csatorna működését.

### *5.1.2 A TRPM5 antagonista TPPO fokozza a humán szebociták lipogenezisét és befolyásolja a sejtek immunfenotípusát*

Bár eddigi adataink alapján megállapítható, hogy a TRPM5 funkcionális expressziója a humán szebocitákon valószínűtlen, így a szőrtüszőkön kifejeződő csatorna modulálása valóban TRPM5-szelektív anyagokkal nem okozhat faggyúmirigyekhez köthető mellékhatásokat. Ugyanakkor mindig előfordulhat, hogy az eredetileg egy adott célpontra szelektívnek gondolt szerről később kiderül, hogy nem szelektív; ezért le akartuk ellenőrizni, hogy azok a TRPM5-modulátorok, amelyekről kimutatták, hogy befolyásolják a hajciklust, hatással vannak-e a humán szebocitákra.

Ennek megfelelően a következő célunk az volt, hogy feltárjuk a TRPM5 antagonistá TPPO és egy választott aktivátor hatásait. Mivel a szőrtüszők vizsgálatánál az anagén fázis meghosszabbításában az aktivátorok közül a DMP hatékonyabbnak bizonyult, mint a Hept,<sup>115</sup> így további kísérleteinkben a TPPO mellett – többnyire – a DMP használata mellett döntöttünk.



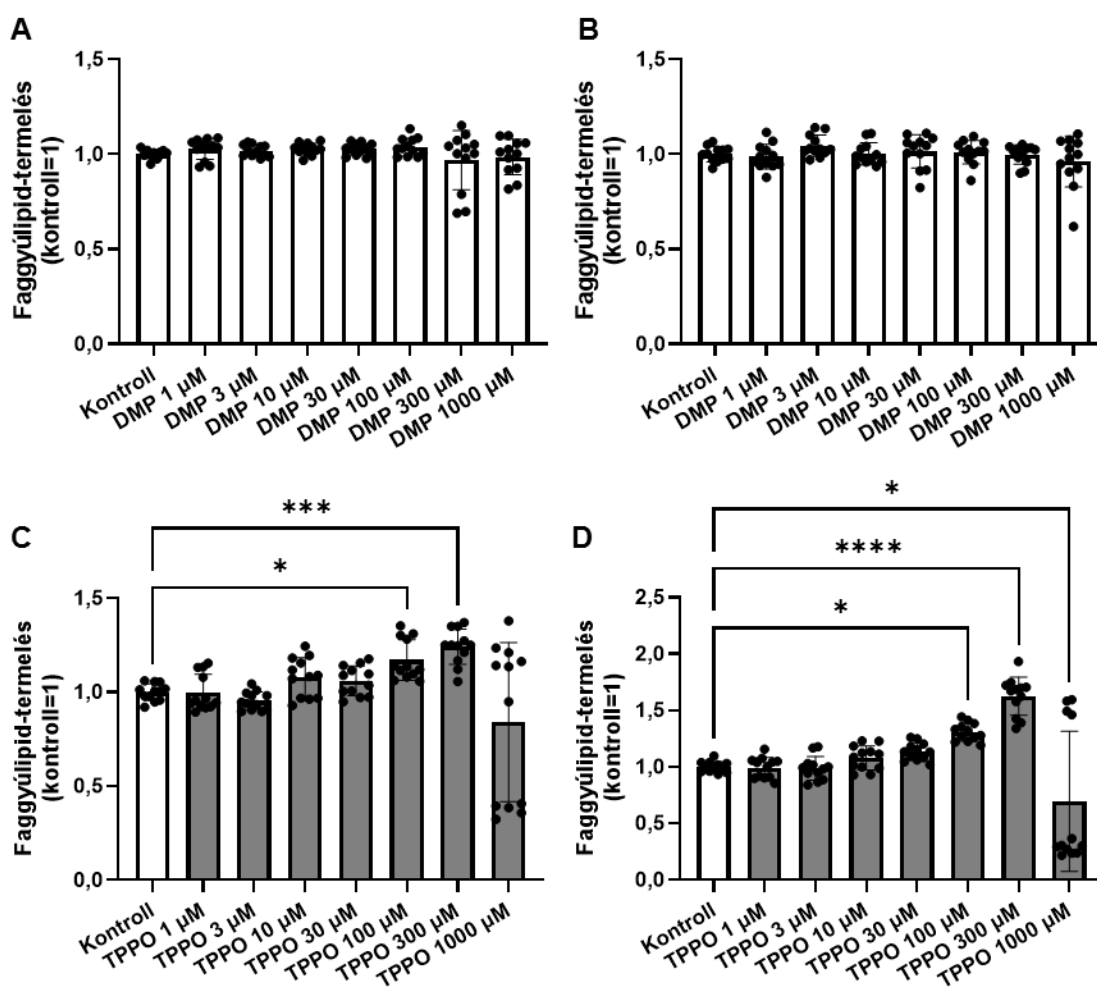
24. ábra

300 µM-ig a DMP és a TPPO nem csökkenti a sejtszámot

Nile Red jelölés, poláros lipidek. Az SZ95 sebocitákat egy TRPM5 antagonistá (TPPO) és aktivátor (DMP) különböző koncentrációival kezeltük 24 (A és C), illetve 48 órán át (B és D). Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=11-12 (biológiai ismétlés); az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  a jelzésnek megfelelően (DMP: 2,5-dimetil-pirazin; TPPO: trifenilfoszfín-oxid).

Első lépésként megerősítettük az MTT-assay (22. ábra) során látott viabilitási adatainkat Nile Red jelölés segítségével is, melyhez a poláros, azaz membránlipidekből

származó fluoreszcencia intenzitást használtuk, mivel az így kapott jel arányos a sejtszámmal.<sup>188</sup> A 24 és 48 órás Nile Red mérés kimutatta, hogy 300  $\mu\text{M}$ -ig a TPPO és a DMP csak elhanyagolható mértékben befolyásolták a sejtszámmal korreláló poláris lipidek szintjét, de 1000  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban a TPPO jelentősen csökkentette azt. Így kijelenthető, hogy mind a TPPO, mind a DMP biztonsággal, a citotoxicitás veszélye nélkül alkalmazható 300  $\mu\text{M}$ -os koncentrációig (24. ábra).

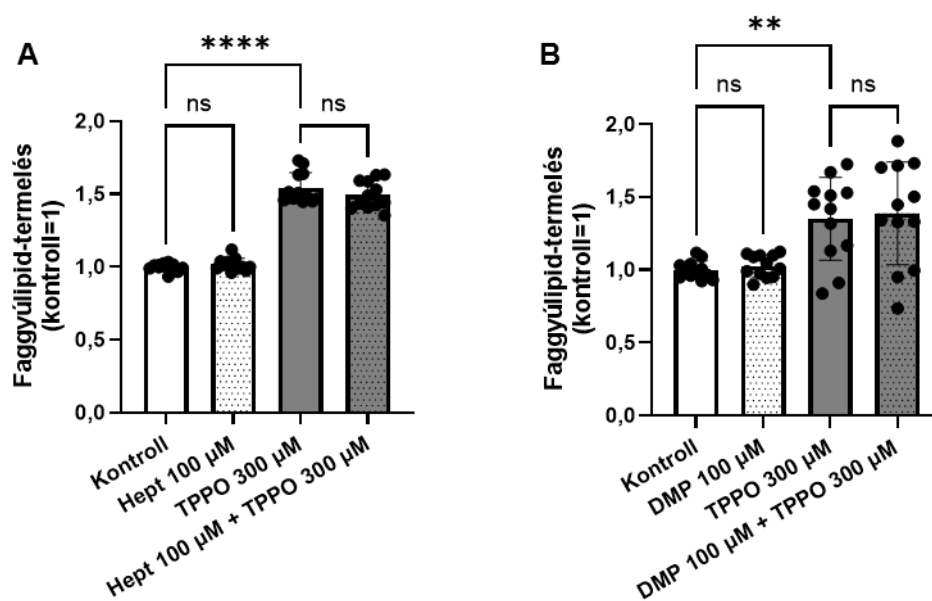


25. ábra

*A DMP nem befolyásolta a sebociták lipidtermelését, míg a TPPO szignifikánsan és koncentrációfüggő módon fokozta a lipogenezist*

Nile Red jelölés, neutrális lipidek. Az SZ95 sebocitákat egy TRPM5 antagonistá (TPPO) és aktivátor (DMP) különböző koncentrációival kezeltük 24 (A, C) vagy 48 órán át (B, D). Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk.  $N=12$  (biológiai ismétlés), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg; \* $P<0,05$ ; \*\*\* $P<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$  a jelzésnek megfelelően (DMP: 2,5-dimetil-pirazin; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).

A modulátorok faggyúlipidekre gyakorolt hatásának kimutatásához ismét a Nile Red-jelölést használtuk, de ezúttal a neutrális lipidek szintjét vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a DMP nem befolyásolta (25. *ábra/A, B*), míg a TPPO 24 és 48 órás kezelése során jelentősen és koncentrációfüggő módon növelte a szebociták lipidszintézisét (25. *ábra/C, D*). Ezt egyik TRPM5-aktivátor sem tudta kivédeni (26. *ábra/A, B*), ami (korábbi expressziós adatainkkal összhangban) arra utal, hogy a hatás TRPM5-független módon alakult ki.

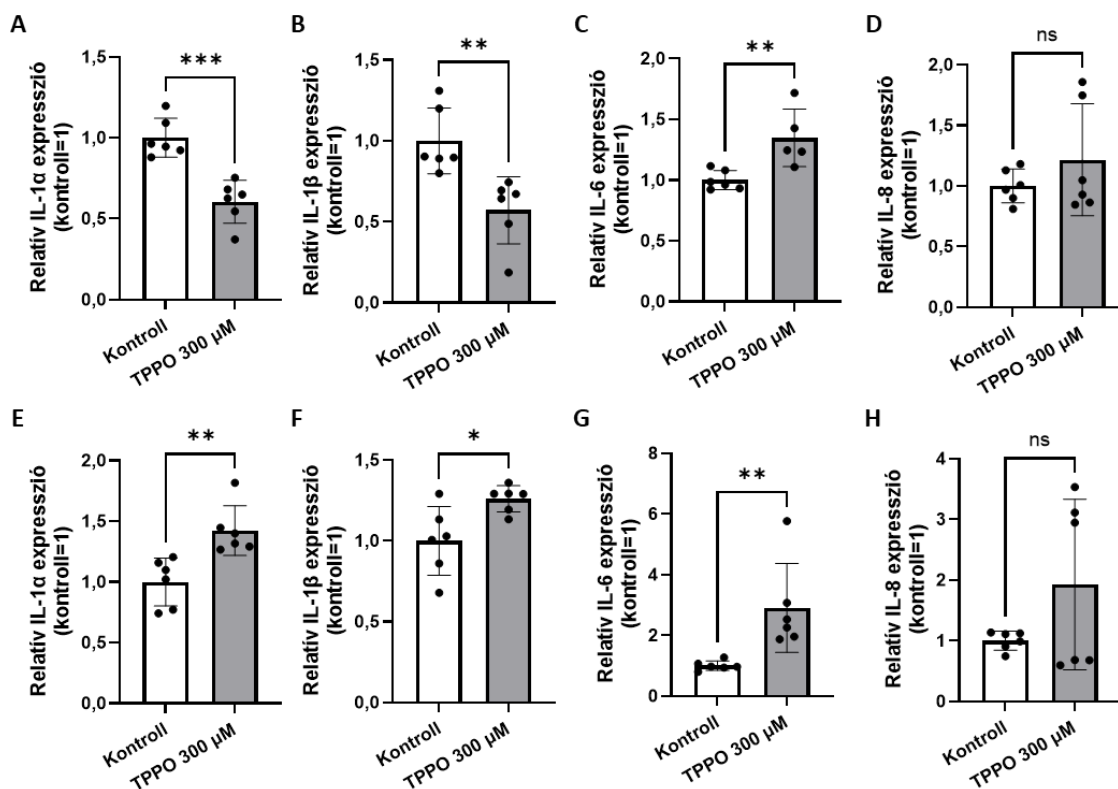


26. *ábra*

***A TPPO lipogén hatását egyik TRPM5-aktivátor sem tudta kivédeni***

*Nile Red* jelölés, a neutrális lipidek vizsgálata. Az SZ95 szebocitákat kombinált kezelésnek vetettük alá 48 órán keresztül: a sejteket a TPPO hatékony lipogén koncentrációjával (300 μM) és a két aktivátor egyikével, a Hept-nal (A) vagy a DMP-vel (B) kezeltük. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=12 (biológiai ismétlés), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,0001 a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns; DMP: 2,5-dimetil-pirazin; Hept: 2-heptanon; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).

A következő kérdés, amelyre a TPPO hatásával kapcsolatban a választ kerestük az volt, hogy hatékony lipogén koncentrációja hogyan befolyásolja a szebociták immunfenotípusát. A választ 3 és 24 órás TPPO-kezelést követően elvégzett RT-qPCR (27. *ábra*) és ELISA (28. *ábra*) kísérleteink adták meg.



27. ábra

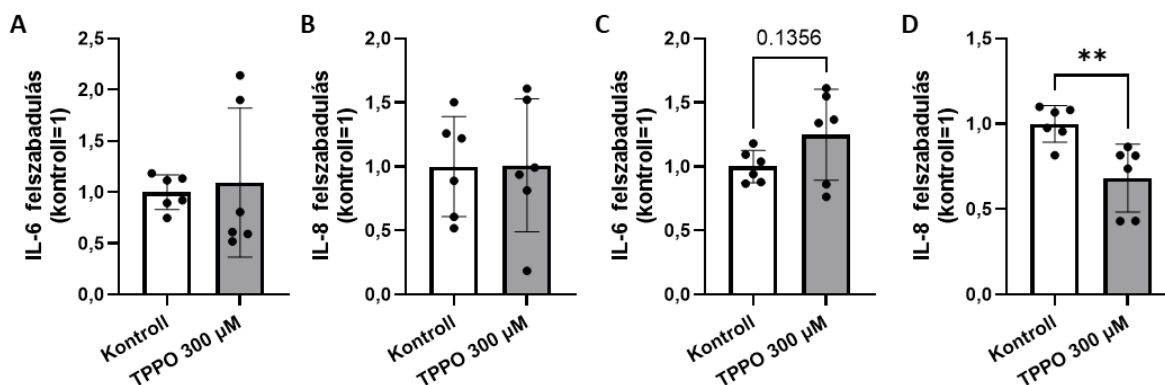
*A TPPO lipogén koncentrációja szignifikáns mértékben növelte az IL-6 mRNS szintű expresszióját, az IL-1α és az IL-1β kifejeződését differenciálтан befolyásolta, míg az IL-8-ra nem volt szignifikáns hatással*

*RT-qPCR. Az IL-1α (A, E), IL-1β (B, F), IL-6 (C, G) és IL-8 (D, H) mRNS szintű expressziója, 3 (A-D) vagy 24 órás (E-H) 300 μM-os TPPO kezelést követően. A  $\Delta\Delta CT$  módszert alkalmazva a belső kontrollként használt PPIA-ra történő normalizálást követően a relatív expressziót az oldószer kontroll esetében tapasztalható átlagos relatív expresszióra is normalizáltuk (a kontrollok átlaga = 1). N=5-6 (az adatpontok az egyes biológiai ismétléseket jelölik, melyek mindegyikét 3 technikai ismétlés átlagaként határoztuk meg), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; \*\*\*\*P<0,0001 a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns; IL: interleukin; PPIA: ciklofillin A, belső kontroll; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).*

A TPPO gyulladáshoz kapcsolódó citokinek expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy szignifikáns mértékben növelni tudta az IL-6 mRNS-szintű kifejeződését (27. ábra/C, G); az IL-1α és IL-1β kifejeződését differenciálтан befolyásolta (27. ábra/A, E és B, F), az IL-8 esetében pedig nem okozott szignifikáns eltérést (27. ábra/D, H).

Ezzel párhuzamosan az RT-qPCR során tesztelt tényezők felülírásából megvizsgáltuk TPPO citokin-fel szabadulásra gyakorolt hatását is. Azt tapasztaltuk, hogy a

TPPO nem befolyásolta szignifikáns mértékben az IL-6 (3 és 24 óra), illetve az IL-8 (3 óra) felszabadulását (28. *ábra/A-C*), viszont a 24 órás kezelések során jelentősen csökkentette az IL-8-szintet (28. *ábra/D*).



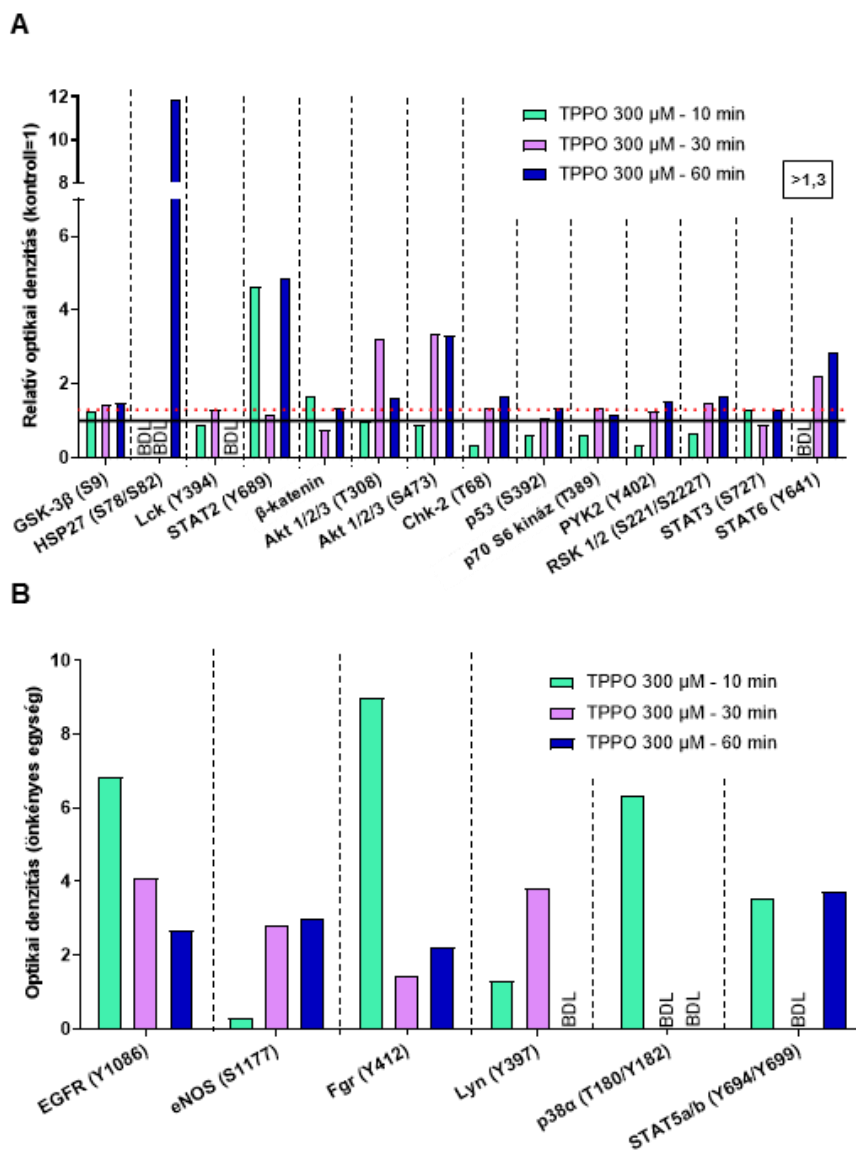
28. *ábra*

*A TPPO nem befolyásolja szignifikáns mértékben az IL-6 felszabadulását 3 és 24 órás kezelést követően, de csökkenti az IL-8 felszabadulást 24 órás kezelés után*

*ELISA. 3 (A, B) és 24 órás (C, D) 300 µM TPPO-kezelést követően az SZ95 szebociták felülírójából IL-6 (A, C) és IL-8 (B, D) citokin-felszabadulást mértünk. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=6 (az adatpontok az egyes biológiai ismétléseket jelölik, melyek mindegyikét 2 technikai ismétlés átlagaként határoztuk meg), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \*\*P<0,01 (IL: interleukin; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).*

### 5.1.3 *Az Akt és az EGFR aktiválása részt vesz a TPPO lipogén hatásának közvetítésében*

A TPPO hatásainak a közvetítésében résztvevő jelátviteli utak azonosítására foszfokináz array-t alkalmaztunk. Ahogy az *Anyagok és módszerek* részben már említésre került, az array lehetővé teszi, hogy egyidejűleg több releváns jelátviteli utat is vizsgálni tudjunk.



29. ábra

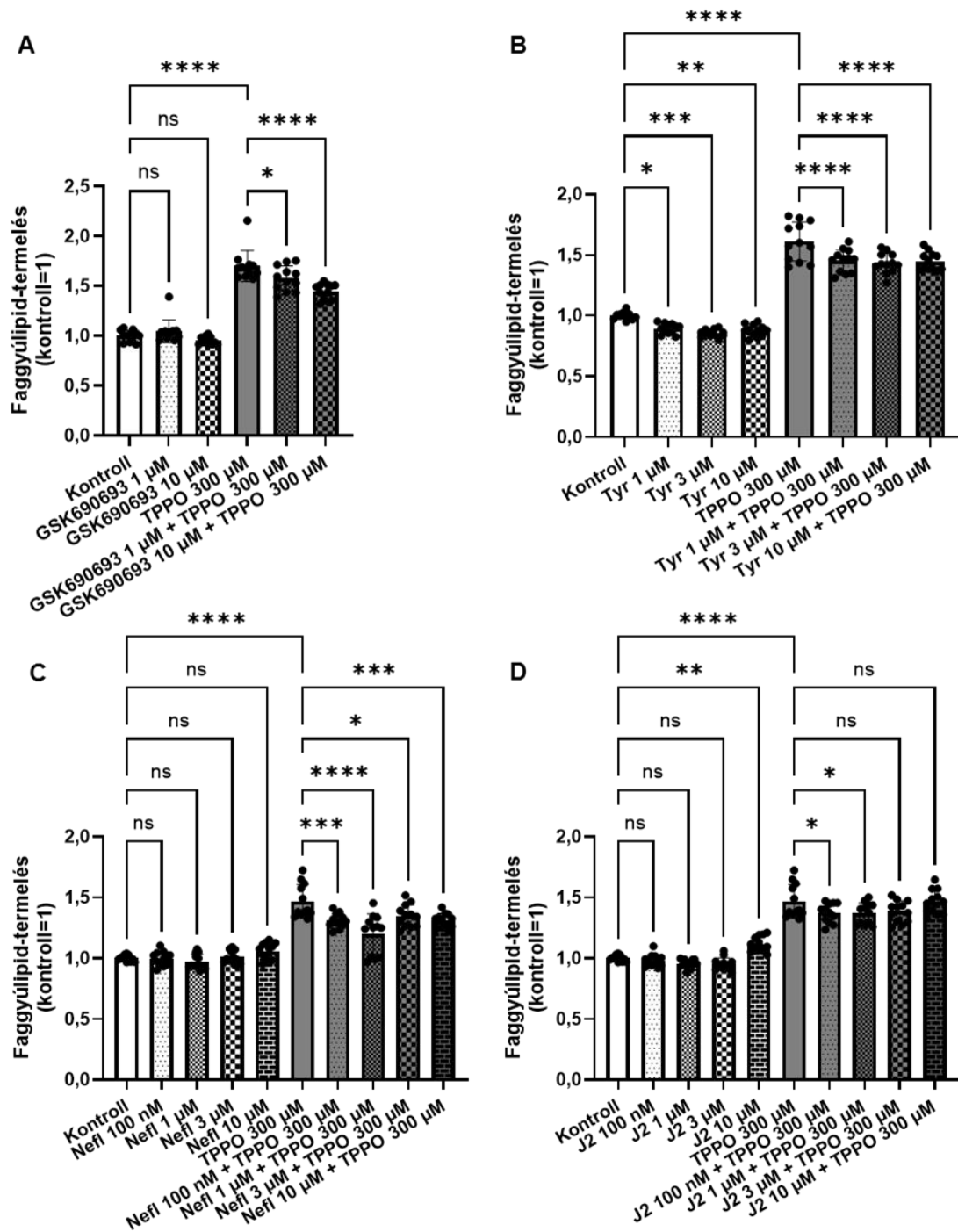
**A TPPO hatásait valószínűleg részben átfedő jelátviteli utak aktiválása közvetítheti**

Foszfokináz array (a releváns foszforilációs helyek zárójelben szerepelnek). Az SZ95 szebocitákat rövid távú (10, 30 és 60 perces) TPPO kezelésnek vetettük alá. Minden esetben 2 technikai ismétléssel dolgoztunk, melyek átlaga adta a jelintenzitást. (A) A háttérérték kivonását követően a jelintenzitásokat normalizáltuk az azonos molekula oldószerrel kezelt kontroll (10 perces kezelés) esetén mért jelintenzitásával (kontroll = 1; folytonos vonal). A jelintenzitás  $\geq 1,3$ -szoros TPPO-indukált növekedését tekintettük releváns változásnak (piros szaggatott vonal). (B) Amikor az oldószerrel kezelt kontroll csoportok jelintenzitása a háttérrel azonos vagy az alatti értéket mutatott, azokban az esetekben a háttérrel korrigált, nyers optikai densitás értékeket ábrázoltuk (BDL: detekciós küszöb alatti érték; Chk: checkpoint kináz; EGFR: epidermális növekedési faktor receptor; eNOS: endoteliális nitrogén-oxid-szintáz; Fgr: FGR proto-onkogén [src család tirozin-kináz]; GSK: glikogén szintáz kináz [gátló foszforiláció]; HSP: hő sokk fehérje; Lck: limfocita fehérje tirozin-kináz; Lyn: LYN proto-onkogén [src család tirozin-kináz]; MAPK: mitogén-aktivált protein kináz; PYK: prolinban-gazdag tirozin-kináz; RSK: riboszomális fehérje S6 kináz; STAT: „szignál transzducer és transzkripció aktivátor”; TPPO: trifenilfoszfín-oxid).

A kísérlet során 10, 30 és 60 perces kezelést követően a TPPO 300  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjának hatását vizsgáltuk. A rövidtávú kezelések több, „akne-releváns” jelátviteli molekula foszforilációját is időfüggő módon növelték, így egyebek mellett fokozódott az Akt,<sup>151,196,197</sup> a p38 $\alpha$  mitogén-aktivált protein kináz (MAPK),<sup>198</sup> epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)<sup>199</sup> és a p38 $\alpha$  MAPK down-stream molekulájaként is funkcionáló hősokk protein (HSP)-27<sup>200</sup> foszforilációja is (**29. ábra**). A fenti útvonalak gátlására GSK690693-at (Akt), tyrphostin AG 1478-at (EGFR), neflamapimidot (Nefl; p38 $\alpha$  MAPK), valamint J2-t (HSP27) használtunk. Ezen gátlószerek alkalmazásával kimutattuk, hogy az Akt (**30. ábra/A**), az EGFR (**30. ábra/B**) és a p38 $\alpha$  MAPK (**30. ábra/C**) gátlása jelentősen csökkenti a TPPO által kiváltott lipogenezist.

A poláros lipidek szintjének ellenőrzésekor bizonyítást nyert, hogy az Akt-inhibitor GSK690693 (**31. ábra/A**) és az EGFR-antagonista tyrphostin AG (**31. ábra/B**) nem befolyásolta a sejtszámmal arányos poláros lipidek szintjét, tehát az Akt és az EGFR gátlása nagy valószínűséggel valóban az egyedi sejtek TPPO-indukálta faggyúlipid-termelését gátolta. Ezzel szemben a p38 $\alpha$  MAPK-gátló Nefl szignifikánsan és koncentrációfüggő módon csökkentette a poláros lipidekből származó fluoreszcens jelet (**31. ábra/C**), ami arra utalt, hogy a liposztatikus hatás nagy valószínűséggel csak látszólagos volt, és valójában a sejtszám csökkenése okozta. Ezzel összhangban, amikor a p38 $\alpha$  MAPK down-stream effektoraként (is) funkcionáló<sup>200</sup> HSP27-et gátoltuk, a TPPO lipogén hatásának mérséklődése mellett (**30. ábra/D**) a poláris lipidek szintjének jelentős, koncentrációfüggő csökkentését figyeltük meg (**31. ábra/D**). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a p38 $\alpha$  MAPK – HSP27 tengely elsősorban a sejtek számára hat, és csak kisebb mértékben befolyásolja az egyedi sejtek faggyúlipid-termelését.

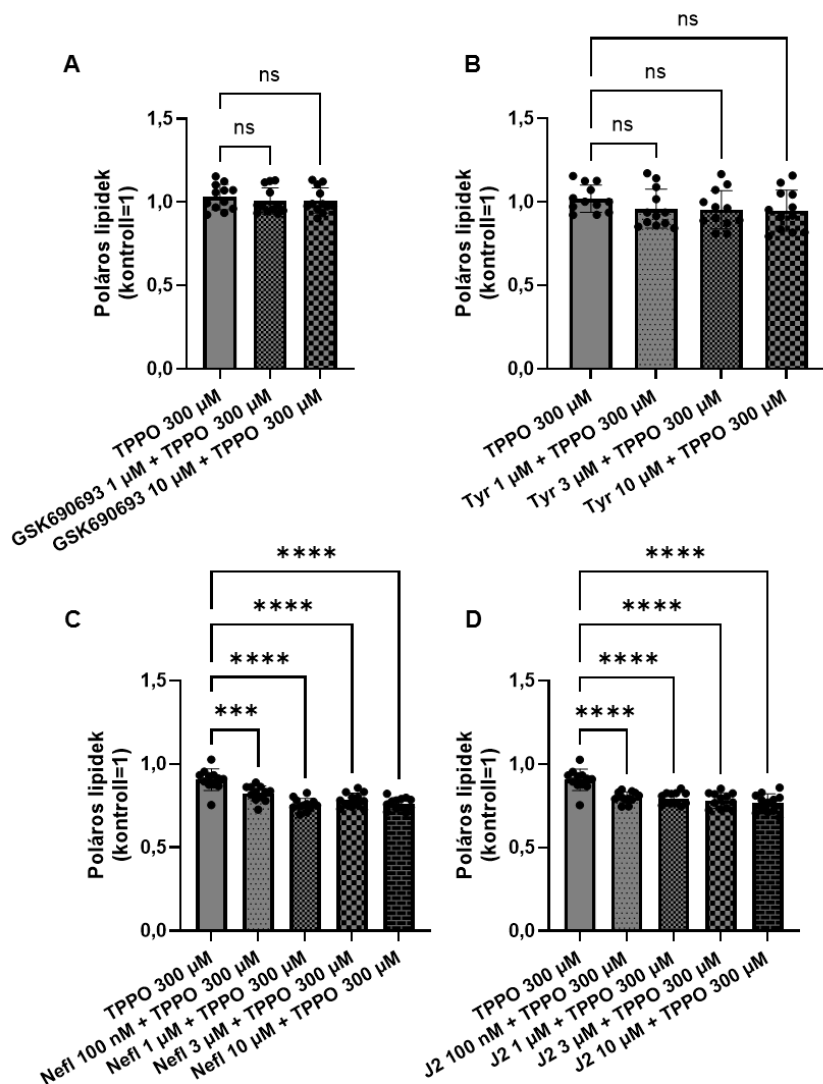
Kísérleteink következő lépéseként az EGFR szerepét siRNS-transzfekeció segítségével is megvizsgáltuk.



30. ábra

*A foszfokináz array alapján választott inhibitorok csökkentették az SZ95 szebociták TPPO által indukált, fokozott faggyúlipid-termelését*

*Nile Red jelölés, a neutrális lipidek vizsgálata. Az SZ95 szebociták lipogenezisét a jelzett 48 órás kezeléseket követően vizsgáltuk. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=12 (biológiai ismétlés), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg; \* $P$ <0,05; \*\* $P$ <0,01; \*\*\* $P$ <0,001; \*\*\*\* $P$ <0,0001 a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns; **GSK690693**: az Akt inhibitora; **Tyr**: tyrphostin AG 1478 [EGFR antagonist]; **Nefl**: neflamapimod [p38 $\alpha$  MAPK-inhibitor]; **J2**: a p38 $\alpha$  MAPK down-stream effektor HSP27 inhibitora; **TPPO**: trifenilfoszfin-oxid).*



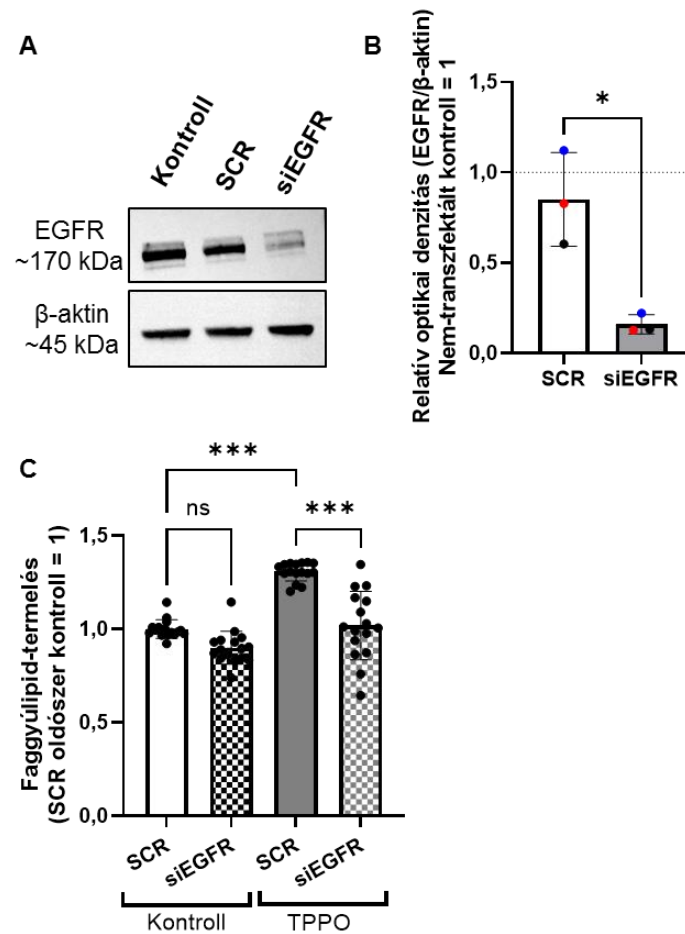
31. ábra

*Az Akt és az EGFR gátlószerei nem voltak hatással az SZ95 sebociták sejtszámára, míg a p38α MAPK és a HSP27 inhibitorai csökkentették azt*

*Nile Red jelölés, a sejtszámmal korreláló poláros lipidek vizsgálata. Az SZ95 tenyészetek sejtszámát a jelzett 48 órás kezeléseket követően vizsgáltuk. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=12 (biológiai ismétlés), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,0001 a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns; J2: a p38α MAPK down-stream effektor HSP27 inhibitora; GSK690693: az Akt inhibitora; Tyr: tyrphostin AG 1478, az EGFR antagonistája; Nefl: neflamapimod, a p38α MAPK inhibitora; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).*

Amint az ábrán látható, az előzetes kísérletek alapján kiválasztott siRNS konstrukt a transzfekció utáni 4. napon szignifikánsan csökkentette az EGFR expresszióját (32. ábra/A-

**B**), a géncsendesítés pedig (az EGFR antagonistával nyert eredményekkel összhangban) lényegében teljesen kivédte a TPPO lipogén hatását (32. *ábra/C*).



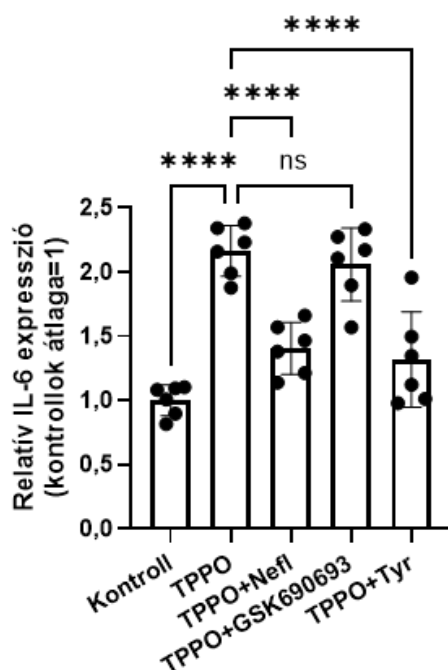
32. *ábra*

**Az EGFR siRNS-mediált csendesítése hatékonyan csökkentette a TPPO lipogén hatását**

Az EGFR siRNS-mediált géncsendesítése. (A-B) Western blot. A mintákat 96 órával a transzfekeció után gyűjtöttük be. Az „A” panelen az EGFR és a  $\beta$ -aktin (loading kontroll) reprezentatív western blotja; a „B” panelen a western blotok optikai denzitometriás elemzésének eredményei láthatóak. A nem transzfekektált kontroll tenyészetek átlaga 1 (szaggatott vonal). Az előzetesen kiválasztott EGFR-specifikus siRNS konstrukt szignifikánsan csökkentette a western blot sávok relatív optikai denzitását a scrambled kontrollhoz viszonyítva.  $N=3$  (független transzfekecióből származó biológiai ismétlés, minden szín egy független kísérlet adatait jelöli), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. (C) Nile Red jelölés, a neutrális lipidek vizsgálata. Az SZ95 szebociták faggyúlipid-termelését a transzfekeciót követő 4. napon kezdve, 48 órás kezelést (300  $\mu$ M TPPO) követően vizsgáltuk. Az adatokat az oldószerrel kezelt SCR kontroll csoport átlagára normáltuk.  $N=16$  (biológiai ismétlés), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg; \* $P<0,05$ ; \*\*\* $P<0,001$  a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns, SCR: scrambled kontroll; siEGFR: EGFR-specifikus siRNS-konstrukt; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).

### 5.1.4 A TPPO által indukált IL-6 up-reguláció független a lipogén Akt-jelátviteltől, és valószínűleg az EGFR és a p38α MAPK útvonalak közvetítik

Az inhibitorok leghatásosabb liposztatikus koncentrációinak (Nefl: 1 μM, GSK690693: 10 μM, tyrphostin AG: 10 μM) segítségével megvizsgáltuk a már említett jelátviteli útvonalak szerepét a TPPO indukálta IL-6 up-regulációban is.



33. ábra

**A TPPO által indukált IL-6 up-reguláció független a lipogén Akt-jelátviteltől, és valószínűleg az EGFR, valamint a p38α MAPK közvetítik**

RT-qPCR. Az IL-6 mRNS szintű expressziója a jelzett 24 órás kezeléseket követően. A  $\Delta\Delta CT$  módszert alkalmaztunk, amely során a belső kontrollként használt PPIA expressziójára történő normalizálást követően a relatív expressziót az oldószer kontroll esetében tapasztalható relatív expresszióra is normalizáltuk (a kontroll átlaga = 1). N=6 (az adatpontok az egyes biológiai ismétléseket jelölik, melyek mindegyikét 3 technikai ismétlés átlagaként határoztuk meg), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg; \*\*\*\*P<0,0001 a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns; IL: interleukin; GSK690693: az Akt inhibitora; Nefl: neflamapimod, a p38α MAPK inhibitora; PPIA: ciklofillin A, belső kontroll; Tyr: tyrphostin AG 1478 [EGFR antagonist]; TPPO: trifenilfoszfín-oxid).

Megállapítottuk, hogy a Nefl, illetve tyrphostin AG alkalmazása szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni a TPPO által kiváltott IL-6 up-regulációt, míg az Akt-

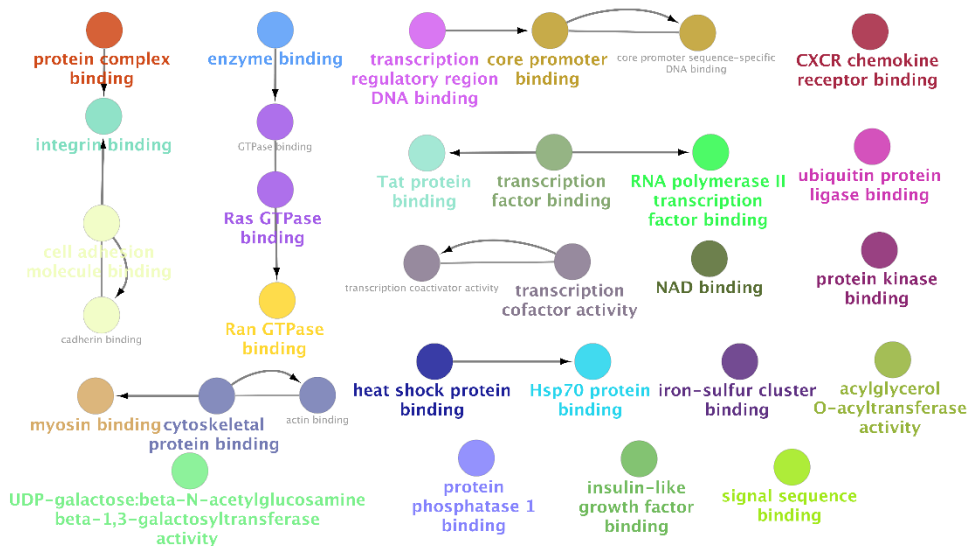
gátló GSK690693 nem befolyásolta azt (**33. ábra**). Eredményeink az jelentik, hogy a TPPO-indukált IL-6 up-reguláció valószínűleg független a lipogén Akt-jelátviteltől, és inkább az EGFR és a p38 $\alpha$  MAPK aktivációjának eredményeként alakulhat ki.

*5.1.5 Az RNS-Seq elemzés eredményei arra utalnak, hogy a TPPO jelentősen befolyásolja a humán szebociták immunfenotípusát, és hatással van számos potenciálisan „akne-releváns” célgén kifejeződésére*

Hogy mélyebb betekintést kapjunk a TPPO hatásának mechanizmusába, az SZ95 szebocitákat 24 órás kezelésnek vetettük alá: a sejteket 300  $\mu$ M TPPO-val vagy kontrollként oldószerrel kezeltük, majd a begyűjtött mintákat RNS szekvenálással elemeztük.

Fontos kiemelni, hogy az RT-qPCR eredményeinkkel összhangban, mely során sem a pre-, sem a posztkonfluens szebocitákban nem volt detektálható a csatorna mRNS-szintű expressziója (**6. táblázat**), a szekvenálás során sem jelent meg a vizsgált mintákban TRPM5-specifikus szekvencia, ami ismét amellet szól, hogy a humán faggyúmirigysejtek valóban nem expresszálják a csatornát.

A szekvenálást követő „GO:molekuláris funkció” útvonal adatbázisának használatával, a szignifikánsan ( $\geq 1,5$ -szeres változás [„fold-change”],  $P < 0,05$ ) up-, illetve down-regulálódó gének felhasználásával végzett elemzés kimutatta, hogy a TPPO-kezelés számos „szebocita-releváns” útvonalat is modulált, többek között a „CXCR kemokin receptor kötődés”-t, az „acilglicerín-O-aciltranszferáz aktivitás”-t, és az „inzulinszerű növekedési faktor kötődés”-t (**34. ábra**).

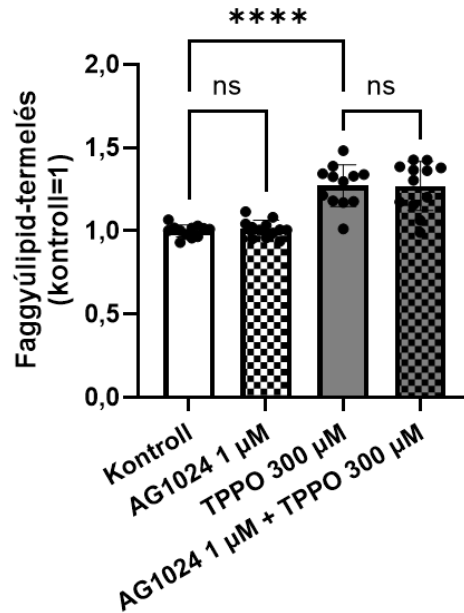


34. ábra

**Az RNS szekvenálást követő útvonalelemzés alapján a TPPO kezelés számos „szebocita-releváns” útvonalat is modulált**

RNS szekvenálást követő útvonalanalízis a szignifikánsan ( $\geq 1,5$ -szeres változás [„fold-change”],  $P < 0,05$ ) up-, illetve down-regulálódó gének felhasználásával. Az SZ95 szebocitákat 24 órás kezelésnek vetettük alá (oldószer kontroll, illetve 300  $\mu\text{M}$  TPPO). Az elemzést a „GO:molekuláris funkció” adatbázis használatával végeztük. A TPPO kezelés számos „szebocita-releváns” útvonalat is modulált, többek között a „CXCR kemokin receptor kötődés”-t, az „acilglicerol-O-aciltransferáz aktivitás”-t és az „inzulinszerű növekedési faktor kötődés”-t.

Mivel a inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor (IGF-1R) a faggyúmirigyek lipogenezisének egyik ismert pozitív regulátora<sup>196,201</sup> és a szebociták Akt szignalizációjának egyik lehetséges up-stream szabályozója,<sup>196</sup> a fenti elemzés ismeretében felmerült annak a lehetősége, hogy a TPPO közvetlenül vagy közvetve aktiválhatja az IGF-1R-t, és ez lehet felelős a lipogén hatás kialakulásáért. A kérdés eldöntésére Nile Red jelölést alkalmaztunk. Eredményeink alapján az IGF-1R antagonistá AG1024 nem befolyásolta a TPPO által fokozott faggyúlipid-termelést (35. ábra), ami azt jelzi, hogy az IGF-1R valószínűleg nem célpontja a TPPO-nak.

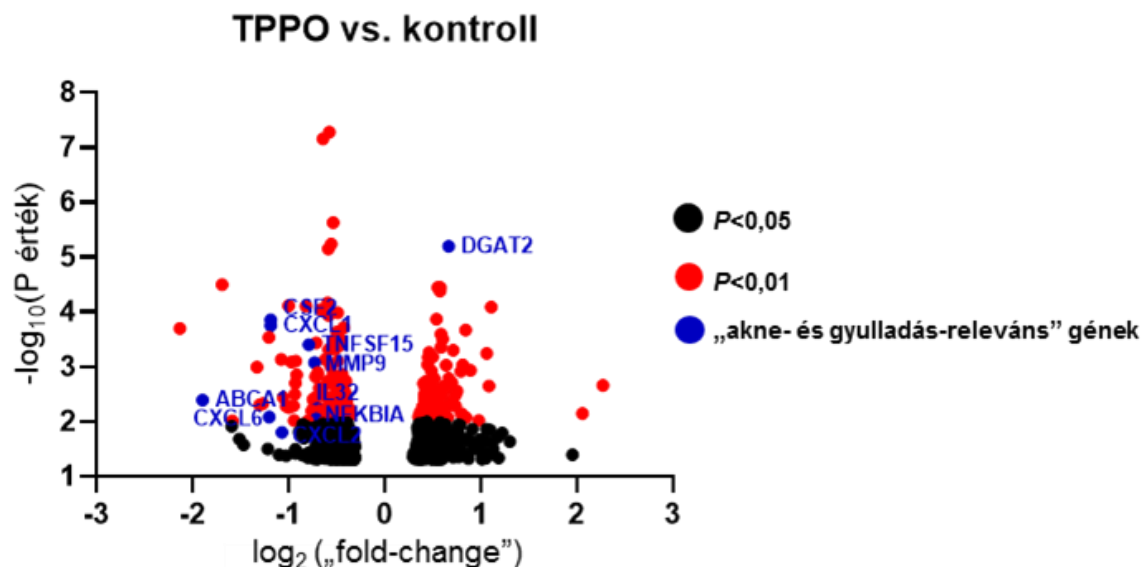


35. ábra

**Az IGF-1R antagonistája AG1024 nem védte ki a TPPO lipogén hatását**

*Nile Red* jelölés, a neutrális lipidek vizsgálata. Az SZ95 szebociták lipogenezisét a jelzett 48 órás kezeléseket követően vizsgáltuk. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk.  $N=12$  (biológiai ismétlés), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg; \*\*\*\* $P<0,0001$  a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns; AG1024: IGF-1R antagonistája; IGF-1R: inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).

A fentiekén túl, az analízis számos olyan fontos célgén-t is azonosított, melyekre a TPPO szignifikáns ( $\geq 1,5$ -szeres változás [„fold-change”],  $P<0,05$ ) hatással volt. Csökkentette több, „akne-releváns”, gyulladásos és egyéb molekula expresszióját is, többek között a kolóniastimuláló faktor 2 (CSF2, más néven granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor [GM-CSF]), C-X-C motívumú kemokin ligand 1 (CXCL-1, más néven GRO- $\alpha$ ), CXCL2, CXCL6,<sup>202–204</sup> IL-32<sup>205</sup>, NFKB inhibitor  $\alpha$  (NFKBIA)<sup>206</sup>, tumornekrózis faktor szupercsalád 15-ös tag (TNFSF15)<sup>207</sup>, mátrix metalloproteináz 9 (MMP9)<sup>208</sup>, illetve az ATP-kötő kazetta A alcsalád 1-es tag (ABCA1)<sup>209</sup>, míg növelte a diacilglicerín O-aciltranszferáz 2 (DGAT2)<sup>210,211</sup> expresszióját (36. ábra).



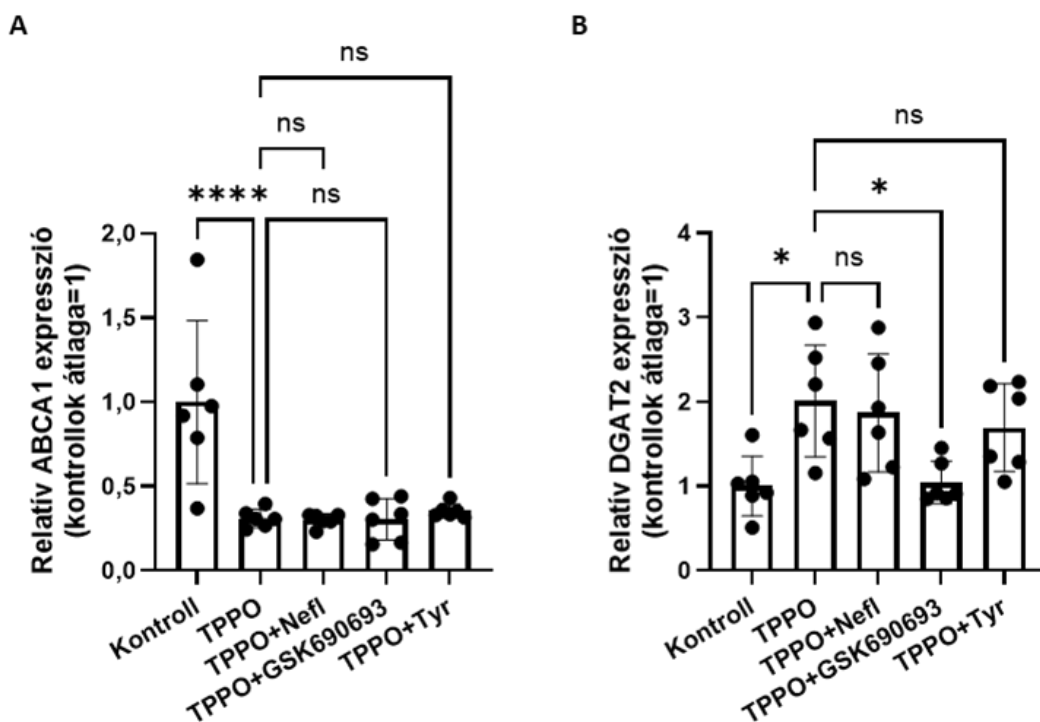
36. ábra

*Az RNS szekvenálás útvonalelemzése kimutatta, hogy a TPPO kezelés számos „szebocita-releváns” útvonalat is modulált*

RNS szekvenálás. Az összes szignifikáns ( $P < 0,05$ ) változást mutató gén felhasználásával létrehozott vulkán-diagram. A **piros** pontok a jelentősebb ( $P < 0,01$ ) változásokat mutató géneket jelzik, míg a leginkább „akne-” és „gyulladás-releváns” gének **kékkel** vannak kiemelve, és a megfelelő pontok mellett meg vannak nevezve. A rövidítések feloldását lásd a szövegben.

Mivel az ABCA1<sup>-/-</sup> egereknél nagyobb faggyúmirigyeket és a bőrben magasabb szabad koleszterinszintet mutattak ki,<sup>209</sup> illetve a DGAT2-ről ismert, hogy a triglicerid szintézis egyik kulcsenzime,<sup>210,211</sup> így a következőkben azt vizsgáltuk 24 órás kezeléseket követően, hogy az Akt-, a p38α MAPK-, illetve az EGFR-útvonal aktiválásának van-e szerepe az ABCA1 down-regulációjában, illetve a DGAT2 up-regulációjában.

Eredményeink azt mutatják, hogy a TPPO valóban képes volt a DGAT2 expresszióját fokozni az ABCA1 expresszióját pedig csökkenteni 24 órás kezelést követően (37. ábra). A 300 μM TPPO ABCA1-ra kifejtett hatását egyik gátlószer sem befolyásolta (37. ábra/A). Ezzel szemben a DGAT2 up-regulációját az Akt-inhibitor GSK690693 (10 μM) kivédte, míg a p38α MAPK (Nefl; 1 μM) és az EGFR (tyrphostin AG; 10 μM) gátlása nem befolyásolta (37. ábra/B).



37. ábra

**A TPPO által indukált lipogenezist a DGAT2 Akt-függő up-regulációja, valamint az ABCA1 expresszióját csökkentő alternatív jelítviteli utak válthatják ki**

RT-qPCR. Az ABCA1 (A) és a DGAT2 (B) mRNS-szintű expressziójának vizsgálata a jelzett 24 órás kezeléseket követően. A  $\Delta\Delta CT$  módszert alkalmazva a belső kontrollként használt PPIA-ra történő normalizálást követően a relatív expressziót az oldószer kontroll esetében tapasztalható relatív expresszióra is normalizáltuk (a kontrollok átlaga = 1). N=6 (az adatpontok az egyes biológiai ismétléseket jelölik, melyek mindegyikét 3 technikai ismétlés átlagaként határoztuk meg), az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg; \* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  a jelzésnek megfelelően (ns: nem szignifikáns ABCA1: ATP-kötő kazetta alcsalád A 1; DGAT2: diacilglicerín-O-aciltranszferáz 2; GSK690693: az Akt inhibitora; Nefl: neflamapimod, a p38 $\alpha$  MAPK inhibitora; PPIA: ciklofillin A, belső kontroll; Tyr: tyrphostin AG 1478, az EGFR antagonistája; TPPO: trifenilfoszfin-oxid).

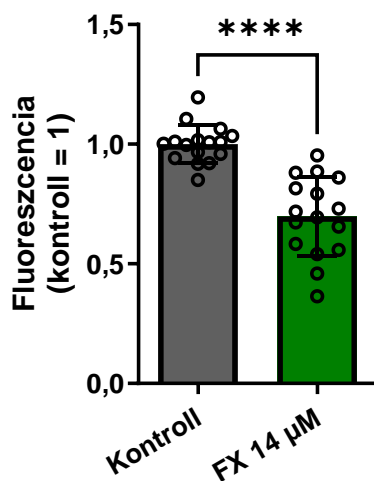
Eredményeink alapján tehát a TPPO által indukált lipogenezis nagy valószínűséggel a DGAT2 Akt-függő up-regulációja és az EGFR-aktivációja következtében alakul ki, amihez hozzájárulhat az ABCA1 (Akt-, p38 MAPK- és EGFR-független) down-regulációja is.

## 5.2 *A fluoxetin (FX) hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja (14 $\mu$ M) antiproliferatív hatást fejt ki humán epidermális keratinocitákon*

Munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy a FX 14  $\mu$ M-ban alkalmazva erős gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a humán epidermális keratinocitákon, és a PI3K útvonal közvetett gátlásán keresztül csökkenti a TLR3 aktivátor p(I:C) által kiváltott viszketés-közvetítő endotelinek felszabadulását is.<sup>30</sup> Tekintettel arra, hogy a PI3K útvonal a gyulladással kapcsolatos folyamatok mellett az epidermális keratinociták proliferációjának is fontos pozitív szabályozója,<sup>176</sup> kísérleteink során azt tűztük ki célul, hogy felderítsük, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja hogyan hat a humán epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára hagyományos 2D sejt kultúrákban és 3D rekonstruált epidermális ekvivalens modellben hosszabb (48-72 órás) kezeléseket követően. A kísérletek során használt donorok adatai az *Anyagok és módszerek* fejezetben találhatóak (**2. táblázat**), az eredmény ábrákon a különböző színű adatpontok a különböző donorokat jelölik.

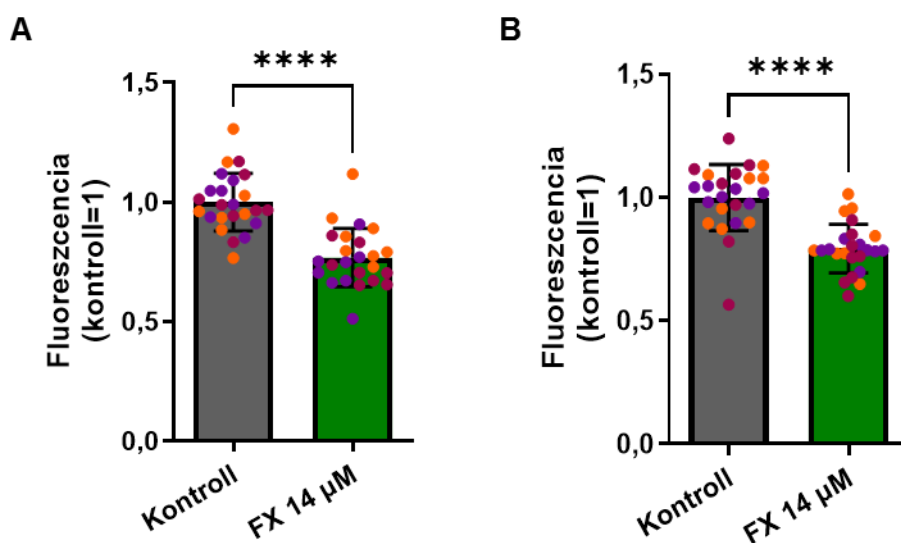
### 5.2.1 *A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja gátolja az epidermális keratinociták proliferációját*

A proliferációs vizsgálatokhoz először CyQUANT-assay-t alkalmaztunk, mely során a hagyományos „2D” keratinocita kultúrákat oldószerrel, illetve 14  $\mu$ M FX-nel kezeltük. A HaCaT humán immortalizált keratinociták esetében látható volt, hogy a FX kezelés gátolta a sejtek proliferációját 48 órás kezelést követően (**38. ábra**), és ez a hatás reprodukálható volt primer sejtek esetében is: az antiproliferatív hatást NHEK tenyészetek esetében 48 és 72 órás kezelést követően is megfigyeltük (**39. ábra**). A modellhez felhasznált primer keratinociták donorainak releváns anamnesztikus adatai a **2. táblázatban** találhatóak.



38. ábra  
*A FX gátolja a HaCaT keratinociták proliferációját*

CyQUANT-assay. A HaCaT keratinociták proliferációját a jelzett 48 órás kezelést követően vizsgáltuk. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=16 (biológiai ismétlés), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg. \*\*\*\*P<0,0001 a jelzésnek megfelelően (FX: fluoxetin).

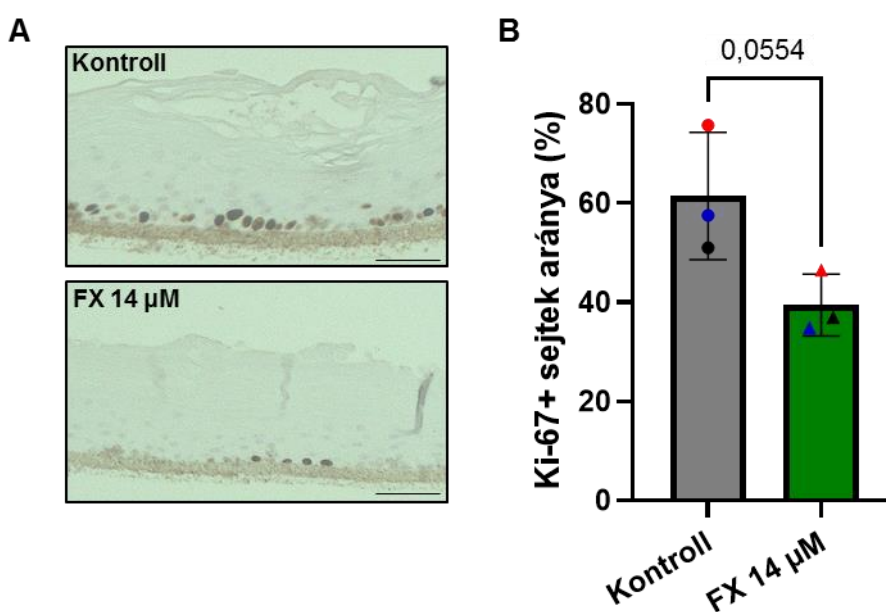


39. ábra  
*A FX gátolja a NHEK-k proliferációját*

CyQUANT-assay. 3 különböző donor keratinocitáinak proliferációját vizsgáltuk a jelzett 48 (A), illetve 72 órás (B) kezelést követően. Az adatokat az oldószerrel kezelt kontroll csoport átlagára normáltuk. N=24 (3 független donor, 8-8 biológiai ismétléssel), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg. A különböző színű adatpontok a különböző donorokat jelölik. \*\*\*\*P<0,0001 a jelzésnek megfelelően (FX: fluoxetin).

Következő lépésként a HaCaT és a NHEK esetében látott antiproliferatív hatást egy „*in vivo-szerűbb*” modellrendszerben (3D rekonstruált humán epidermisz-ekvivalens) is ellenőriztük. A modellhez felhasznált primer keratinocitákra vonatkozó elérhető információk az *Anyagok és módszerek* fejezet **3. táblázatában** található. Tenyészteteinket 48 órás FX kezelésnek (14  $\mu$ M) vetettük alá. A mintafeldolgozást követően elsőként Ki-67 immunjelölést alkalmaztunk, hiszen, mint ismert, a Ki-67 nukleáris megjelenése a sejtproliferáció jellemző, széleskörben alkalmazott, megbízható markere.<sup>212</sup>

A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy (a CyQUANT mérések eredményeivel összhangban) a FX mind a három donor esetén egyértelműen csökkentette a Ki-67+, azaz proliferáló sejtek arányát, a hatás azonban (a Ki-67+ sejtmagok arányának kontrollcsoportban tapasztalható erős donorfüggése miatt) nem volt statisztikailag szignifikáns ( $P=0,0554$ ) (**40. ábra**).



**40. ábra**

***A FX minden donor esetén csökkenti a Ki-67+ sejtmagok arányát 3D modellben***

*Ki-67 immunhisztokémia. A 3D epidermisz-ekvivalenseket 48 órán keresztül a jelzett módon kezeltük. (A) A Ki-67 jelölés reprezentatív képei; méretvonal: 50  $\mu$ m. (B) A Ki-67 immunhisztokémia statisztikai elemzése. N=3 donor, az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. A különböző színű adatpontok a 3 különböző donort jelölik (FX: fluoxetin).*

A fenti donorfüggés kiküszöbölésére a vizsgálatainkat az egyes donorok szintjén végeztük a Fisher-féle egzakt teszt segítségével folytattuk. Az elemzés kimutatta, hogy az FX hatása a proliferáló (Ki-67+) és a nem proliferáló (Ki-67-) sejtek számára mindhárom donor esetében erősen szignifikáns volt ( $P=0,0016$ ,  $P<0,0001$  és  $P=0,0001$ ; az elemzés eredményeit a 7. táblázat foglalja össze), így eredményeink arra utalnak, hogy a FX hatékony gyulladásgátló koncentrációja (véltetőleg a pro-proliferatív PI3K útvonal indirekt gátlása révén)<sup>30</sup> hosszabb távú kezelések során valóban csökkenti a hámsejtek proliferációját.

### 7. táblázat

*A FX mindhárom donor esetén egyértelmű antiproliferatív hatást fejt ki a 3D epidermisz-ekvivalens modellben (kontingencia táblázat, Fisher-féle egzakt teszt)*

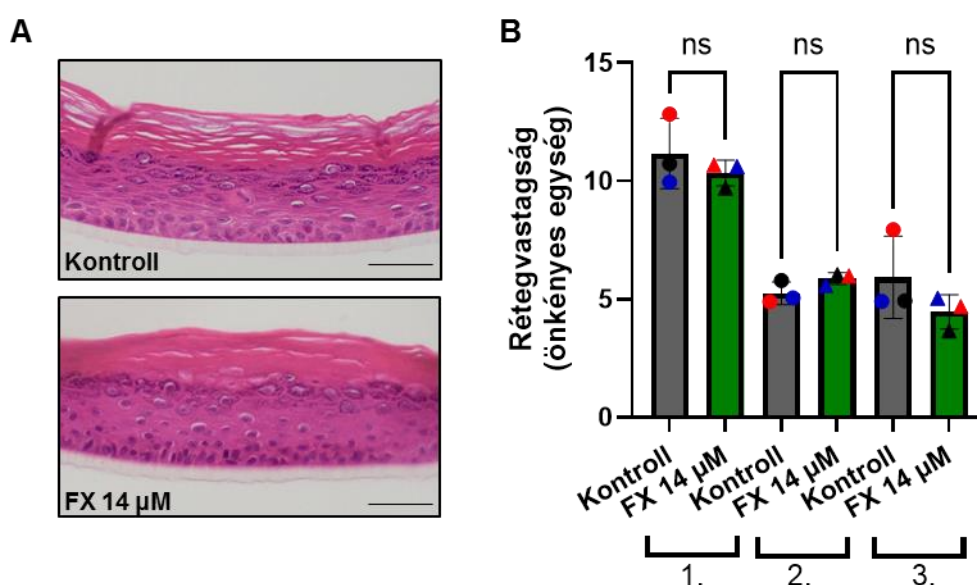
Donor	Kezelés	Ki-67- magok száma	Ki-67+ magok száma	P érték
<b>KC-36</b>	Kontroll	116	121	<b>0,0016</b>
	FX 14 $\mu$ M	169	99	
<b>KC-37</b>	Kontroll	61	191	<b>&lt;0,0001</b>
	FX 14 $\mu$ M	54	47	
<b>KC-38</b>	Kontroll	70	95	<b>0,0001</b>
	FX 14 $\mu$ M	86	46	

#### 5.2.2 A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja nem befolyásolja jelentősen a humán epidermális keratinociták differenciálódását és barrierképző képességét

A proliferációs vizsgálatokat követően azt is megvizsgáltuk, hogy a FX gyulladáscsökkentő koncentrációja (14  $\mu$ M) miként befolyásolja az epidermális keratinociták differenciációját, és ezen keresztül a barrierformáló képességüket.

A 3D modell ismételt felhasználásával először az epidermális sejtrétegek vastagságának alakulását vizsgáltuk FX kezelést követően hematoxilin-eozin (HE) festés

segítségével. Az metszetekről készült felvételek felhasználásával képanalízist végeztünk, mely során lemértük a teljes rekonstruált epidermisz vastagságát, valamint a *stratum basale*tól a *stratum granulosum*ig terjedő terület vastagságát, és ezek alapján kiszámoltuk a *stratum corneum* vastagságát. Minden értéket a transzwell-filter (állandónak tekintett) vastagságára normalizáltunk, hogy kiszűrjük a metszési sík eltéréseiből adódó esetleges különbségeket. A hisztomorfometriai elemzés azt mutatta, hogy a FX kezelés nem okozott szignifikáns változást az epidermisz rétegeinek vastagságában (41. ábra).



41. ábra

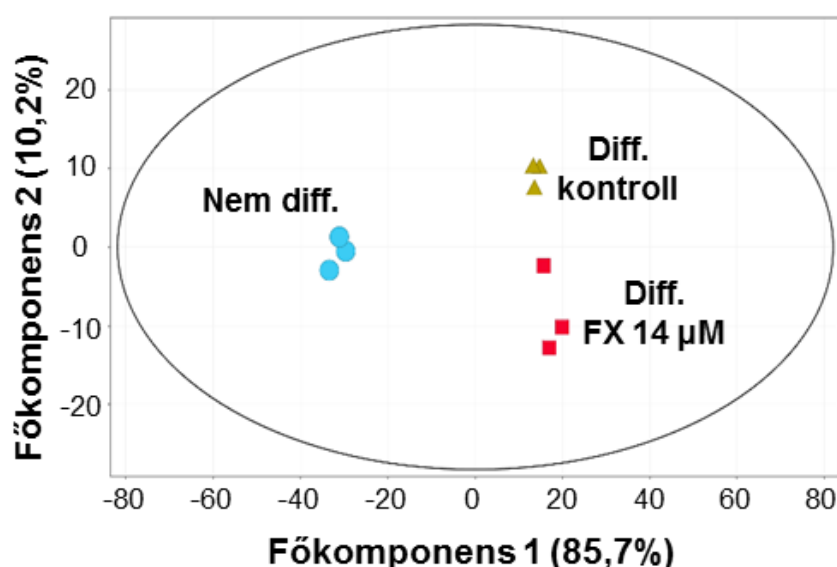
**A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja nem okoz szignifikáns eltérést az epidermisz rétegeinek vastagságában**

*Hematoxilin-eozin festés 3D epidermisz-ekvivalensben. (A) A hematoxilin-eozin festés reprezentatív képei; méretvonal: 50 µm. (B) A hematoxilin-eozin festéssel meghatározott kiválasztott epidermális rétegek vastagságának statisztikai elemzése; 1.: az epidermisz teljes vastagsága; 2.: a stratum basale-tól a stratum granulosum tetejéig mért rétegvastagság; 3.: a stratum corneum (számított) vastagsága. A vastagságot önkényes egységekben mértük, és az adatokat a transzwell-filter (állandónak tekintett) vastagságára normalizáltuk. N=3 donor; az adatokat átlag±SD formában adtuk meg. A különböző színű adatpontok a különböző donorokat jelölik (FX: fluoxetin).*

Hogy mélyebb betekintést nyerjünk a FX hatásaiba, RNS szekvenálást végeztünk prekonfluens, azaz aktívan proliferáló, valamint differenciálódó HaCaT keratinocitákon,

amelyeket a posztkonfluens állapot elérése után magas  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú tápoldatban 24 órán keresztül oldószer, illetve FX (14  $\mu\text{M}$ ) kezelésnek vettünk alá.

Amint azt a főkomponens-elemzés kimutatta, a FX-nek nem volt jelentős hatása a génextpressziós mintázatnak a sejtek differenciációjával összefüggő változásaira, mivel az oldószerrel és a FX-nel kezelt csoportok a minták közötti összes különbség 85,7%-áért felelős 1. főkomponens alapján lényegében nem különböztek egymástól (**42. ábra**).



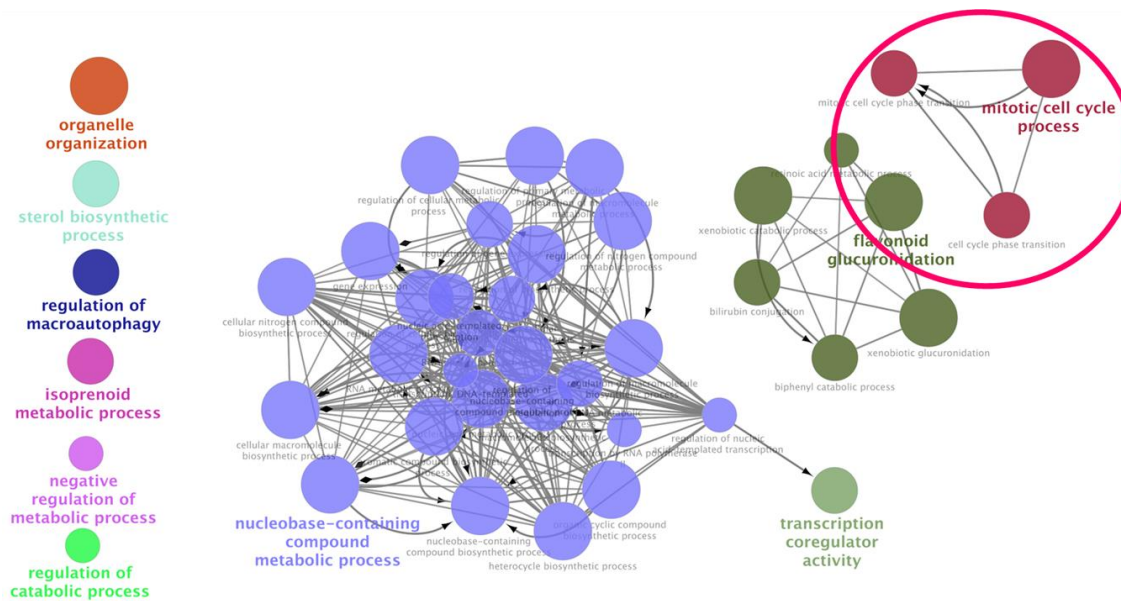
**42. ábra**

**A HaCaT keratinocitákban a FX kezelés nem volt hatással génextpressziós mintázat differenciációval összefüggő változásaira**

RNS szekvenálás, főkomponens-elemzés proliferáló és differenciálódó HaCaT keratinocitákon. A differenciálódó keratinocitákat a jelzettnek megfelelően kezeltük (**Nem diff.**: nem differenciáltatott, proliferáló keratinociták; **Diff.**: differenciáltatott [és oldószerrel kezelt] keratinociták; **FX**: fluoxetin).

A fentiekkel összhangban azt találtuk, hogy viszonylag alacsony volt azoknak a géneknek a száma, amelyeket az FX szignifikánsan ( $\geq 2$ -szeres változás [„fold-change”],  $P < 0,05$ ) up- (46 gén) vagy down-regulált (38 gén). Ezzel együtt az elvégzett útvonalelemzés a FX által jelentősen szabályozott útvonalként azonosította a „mitotikus sejtciklus folyamat”-ot (**43. ábra**), megerősítve azt a megfigyelést, hogy a FX potens gyulladásgátló koncentrációja hosszabb távú kezeléseknél során a keratinocitákat egy kevésbé proliferatív

fenotípus irányába hangolhatja. Összességében tehát adataink mellett szólnak, hogy a FX gyulladáscsökkentő és lehetséges viszketés-csillapító hatása<sup>30</sup> hosszabb (48-72 óras) időskálán antiproliferatív aktivitással járhat együtt.

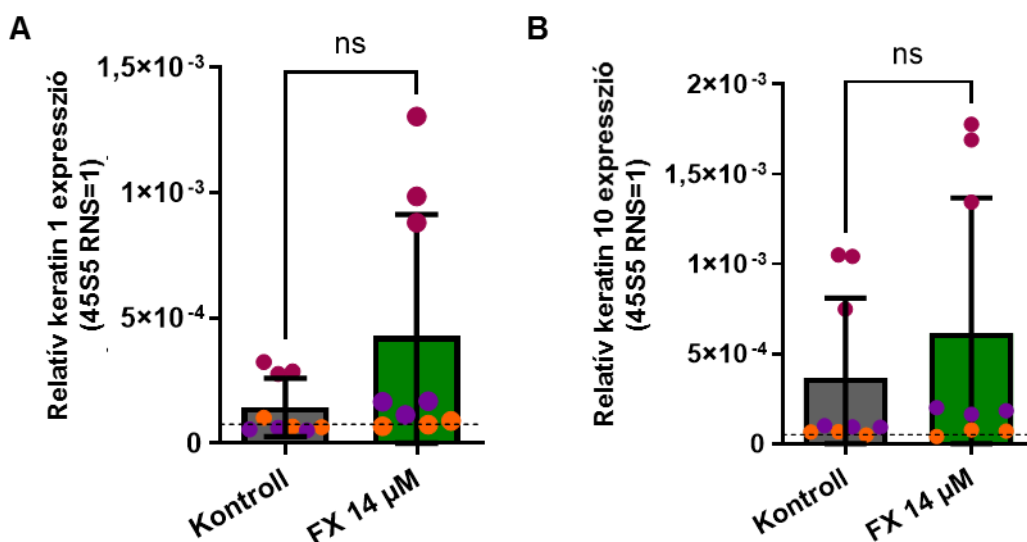


43. ábra

***A FX kezelés szignifikánsan szabályozott egy proliferációhoz kapcsolható útvonalat HaCaT keratinocitákban***

RNS szekvenálás, a FX (14  $\mu\text{M}$ ; 24 órás kezelés) által modulált útvonalak elemzése. Az elemzés a FX által jelentősen szabályozott útvonalaként azonosította a „mitotikus sejtciklus folyamat”-ot (*pirossal* jelölve), mely alátámasztja azt, hogy a FX valóban befolyásolhatja a hámsejt-proliferációt.

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a FX miként befolyásolja a keratinociták differenciációját, ezért primer keratinociták felhasználásával megvizsgáltuk két, a kísérletes bőrgyógyászati kutatásokban széles körben használt korai differenciációs marker,<sup>11</sup> a K1 és a K10 expresszójának változásait. Három NHEK donorból prekonfluens (proliferáló) és posztkonfluens tenyészeteket készítettünk, amelyeket a megfelelő konfluencia elérésekor, a differenciáció elősegítése érdekében magas  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú oldatban kezeltünk oldószerrel, illetve 14  $\mu\text{M}$  FX-nel 24 órán keresztül. Az mRNS-szintű vizsgálatból látható, hogy a differenciáltatott kontrollhoz viszonyítva a FX kezelés nem csökkentette a K1 és a K10 differenciáció által indukált up-regulációját (**44. ábra**).

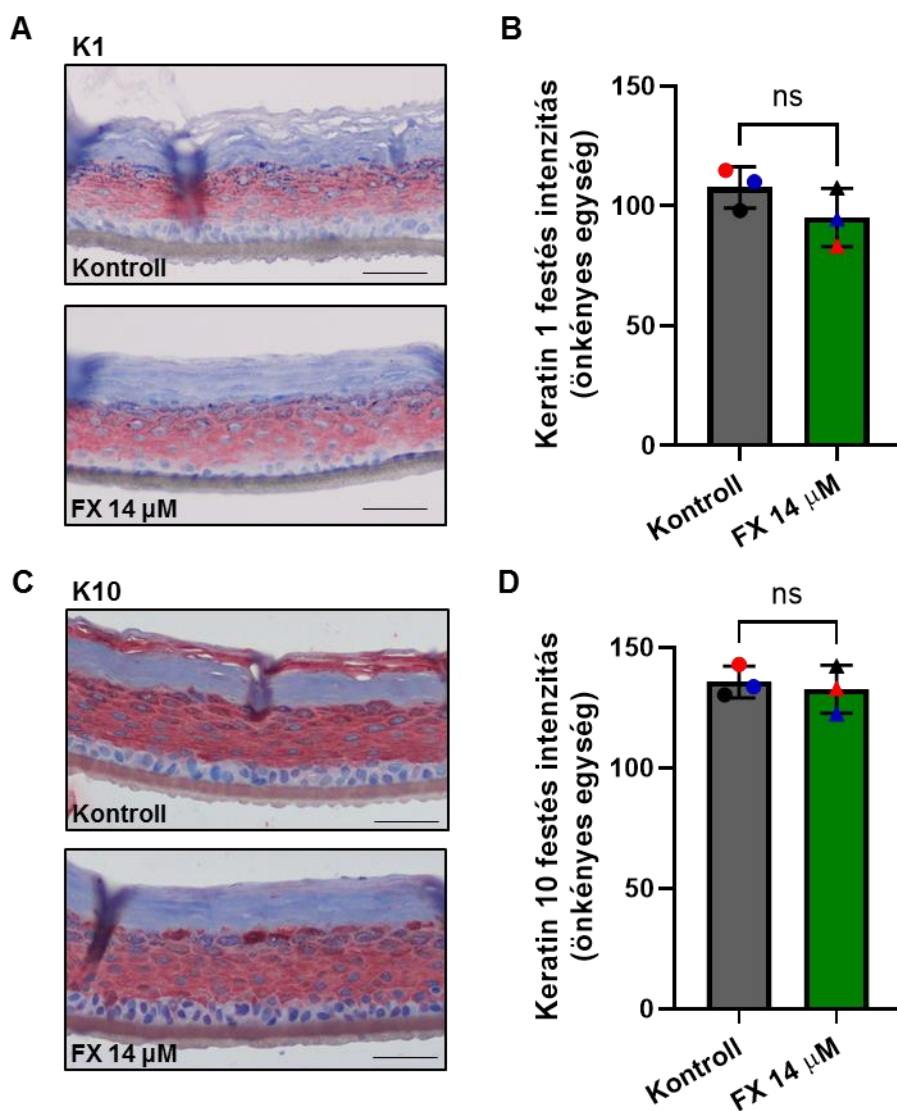


44. ábra

*A FX nem csökkentette a primer keratinocitákban a K1 és K10 korai differenciációs markerek differenciáció által indukált up-regulációját*

*RT-qPCR; három NHEK donor korai differenciációs markereinek (A: K1; B: K10) mRNS-szintű expressziója a jelzett 24 órás kezeléseket követően. Az adatokat a  $\Delta$ CT módszer használatával, a 45S5 RNS-re történő normalizálást követően relatív expresszió formában ábráztuk. A szaggatott vízszintes vonalak a K1 (A) és a K10 (B) átlagos expressziós szintjét jelölik a prekonfluens, proliferáló kultúrákban. N=9 (3 donor, donoronként 3 biológiai ismétlés, melyeket egyenként 3 technikai ismétlés átlaga ad), az adatokat átlag±SD formában adtuk meg. A különböző színű adatpontok a 3 különböző donort jelölik (ns: nem szignifikáns; 45S5 RNS: belső kontroll; FX: fluoxetin).*

Annak érdekében, hogy az RT-qPCR során látottakat fehérje szinten is megvizsgáljuk, a már korábban is alkalmazott 3D modellen szemikvantitatív immunhisztomorfometriával meghatároztuk a K1 és a K10 expresszióját. A szövettani metszeteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 48 órás FX-kezelés nem változtatta meg jelentősen egyik keratin kifejeződését sem (45. ábra). Ez az eredmény (összhangban az eddig bemutatottakkal) azt erősíti meg, hogy a FX a hatásos gyulladáscsökkentő koncentrációjában (14 μM) alkalmazva nem befolyásolja jelentősen az epidermális differenciálódást.



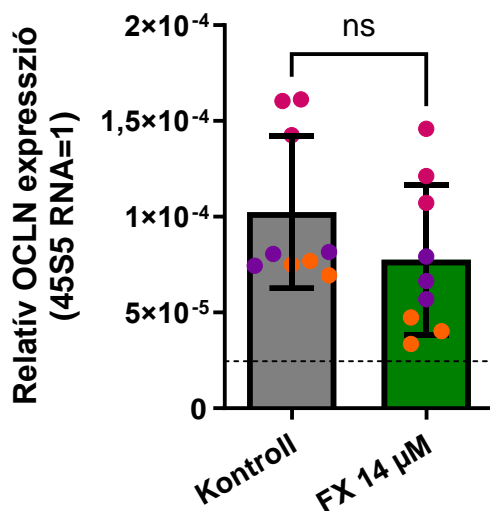
45. ábra

*A K1 és a K10 fehérje szintű kifejeződését nem befolyásolja a FX*

*K1 és K10 immunhisztokémia. A 3D epidermisz-ekvivalenseket a jelzett módon kezeltük 48 órán keresztül. (A és C) A K1 (A) és a K10 (C) immunfestés reprezentatív képei. Méretvonal: 50  $\mu\text{m}$ . (B és D) A K1 (B) és a K10 (D) immunhisztokémia statisztikai elemzése.  $N=3$  donor. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. A különböző színű adatpontok a 3 donort jelölik (FX: fluoxetin; K1: keratin 1; K10: keratin 10).*

Az epidermális differenciálódást és ezzel a fizikokémiai barrier kiépülését a K1 és a K10 mellett számos egyéb markerrel is nyomon lehet követni. Ezen markerek közé tartozik az OCLN is, amely a *stratum corneum* alatt, a *stratum granulosum*ban járul hozzá a tight junction barrier kialakításához.<sup>16,213</sup> Az OCLN kifejeződését vizsgálva megállapítottuk,

hogy a FX nem csökkentette a molekula differenciáció-indukálta up-regulációját primer humán epidermális keratinociták esetén (46. ábra).



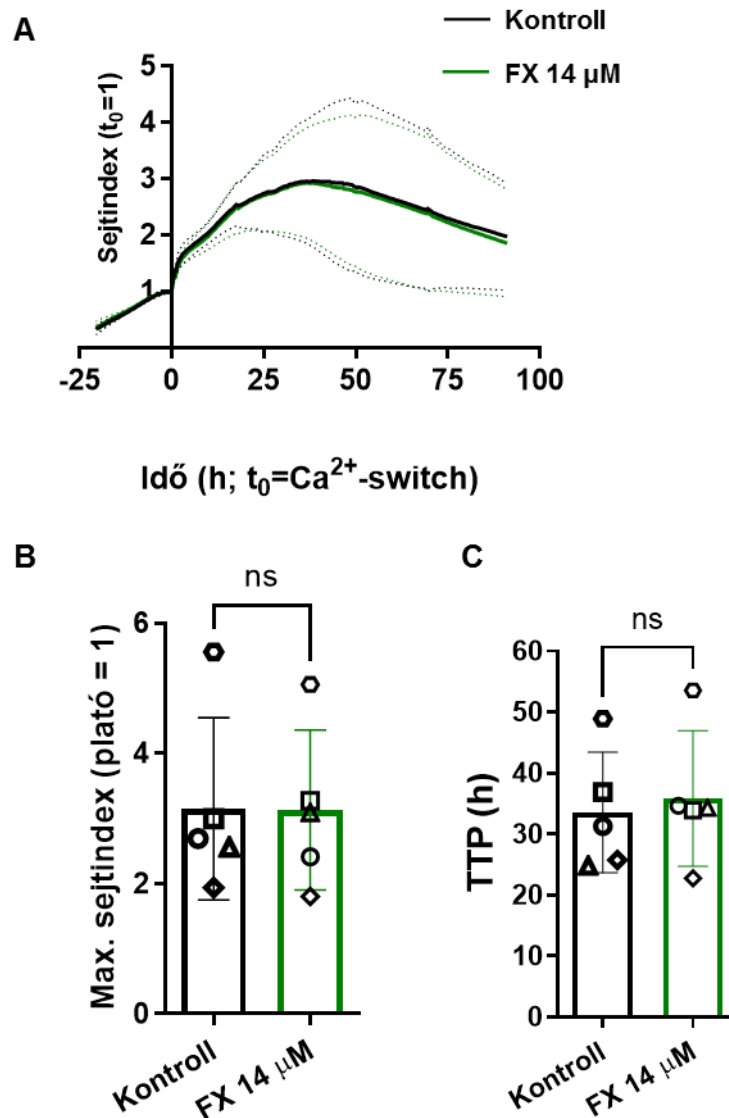
46. ábra

***A FX gyulladáscsökkentő koncentrációja nem befolyásolja az OCLN mRNS-szintű expresszióját primer humán keratinocitákban***

*RT-qPCR. Az OCLN mRNS-szintű expressziója három NHEK donor sejteiben a jelzett 24 órás kezeléseket követően. Az adatokat a  $\Delta CT$  módszer használatával, a 45S5 RNS-re történő normalizálást követően relatív expresszió formában ábrázoltuk. A szaggatott vízszintes vonal az OCLN átlagos expressziós szintjét jelöli a prekonfluens, proliferáló kultúrákban.  $N=9$  (3 donor, donoronként 3 biológiai ismétlés, melyeket egyenként 3 technikai ismétlés átlagaként számoltunk ki), az adatokat  $\text{átlag} \pm \text{SD}$  formában adtuk meg. A különböző színű adatpontok a különböző donoroikat jelölik (ns: nem szignifikáns; 45S5 RNS: belső kontroll; FX: fluoxetin, OCLN: okkludin).*

Természetesen az OCLN mRNS-szintű kifejeződése önmagában nem szolgáltat perdöntő bizonyítékot az epidermális fizikokémiai barrier épségét illetően, ezért kísérleteink zárásaként a barrier funkcionális vizsgálatát végeztük el két modellrendszerben. Elsőként az elektromos impedancia valós idejű monitorozásával<sup>193</sup> figyeltük meg a FX hatását a HaCaT keratinociták barrierformálási képességére. Méréseink során a keratinociták (alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú) tápoldatát a konfluens állapot elérésekor (azaz akkor, amikor az impedancia alapján meghatározott sejtinдекс platófázisa kialakult) a differenciálódást indukáló, magas

Ca<sup>2+</sup>-tartalmúra cseréltük, és ebben az új tápoldatban elvégeztük a szükséges kezeléseket (14 μM FX vagy oldószer). Az adatok elemzése során kiderült, hogy a FX-kezelés nem változtatta meg a megnövelt Ca<sup>2+</sup>-szint által kiváltott, a differenciációval összefüggő jelemelkedést (47. ábra).

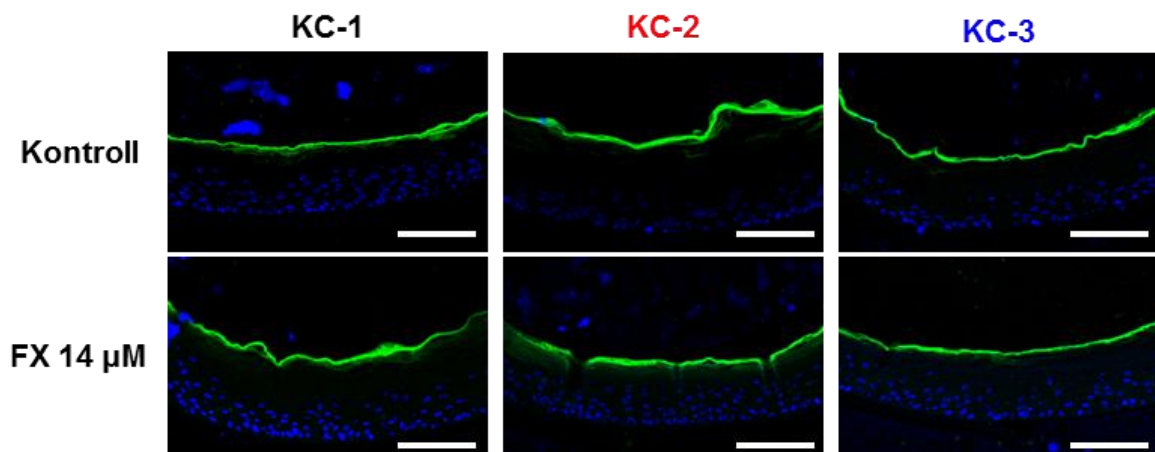


47. ábra

**A TEER mérés alapján a FX nem befolyásolja a keratinociták differenciációját**

A 2D keratinocita sejtréteg elektromos impedanciájának valós idejű mérése. A HaCaT keratinocitákat a konfluencia elérésekor ( $t_0$ , a sejtindex = 1) a differenciációt segítő, magas Ca<sup>2+</sup>-tartalmú tápoldatban kezeltük.  $N=5$  független kísérlet, mindegyikben legalább 4 biológiai ismétléssel; az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. A B és C paneleken az azonos alakú adatpontok független kísérletekben nyert eredményeket mutatnak, melyek mindegyikét  $N\geq 4$  biológiai ismétlés átlagaként határoztuk meg (ns: nem szignifikáns; FX: fluoxetin; TTP: „time to peak”, a maximális amplitúdó eléréséhez szükséges idő).

A HaCaT keratinocitákon nyert TEER adatok megerősítésére és az epidermális barrier integritásának ellenőrzésére lucifer yellow (LY) „outside-in” festékpenetrációs assay-t alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a képeken zölddel megjelenő, topikálisan alkalmazott LY egyetlen donor esetén sem terjedt be a *stratum corneum* alá a kezelések hatására (48. ábra), ami arra utal, hogy az epidermisz szerkezete a FX-expozíciót követően is megtartott maradt.



48. ábra

***A FX nem befolyásolja a barrier integritását 3D epidermisz-ekvivalens kultúrákban***

*LY „outside-in” festékpenetrációs assay, reprezentatív ábrák. A 3D epidermisz-ekvivalenseket (N=3 donor) a jelzett módon kezeltük 48 órán keresztül, majd az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint topikális LY adagolást végeztünk. Méretvonal: 100 µm; kék: DAPI (sejtmagok), zöld: LY, 1 mM (FX: fluoxetin; LY: lucifer yellow).*

A fenti 2D és 3D tenyészetekben nyert transzkriptomikai, (immun)hisztomorfometriai és TEER analízisből származó adataink együttesen arra utalnak, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja valószínűleg nem befolyásolja érdemben a humán epidermális keratinociták differenciálódását és barrierformáló képességét. Mindez azt jelenti, hogy a FX gyulladáscsökkentő és lehetséges viszketéscsillapító hatása<sup>30</sup> hosszabb (48-72 órás) időskálán antiproliferatív hatással járhat együtt, anélkül, hogy a differenciációra és a barrierképzésre számottevő negatív hatást gyakorolna.

## 6. Megbeszélés

A bőr összetett szerkezete révén számos funkciót lát el, többek között szenzoros, motoros, endokrin, exokrin, transzport és hőszabályozó szerepe is van,<sup>4</sup> de ezek mellett kiemelten fontos az általa kialakított barrier. A bőr összetett védelmi vonalként működik, megóvva a szervezetet a különböző külső hatásoktól, ártalmaktól, illetve a kórokozó mikroorganizmusoktól. Ezt a védelmet fizikai-kémiai, mikrobiológiai és immunológiai barriererek segítségével, illetve ezen barrierkomponensek szoros együttműködésével biztosítja. A bőr barrier ép szerkezete és megfelelő működése elengedhetetlen, mivel sérülése – például az epidermális keratinociták differenciációjának vagy a szebociták működésének zavara – hozzájárulhat olyan komplex patomechanizmusú betegségek kialakulásához, mint az atópiás dermatitisz vagy a pikkelysömör.<sup>5</sup>

Ahogy az már az *Irodalmi áttekintés* fejezetben is részletezésre került, a TRP ioncsatorna szupercsalád tagjai a bőr számos sejtípusában kifejeződnek, ahol összetett, szabályozó funkciót látnak el. Nem jelentenek kivételt ez alól a faggyúmirigy sejtjei sem. Az elmúlt években számos TRP csatornáról derült ki, hogy kifejeződik a humán szebocitákon, ideértve a TRPV1,<sup>125,148–150</sup> TRPV2,<sup>125</sup> a TRPV3<sup>126</sup> és a TRPV4<sup>125</sup> csatornát, míg a TRPA1 és TRPM8 mRNS-szintű expresszióját a kimutatási határ alatti volt.<sup>125</sup> Ezek közül a főleg Ca<sup>2+</sup>-ra permeábilis TRPV1, TRPV3 és TRPV4 negatív szabályozói a faggyúmirigyek lipogenezisének,<sup>125,126,148</sup> a TRPV3 pedig jelentős pro-inflammatórikus hatással bír.<sup>126</sup>

Egy a közelmúltban megjelent publikációban leírták, hogy a TRP család egy másik tagja, a TRPM5 is jelen lehet a humán faggyúmirigyeken.<sup>115</sup> A TRPM5 egy Ca<sup>2+</sup>-aktivált, de monovalens kationokra permeábilis csatorna,<sup>112</sup> mely az említett közlemény alapján a hajciklus hatékony pro-anagén szabályozója, így ígéretes terápiás célpont lehet különböző

szőrnövekedési rendellenességekben.<sup>115</sup> Anatómiai elhelyezkedésükből adódóan a szőrtüszők TRPM5 csatornáját célzó kezelések hatással lehetnek a szomszédos faggyúmirigyek biológiájára is esetleges nem kívánt mellékhatásokat okozva, így célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a TRPM5 expresszióját és a csatorna modulálásnak hatását a humán szebociták esetében. Jelen értekezés első fele az erre irányuló kísérleteket foglalja össze.

Kísérleteink során az SZ95 humán immortalizált sejtvonalat használtuk, mely a faggyúmirigysejtek egyik legjobb *in vitro* modellrendszere,<sup>66</sup> a TRPM5 modulálására pedig az antagonistá TPPO-t és két aktivátort, a Hept-t és a DMP-t alkalmaztuk. Első lépésként több komplementer kísérletes megközelítést alkalmazva kimutattuk, hogy a TRPM5 valószínűleg nem expresszálódik funkcionálisan aktív formában a humán szebocitákon.

Valóban; bár két különböző TRPM5-specifikus TaqMan assay-t is teszteltünk, a csatorna mRNS-szintű kifejeződését nem tudtuk meggyőzően kimutatni a pre- és posztkonfluens szebocita mintákban, hiszen a Ct értékek minden esetben a kimutatási küszöb környéken vagy az alatt voltak (**6. táblázat**), és ezzel összhangban a később elvégzett RNS szekvenálás során sem sikerült TRPM5-specifikus szekvenciát detektálnunk a mintákban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1037731>).

Hasonlóképpen, bár a western blotok során két különböző TRPM5-specifikus antitestet is kipróbáltunk, egyik sem eredményezett specifikus sávokat a gyártók által jelzett, valamint az UniProt adatbázisban megadott molekulatömegeknél (**19. ábra** és **20. ábra**). Ráadásul a humán szőrtüszőkkel ellentétben,<sup>115</sup> a TRPM5 siRNS transzfekcióval mediált géncsendesítése sem változtatta meg szignifikánsan a feltételezett TRPM5-specifikus sávok optikai denzitását, ami ismét a jelek aspecifikus mivolta mellett szól (**21. ábra**).

Végezetül a TRPM5 kifejeződését funkcionális szempontból is megvizsgáltuk. Mivel a vizsgált ioncsatorna monovalens kationokra permeábilis,<sup>112</sup> így a TRPM5 modulátoroknak

a szebociták ionhomeosztázisára gyakorolt hatását  $\text{Na}^+$ -érzékeny, SBFI AM-alapú fluoreszcens vizsgálattal ellenőriztük, majd méréseinket Fura-2 AM-alapú  $\text{Ca}^{2+}$ -mérésekkel egészítettük ki. Ehhez először ellenőriztük MTT viabilitási assay segítségével, hogy az általunk alkalmazott modulátorok miként hatnak a sejtek életképességére, ez alapján ki tudtuk választani a legmagasabb, egyértelműen nem citotoxikus koncentrációt a további mérésekhez, mely a TPPO, Hept és DMP esetében is  $300 \mu\text{M}$  volt (**22. ábra**). Az ionmérések során megállapítottuk, hogy a  $300 \mu\text{M}$ -ban alkalmazott TPPO, Hept és DMP sem okozott semmilyen változást a szebociták  $\text{Na}^+$ - vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisában (**23. ábra**).

Eredményeink tehát azt jelzik, hogy a TRPM5 valószínűleg nem fejeződik ki funkcionálisan aktív formában a humán szebocitákon, így a csatorna valóban szelektív modulátorai valószínűleg nem gyakorolnak majd közvetlen hatást a faggyúmirigyekre. Eredményeink emellett arra is felhívják a figyelmet, hogy (sok más TRP csatornához hasonlóan)<sup>214</sup> a TRPM5 kizárólag antitestekre támaszkodó azonosítása félrevezető lehet, így az expresszió igazolásához mindenképpen erősen ajánlott más, kiegészítő módszerek alkalmazása is, amelyekkel az mRNS-szintű expressziót, illetve a csatorna funkcionális aktivitását is ellenőrizhetjük.

Bár eredményeink alapján a csatorna valószínűleg nincs jelen funkcionálisan aktív formában a humán szebocitákon, úgy döntöttünk, hogy folytatjuk kísérleteinket, és megvizsgáljuk, hogy a TRPM5-szelektívnek gondolt modulátorok kiváltképpen-e TRPM5-független, nem-specifikus hatásokat ezeken sejteken. Mivel a szőrtüszők vizsgálatánál az anagén fázis meghosszabbításában a DMP felülmúlta a Hept hatékonyságát,<sup>115</sup> így további kísérleteinkben az antagonistá TPPO mellett a TRPM5-aktivátorok közül a DMP-t részesítettük előnyben.

Munkánkat a szebociták egyik legmeghatározóbb jellemzőjének, a lipidtermelésnek a vizsgálatával folytattuk. A Nile Red jelölés során a poláros lipidek fluoreszcens jele, mely

arányos a sejtszámmal, megerősített azt, amit az MTT-assay során is láttunk: a vizsgált modulátorok 300  $\mu\text{M}$ -ig teljes biztonsággal alkalmazhatóak a citotoxicitás veszélye nélkül (**24. ábra**). A neutrális lipidek detektálása során, mely értékek a szebociták faggyúlipid-termelését számszerűsítik, adataink pedig azt mutatták, hogy a DMP 1000  $\mu\text{M}$  koncentrációig nem volt hatással a lipogenezisre (**25. ábra/A, B**), míg a TPPO nem citotoxikus koncentrációi dóziszfüggően fokozták a sejtek lipidtermelését (**25. ábra/C, D**) a 24 és 48 órás kezelések során, ráadásul sem a DMP, sem a Hept (mindkettő 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazva) nem tudta csökkenteni ezt a hatást (**26. ábra**), megerősítve, hogy az valóban TRPM5-független módon alakult ki.

A fokozott faggyúlipid-termelés az akne, azaz a pattanásosság patogenezisének egyik fontos összetevője. A csökkent faggyúlipid-termelés normalizálása pedig, főleg, ha gyulladáscsökkentő hatás is társul hozzá, fontos terápiás eszköz lehet a bőrszárazsággal (is) kísért kórképek különböző formáinak (pl. atópiás dermatitisz vagy pikkelysömör) kezelése esetén,<sup>46,47,79,80,215</sup> ezért a következőkben a TPPO szebociták immunfenotípusára gyakorolt hatását kívántuk feltérképezni.

Ennek során megállapítottuk, hogy a TPPO hatékony lipogén koncentrációja (300  $\mu\text{M}$ ) differenciáltan befolyásolta a szebociták citokinprofilját: a 3 és 24 órás kezelést követő RT-qPCR-ok során időfüggő hatást láttunk az IL-1 $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  expressziója esetében, míg az IL-6 kifejeződését up-regulálta, az IL-8-ét pedig nem befolyásolta (**27. ábra**). A citokinek expressziója mellett ELISA segítségével a felszabadulásukra gyakorolt hatást is ellenőriztük (**28. ábra**). Érdekes módon, bár az IL-6 expressziót a TPPO kezelés képes volt szignifikánsan fokozni (**27. ábra**), és a felszabadulásban is megmutatkozott ez a tendencia, de ebben az esetben a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ( $P=0,1356$ , 24 órás kezelést követően; **28. ábra/C**), míg az IL-8 felszabadulását a 24 órás kezelés szignifikánsan csökkentette (**28. ábra/D**). Ezen adatok összességében arra utalnak, hogy a TPPO hatása az

immunfenotípusra komplex formában mutatkozik meg. A képet tovább árnyalják az RNS szekvenálás során nyert adataink. A TPPO lipogén koncentrációja ugyanis jelentősen csökkentette több releváns gyulladáscsökkentő molekula expresszióját, többek között a CSF2 (GM-CSF), CXCL-1 (GRO- $\alpha$ ), CXCL2, CXCL6, IL-32, NFKBIA, TNFSF15 és MMP9 kifejeződését (**34. ábra**). Közülük a CSF2, a CXCL1, a CXCL2 és a CXCL6 mRNS-szinten fokozott expressziót mutatnak aknés elváltozásokban,<sup>202-204</sup> az IL-32-nek az atópiás dermatitisz patogenezisében van szerepe,<sup>205</sup> az NFKBIA kifejeződése megemelkedett a *C. acnes*-fertőzött prosztata epitésejtekben,<sup>206</sup> a TNFSF15 bizonyos alléljai pedig hozzájárulhatnak a pikkelysömör patogeneziséhez,<sup>207</sup> míg az MMP9 az izotretinoinnal kezelt aknés betegekben mutat csökkent szintet.<sup>208</sup> Mivel ezen hatások többsége (valamint az IL-8 felszabadulás csökkenése; **28. ábra/D**) összességében inkább gyulladáscsökkentőnek tűnik, adataink felvetik annak lehetőségét, hogy a faggyútermelés mérsékelt emelése és dominánsan gyulladáscsökkentő hatása révén a TPPO (vagy még inkább a TPPO funkcionális analógjai) jótékony hatást fejthetnek ki a gyulladással és bőrszárazsággal kísért kórképekben.

A továbbiakban a célunk az eddig látott hatások mechanizmusának felderítésre volt, melyhez elsőként foszfokináz array-t alkalmaztunk, ahol a TPPO korábban is alkalmazott hatékony lipogén koncentrációját (300  $\mu$ M) vizsgáltuk rövid távú kezeléseket (10, 30 és 60 perc) követően. Az array kiértékelése során azt figyeltük meg, hogy a TPPO időfüggő módon volt képes modulálni számos releváns jelátviteli molekula, pl. az Akt,<sup>151,196,197</sup> az EGFR<sup>199</sup> és a p38 $\alpha$  MAPK,<sup>198</sup> valamint a p38 $\alpha$  MAPK down-stream effektoraként is működő<sup>200</sup> HSP27 foszforiláltságát (**29. ábra**), és mindezt ráadásul a „megfelelő” sorrendben tette, hiszen a p38 $\alpha$  MAPK 10 perces kezelésnél bekövetkező foszforilációját időben később (60 percnél) követte a HSP27 foszforilációja, ami amellettszól, hogy utóbbi valóban lehetett a p38 $\alpha$  MAPK aktiváció következménye (**29. ábra**).

A foszfokináz array alapján kiválasztott szelektív farmakológia inhibitorokkal kimutattuk, hogy a TPPO lipogén hatása valószínűleg az Akt és az EGFR útvonalak aktiválásához kapcsolható, hiszen gátlószerek a GSK690693 és a tyrphostin AG képesek volt csökkenteni a TPPO által indukált faggyúlipid-termelést (**30. ábra/A-B**). Érdekes módon a p38 $\alpha$  MAPK- és a HSP27-inhibitorok (a Nefl és a J2) szintén csökkentették a faggyúlipidek szintjét (**30. ábra/C-D**), azonban liposztatikus hatásuk háttérben valószínűleg nem az egyedi sejtek lipidtermelésének mérséklődése, hanem a sejtek számának csökkenése állt, hiszen jelentősen csökkentették a sejtszámmal korreláló poláros (membrán) lipidek szintjét is (**31. ábra/C-D**). Ezzel szemben az Akt és az EGFR farmakológiai blokkolásakor tisztán liposztatikus hatást figyeltünk meg (**31. ábra/A-B**), és az EGFR részvételét siRNS-transzfekeció által mediált szelektív géncsendesítés segítségével is megerősítettük (**32. ábra**).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a fenti szignalizációs útvonalaknak milyen szerepe van a TPPO által indukált IL-6 up-regulációban. Azt találtuk, hogy az Akt valószínűleg nem vesz részt a folyamatban, viszont a p38 $\alpha$  MAPK és az EGFR jelátvitelnek szerepe van benne, ugyanis gátlószerek (a Nefl és a tyrphostin AG) visszafordították a citokin expressziójának TPPO-indukált fokozódását (**33. ábra**). Ezek az eredmények összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal, melyek szerint a 72 órás EGF kezelés növeli az IL-6 felszabadulását humán szebocitákból az EGF nélkül tenyésztett sejtekhez viszonyítva,<sup>199</sup> a p38 $\alpha$  MAPK kaszkádról pedig ismert, hogy pro-inflammatórikus hatást fejt ki ezeken a sejteken.<sup>216-218</sup>

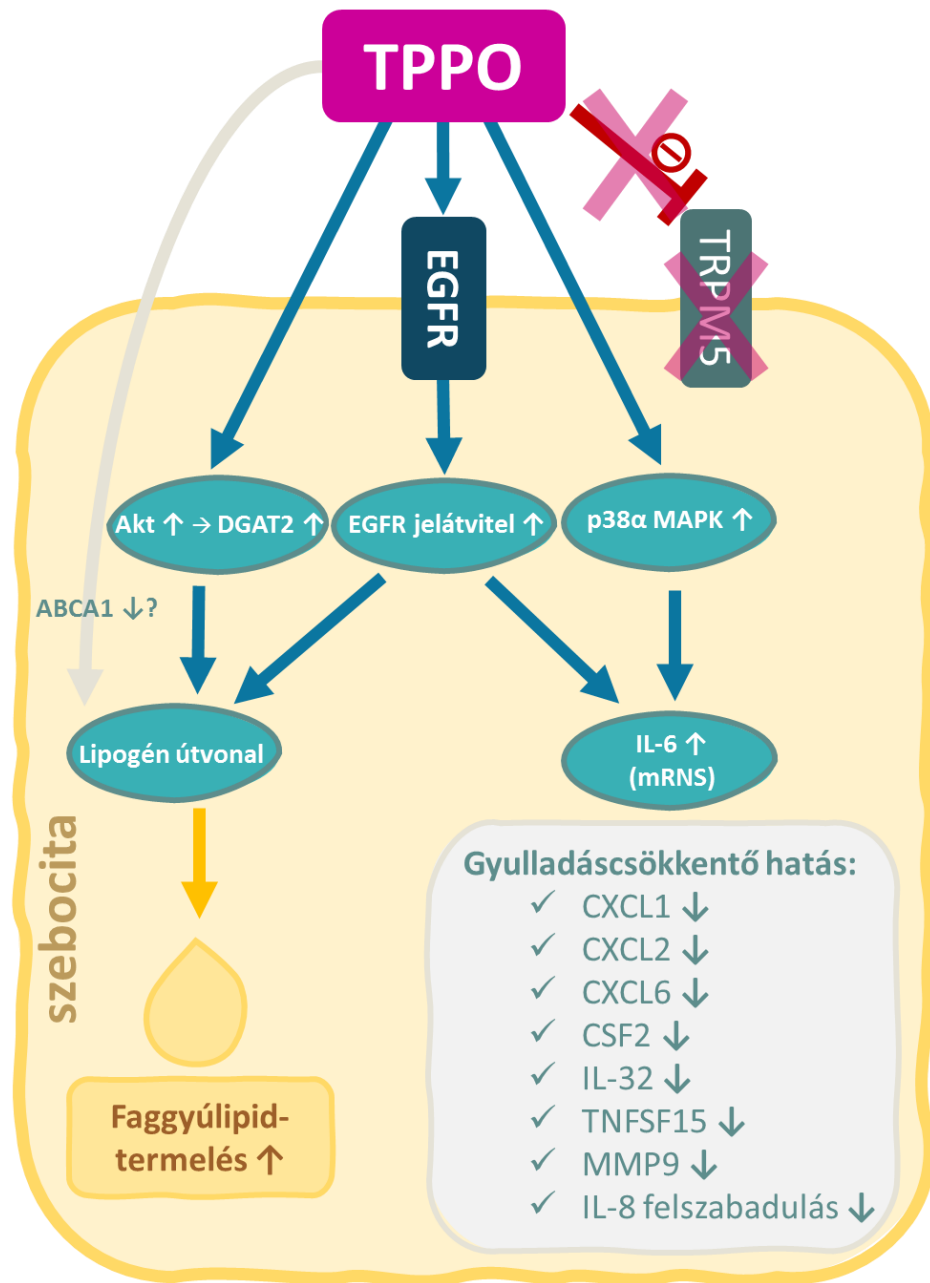
Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést kapjunk a TPPO biológiai hatásaiba, RNS szekvenálást végeztük, mely során összevetettük a 24 órán át oldószerrel, illetve 300  $\mu$ M TPPO-val kezelt humán szebociták transzkriptomját. Az analízis feltárta, hogy több releváns jelátviteli útvonalra is jelentős hatással volt a TPPO-kezelés; ilyen volt például az „*inzulinszerű növekedési faktor kötődés*” (**34. ábra**). Mivel az IGF-1-ről ismert, hogy az Akt

jelátvitel szabályozásán keresztül serkenti a szebociták faggyúlipid-termelését,<sup>196,201</sup> így felmerült annak a lehetősége is, hogy a TPPO közvetlenül vagy közvetve aktiválhatja az IGF-1R-t. A kérdés eldöntésére egy újabb Nile Red-jelölést alkalmaztunk, és kimutattuk, hogy az IGF-1R valószínűleg nem célpontja a TPPO-nak, az IGF-1R antagonistá AG1024 ugyanis nem befolyásolta a TPPO lipogén hatását (**35. ábra**).

Az RNS szekvenálás során a már említetteken (lásd fentebb) túl két olyan lehetséges szabályozó molekulát is azonosítottunk, melyek szerepet játszhattak a TPPO lipogén hatásának kialakításában. A TPPO jelentősen down-regulálta az ABCA1-et, és up-regulálta a DGAT2-t (**36. ábra**). Mivel a szakirodalmi adatok alapján ezek ígéretes célmolekuláknak tűntek – az ABCA1<sup>-/-</sup> egereknél nagyobb faggyúmirigyeket és a bőrben magasabb szabadoleszterin-szintet mutattak ki,<sup>209</sup> míg a DGAT2-ről ismert, hogy a triglicerid szintézis egyik kulcsenzime<sup>210,211</sup> – így a következőkben azt a kérdést tettük fel, hogy a már vizsgált kaszkádoknak, azaz az Akt, a p38 $\alpha$  MAPK vagy EGFR-útvonalnak az aktiválása szerepet játszik-e az ABCA1 le-, illetve a DGAT2 felszabályozásában. Eredményeink alapján elmondható, hogy az ABCA1 down-regulációját nem befolyásolta a fenti útvonalak gátlása, mivel egyik inhibitor sem ellensúlyozta a TPPO hatását (**37. ábra/A**), míg a DGAT2 up-regulációja kifejezetten az Akt-aktivitáshoz kapcsolható, hiszen a GSK690693 képes volt a TPPO-indukált expresszió fokozódást visszafordítani (**37. ábra/B**). Mindez azt is jelenti, hogy – bár az EGFR szignalizáció elméletileg mind az Akt,<sup>215</sup> mind a p38 $\alpha$  MAPK<sup>219</sup> útvonalak aktiválásában szerepet játszhat – esetünkben az Akt útvonal aktiválódása nagy valószínűséggel az EGFR-től függetlenül történt, hiszen ha az Akt az EGFR down-stream effektora lett volna, akkor a DGAT2 up-regulációt nemcsak az Akt-gátlás, hanem az EGFR-antagonizmus is kivédte volna.

Összefoglalva, preklinikai adataink amellet szólnak, hogy a valóban specifikus TRPM5 modulátorok használata valószínűleg nem eredményez majd közvetlen, a

faggyúmirigyekkel kapcsolatos mellékhatásokat, de a TPPO a TRPM5-től független módon kedvezően befolyásolhatja a faggyúmirigyek biológiai folyamatait (49. ábra). Adataink alapján felvetik a TPPO (és a biztonságos funkcionális TPPO analógok) alkalmazásának lehetőségét a gyulladással és bőrszárazsággal kísért kórképek kezelésében.



49. ábra

**A TPPO TRPM5-független hatásainak áttekintése humán szebocitákon**

A TPPO mérsékelten növeli a faggyúlipid-termelést az Akt-DGAT2-tengely és az EGFR jelátvitel aktiválásán keresztül, és befolyásolja a humán faggyúsejtek immunfenotípusát, elsősorban gyulladáscsökkentő irányba eltolva azt.

Az értekezés második felében egy leginkább antidepresszánsként ismert szer, a fluoxetin (FX) hatásait vizsgáltuk a humán epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára. A témaválasztás elsősorban különösnek hathat, és jogosan merülhet fel a kérdés, hogy egy szelektív szerotonin visszavételezést gátló farmakon miként kerülhet felhasználásra a bőrgyógyászatban.

A FX a kísérletes bőrgyógyászattal foglalkozók figyelmét nem ok nélkül keltette fel. Számos bőrgyógyászati (is) releváns hatásáról születtek már közlemények: irodalmi adatok támasztják alá gyulladáscsökkentő<sup>162-165</sup> és viszketéscsillapító hatását,<sup>166,167</sup> emellett leírták, hogy a mikrodisszekált humán szőrtüszők repigmentációját is elősegíti<sup>159</sup>, és diabéteszes egereknél, illetve fertőzött sebekkel rendelkező embereknél lokális alkalmazása a sebgyógyulásra is pozitív hatást fejtett ki.<sup>160,161</sup> A fentiekben túl munkacsoportunk a közelmúltban kimutatta, hogy a FX 14  $\mu$ M-os koncentrációban alkalmazva erős gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki tenyésztett humán epidermális keratinocitákon, és a PI3K útvonal közvetett gátlásán keresztül csökkentette a viszketésmediátor endotelinek TLR3 aktivátor p(I:C) által indukált felszabadulását is.<sup>30</sup> A PI3K-szignalizációnak közismert szerepe van az immunválasz alakításában,<sup>174,175</sup> emellett pedig a epidermális keratinociták proliferációjának pozitív szabályozója, és fontos szerepet játszik pikkelysömörben a lézionális keratinociták proliferációjának fokozásában.<sup>176</sup>

Ugyan nemrégiben publikált rövidtávú (3, illetve 24 óra) kísérleteink során a FX nem okozott nyilvánvaló eltérést a humán epidermális keratinociták sejtszámában,<sup>30</sup> de a hosszabb távú kezelések során kifejtett hatásaival kapcsolatban nem rendelkezünk információval. Mivel a keratinociták proliferációs-differenciációs egyensúlyát érintő hatások károsíthatják az epidermális barriert és ezzel különféle mellékhatások megjelenéséhez vezethetnek, jelen kísérletsorozatban azt kívántuk feltárni, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja (14  $\mu$ M), miként befolyásolja a humán

epidermális keratinociták proliferációját és differenciációját hosszabb távú (48 és 72 órás) kezelések során. Az erre irányuló kísérleteink során a 2D tenyésztett HaCaT keratinociták és primer humán epidermális keratinociták mellett egy még „*in vivo*-közelibb” modellt, a 3D humán epidermisz-ekvivalenst<sup>181</sup> alkalmaztuk.

Első lépésként CyQUANT proliferációs assay segítségével megvizsgáltuk, hogy a 14  $\mu$ M-ban alkalmazott FX miként befolyásolja a HaCaT keratinociták sejtszámát. Azt tapasztaltuk, hogy 48 órás kezelést követően a farmakon csökkentette a sejtek proliferációját (**38. ábra**). A hatás reprodukálható volt NHEK-k felhasználásával is, ahol szintén antiproliferatív hatást találtunk 48 és 72 órás kezelést követően az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva (**39. ábra**).

A látottak klinikai relevanciájának megerősítésére 3D epidermisz-ekvivalens kultúrákat 48 órás FX kezelésnek vetettünk alá, majd a mintafeldolgozást követően Ki-67 jelölést alkalmaztunk, mely a proliferáló sejtek egy jellemző markere.<sup>212</sup> Bár a Ki-67+ sejtmagok arányának kontrollcsoporton belüli erőteljes donorfüggése miatt a hatás minimálisan a szignifikancia határ alatt maradt ( $P=0,0554$ ), azt találtuk, hogy a FX mindhárom donorban látványosan csökkentette a Ki-67+ sejtek arányát (

**40. ábra**). Ezzel összhangban az egyes donorok szintjén végzett Fisher-féle egzakt teszt kimutatta, hogy a FX hatása a proliferáló (Ki-67+) és a nem proliferáló (Ki-67-) sejtek számára mindhárom donor esetében erősen szignifikáns volt (**7. táblázat**). Adataink tehát amellett szóltak, hogy a FX gyulladást és viszketést csökkentő hatása<sup>30</sup> egy hosszabb időskálán antiproliferatív aktivitással társulhat.

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy a FX milyen hatással van az epidermális keratinociták differenciációjára és ezáltal a sejtek barrierformáló képességére. Bár a FX-kezelt 3D modelleken a hematoxin-eozin festés elemzése (**41. ábra**) nem mutatott ki semmilyen változást az epidermisz vastagságában, mélyebb betekintést szeretnénk volna

nyerni az FX hatásaiba, ezért RNS szekvenálást végeztünk. A szekvenálás során három csoportból származó RNS mintát elemeztünk: prekonfluens (azaz aktívan proliferáló), valamint posztkonfluens, differenciálódó HaCaT keratinocitákat, amelyeket 14  $\mu\text{M}$  FX-nel vagy annak oldószerével kezeltünk magas  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmú közegben („ $\text{Ca}^{2+}$ -switch”) 24 órán keresztül a konfluencia elérése után. (Az így nyert RNS szekvenálási adataink az alábbi linken érhetőek el: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA1122410>.)

A főkomponens elemzés kimutatta, hogy a FX-kezelésnek nem volt jelentős hatása a génextpressziós mintázat differenciációval összefüggő megváltozására, hiszen a posztkonfluens tenyészetek esetében az oldószerrel, illetve FX-nel kezelt csoportok lényegében nem különböztek egymástól az összes különbség 85,7%-áért felelős 1. főkomponens szerint (**42. ábra**). Ezt erősíti az is, hogy alacsony volt azoknak a géneknek a száma, amelyeket a FX szignifikáns mértékben ( $\geq 2$ -szeres változás [„fold-change”],  $P < 0,05$ ) szabályozott bármelyik irányba: csupán 46 up-, illetve 38 down-regulált gén felelt meg a fenti kritériumoknak. Érdekes módon azonban – a korábban tárgyalt proliferációs eredményeket kiegészítve és egyben indirekten meg is erősítve – az útvonalelemzés során azt találtuk, hogy a „mitotikus sejtciklus folyamat”-ra a FX jelentős hatást fejtett ki (**43. ábra**), ami amellet szól, hogy a FX-kezelés valóban befolyásolja a keratinociták proliferációját.

A folytatásban korai differenciációs markerek (K1 és K10)<sup>11</sup> mRNS-szintű expresszióját vizsgáltuk három különböző donorból származó primer keratinocita tenyészet felhasználásával, és azt találtuk, hogy a FX 24 órás kezelése során nem csökkentette a K1 és a K10 differenciáció-indukálta up-regulációját (**44. ábra**). Hogy ezt fehérje szinten is ellenőrizzük, ismét a 3D epidermisz-ekvivalenseket használtuk, és szemikvantitatív immunhisztomorfometriával elemeztük a K1 és K10 expresszióját. Az elemzés során azt találtuk, hogy 48 órás kezelést követően sem volt a FX-nek jelentős hatása a az epidermális

differenciálódásra (**45. ábra**). Ezzel összhangban kimutattuk azt is, hogy a FX nem csökkentette egy másik fontos differenciációs marker, a tight junction barrier kialakításában fontos OCLN<sup>16,213</sup> differenciáció-indukálta fokozott kifejeződését sem (**46. ábra**).

Végezetül a FX keratinociták barrierformáló képességére gyakorolt hatását is ellenőriztük. Ehhez funkcionális vizsgálatokat végeztünk, amely során HaCaT keratinociták elektromos impedanciáját követtük nyomon valós időben TEER segítségével.<sup>193</sup> A mérés során ismét „Ca<sup>2+</sup>-switch-et” alkalmaztunk a konfluens állapot (plató fázis) elérésekor. Adataink azt mutatták, hogy a FX nem változtatta meg a megemelt Ca<sup>2+</sup>-szint által kiváltott, differenciációhoz kapcsolható jelemelkedést (**47. ábra**), azaz vélhetőleg nem befolyásolta negatívan a differenciáció során kialakuló sejtközötti kapcsolatok integritását.

Természetesen a 2D sejtkultúrákon végzett „barriervizsgálatok” eredményei csak korlátozott előrejelzést adhatnak egy anyag epidermiszre gyakorolt hatásairól, ezért kísérleteink zárásaként egy LY-alapú „outside-in” festékpenetrációs vizsgálatot is elvégeztünk 3D epidermisz ekvivalensek felhasználásával. Összhangban a korábbiakkal, ez a vizsgálat is azt mutatta, hogy a 14 µM-ban alkalmazott FX nem károsította az epidermisz-ekvivalens modellekben kialakuló epidermális barrier integritását, hiszen, amint az a reprezentatív (**48. ábra**) képeken jól megfigyelhető, a fluoreszcens LY egyetlen esetben sem terjedt be a stratum corneum alá. Így a differenciációra és barrierformálási képességre irányuló kísérleteink alapján elmondható, hogy a FX hatékony gyulladáscsökkentő koncentrációja valószínűleg nem károsítja az epidermális keratinociták ezen funkcióját.

Összefoglalva, adataink amellet szólnak, hogy a korábban közölt gyulladás- és lehetséges viszketéscsökkentő hatása mellett, melyet a pikkelysömör kialakulásában is szerepet játszó<sup>176</sup> PI3K gátlásán keresztül fejt ki,<sup>30</sup> a FX csökkentheti az epidermális keratinociták proliferációját úgy, hogy eközben a differenciációra és a barrierképzésre nincs

negatív hatással. Ezek alapján elképzelhető, hogy helyileg alkalmazva jótékony hatást fejthet ki a hiperproliferációval járó gyulladásos bőrbetegségekben, így például a pikkelysömörben.

Munkacsoportunk már korábban publikált RNS szekvenálás elemzésében (mely az alábbi linken érhető el: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1022043>) is találhatóak ezt alátámasztó adatok: a FX csökkentette a p(I:C)-indukált „interferon- $\alpha$  indukálható fehérje-6” (IFI6 vagy más néven G1P3) fokozott kifejeződését, mely a pszoriázisos betegek bőrében is magasabb szinten van jelen,<sup>220,221</sup> illetve gátolta a CXCL17 – mely pikkelysömörös egérmodellekben képes a bizonyos kóros gyulladásos folyamatok csökkentésére<sup>222</sup> – p(I:C) általi leszabályozását.

Munkánkkal összefüggésben fontos a szakirodalomban található ellentmondásos adatokra is felhívni a figyelmet. Bizonyos esettanulmányok szerint a FX kezelés összefügghet a pszoriázis indukciójával illetve súlyosbításával,<sup>223–225</sup> míg más publikációkban a FX pikkelysömörben kifejtett jótékony hatásáról írnak állatmodellben<sup>226</sup> és ember<sup>227</sup> esetében egyaránt. A látszólagos ellentmondások oka az lehet, hogy a FX a különböző célpontjait dózisfüggő módon befolyásolhatja, így eltérő koncentrációkban akár eltérő útvonalakon keresztül is hathat. Erről munkacsoportunk is írt a már említett publikációban: a 14  $\mu$ M FX biológiai aktivitásspektruma nagyon közel volt a PI3K-gátló GDC0941 (pictilisib) spektrumához, így ebben a koncentrációban a FX a hatását valószínűleg a PI3K-on keresztül fejt ki, azonban ennél alacsonyabb koncentrációban a spektruma távolabb esett a GDC0941-től, és inkább a szerotoninéhoz hasonlított.<sup>30</sup>

A FX repozicionálásának lehetőségét<sup>157</sup> fontolgatva érdemes az alkalmazás módján is elgondolkodni, hiszen az orálisan alkalmazott FX plazmakoncentrációja 0,4-2  $\mu$ M közötti értéket mutat,<sup>228,229</sup> szisztémás kezelés esetén pedig a bőrben mérhető koncentráció csupán a plazmaszint kb. 41%-a.<sup>230</sup> Ennek megfelelően ahhoz, hogy kifejthesse a keratinocitákon

antiproliferatív, gyulladáscsökkentő és viszketéscsillapító hatását, a FX lokális alkalmazása lehet megfelelő.

## 7. Összegzés

A disszertáció első felében részletezett kísérleteink során az emberi szőrtüszőkben is jelenlévő TRPM5-nek a kifejeződését és funkcionális szerepét vizsgáltuk humán SZ95 szebocitákon. Bár eredményeink azt mutatják, hogy a TRPM5 funkcionálisan aktív formában nem fejeződik ki szebocitákon, azonban antagonistája, a TPPO képes jelentősen fokozni a sejtek faggyúlipid-termelését, mely hatás az Akt szignalizáció és az EGFR közvetítésével, a DGAT2 Akt-függő up-regulációján keresztül alakul ki. Emellett a TPPO összetett hatást fejt ki a szebociták immunfenotípusára: EGFR- és p38 $\alpha$  MAPK-függő módon fokozta az IL-6 expresszióját, valamint csökkentette az IL-8 felszabadulását és több gyulladáscitokin mRNS-szintű kifejeződését is. Adataink arra utalnak, hogy a specifikus TRPM5 modulátorok használata valószínűleg nem eredményez közvetlen, faggyúmirigyvel kapcsolatos mellékhatásokat, de a TPPO, illetve szerkezeti analógjai TRPM5-független módon befolyásolhatják a faggyúmirigyek biológiáját.

Kísérleteink második felében a FX bizonyítottan hatásos gyulladásgátló koncentrációjának (14  $\mu$ M) hatását vizsgáltuk humán epidermális keratinociták proliferációjára és differenciációjára. Megállapítottuk, hogy a FX antiproliferatív hatást fejt ki az epidermális keratinocitákban, de nem befolyásolja az epidermisz vastagságát, és az általunk vizsgált differenciációs markerekre sem volt szignifikáns hatással, illetve nem károsította a hámsejtek barrierformálási képességét sem. Összefoglalva, korábbi és jelenlegi adataink azt mutatják, hogy az antidepresszáns FX bőrgyógyászati repozicionálása lehetséges: 14  $\mu$ M-ban alkalmazva a gyulladáscsökkentő hatás mellett a humán epidermális keratinociták proliferációját is gátolhatja anélkül, hogy negatívan befolyásolná differenciációjukat és barrierformáló képességüket.

## 8. Summary

In the first part of the thesis, we investigated the expression and functional role of TRPM5, an ion channel recently demonstrated to be expressed in human hair follicles, in human SZ95 sebocytes. While our results demonstrated that TRPM5 was not expressed on sebocytes in functionally active form, its antagonist (TPPO) was able to significantly increase sebaceous lipogenesis. This effect was mediated via Akt- and EGFR-coupled signaling pathways, through the Akt-dependent up-regulation of DGAT2. In addition, TPPO exerted differential effects on the immune phenotype of sebocytes. Indeed, it increased IL-6 expression in an EGFR- and p38 $\alpha$  MAPK-dependent manner, and it simultaneously suppressed the release of IL-8, as well as the mRNA-level expression of several pro-inflammatory cytokines. Collectively, our data suggest that the use of specific TRPM5 modulators would be unlikely to result in direct sebaceous gland-related side effects. However, TPPO (or its structural analogues) may affect sebaceous gland biology in a TRPM5-independent manner.

In the second part of our experiments, we investigated the effect the potent anti-inflammatory concentration of FX (14  $\mu$ M) on the proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. We found that FX exerted an anti-proliferative effect in epidermal keratinocytes, but it did not affect epidermal thickness, it did not have a significant effect on the examined differentiation markers, and it did not impair the barrier-forming capacity of the keratinocytes. In conclusion, together with our previous and published findings, our current data demonstrated that dermatological application of the antidepressant FX may be possible: in addition to its anti-inflammatory activity, 14  $\mu$ M of FX may exert anti-proliferative effect on human epidermal keratinocytes without detrimentally affecting their differentiation and barrier-forming capacity.

## 9. Irodalomjegyzék

- 1 Montagna W, Ebling FJG. Human skin. Encyclopedia Britannica. [WWW Document]. 2024.URL <https://www.britannica.com/science/human-skin> [accessed on 4 September 2024].
- 2 Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. A kültakaró. In: *Szövettan*. Budapest, Medicina Könyvkiadó, 2007; 400–21.
- 3 Barbieri JS, Wanat K, Seykora J. Skin: Basic Structure and Function. In: *Pathobiology of Human Disease* (McManus LM, Mitchell RN, eds). San Diego, Academic Press, 2014; 1134–44.
- 4 Oláh A, Szöllösi AG, Bíró T. The Channel Physiology of the Skin. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 163* (Nilius B, Amara SG, Gudermann T, *et al.*, eds). Berlin, Heidelberg, Springer, 2012; 65–131.
- 5 Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; **17**:1063–72.
- 6 Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control* 2006; **34**:S98–110.
- 7 Pillai S, Bikle D, Mancianti M, *et al.* Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* 1990; **143**. doi:10.1002/jcp.1041430213.
- 8 Hennings H, Michael D, Cheng C, *et al.* Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980; **19**:245–54.
- 9 Pillai S, Bikle DD, Hincenbergs M, Elias PM. Biochemical and morphological characterization of growth and differentiation of normal human neonatal keratinocytes in a serum-free medium. *J Cell Physiol* 1988; **134**:229–37.
- 10 Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K. Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol EJD* 2014; **24**:650–61.
- 11 Agarwal R, Dittmar T, Beer H-D, *et al.* Human epidermis organotypic cultures, a reproducible system recapitulating the epidermis in vitro. *Exp Dermatol* 2023; **32**:1143–55.
- 12 Bikle DD, Xie Z, Tu C-L. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2012; **7**:461–72.
- 13 Rawlings. Recent advances in skin ‘barrier’ research. *J Pharm Pharmacol* 2010; **62**. doi:10.1211/jpp.62.06.0002.

- 14 Madison KC. Barrier function of the skin: ‘la raison d’être’ of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003; **121**:231–41.
- 15 Lefèvre-Utile A, Braun C, Haftek M, Aubin F. Five Functional Aspects of the Epidermal Barrier. *Int J Mol Sci* 2021; **22**:11676.
- 16 Rachow S, Zorn-Kruppa M, Ohnemus U, *et al.* Occludin Is Involved in Adhesion, Apoptosis, Differentiation and Ca<sup>2+</sup>-Homeostasis of Human Keratinocytes: Implications for Tumorigenesis. *PLoS ONE* 2013; **8**:e55116.
- 17 Pilgram GS, van der Meulen J, Gooris GS, *et al.* The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1511**:244–54.
- 18 Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW. Thematic Review Series: Skin Lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res* 2008; **49**:4–11.
- 19 Gallo R, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol* 2011; **131**. doi:10.1038/jid.2011.182.
- 20 Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* 2008; **158**:442–55.
- 21 Wanke I, Steffen H, Christ C, *et al.* Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol* 2011; **131**:382–90.
- 22 Kuo I-H, Carpenter-Mendini A, Yoshida T, *et al.* Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function – Implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol* 2013; **133**:988–98.
- 23 Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:679–91.
- 24 Miller LS, Modlin RL. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol* 2007; **127**:262–3.
- 25 Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol* 2019; **19**:19–30.
- 26 Clausen M-L, Agner T. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. *Curr Probl Dermatol* 2016; **49**:38–46.
- 27 Nguyen H, Trujillo-Paez J, Umehara Y, *et al.* Role of Antimicrobial Peptides in Skin Barrier Repair in Individuals with Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. doi:10.3390/ijms21207607.
- 28 Tamagawa-Mineoka R. Toll-like receptors: their roles in pathomechanisms of atopic dermatitis. *Front Immunol* 2023; **14**:1239244.

- 29 Szöllősi AG, McDonald I, Szabó IL, *et al.* TLR3 in Chronic Human Itch: A Keratinocyte-Associated Mechanism of Peripheral Itch Sensitization. *J Invest Dermatol* 2019; **139**:2393-2396.e6.
- 30 Tóth KF, Ádám D, Arany J, *et al.* Fluoxetine exerts anti-inflammatory effects on human epidermal keratinocytes and suppresses their endothelin release. *Exp Dermatol* 2024; **33**:e14988.
- 31 Wilson SR, Thé L, Batia LM, *et al.* The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell* 2013; **155**:285–95.
- 32 Thody AJ, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* 1989; **69**. doi:10.1152/physrev.1989.69.2.383.
- 33 Schneider MR, Paus R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: Lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**:181–5.
- 34 Montagna W, Ellis RA, Silver AF. Comparative aspects of sebaceous glands. In: *Advances in Biology of Skin. Vol IV. The Sebaceous Glands*. Oxford, Pergamon Press, 1963; 32–45.
- 35 Pochi PE, Strauss JS. Studies on the sebaceous glands in acne and endocrine disorders. *Bull N Y Acad Med* 1977; **53**:359–67.
- 36 Mykytowycz R, Goodrich BS. Skin glands as organs of communication in mammals. *J Invest Dermatol* 1974; **62**:124–31.
- 37 Kligman AM. The uses of sebum. *Br J Dermatol* 1963; **75**:307–19.
- 38 Zouboulis CC, Baron JM, Böhm M, *et al.* Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol* 2008; **17**:542–51.
- 39 Tóth BI, Oláh A, Szöllősi AG, *et al.* “Sebocytes’ makeup” - Novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 2011; **461**:593–606.
- 40 Zouboulis CC, Picardo M, Ju Q, *et al.* Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2016; **17**:319–34.
- 41 Lovászi M, Szegedi A, Zouboulis CC, Törőcsik D. Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermatoendocrinol* 2017; **9**:e1375636.
- 42 Schmid-Wendtner M-H, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; **19**:296–302.
- 43 Béke G, Dajnoki Z, Kapitány A, *et al.* Immunotopographical Differences of Human Skin. *Front Immunol* 2018; **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.00424.
- 44 Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol* 2009; **1**:68–71.

- 45 Zouboulis CC, Fimmel S, Ortmann J, *et al.* Sebaceous Glands. In: *Neonatal skin: structure and function* (Maibach HI, Boisits EK, eds), 2nd ed., rev.expanded. New York, M. Dekker, 2003.
- 46 Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* 2009; **1**:72–6.
- 47 Mijaljica D, Townley JP, Spada F, Harrison IP. The heterogeneity and complexity of skin surface lipids in human skin health and disease. *Prog Lipid Res* 2024; **93**:101264.
- 48 Pappas A, Fantasia J, Chen T. Age and ethnic variations in sebaceous lipids. *Dermatoendocrinol* 2013; **5**:319–24.
- 49 Ohsawa K, Watanabe T, Matsukawa R, *et al.* The possible role of squalene and its peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage caused by U.V. irradiation. *J Toxicol Sci* 1984; **9**:151–9.
- 50 Thiele JJ, Weber SU, Packer L. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:1006–10.
- 51 Zouboulis CC. Human skin: an independent peripheral endocrine organ. *Horm Res* 2000; **54**:230–42.
- 52 Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, *et al.* Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol* 2003; **120**:905–14.
- 53 Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol* 2001; **116**:793–800.
- 54 Krämer C, Seltmann H, Seifert M, *et al.* Characterization of the vitamin D endocrine system in human sebocytes in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; **113**:9–16.
- 55 Makrantonaki E, Adjaye J, Herwig R, *et al.* Age-specific hormonal decline is accompanied by transcriptional changes in human sebocytes in vitro. *Aging Cell* 2006; **5**:331–44.
- 56 Zouboulis CC, Coenye T, He L, *et al.* Sebaceous immunobiology - skin homeostasis, pathophysiology, coordination of innate immunity and inflammatory response and disease associations. *Front Immunol* 2022; **13**:1029818.
- 57 Tan JKL, Bhate K. A global perspective on the epidemiology of acne. *Br J Dermatol* 2015; **172 Suppl 1**:3–12.
- 58 Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, *et al.* What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* 2005; **14**:143–52.
- 59 Zouboulis CC, Jourdan E, Picardo M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 2014; **28**:527–32.
- 60 Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, *et al.* New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol* 2009; **18**:821–32.

- 61 Federman DG, Kirsner RS. Acne vulgaris: pathogenesis and therapeutic approach. *Am J Manag Care* 2000; **6**:78–87; quiz 88–9.
- 62 Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, *et al.* Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2016; **74**:945-973.e33.
- 63 Plewig G, Luderschmidt C. Hamster ear model for sebaceous glands. *J Invest Dermatol* 1977; **68**:171–6.
- 64 Potter JE, Prutkin L, Wheatley VR. Sebaceous gland differentiation. I. Separation, morphology and lipogenesis of isolated cells from the mouse preputial gland tumor. *J Invest Dermatol* 1979; **72**:120–7.
- 65 Zheng Y, Eilertsen KJ, Ge L, *et al.* Scd1 is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet* 1999; **23**:268–70.
- 66 Zouboulis CC, Seltmann H, Orfanos CE, Neitzel H. Establishment and Characterization of an Immortalized Human Sebaceous Gland Cell Line (SZ95)1. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:1011–20.
- 67 Lo Celso C, Berta M, Braun K, *et al.* Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells Dayt Ohio* 2008; **26**. doi:10.1634/stemcells.2007-0651.
- 68 Fasseeh AN, Elezbawy B, Korra N, *et al.* Burden of Atopic Dermatitis in Adults and Adolescents: a Systematic Literature Review. *Dermatol Ther* 2022; **12**:2653–68.
- 69 Gelfand JM, Feldman SR, Stern RS, *et al.* Determinants of quality of life in patients with psoriasis: a study from the US population. *J Am Acad Dermatol* 2004; **51**:704–8.
- 70 Horn EJ, Fox KM, Patel V, *et al.* Association of patient-reported psoriasis severity with income and employment. *J Am Acad Dermatol* 2007; **57**:963–71.
- 71 Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; **26**:314–20.
- 72 Griffiths CEM, van de Kerkhof P, Czarnecka-Operacz M. Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Dermatol Ther* 2017; **7**:31–41.
- 73 Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009; **361**:496–509.
- 74 Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:699–711.
- 75 Yan D, Gudjonsson JE, Le S, *et al.* New Frontiers in Psoriatic Disease Research, Part I: Genetics, Environmental Triggers, Immunology, Pathophysiology, and Precision Medicine. *J Invest Dermatol* 2021; **141**:2112-2122.e3.
- 76 Psoriasis - Symptoms [WWW Document]. nhs.uk. 2017.URL <https://www.nhs.uk/conditions/psoriasis/symptoms/> [accessed on 9 March 2025].

- 77 Kárpáti S, Kemény L, Remenyik Éva. Gyulladásos kórképek - Papulosus és papulosquamosus bőrbetegségek - Psoriasis (Gyulai Rolland). In: *Bőrgyógyászat és venerológia*. Budapest, Medicina Könyvkiadó, 2012; 442–55.
- 78 Zhou X, Chen Y, Cui L, *et al.* Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. *Cell Death Dis* 2022; **13**:81.
- 79 Liakou AI, Nyengaard JR, Bonovas S, *et al.* Marked Reduction of the Number and Individual Volume of Sebaceous Glands in Psoriatic Lesions. *Dermatol Basel Switz* 2016; **232**:415–24.
- 80 Rittié L, Tejasvi T, Harms PW, *et al.* Sebaceous Gland Atrophy in Psoriasis: An Explanation for Psoriatic Alopecia? *J Invest Dermatol* 2016; **136**:1792–800.
- 81 Kárpáti S, Kemény L, Remenyik Éva. Allergia és intolerancia reakciók bőrtünetei - Ekzemák - Atópiás ekzema (atópiás dermatitis) (Temesvári Erzsébet). In: *Bőrgyógyászat és venerológia*. Budapest, Medicina Könyvkiadó, 2012; 375–81.
- 82 Banks TA, Gada SM. Filaggrin mutations as an archetype for understanding the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2014; **71**:592–3.
- 83 Weidinger S, Beck LA, Bieber T, *et al.* Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primer* 2018; **4**:1–20.
- 84 Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; **358**:1483–94.
- 85 Atopic dermatitis (eczema) - Symptoms and causes [WWW Document]. Mayo Clin. URL <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/atopic-dermatitis-eczema/symptoms-causes/syc-20353273> [accessed on 9 March 2025].
- 86 Thomsen SF. Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment. *ISRN Allergy* 2014; **2014**:354250.
- 87 Panther DJ, Jacob SE. The Importance of Acidification in Atopic Eczema: An Underexplored Avenue for Treatment. *J Clin Med* 2015; **4**:970–8.
- 88 Paller AS, Kong HH, Seed P, *et al.* The microbiome in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **143**:26–35.
- 89 Shi VY, Leo M, Hassoun L, *et al.* Role of sebaceous glands in inflammatory dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 2015; **73**:856–63.
- 90 Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 1969; **224**:285–7.
- 91 Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989; **2**:1313–23.
- 92 Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, *et al.* TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:9652–6.

- 93 Li M, Yu Y, Yang J. Structural Biology of TRP Channels. In: *Transient Receptor Potential Channels* (Islam MdS, ed). Dordrecht, Springer Netherlands, 2011; 1–23.
- 94 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**:816–24.
- 95 Duncan LM, Deeds J, Hunter J, *et al.* Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 1998; **58**:1515–20.
- 96 Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* 1999; **274**:7325–33.
- 97 Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996; **272**:1339–42.
- 98 Bassi MT, Manzoni M, Monti E, *et al.* Cloning of the Gene Encoding a Novel Integral Membrane Protein, Mucolipidin—and Identification of the Two Major Founder Mutations Causing Mucopolidosis Type IV. *Am J Hum Genet* 2000; **67**:1110–20.
- 99 Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* 2003; **301**:96–9.
- 100 Miller BA. TRPC2. *Handb Exp Pharmacol* 2014; **222**:53–65.
- 101 Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011; **12**:218.
- 102 Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. PERMEATION AND SELECTIVITY OF TRP CHANNELS. *Annu Rev Physiol* 2006; **68**:685–717.
- 103 Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, *et al.* Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 2003; **278**:21493–501.
- 104 Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJS, *et al.* TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 2003; **121**. doi:10.1085/jgp.20028740.
- 105 Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol CB* 2003; **13**:1153–8.
- 106 Dong X, Wang X, Xu H. TRP Channels of Intracellular Membranes. *J Neurochem* 2010; **113**:313.
- 107 Brożyna AA, Guo H, Yang S-E, *et al.* TRPM1 (melastatin) expression is an independent predictor of overall survival in clinical AJCC stage I and II melanoma patients. *J Cutan Pathol* 2017; **44**:328–37.
- 108 Vriens J, Owsianik G, Voets T, *et al.* Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflug Arch* 2004; **449**:213–26.

- 109 Chubanov V, Köttgen M, Touyz RM, Gudermann T. TRPM channels in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2024; **20**:175–87.
- 110 Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2005; **2005**:re3.
- 111 Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, *et al.* Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 2005; **438**:1022–5.
- 112 Liman ER. TRPM5. *Handb Exp Pharmacol* 2014; **222**:489–502.
- 113 Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, *et al.* Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. *Cell* 2003; **112**:293–301.
- 114 Vennekens R, Mesuere M, Philippaert K. TRPM5 in the battle against diabetes and obesity. *Acta Physiol Oxf Engl* 2018; **222**. doi:10.1111/apha.12949.
- 115 Mardaryev A, Van Lessen M, Alam M, *et al.* Hair Follicle Chemosensation: TRPM5 Signaling Is Required for Anagen Maintenance. *J Invest Dermatol* 2021; **141**:2300–3.
- 116 Palmer RK, Atwal K, Bakaj I, *et al.* Triphenylphosphine oxide is a potent and selective inhibitor of the transient receptor potential melastatin-5 ion channel. *Assay Drug Dev Technol* 2010; **8**:703–13.
- 117 López F, Delgado R, López R, *et al.* Transduction for Pheromones in the Main Olfactory Epithelium Is Mediated by the Ca<sup>2+</sup>-Activated Channel TRPM5. *J Neurosci* 2014; **34**:3268–78.
- 118 PubChem. 2-Heptanone [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8051> [accessed on 12 July 2024].
- 119 PubChem. 2,5-Dimethylpyrazine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31252> [accessed on 12 July 2024].
- 120 Etter MC, Baures PW. Triphenylphosphine oxide as a crystallization aid. *J Am Chem Soc* 1988; **110**:639–40.
- 121 Zhang J-Q, Ye J, Huang T, *et al.* Conversion of triphenylphosphine oxide to organophosphorus via selective cleavage of C-P, O-P, and C-H bonds with sodium. *Commun Chem* 2020; **3**:1–9.
- 122 James JE. Electronic detection K9s: the newest weapon in the fight against human trafficking and child predators. *Issues Inf Syst* 2023; **24**:40–50.
- 123 Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011; **10**:601–20.
- 124 Szabó IL, Herczeg-Lisztes E, Szegedi A, *et al.* TRPV4 Is Expressed in Human Hair Follicles and Inhibits Hair Growth In Vitro. *J Invest Dermatol* 2019; **139**:1385–8.
- 125 Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, *et al.* Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest* 2014; **124**:3713–24.

- 126 Szántó M, Oláh A, Szöllösi AG, *et al.* Activation of TRPV3 Inhibits Lipogenesis and Stimulates Production of Inflammatory Mediators in Human Sebocytes-A Putative Contributor to Dry Skin Dermatoses. *J Invest Dermatol* 2019; **139**:250–3.
- 127 Bidaux G, Borowiec A, Gordienko D, *et al.* Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**:E3345–54.
- 128 Caterina MJ, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharm Basel Switz* 2016; **9**. doi:10.3390/ph9040077.
- 129 Moran MM. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2018; **58**:309–30.
- 130 Ho J-C, Lee C-H. TRP channels in skin: from physiological implications to clinical significances. *Biophys Nagoya-Shi Jpn* 2015; **11**:17–24.
- 131 Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, *et al.* Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **291**:124–9.
- 132 Sulk M, Seeliger S, Aubert J, *et al.* Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. *J Invest Dermatol* 2012; **132**:1253–62.
- 133 Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, *et al.* A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 2002; **296**:2046–9.
- 134 Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, *et al.* The TRPV4 Channel Contributes to Intercellular Junction Formation in Keratinocytes. *J Biol Chem* 2010; **285**:18749–58.
- 135 Lehen'kyi V, Beck B, Polakowska R, *et al.* TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. *J Biol Chem* 2007; **282**:22582–91.
- 136 Müller M, Essin K, Hill K, *et al.* Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 2008; **283**:33942–54.
- 137 Atoyán R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol* 2009; **129**:2312–5.
- 138 Wang H, Xu Z, Lee BH, *et al.* Gain-of-Function Mutations in TRPM4 Activation Gate Cause Progressive Symmetric Erythrokeratoderma. *J Invest Dermatol* 2019; **139**:1089–97.
- 139 Bidaux G, Borowiec A, Gordienko D, *et al.* Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**:E3345–3354.
- 140 Cheng X, Jin J, Hu L, *et al.* TRP Channel regulates EGFR signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation. *Cell* 2010; **141**:331–43.

- 141 Szöllősi AG, Vasas N, Angyal Á, *et al.* Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2018; **138**:365–74.
- 142 Lin Z, Chen Q, Lee M, *et al.* Exome Sequencing Reveals Mutations in TRPV3 as a Cause of Olmsted Syndrome. *Am J Hum Genet* 2012; **90**:558–64.
- 143 Zhao J, Munanairi A, Liu X-Y, *et al.* PAR2 mediates itch via TRPV3 signaling in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2020; **140**:1524–32.
- 144 Wu Q, Bai P, Xia Y, *et al.* Capsaicin Inhibits the Expression of Melanogenic Proteins in Melanocyte via Activation of TRPV1 Channel: Identifying an Inhibitor of Skin Melanogenesis. *J Agric Food Chem* 2020; **68**:14863–73.
- 145 Bellono N, Kammel L, Zimmerman A, Oancea E. UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**. doi:10.1073/pnas.1215555110.
- 146 Zheng J, Liu F, Du S, *et al.* Mechanism for Regulation of Melanoma Cell Death via Activation of Thermo-TRPV4 and TRPV2. *J Oncol* 2019; **2019**:7362875.
- 147 Guo H, Carlson JA, Slominski A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp Dermatol* 2012; **21**:650–4.
- 148 Tóth BI, Géczy T, Griger Z, *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Signaling as a Regulator of Human Sebocyte Biology. *J Invest Dermatol* 2009; **129**:329–39.
- 149 Bodó E, Kovács I, Telek A, *et al.* Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol* 2004; **123**:410–3.
- 150 Ständer S, Moormann C, Schumacher M, *et al.* Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* 2004; **13**:129–39.
- 151 Markovics A, Angyal Á, Tóth KF, *et al.* GPR119 Is a Potent Regulator of Human Sebocyte Biology. *J Invest Dermatol* 2020; **140**:1909-1918.e8.
- 152 Bodó E, Bíró T, Telek A, *et al.* A Hot New Twist to Hair Biology. *Am J Pathol* 2005; **166**:985–98.
- 153 Borbíró I, Lisztes E, Tóth BI, *et al.* Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J Invest Dermatol* 2011; **131**:1605–14.
- 154 Szabó IL, Lisztes E, Béke G, *et al.* The Phytocannabinoid (-)-Cannabidiol Operates as a Complex, Differential Modulator of Human Hair Growth: Anti-Inflammatory Submicromolar versus Hair Growth Inhibitory Micromolar Effects. *J Invest Dermatol* 2020; **140**:484-488.e5.
- 155 Hillhouse TM, Porter JH. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol* 2015; **23**:1–21.

- 156 Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: Twenty years since its first publication. *Life Sci* 1995; **57**:411–41.
- 157 Abels C, Soeberdt M. Can we teach old drugs new tricks?-Repurposing of neuropharmacological drugs for inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 2019; **28**:1002–9.
- 158 Liao S, Shang J, Tian X, *et al.* Up-regulation of melanin synthesis by the antidepressant fluoxetine. *Exp Dermatol* 2012; **21**:635–7.
- 159 Chéret J, Gherardini J, Bertolini M, Paus R. Fluoxetine promotes human hair follicle pigmentation ex vivo: serotonin reuptake inhibition as a new antigreying strategy? *Br J Dermatol* 2020; **182**:1492–4.
- 160 Nguyen CM, Tartar DM, Bagood MD, *et al.* Topical Fluoxetine as a Novel Therapeutic That Improves Wound Healing in Diabetic Mice. *Diabetes* 2019; **68**:1499–507.
- 161 Yoon DJ, Nguyen C, Bagood MD, *et al.* Topical Fluoxetine as a Potential Nonantibiotic Adjunctive Therapy for Infected Wounds. *J Invest Dermatol* 2021; **141**:1608-1612.e3.
- 162 Nazimek K, Kozłowski M, Bryniarski P, *et al.* Repeatedly administered antidepressant drugs modulate humoral and cellular immune response in mice through action on macrophages. *Exp Biol Med* 2016; **241**:1540–50.
- 163 Curzytek K, Kubera M, Szczepanik M, *et al.* Crosstalk between contact hypersensitivity reaction and antidepressant drugs. *Pharmacol Rep PR* 2013; **65**:1673–80.
- 164 Curzytek K, Maes M, Kubera M. Immune-Regulatory and Molecular Effects of Antidepressants on the Inflamed Human Keratinocyte HaCaT Cell Line. *Neurotox Res* 2021; **39**:1211–26.
- 165 Kim K. Neuroimmunological Mechanism of Pruritus in Atopic Dermatitis Focused on the Role of Serotonin. *Biomol Ther* 2012; **20**:506–12.
- 166 Boozalis E, Khanna R, Kwatra SG. Selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of chronic pruritus. *J Dermatol Treat* 2018; **29**:812–4.
- 167 Kouwenhoven TA, van de Kerkhof PCM, Kamsteeg M. Use of oral antidepressants in patients with chronic pruritus: A systematic review. *J Am Acad Dermatol* 2017; **77**:1068-1073.e7.
- 168 Ambati M, Apicella I, Wang S-B, *et al.* Identification of fluoxetine as a direct NLRP3 inhibitor to treat atrophic macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; **118**:e2102975118.
- 169 Su H-C, Ma C-T, Yu B-C, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates anti-inflammatory property of fluoxetine. *Int Immunopharmacol* 2012; **14**:150–6.
- 170 Bai Q, Song D, Gu L, *et al.* Bi-phasic regulation of glycogen content in astrocytes via Cav-1/PTEN/PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway by fluoxetine. *Psychopharmacology (Berl)* 2017; **234**:1069–77.

- 171 Park B-K, Kim YH, Kim YR, *et al.* Antineuroinflammatory and Neuroprotective Effects of Gyejibokryeong-Hwan in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglia. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* 2019; **2019**:7585896.
- 172 Yang H, Cao Q, Xiong X, *et al.* Fluoxetine regulates glucose and lipid metabolism via the PI3K-AKT signaling pathway in diabetic rats. *Mol Med Rep* 2020; **22**:3073–80.
- 173 Önal HT, Yetkin D, Ayaz F. Immunostimulatory activity of fluoxetine in macrophages via regulation of the PI3K and P38 signaling pathways. *Immunol Res* 2022; **71**:413.
- 174 Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1851**:882–97.
- 175 Stark A-K, Sriskantharajah S, Hessel EM, Okkenhaug K. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2015; **23**:82–91.
- 176 Zhang M, Zhang X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2019; **311**:83–91.
- 177 Solmi M, Fornaro M, Ostinelli EG, *et al.* Safety of 80 antidepressants, antipsychotics, anti-attention-deficit/hyperactivity medications and mood stabilizers in children and adolescents with psychiatric disorders: a large scale systematic meta-review of 78 adverse effects. *World Psychiatry* 2020; **19**:214.
- 178 Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, *et al.* Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; **106**:761–71.
- 179 Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1999; **112**:343–53.
- 180 Schürer N, Köhne A, Schliep V, *et al.* Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* 1993; **2**:179–85.
- 181 Niehues H, Bouwstra JA, El Ghalbzouri A, *et al.* 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Exp Dermatol* 2018; **27**:501–11.
- 182 Rikken G, Niehues H, van den Bogaard EH. Organotypic 3D Skin Models: Human Epidermal Equivalent Cultures from Primary Keratinocytes and Immortalized Keratinocyte Cell Lines. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2020; **2154**:45–61.
- 183 Rikken G, Meesters LD, Jansen PAM, *et al.* Novel methodologies for host-microbe interactions and microbiome-targeted therapeutics in 3D organotypic skin models. *Microbiome* 2023; **11**:227.
- 184 van den Bogaard E, Ilic D, Dubrac S, *et al.* Perspective and Consensus Opinion: Good Practices for Using Organotypic Skin and Epidermal Equivalents in Experimental Dermatology Research. *J Invest Dermatol* 2021; **141**:203–5.

- 185 Mildner M, Jin J, Eckhart L, *et al.* Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J Invest Dermatol* 2010; **130**:2286–94.
- 186 Pendaries V, Malaisse J, Pellerin L, *et al.* Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation. *J Invest Dermatol* 2014; **134**:2938–46.
- 187 Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 2021; **22**:12827.
- 188 Greenspan P, Fowler SD. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* 1985; **26**:781–9.
- 189 Zouboulis CC. Sebaceous cells in monolayer culture. *Vitro Cell Dev Biol - Anim* 1992; **28**:699–699.
- 190 Jones LJ, Gray M, Yue ST, *et al.* Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 2001; **254**:85–98.
- 191 Oakes SG, Martin WJ, Lisek CA, Powis G. Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2 AM) by cells. *Anal Biochem* 1988; **169**:159–66.
- 192 Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, *et al.* N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; **326**:432–42.
- 193 Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, *et al.* TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* 2015; **20**:107–26.
- 194 Cellular Impedance | Agilent [WWW Document]. URL <https://www.agilent.com/en/technology/cellular-impedance> [accessed on 4 March 2025].
- 195 TRPM5 - Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [WWW Document]. URL <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NZQ8/entry#structure> [accessed on 4 September 2024].
- 196 Smith TM, Gilliland K, Clawson GA, Thiboutot D. IGF-1 induces SREBP-1 expression and lipogenesis in SEB-1 sebocytes via activation of the Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K)/Akt pathway. *J Invest Dermatol* 2008; **128**:1286–93.
- 197 Li M-T, Pi X-X, Cai X-L, *et al.* Ferredoxin reductase regulates proliferation, differentiation, cell cycle and lipogenesis but not apoptosis in SZ95 sebocytes. *Exp Cell Res* 2021; **405**:112680.

- 198 Kwon HC, Kim TY, Lee CM, *et al.* Active compound chrysophanol of *Cassia tora* seeds suppresses heat-induced lipogenesis via inactivation of JNK/p38 MAPK signaling in human sebocytes. *Lipids Health Dis* 2019; **18**:135.
- 199 Törőcsik D, Fazekas F, Póliska S, *et al.* Epidermal Growth Factor Modulates Palmitic Acid-Induced Inflammatory and Lipid Signaling Pathways in SZ95 Sebocytes. *Front Immunol* 2021; **12**:600017.
- 200 Lyte P, Sur R, Nigam A, Southall MD. Heat-killed *Propionibacterium acnes* is capable of inducing inflammatory responses in skin. *Exp Dermatol* 2009; **18**:1070–2.
- 201 Smith TM, Cong Z, Gilliland KL, *et al.* Insulin-like growth factor-1 induces lipid production in human SEB-1 sebocytes via sterol response element-binding protein-1. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:1226–32.
- 202 Kelhämä H-L, Palatsi R, Fyhrquist N, *et al.* IL-17/Th17 pathway is activated in acne lesions. *PLoS One* 2014; **9**:e105238.
- 203 Li X, Jia Y, Wang S, *et al.* Identification of Genes and Pathways Associated with Acne Using Integrated Bioinformatics Methods. *Dermatol Basel Switz* 2019; **235**:445–55.
- 204 Trivedi NR, Gilliland KL, Zhao W, *et al.* Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:1071–9.
- 205 Meyer N, Zimmermann M, Bürgler S, *et al.* IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**:858–865.e10.
- 206 Drott JB, Alexeyev O, Bergström P, *et al.* *Propionibacterium acnes* infection induces upregulation of inflammatory genes and cytokine secretion in prostate epithelial cells. *BMC Microbiol* 2010; **10**:126.
- 207 Képiró L, Széll M, Kovács L, *et al.* Genetic risk and protective factors of TNFSF15 gene variants detected using single nucleotide polymorphisms in Hungarians with psoriasis and psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 2014; **75**:159–62.
- 208 Papakonstantinou E, Aletras AJ, Glass E, *et al.* Matrix metalloproteinases of epithelial origin in facial sebum of patients with acne and their regulation by isotretinoin. *J Invest Dermatol* 2005; **125**:673–84.
- 209 Deng Y, Ohgami N, Iida M, *et al.* Histological analysis of the skin of Abca1-deleted mice: A potential model for dry skin. *Eur J Dermatol EJD* 2019; **29**:549–51.
- 210 Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, *et al.* Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; **279**:11767–76.
- 211 Wakimoto K, Chiba H, Michibata H, *et al.* A novel diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) is decreased in human psoriatic skin and increased in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **310**:296–302.

- 212 Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, *et al.* Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006; **206**:624–35.
- 213 Brandner J, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, *et al.* Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers* 2014; **3**:e974451.
- 214 Meissner M, Obmann VC, Hoschke M, *et al.* Lessons of Studying TRP Channels with Antibodies. In: *TRP Channels* (Zhu MX, ed). Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis, 2011.
- 215 Garay C, Judge G, Lucarelli S, *et al.* Epidermal growth factor–stimulated Akt phosphorylation requires clathrin or ErbB2 but not receptor endocytosis. *Mol Biol Cell* 2015; **26**:3504–19.
- 216 Nguyen CT, Sah SK, Zouboulis CC, Kim T-Y. Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation. *Sci Rep* 2018; **8**:4024.
- 217 Hou X-X, Chen G, Hossini AM, *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates the Expression of TNF- $\alpha$  and IL-8 in Human Sebocytes via the MyD88-p65NF- $\kappa$ B/p38MAPK Signaling Pathways. *J Innate Immun* 2019; **11**:41–51.
- 218 Huang Y-C, Yang C-H, Li T-T, *et al.* Cell-free extracts of *Propionibacterium acnes* stimulate cytokine production through activation of p38 MAPK and Toll-like receptor in SZ95 sebocytes. *Life Sci* 2015; **139**:123–31.
- 219 Liu Z, Ning F, Cai Y, *et al.* The EGFR-P38 MAPK axis up-regulates PD-L1 through miR-675-5p and down-regulates HLA-ABC via hexokinase-2 in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Commun* 2021; **41**:62–78.
- 220 Szegedi K, Sonkoly E, Nagy N, *et al.* The anti-apoptotic protein G1P3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS. *Exp Dermatol* 2010; **19**:269–78.
- 221 Szlavicz E, Olah P, Szabo K, *et al.* Analysis of psoriasis-relevant gene expression and exon usage alterations after silencing of SR-rich splicing regulators. *Exp Dermatol* 2018; **27**:656–62.
- 222 Oka T, Sugaya M, Takahashi N, *et al.* CXCL17 Attenuates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Inflammation by Recruiting Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2017; **198**:3897–908.
- 223 Hemlock C, Rosenthal JS, Winston A. Fluoxetine-induced psoriasis. *Ann Pharmacother* 1992; **26**:211–2.
- 224 Sadatmadani S-F, Siadat AH, Iraj F, Alsahebhosoul F. Antidepressants and the Risk of Psoriasis Induction: A Case–Control Study. *Adv Biomed Res* 2023; **12**:16.
- 225 Tan Pei Lin L, Kwek SK. Onset of psoriasis during therapy with fluoxetine. *Gen Hosp Psychiatry* 2010; **32**:446.e9-446.e10.

- 226 Jia Wen W, Hong S, Sheng Xiang X, Jing L. Depression- and anxiety-like behaviour is related to BDNF/TrkB signalling in a mouse model of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2018; **43**:254–61.
- 227 Mitra A. Role of anti-depressant fluoxetine in the puvva treatment of psoriasis vulgaris. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2001; **67**:292.
- 228 Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, *et al.* AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; **44**:195–235.
- 229 Pope S, Zarea SG. Serum fluoxetine and norfluoxetine levels support the safety of fluoxetine in overdose. *Ann Gen Psychiatry* 2016; **15**:30.
- 230 Neudeck BL, Taddonio TE, Garner WL, Welage LS. Determination of fluoxetine and norfluoxetine concentrations in cadaveric allograft skin. *Pharmacotherapy* 1998; **18**:851–5.

## **10. Tárgyszavak**

Epidermisz, faggyúmirigy, fluoxetin, gyulladás, keratinocita, lipogenezis, proliferáció, szebocita, TRPM5 csatorna.

## **11. Key words**

Epidermis, fluoxetine, inflammation, keratinocyte, lipogenesis, sebaceous gland, sebocyte, proliferation, TRPM5 channel.

## 12. Köszönetnyilvánítás

Ezzel a pár sorral szeretném megköszönni mindazok segítségét, biztatását, támogatását, akik valamilyen formában hozzájárultak az eddigi utamhoz, melynek egyik fontos mérföldköve – de nem végállomása – ennek a disszertáció megszületése.

Köszönöm a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának **prof. dr. Csernoch László** professzor úrnak, aki biztosította a PhD munkámhoz szükséges feltételeket, és korábbi témavezetőmnek, **prof. dr. Bíró Tamásnak**, aki lehetővé tette, hogy elinduljak ezen az úton, lehetőséget adott, hogy elkezdjem PhD tanulmányaimat a kutatócsoportjában.

Hálás köszönöttel tartozom jelenlegi témavezetőm **dr. Oláh Attila** támogatásáért, aki mind szakmai, mind emberi oldalról kiemelkedő kutató, oktató, tutor és kolléga. Köszönöm a belém vetett bizalmat és hogy ennyit tanulhattam Tőled!

Köszönöttel tartozom közvetlen munkatársaimnak, **Arany Józsefnek**, **dr. Lisztes Erikának**, **Barotáné Kovács Mónikának** és volt kollégáimnak **Volascsekné dr. Tóth Kinga Fanninak** és **dr. Markovics Arnoldnak**. Sokat tanultam Tőletek és mindig önzetlenül segítettetek, vagy tettekkel vagy ha arra volt szükség, egy-egy biztató szóval.

Köszönettel tartozom **a kutatócsoport és az intézet korábbi és jelenlegi dolgozóinak, PhD hallgatóinak**, akikhez bármikor fordulhattam, ha tanácsra, segítségre volt szükségem. Közöttük is különösen köszönöm **dr. Tóth István Balázs**, **dr. Szöllösi Attila Gábor**, **dr. Czifra Gabriella**, **dr. Deák-Pocsai Krisztina**, **dr. Telek-Haberberger Andrea**, **dr. Szabó László** és **Hollósi Erika** segítségét.

Az évek alatt több **TDK hallgatóval** is együtt dolgozhattam, ez idő alatt nem csak én tanítottam, hanem sokat tanulhattam is. Köszönöm a közös munkát és az együtt elért eredményeket, **Pető Orsolya**, **Tolvaj Beatrix**, **Nyitrai Tamara** és **Nitu Devi**!

Köszönöm a lehetőséget a hollandiai Radboud University, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Experimental Dermatology Laboratory vezetőjének, **prof. dr.**

**Ellen van den Bogaard**-nak, hogy egy hónapig náluk tanulhattam, és hálás vagyok nijmegeni tutoromnak, **dr. Hanna Niehues**-nak, aki a tanulmányút során rengeteg dolgot tanított nekem és adott egy másik szemléletet a laboratóriumi munkához.

Köszönettel tartozom kollaborációs partnereink, **prof. dr. Christos C. Zouboulis**, **prof. dr. Christoph Abels**, **dr. Michael Soeberdt**, **dr. Pór Ágnes**, **dr. Váradi Judit**, **dr. Póliska Szilárd**, **dr. Kolozsi Péter** és **dr. Tóth Dezső** felbecsülhetetlen értékű segítségét.

Köszönöm a **Barátaimnak**, hogy végig mellettem álltak az egyetemi és PhD-s éveim alatt, bátorításukra mindig számíthattam.

Végezetül, a legnagyobb hálával a **Családomnak** tartozom, akik mindig támogatnak abban, hogy tanuljak, fejlődjek, és hogy megvalósítsam azt az álmot, amit a PhD fokozat megszerzése és a kutatóvá válás jelent. Köszönöm **Anyukámnak**, **Apukámnak**, **Testvéremnek** és **Nagyszüleimnek**, hiszen nélkülük nem jutottam volna el idáig, köszönöm, hogy szerető családi támogatásukra mindig számíthatok. Külön hálás vagyok a **Férjemnek** a türelméért, megértéséért, támogatásáért, hogy nem szakmabeliként is mindig kíváncsisággal fordul a munkám felé, és hogy elviseli a hosszúra nyúlt munkanapokat. Köszönöm, hogy mindig számíthatok Rátok!

A doktori disszertáció alapjául szolgáló kísérletek a *GINOP-2.3.2-15-2016-00050 (PEPSYS)*, az *EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009* „Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése”, az *EFOP-3.6.1-16-2016-00022*, az *NKFIH „FK” (134235 és 134725)* és a *Kulturális és Innovációs Minisztérium (TKP2021-NKTA-34)* pályázatai, valamint a *DE ÁOK „Momentum proof-of-concept”* alap támogatásával készültek. A fluoxetin biológiai hatásainak vizsgálatát ipari kollaborációs partnerünk (*Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel*; Bielefeld, Németország) is támogatta.

„Csak üss rá a pálcáddal, mondd, hogy „**Csíny letudva!**” ”  
J. K. Rowling: *Harry Potter és az azkabani fogoly*

## 13. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/190/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ádám-Nagy Dorottya  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10063659

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ádám, D.**, Arany, J., Tóth, K. F., Póliska, S., Váradi, J., Kolozsi, P., Tóth, D., Niehues, H., van den Bogaard, E. H., Soeberdt, M., Abels, C., Oláh, A.: Fluoxetine exerts anti-proliferative effect in human epidermal keratinocytes.  
*Arch Dermatol Res.* 317 (1), 1-6, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-024-03711-9>  
IF: 1.8 (2023)
2. **Ádám, D.**, Arany, J., Tóth, K. F., Pető, O., Nyitrai, T., Tóth, I. B., Póliska, S., Zouboulis, C. C., Oláh, A.: The TRPM5 antagonist triphenylphosphine oxide (TPPO) increases sebaceous lipogenesis and modulates immune phenotype of human sebocytes in a TRPM5-independent manner.  
*Exp. Dermatol.* 34 (5), 1-13, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.70115>  
IF: 3.5 (2023)

### További közlemények

3. Tóth, K. F., **Ádám, D.**, Arany, J., Ramirez, Y. A., Bíró, T., Drake, J. I., O'Mahony, A., Szöllősi, A. G., Póliska, S., Kílic, A., Soeberdt, M., Abels, C., Oláh, A.: Fluoxetine exerts anti-inflammatory effects on human epidermal keratinocytes and suppresses their endothelin release.  
*Exp. Dermatol.* 33 (1), 1-15, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14988>  
IF: 3.5 (2023)





4. Lőrincz, E. B., Tóth, G., Spolárics, J., Herczeg, M., Hodek, J., Zupkó, I., Minorics, R., **Ádám, D.**, Oláh, A., Zouboulis, C. C., Weber, J., Nagy, L., Ostorházi, E., Bácskay, I., Borbás, A., Herczegh, P., Bereczki, I.: Mannich-type modifications of (-)-cannabidiol and (-)-cannabigerol leading to new, bioactive derivatives.  
*Sci. Rep.* 13 (1), 19618, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-45565-7>  
IF: 3.8
5. **Ádám, D.**, Arany, J., Tóth, K. F., Tóth, I. B., Szöllösi, A. G., Oláh, A.: Opioidergic Signaling: a Neglected, Yet Potentially Important Player in Atopic Dermatitis.  
*Int. J. Mol. Sci.* 23 (8), 4140, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084140>  
IF: 5.6
6. Markovics, A., Angyal, Á., Tóth, K. F., **Ádám, D.**, Péntes, Z., Magi, J., Pór, Á., Kovács, I., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Bíró, T., Oláh, A.: GPR119 is a potent regulator of human sebocyte biology.  
*J. Invest. Dermatol.* 140 (10), 1909-1918, 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.02.011>  
IF: 8.551
7. Tóth, K. F., **Ádám, D.**, Bíró, T., Oláh, A.: Cannabinoid signaling in the skin: therapeutic potential of the "c(ut)annabinoid" system.  
*Molecules.* 24 (5), 918, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24050918>  
IF: 3.267

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30,018**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
5,3**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.05.08.

