

**Jelátviteli mechanizmusok szerepe a bőr biológiai
folyamatainak szabályozásában**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:

Dr. Telek Andrea

Témavezetők:

Dr. Bíró Tamás

Dr. Csernoch László



DEBRECEN

2007

BEVEZETÉS

A bőr funkcionális anatómiája; a HaCaT keratinocyták

Egészen a múlt század közepéig tartotta magát az az elképzelés, hogy a bőr „csupán” a szervezet mechanikai, termikus és fényingerekkel szembeni védelmét biztosítja. A részletesebb kutatások azonban rávilágítottak arra, hogy a bőr emellett számos más biológiai folyamat szabályozásában is résztvesz, így napjainkban testünk legnagyobb tömegű szerve intenzív kutatások tárgyát képezi.

A bőr (cutis) anatómiailag három részre különíthető el, melyek mind fejlődéstanilag, mind funkcionálisan eltérnek egymástól. A külvilággal közvetlenül a hám (*epidermis*) érintkezik, melyben különböző típusú sejtek fordulnak elő: keratinocyták, Merkel-sejtek, melanocyták, Langerhans-sejtek, lymphocyták. A hám következő része az irha (*dermis*). Az irhában az alábbi sejtek találhatóak: fibroblastok, histiocyták/macrophagok, hízósejtek, zsírsejtek, differenciálatlan mesenchymalis sejtek, lymphocyták, plazmasejtek, eosinophil, basophil, neutrophil granulocyták, illetve monocyták. A hám legbelső része a bőralja (*subcutis*).

Az epidermális keratinocyták biológiai funkciói jól vizsgálhatók HaCaT sejtvonalon (Human Adult skin keratinocytes, low Ca²⁺, elevated Temperature). A sejteket egy melanomában szenvedő férfibeteg hátbőrének azon részéből izolálták, amely, bár a tumor melletti részből származott, de bizonyítottan nem szenvedett malignus átalakulást. A HaCaT sejtek genetikailag különböznek a normál humán epidermális keratinocytáktól (NHEK), ugyanakkor (a fokozott proliferációs képesség mellett) megtartották differenciálódási potenciáljukat.

A szőrtüsző funkcionális anatómiája

A bőr egyik függeléke a szőrtüsző. A szőrtüszőt első megközelítésben egy hagymához lehet hasonlítani, ahol a hagyma belső leveleinek a *dermális papilla (DP)* felel meg, amit a *belső és külső gyökérhüvely* (inner root sheath, *IRS*; outer root sheath, *ORS*) *keratinocyták* hengerei borítanak. A hagyma szára reprezentálja a folyamatosan növekvő hajszálat, melynek rétegeit a DP fölött elhelyezkedő keratinocyták hozzák létre, míg színét a folliculáris melanocyták pigmenttermelése határozza meg. A hajszál aktívan növekszik az alatta található IRS-sel együtt mozogva, melynek terminálisan differenciálódott keratinocytákból felépülő rétegei (Henle, Huxley, kutikula) borítják be és védik a hajszálat.

A lassú proliferációs rátával jellemezhető ORS alkotja a szőrtüsző következő rétegét, mely ellátja a szőrtüszőt, valamint a hajszálat oxigénnel, tápanyagokkal, sejtekkel (Langerhans-sejtek, keratinocyták), továbbá a hajciklus szabályozásában meghatározó szereppel bíró mediátorokkal.

A hajciklus

A szőrtüszőt az egész életen át váltakozó regressziós és regenerációs tevékenysége teszi egyedülállóvá a többi emlős szerv közül. A regresszió és regeneráció ezen periódikus váltakozását nevezzük *hajciklus*nak, melynek három jellegzetes szakaszát különböztetjük meg. Az *anagén* fázisban, elsősorban az epithelialis rétegekben, aktív proliferáció zajlik, a szőrtüsző ebben a fázisban éri el maximális fejlettségét. A *katagén* fázisban a szőrtüsző növekedése megáll, regressziós folyamatok indulnak be. Kiterjedt apoptózis zajlik a keratinocyták különféle rétegeiben, míg a DP sejteinek számában bekövetkező csökkenés a DP-ból való kivándorlás eredménye. A

melanocyták programozott elhalása miatt csökken a pigmentszemcsék mennyisége is. Az utolsó, nyugalmi *telogén* fázis pedig a tulajdonképpeni felkészülés a következő anagénre.

Számos növekedési faktorról, citokinről, hormonról és egyéb molekuláról bizonyosodott be, hogy a hajciklus valamelyik pontján képes beavatkozni a fenti folyamatba. Ezen molekulákat a hajciklus pozitív, illetve negatív regulátorainak nevezzük.

A vanilloid (capsaicin) receptor-1 (TRPV1)

A capsaicin-receptor egy nem-specifikus (főként Ca^{2+} -ionokra permeábilis) kationcsatorna, melyet ma a nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekintünk. A receptor klónozása és molekuláris karakterizálása Caterina és munkatársai (1997) nevéhez fűződik. A patkány TRPV1 egy 838 aminosavból álló, 95 kDa tömegű fehérje, melyet 2514 nukleotid kódol. Strukturális sajátosságai alapján a TRPV1 homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (tranzien receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptorcsalád egyik altípusának tekinthető. A receptorok közös jellemzője, hogy 6-transzmembrán doménnel, valamint intracelluláris N- és C-terminálissal rendelkeznek, és valószínűleg tetramer formában vannak jelen a sejtekben.

Az első vegyület, mely összefüggésbe hozható a TRPV1-gyel, a csípős paprikából (*Capsaicum annuum*) izolálható capsaicin. A capsaicin celluláris hatásmechanizmusa a szenzoros neuronokon három egymást követő folyamattal jellemezhető: az *excitációval*, a *deszenzitizációval* és a *neurotoxicitással*. Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy a TRPV1-et nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos, a szervezetben képződő endogén anyag („endovanilloidok”) is képes aktiválni (pl. hő, acidózis, gyulladáshoz vezető mediátorok, stb.)

A TRPV1 expressziója a szervezetben

A receptort elsőként a primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportjában írták le. Beszámoltak emellett arról is, hogy az agy számos további helyén is (cerebellum, cortex, striatum, bulbus olfactorius, híd, hippocampus és thalamus) megtalálható a TRPV1. Ugyanakkor a receptor elhelyezkedése és működése nem csupán neuronális szövetekre korlátozódik. Bíró és mtsai például beszámoltak capsaicin-szerű hatásról hízósejteken és glióma sejteken. További kutatócsoportok emellett beszámoltak a capsaicin specifikus hatásairól, többek között, humán polimorfonukleáris sejteken, lymphocytákon, thymocytákon, bronchiális epitheliumon, valamint a húgyhólyag epitheliális, intersticiális és simaizomsejtjeiben.

A TRPV1 funkcionális szerepe a szőrtüszőben – előzetes eredmények

A legújabb felfedezések egyike volt, amikor munkacsoportunk (másokhoz hasonlóan) a TRPV1-et funkcionálisan is kimutatta humán bőr epidermisén és tenyésztett epidermális keratinocytákon. Kísérleteink során beszámoltunk a TRPV1 expressziós mintázatáról a bőr különböző rétegeiben (epidermis) és sejtjeiben (Langerhans-sejtek, sebocyták, az erek simaizomsejtjei, a faggyúmirigy epithelialis sejtjei, hízósejtek). Humán szőrtüszőben a TRPV1 az ORS, az IRS, valamint a mátrix keratinocyták rétegében fejeződött ki. Megállapítottuk emellett, hogy a TRPV1-immunoreaktivitás változik a hajciklus során: katagén fázisú folliculusban, elsősorban az ORS-ben, fokozott TRPV1 expressziót láttunk. Kimutattuk továbbá, hogy capsaicin alkalmazása dóziszfüggően csökkentette a szőrtüsző elongációját, mely hatás kivédhető volt a TRPV1 specifikus antagonistá iodo-resiniferatoxinnal (I-RTX). Bebizonyosodott az is, hogy a capsaicin csökkentette a proliferáló, Ki67 pozitív sejtek számát és növelte a TUNEL pozitív apoptotikus sejtek

arányát. Emellett a TRPV1 aktiválása katagén átalakulást indukált a folliculusok nagy részében.

HaCaT és ORS keratinocytákon szintén erőteljes TRPV1 expressziót figyeltünk meg. A receptor funkcionális szerepét bizonyította, hogy capsaicin alkalmazása megemelte az intracelluláris kalciumkoncentrációt ($[Ca^{2+}]_i$), mely kivédhető volt I-RTX alkalmazásával, valamint extracelluláris $[Ca^{2+}]_e$ csökkentésével. A proliferációs és apoptózis markerek flow-cytometriai analízise megerősítette eddigi eredményeinket: a Ki67 marker, valamint a hajciklus pozitív regulátorainak szintje megemelkedett, míg az annexin-V és a hajciklus negatív regulátorainak szintje lecsökkent capsaicin hatására.

A cannabinoidok

A cannabinoidok nevüket a *Cannabis sativa* leveléből izolált Δ^9 – tetrahydrocannabinolról (Δ^9 -THC) -ról kapták. A cannabinoid vegyületek különböző alcsoportokra oszthatók: növényi, endogén és szintetikus cannabinoidokra. A *növényi cannabinoidok* közé tartozik a már említett Δ^9 -THC, valamint a Δ^8 -THC. Az elsőként felfedezett *endogén cannabinoid* az N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide, AEA). Az AEA az eicosanoidok közé tartozó, 22 szénatomból álló vegyület, mely a preszinaptikus membránon retrográd hírvivőként gátolja többek között az NMDA, a szerotonin és az acetilkolin felszabadulását. Az eicosanoidok közé tartozik ezen kívül a 2-arachidonoylglycerol (2-AG). A *szintetikus cannabinoidok* közé a Δ^9 -THC analógjai tartoznak.

A cannabinoid receptorok

A cannabinoid 1 receptor (CB1) génje a 6. kromoszómán található, a q14-15-ös régióban. A 473 aminosavból álló, 60 kDa tömegű molekula szerkezetileg a 7-transzmembrán fehérjék közé tartozik. A CB1 G-

protein jelátvitellel működő, metabotróp receptor, mely aktivációjának hatására a membránban különböző Ca^{2+} -és K^+ -csatornák modulációja következik be.

Az ugyancsak 7-transzmembrán doménnel rendelkező metabotróp CB2 génje az 1. kromoszóma hosszú karjának 36. régiójában található. A protein 360 aminosavból áll és 44% -os homológiát mutat a CB1-ral. A két receptor transzmembrán régiójában 68%-os a homológia, mely arra utal, hogy a két molekula funkciójában nagy a hasonlóság. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a CB2, hasonlóan a CB1-hez, pl. a mitogén-aktiválta protein kináz szignalizációs útvonalon keresztül génexpressziós változásokat is elindíthat.

A cannabinoid receptorok előfordulása a szervezetben

A CB1-et kezdetben az idegrendszerben írták le, ahol azt találták, hogy a receptor aktiválása szerepet játszik pl. a memóriafolyamatokban, a tanulásban (long-term potentiation), vagy a viselkedési reakciók szabályozásában. A CB2 ezzel szemben legnagyobb mennyiségben az immunrendszerben fordul elő. Kisebb mennyiségben detektáltak CB2 mRNS-t a thymusban, csontvelőben, szívben, tüdőben, prostatában, uterusban, kisagyban, valamint a hippocampusban.

A cannabinoid rendszer a bőrben

Az utóbbi időszak kísérletei bebizonyították, hogy a cannabinoid rendszer, az ideg-, illetve az immunrendszeren kívül, megtalálható a humán bőrben is. Kimutatták, hogy mindkét receptor jelentős mértékben kifejeződik a humán bőr különböző szöveti elemeiben (pl. epidermális keratinocyták, faggyúmirigy epithelialis sejtjei, hízósejtek). Megállapították emellett, hogy mind a HaCaT, mind a NHEK tartalmazzák az endocannabinoidok metabolizmusában szerepet játszó

enzimeket, valamint képesek az endocannabinoid szintézisére is. Végezetül bebizonyosodott, hogy a receptorok aktiválása olyan „perifériás” folyamatok aktivitásában eredményez mélyreható változásokat, mint pl. a tumorigenesis, a gyulladásos és neuropathiás fájdalom, valamint a viszketés.

Mechanikai ingerek hatása a bőrre; mechanoszenzitív csatornák

A mechanikai ingerek érzékelésére számos sejt képes a szervezetben, így a humán bőr különféle sejtpopulációi is. Tartós mechanikai hatásra a bőr sejtjeinek hyperproliferációja következhet be, amely különböző bőrelváltozásokhoz (pl. hyperkeratosis) vezethet.

A mechanikai hatások érzékelésére képes mechanoszenzitív csatornák (MSC) megnyílása megváltoztathatja a sejtek membránpotenciálját, illetve az $[Ca^{2+}]_i$ -t, mely utóbbi emelkedése pl. aktiválhatja a protein kináz C (PKC) izoenzimeket. Ezen mechanizmusokról ugyanakkor ismert, hogy jelentős mértékben résztvesznek a keratinocyták proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában.

A MSC egy csoportja a sejttérfogat szabályozásában vesz részt. A sejttérfogat megváltoztatásának egyik módja a sejtet körülvevő oldat tonicitásának növelése, illetve csökkentése, mely csökkenti, illetve növeli a sejttérfogatot. Ezáltal a fent említett MSC-k aktiválódását/inaktiválódását okozza, mely változatos jelátviteli folyamatokat, s így biológiai válaszokat indít el a sejtekben.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Korábbi munkánk során beszámoltunk a TRPV1-nek a humán szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött funkcionális szerepéről. Jelen kísérleteinkben először azt kívántuk vizsgálni, hogy mi a hasonlóság a humán és az egér bőr TRPV1 expressziója között. Ezt követően összehasonlítottuk a hajciklus időbeli változásait a két faj között, valamint (TRPV1 génhíányos egerek vizsgálatával) azt elemeztük, hogy egérben hogyan változik a hajciklus TRPV1 hiányában.

2. Kísérleteink következő részében a cannabinoid receptorok (CB) expressziós mintázatát határoztuk meg a szőrtüszőben, valamint vizsgáltuk, hogy változik-e a receptorok expressziós mintázata a hajciklus különböző fázisaiban. Ezek után arra kerestük a választ, hogy a különböző cannabinoid vegyületek alkalmazása hogyan befolyásolja a folliculusok különböző biológiai funkcióit. Ennek során elemeztük az AEA, a 2-AG, illetve a Δ^9 -THC hatását a szőrszál elongációjára, a proliferációs és apoptotikus folyamatok jellegzetességeire, valamint a hajciklus eseményeinek időbeli alakulására. Végezetül azt vizsgáltuk, hogy a humán szőrtüsző növekedési mechanizmusának szabályozásában van-e kapcsolat a TRPV1 és CB rendszerek között.

3. Munkánk utolsó fázisában a mechanoszenzitív csatornák (MSC) aktivációjának hatását vizsgáltuk HaCaT keratinocytákon. Különböző hipotonias stimulusok alkalmazásakor meghatároztuk a kialakuló membránpotenciál-változások mértékét, valamint azt, hogy ezen módosulások hátterében mely ioncsatornák megnyílása állhat. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az MSC-k aktiválódása hogyan szabályozza a sejtek proliferációs és differenciálódási állapotait.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán szőrtüszők és a HaCaT keratinocyták tenyésztése

A hajfollikulusokat plasztikai sebészeti operációkból visszamaradt hajas fejbőrrel izoláltuk. A follikulusokat kiegészített Williams' E médiumban 7 illetve 9 napon keresztül tenyésztettük és naponta mértük a hossznövekedését. Adott anyag hatásának vizsgálatát 18-24 follikuluson végeztük el, az adatok statisztikai elemzése Mann-Whitney teszttel történt. A tenyésztés végén a szőrtüszőket beágyaztuk és 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk belőlük. A plasztikai sebészeti operációkból kapott bőrdarabok szolgálták a teljes bőrt reprezentáló fagyasztott metszetek készítésére is.

A HaCaT keratinocytákat 10% embrionális borjúsavót és antibiotikumokat tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük.

TRPV1 knockout egér

Kísérleteink egy részében B6.129S4 típusú, nőstény TRPV1 knockout egereket használtunk. A mutációt az egér TRPV1-et kódoló 11B3 kromoszómáján lokalizált génben hozták létre, ahol az ötödik transzmembrán domén egy részében, a hatodik transzmembrán doménben, valamint a köztük levő hurkot kódoló exonban indukáltak mutációt. Az egerek szőrét a háti területről epilálással eltávolítottuk, és így indukáltuk a hajciklus kezdeti stádiumát. A TRPV1 expressziójában bekövetkezett változásokat a morfológiai ciklus 45. napjáig követtük (P1-P45) nyomon. A hát bőrét a ciklus különböző stádiumaiban eltávolítottuk és belőlük metszeteket készítettünk. Kontrollként azonos korú, C57BL/6 vad típusú egereket használtunk.

Szövetteni és morfológiai vizsgálatok

A humán szőrtüszők morfológiai vizsgálatára a 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteken haematoxylin-eozin festést végeztünk. A folliculusokat meghatározott morfológiai kritériumok alapján soroltuk a megfelelő stádiumba (anagén, katagén). A folliculusok melanintartalmának meghatározására Masson-Fontana festést végeztünk.

Az egerek folliculusainak hajciklus-stádiumai közötti különbségeket kvantitatív és kvalitatív hisztomorfometria segítségével határoztuk meg, az állatok bőréből készített haematoxylin-eozin festett metszeteken. A *kvantitatív hisztomorfometriai* vizsgálatokhoz elegendő számú (minimum 20-20 darab csoportonként) longitudinálisan metszett folliculus hajciklus-stádiumát határoztuk meg adott morfológiai kritériumok szerint. Ennek alapján az anagén fázisú szőrtüszők I-VI-ig, a katagén fázisú szőrtüszők I-VIII-ig terjedő stádiumba sorolhatók, míg a telogén fázist nem különítjük el további stádiumokra.

Ezt követően a kvantitatív meghatározást tovább pontosítottuk az úgynevezett „kumulatív hajciklus pont” kiszámításával (*kvalitatív hisztomorfometria*). Ennek során a különböző stádiumban levő folliculusokhoz hozzárendelünk egy pontértéket (például anagén I=1 pont), és az így kapott értéket megszorozzuk egy stádiumnak megfelelő szorzóval. Ekkor anagén fázisú folliculus esetén 1-6-ig, katagén fázisú esetén 1-8-ig terjedő értéket kapunk.

Immunhiszto- és -citokémia

A CB1, illetve CB2 izolált szőrtüszőn való kimutatására, valamint a TRPV1 expressziójának kontroll, illetve knockout egéren való meghatározására a tyramide-substrate amplification (TSA), valamint az alkalikus foszfatáz alapú ABC módszereket használtunk.

A tenyésztett szőrtüszőkön a proliferáló és az apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására a Ki-67/TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) kettős festést használtuk. Az eljárás során az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker immunhisztokémiai kimutatása ad felvilágosítást, az apoptotizált sejtek megjelenítése pedig a DNS-fragmentáció során keletkezett szabad 3' végek jelölésén alapul.

Kvantitatív PCR (Q-PCR)

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System segítségével, az 5' nukleáz módszer felhasználásával történt. A teljes RNS-t 100-200 darab frissen izolált szőrtüszőből TRIzol reagens segítségével vontuk ki a gyártó cég instrukcióit követve. A teljes RNS-ből első lépésben cDNS-t állítottunk elő, majd a PCR amplifikációt TaqMan primerek és próbák alkalmazásával végeztük. Belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz szolgált.

A folliculusok endogén cannabinoid tartalmának meghatározása

Frissen izolált, kb. 50 mg tömegű folliculust $^2\text{H}_4$ -AEA-t tartalmazó pufferrel homogenizáltuk, majd kapcsolt folyadék kromatográfiás és tömegspektroszkópiás eljárással azonosítottuk az endogén cannabinoidokat. A kapott értékeket fmol/mg és pmol/mg nedves szövet mértékegységben adtuk meg.

Alkalmazott oldatok

A HaCaT keratinocyták hipotóniás stressztűrésének vizsgálatára a sejteket a mérések előtt 30 percig szobahőmérsékleten normál Tyrode-oldatban tartottuk. Ezt követően a sejteket módosított Tyrode-oldatba tettük, amelyben a NaCl tartalom felét Na-glutamáttal helyettesítettük. A

hipotóniás oldatok ozmolalitása a Na-glutamát felének, illetve egészének eltávolítása után rendre 75%-ra (TY75), illetve 50%-ra (TY50) csökkent. A kalciummentes oldat előállításakor a Tyrode-oldatot 1 mM EGTA-val egészítettük ki és kihagytuk a CaCl_2 -ot.

Az alacsony szérumszámú, hipotóniás tenyésztőoldat (LS50) esetében a normál tenyésztőoldat térfogatának felét desztillált vízzel pótoltuk. Kontrollként csökkentett szérumszámú médiumot alkalmaztunk (LS): ekkor desztillált víz helyett Tyrode-oldatot használtunk, így az LS oldat izotóniás maradt, ugyanakkor szérumszámja a felére csökkent és megegyezett az LS50-ével.

Patch-clamp és konvencionális mikroelektródás mérések

A hipotóniás stressz nyugalmi membránpotenciálra, valamint a sejtmembránon átfolyó áramokra kifejtett hatását feszültség-clamp technikával, egész-sejt konfigurációban vizsgáltuk. A mérésekhez Axopatch 200A típusú erősítőt használtunk. A 2-3 M Ω ellenállású pipettákat általában K-aszpartát-tartalmú belső oldattal töltöttük fel. A Ca^{2+} -aktivált áramok vizsgálatokor a pipetta oldatban 5 mM BAPTA-t alkalmaztunk az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésének kivédésére. A passzív elektromos tulajdonságok vizsgálatokor a sejteket 5 mV nagyságú, 40 ms időtartamú impulzussal ingereltük. A tartási potenciált -40 mV-ra állítottuk, a sejtek lineáris kapacitása 20 és 40 pF között változott. Az elektromos jeleket 1 kHz frekvenciával rögzítettük, majd az elemzést pClamp 6.0.4 szoftver segítségével végeztük.

A transzmembrán potenciálváltozásokat konvencionális mikroelektróda technikával detektáltuk. A mikroelektródákat 3 mM KCl-al töltöttük fel, a pipettahegy ellenállása 25 és 30 M Ω között változott. Az elektródákat Axoclamp-2B erősítő bemenetéhez csatlakoztattuk. A

jeleket 100 kHz frekvenciával, Digidata 1200 rendszer segítségével rögzítettük.

A differenciálódási markerek Western (immuno) blot analízise

A sejtek ultrahangos feltárását követően a lizátumok proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel határoztuk meg. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét a proteineket, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Ezután a membránokat az elsődleges involukrin-, filaggrin- vagy transzglutamináz-ellenes antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át, majd másodlagos antitestekkel történő jelölés következett. Az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel tettük láthatóvá.

Intracelluláris kalciummérés

Az $[Ca^{2+}]_i$ változásának mérésére a fedőlemezre szélesztett keratinocytákat 5 μ M kalcium érzékeny fluoreszcens fura-2 festék acetoximetilészter (AM) formájával 60 percig inkubáltuk 37°C-on. A fura-2 AM-rel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket ezután invertáló fluoreszcens mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva egy fotoelektron-sokszorozóval. Az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat Grynkiewicz és munkatársai (1985) által leírt egyenletekkel számoltuk ki:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (F_{380}[0] / F_{380}[Ca]),$$

ahol a K_D -t 76 nmol/l, az $R_{min} = 0,42$, $R_{max} = 8,6$ és $F_{380}[0] / F_{380}[Ca] = 15,3$.

Az élő sejtszám vizsgálata

A mechanikai stressz, illetve a tenyésztőoldat szérumszertartalmának hatását az élő sejtszámra MTT alapú proliferációs assay segítségével határoztuk meg. A módszer alapja, hogy az élő sejtek mitochondriális dehidrogenáz enzimje az MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium bromid) tetrazolium gyűrűjét hasítja és vízben oldhatatlan formában kristályok keletkeznek, melyek mennyisége kolorimetriásan mérhető 550 nm-en. A 96-lyukú tenyésztőedényben szélesztett sejteket normál, illetve csökkentett szérumszertartalmú oldatban kezdtük el tenyészteni. A kontroll kísérletek során a sejteket 12 napon keresztül a kiegészített DMEM tápoldatokban tenyészettük. A hypotóniás stressz hatásának tanulmányozása esetén, amennyiben a kiindulási oldat NS volt, a tenyésztés 6. napján lecseréltük LS, LS50-re, míg LS oldat kezdetben történő alkalmazásakor LS50, illetve NS oldatra váltottunk. Az élő sejtszám változásait a 2.,4.,6.,8.,10. és 12. napon mértük.

Statisztikai elemzések

Mérési eredményeinket átlag \pm SEM formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szinttel dolgozva a Student-féle *t*-tesztet alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

1. A TRPV1 szerepe a hajciklus szabályozásában; a hajciklus fázisainak időbeli változása TRPV1 knockout egerekben

A TRPV1 expressziója hajciklus-függő változást mutat egér bőrben

Vadtípusú egerek bőrét vizsgálva megállapítottuk, hogy (hasonlóan a humán bőrben tapasztaltakhoz) a TRPV1 elsősorban a bazális epidermis rétegekben mutat jelentős expressziót. A folliculusok epithelialis sejtjeiben szintén magas TRPV1 immunreaktivitást (ir) figyeltünk meg, míg a DP TRPV1 negatívnak bizonyult. Ugyancsak hasonlóan a humán adatokhoz, a legerőteljesebb TRPV1-ir-t a katagén fázisú folliculusok epithelialis részében, valamint a telogén folliculusok másodlagos hajcsírájában detektáltunk. Az anagén fázisú, gyorsan proliferáló epithelialis réteg, valamint az IRS és a disztális, prekortikális mátrix keratinocyták csökkent TRPV1 expressziót mutattak. Ez alól csak az anagén VI-os fázisú folliculus asszimmetrikus, lemez alakú mátrix keratinocytáiban megjelenő igen kifejezett TRPV1-ir volt kivétel.

A TRPV1 hiánya késlelteti a folliculusok katagén és telogén transzformációját egér bőrben

Ezután kvantitatív hisztomorfometria segítségével összehasonlítottuk a hajciklus időbeli lefolyásában bekövetkező változásokat kontroll, valamint TRPV1 knockout egerekben. Azt találtuk, hogy a 19. napig nincs kimutatható makroszkópos, illetve mikroszkópos különbség a vad típusú és a knockout egerek között. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy míg a 19. napon a vad típusú egerek folliculusai már beléptek a morfogenezis 8. stádiumába (ami megfelel a katagén transzformációnak), addig a knockout állatok folliculusai ehhez képest

szignifikáns kését mutattak. Ehhez hasonlóan a knockout állatok szőrtüszőinek telogén transzformációja ugyancsak elmaradt a vad típusúakhoz képest (a ciklus 25. napján). Ugyanakkor az első spontán anagén fázisba történő átmenetben (a ciklus 32. napja), valamint az ezt követő hajciklusban (a ciklus 45. napja) nem volt szignifikáns különbség a két állatcsoport között.

2. A cannabinoid receptorok szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

A CB1 mind protein, mind mRNS szinten kifejeződik a humán folliculusban

Kísérleteink következő részében a CB1 és CB2 expresszióját vizsgáltuk humán túlélő szőrtüsző szervkultúrában. Az anagén VI fázisú szőrtüszőben a legintenzívebb festődést az ORS keratinocyták rétegében detektáltuk (az intenzitás a folliculus disztális része felé haladva növekedett). Emellett kisebb mértékű CB1 expressziót figyeltünk meg az IRS keratinocyták, valamint a CTS rétegében. Ezzel ellentétben a DP, illetve a mátrix keratinocyták rétege CB1 negatívnak bizonyult. Eredményeinket Q-PCR technika felhasználásával is alátámasztottuk.

Megállapítottuk emellett, hogy katagén fázisban, elsősorban a mátrix keratinocytákban, fokozódott a CB1 expresszió. Ez különösen azért bír nagy jelentőséggel, mert ebben a régióban az anagén fázisban nem tapasztaltunk CB1 immunoreaktivitást.

Végezetül fontos eredményünk volt, hogy a CB2 jelenlétét nem sikerült kimutatnunk a humán szőrtüszőben (sem immunfestéssel, sem Q-PCR módszerrel).

Az AEA dózisfüggően gátolja a hajszál növekedését és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptozist és katagén transzformációt indukál

Ezt követően az endocannabinoidok hatását elemeztük a szőrtüsző biológiai folyamataira. Megállapítottuk, hogy az AEA dózisfüggően csökkentette a hajszál elongációját. Ezen hatás a CB1-en keresztül valósult meg, hiszen az önmagában hatástalan CB1 specifikus antagonistá AM-251 teljes mértékben felfüggesztette az AEA hatását. Ki67/TUNEL festés segítségével kimutattuk azt is, hogy az AEA dózisfüggően növelte az apoptotikus, TUNEL+ sejtek számát, ugyanakkor szignifikáns módon lecsökkentette a proliferáló, Ki67+ sejtek számát.

Az apoptotikus sejtek számának fent bemutatott fokozódása jó összhangban volt a hajciklusban megfigyelt eseményekkel; azaz, az AEA hatására a follikulusok katagén transzformációjának aránya szignifikánsan nőtt a kezeletlen szőrtüszőkhöz képest. Ez alátámasztja a növekedési görbék eredményeit, hiszen a katagén, azaz regressziós fázisra az apoptotikus folyamatok fokozódása jellemző. Kimutattuk továbbá, hogy az AEA nem befolyásolta a szőrtüszők melanintartalmát.

Érdekes volt megfigyelnünk emellett, hogy a másik endocannabinoid, a 2-AG nem volt hatással a fenti folyamatokra.

Az endocannabinoidok kifejeződnek a humán szőrtüszőben

A follikulusok endogén cannabinoidtartalmának meghatározására spektrometriás kísérleteket végeztünk. Megállapítottuk, hogy a tenyésztett humán follikulusok jelentős – más perifériás szövettel (így pl. szívizom) összevethető – mennyiségű (6.6-11.2 fmol/mg szövet) AEA-t tartalmaznak. Kimutattuk ugyanakkor azt is, hogy a 2-AG szőrtüszőben mérhető koncentrációja csupán mintegy 0.3-0.3 fmol/mg szövet.

A Δ^9 -THC jól „utánozza” az AEA hatását

Ezt követően az exocannabinoid Δ^9 -THC hatását elemeztük. Megállapítottuk, hogy Δ^9 -THC az AEA hatásával szinte megegyező módon változtatta meg a humán szőrtüsző biológiai folyamatait. Azaz, az exocannabinoid dóziszfüggő módon meggátolta a hajszálak hossznövekedését, lecsökkentette a proliferáló (Ki67+) sejtek számát, valamint apoptózist (TUNEL+ sejtek számának növekedése) és katagén regressziós transzformációt váltott ki.

Egyedüli különbségnek az adódott, hogy a Δ^9 -THC szignifikánsan és dóziszfüggően lecsökkentette a hajszál melanintartalmát, mely hatás független volt a katagén transzformáció során megfigyelt depigmentációtól.

A CB1- és TRPV1-kapcsolt szignalizáció egymástól függetlenül, de additív módon gátolja a szőrtüsző növekedését

Korábbi kísérleteinkben bemutattuk, hogy a TRPV1 capsaicinnel történő aktiválása az AEA hatásával teljes mértékben megegyező módon meggátolta a szőrtüsző növekedését. Felmerült tehát, hogy a számos sejtes rendszerben „endovanillodként” is funkcionáló AEA (a CB1 mellett) a TRPV1-en keresztül is hat(hat).

Kombinált TRPV1- és CB1-specifikus antagonist/agonista kezelési protokollokat alkalmazva megállapítottuk, hogy a két receptor-mediált rendszer egymástól függetlenül, de additív módon képes a follikulus növekedésének gátlására. Kimutattuk ugyanis, hogy az AEA hajszál-elongációt és mátrix keratinocytá-proliferációt csökkentő, valamint az apoptózist fokozó hatását csak a CB1-specifikus antagonist tudta kivédeni, de a TRPV1 antagonist I-RTX nem. Ezzel jó összhangban megállapítottuk, hogy a capsaicin (az AEA-val teljes mértékben megegyező) hatását az I-RTX kivédte, míg a CB1

antagonista AM-251 hatástalannak mutatkozott. Végezetül bebizonyosodot, hogy az AEA és a capsaicin hatásai additívak a szőrtüsző növekedésének gátlásában.

3. Stretch-aktivált csatornák szerepe a keratinocyták proliferációjában és membránpotenciáljának szabályozásában

Hypotóniás stressz alkalmazása lecsökkenti a keratinocyták nyugalmi membránpotenciálját és membránáramokat vált ki

Ezt követően a mechanikai stressz hatását vizsgáltuk HaCaT keratinocyták különféle sejtfolymataira. Konvencionális mikorelektroda technikával, valamint a patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációjának alkalmazásakor kimutattuk, hogy hypotóniás oldatok (TY75, TY50) használatakor a sejtek nyugalmi membránpotenciálja a kontrollhoz képest egyre negatívabb értéken stabilizálódott. Megállapítottuk azt is, hogy olyan HaCaT keratinocytákon, melyek 12 órán keresztül az általános PKC aktivátor forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) előkezeltünk, a hypotóniás oldatok szignifikánsan nagyobb mértékű hyperpolarizációt okoztak, mint a nem-kezelt kontroll sejteken.

Patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációját segítségével azt is vizsgáltuk, hogy a megfigyelt membránpotenciál-változások háttérében milyen membránáramok állnak. Normál tonicitású tenyésztőoldatban nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és PMA-val előkezelt sejtek membránjain átfolyó áramokban. Hypotóniás oldat alkalmazásakor ugyanakkor megnőtt a membránon átfolyó áram nagysága, amely változás kifejezettebb volt a PMA-val előkezelt, mint kontroll keratinocytákon.

A stressz-indukálta áram nagyságát a Cl⁻ elvonása csökkenti, ugyanakkor az extracelluláris Ca²⁺ pufferelese nem változtatja meg jelentősen

Annak eldöntésére, hogy milyen ionáram lehet felelős a megfigyelt különbségekért a két csoportban, Cl⁻-mentes oldatban végeztünk méréseket. A Cl⁻ elvonása kis mértékben, de nem szignifikánsan depolarizálta a membránt a kontroll állapothoz képest. A Cl⁻-mentes hypotóniás oldat alkalmazása ugyanakkor csak igen kismértékben hyperpolarizálta a membránt, ami szignifikánsan kisebb mértékű membránpotenciál-változás volt, mint azt a Cl⁻-t tartalmazó (kontroll hypotóniás) oldatok esetében tapasztaltuk. Ezen eredménnyel összhangban az áram-feszültség karakterisztika elemzéséből kiderült, hogy a Cl⁻ elvonása lecsökkentette az egyes membránpotenciál-értékekhez tartozó áramértékeket a kontrollhoz képest.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az [Ca²⁺]_i emelkedése részt vesz-e az előbb leírt Cl⁻-áram aktiválásában. Kimutattuk, hogy az ismert Ca²⁺ puffer BAPTA intracelluláris alkalmazása nem védte ki a hypotóniás stressz által okozott áramnövekedést, azaz a mechanoszenzitív Cl⁻-csatornák aktiválódása nem mutatott lényeges kalciumfüggést.

Hypotóniás oldat alkalmazása [Ca²⁺]_i-emelkedést ált ki

További kísérleteink során azt tanulmányoztuk, hogy a hypotóniás stressz okoz-e változást a keratinocyták [Ca²⁺]_i-jában. Kontrollként az ATP stimulusra kialakuló Ca²⁺-választ vizsgáltuk különböző mértékben hypotóniás (TY75 és TY50) oldatokban. Kinetikai paramétereik alapján két típusú Ca²⁺-választ tudtunk megkülönböztetni: a „tranzienst”, azaz gyorsan kialakuló és lecsengő [Ca²⁺]_i-emelkedést, valamint a „lassú” választ, amely a hypotóniás oldat alkalmazása alatt végig megfigyelhető volt. A „tranzienst” típusú választ mindkét oldat alkalmazása esetén

sikerült kiváltani, TY50 használatakor azonban nagyobb volt a tranziensek amplitúdója, mint TY75 esetében. „Lassú” típusú választ ugyanakkor csupán TY50 oldatban mértünk.

Kimutattuk azt is, hogy a PMA előkezelt sejteken a „tranzien” válasz amplitúdója nagyobb volt, mint a kontroll keratinocytákon. Megfigyeltük emellett, hogy a PMA előkezelt sejteken már a TY75 oldat is képes volt „lassú” választ kiváltani. Bebizonyosodott az is, hogy az ATP által kiváltott tranziensek paraméterei hasonlóak voltak kontroll és PMA-kezelt sejtek esetében. Végezetül megállapítottuk, hogy mind kontroll, mind pedig a PMA előkezelt sejtekben a kialakult Ca^{2+} -válasz nagysága erőteljesen függött az $[Ca^{2+}]_e$ -től.

A tenyésztőoldat szérumszertartalmának, valamint tonicitásának változása befolyásolja a HaCaT keratinocyták proliferációját és differenciálódását

Kísérleteink folytatásában a mechanikai stressz keratinocyták proliferációjára és differenciálódására gyakorolt hatását vizsgáltuk. Alacsony szérumszertartalmú, izotóniás oldatban lecsökkent az élő sejtek száma, ugyanakkor fokozódott a differenciálódási kifejeződése. Alacsony szérumszertartalmú, hypotóniás oldatban ugyanakkor a differenciálódási markerek szintje csak kismértékben változott. Normál szérumszertartalmú oldatból alacsony szérumszertartalmúra történő váltáskor lecsökkent a sejtproliferáció és fokozódott a differenciálódás. Amennyiben a sejteket normál szérumszertartalmú oldatból alacsony szérumszertartalmú, hypotóniás oldatba helyeztük, akkor proliferáció csökkenése és a differenciálódási fokozódása jelentősen kisebb volt, mint a fent említett kísérletekben. Megfigyeltük Végezetül, hogy ha a tenyésztőmédium a kísérlet kezdetétől fogva alacsony szérumszertartalmú volt, mind a hypotóniás stressz, mind a normál szérumszertartalomra való visszatérés fokozta az élő sejtek számát.

MEGBESZÉLÉS

A hajciklus időbeli „eltolódása” TRPV1 knockout egerekben

Napjainkban egyre több közlemény számol be arról, hogy a TRPV1, a szenzoros idegrendszeren kívül, számos perifériás szövet- és sejttípusban is kifejeződik. Ezen eredményekhez kapcsolódva, jelen kísérleteinkben először írtuk le a TRPV1 expresszióját egér bőr és szőrtüsző többféle nem-neuronális sejtfeleségén. Bebizonyosodott az is, hogy az epidermalis és follikuláris kifejeződési mintázat nagyban hasonlít a humán bőrben megfigyeltekhez. Ugyancsak hasonlóságnak mutatkozott, hogy a TRPV1 expressziója egér bőrben is jelentős mértékben függ a hajciklus stádiumaitól (azaz katagénben fokozódott).

A TRPV1 funkcionális szerepe jól vizsgálható kontroll és TRPV1 knockout állatok összehasonlításával. Kísérleteink tanulsága szerint a hajciklus fázisainak időtartamában lényeges különbség volt megfigyelhető a kontroll és a knockout állatok között: a TRPV1-et nem expresszáló állatok szőrtüszőinek fejlődése jelentős késést mutatott a vad típusúakhoz képest. Ez az eredmény ugyancsak összhangban van korábbi, a tenyésztett humán szőrtüszők vizsgálatokor nyert adatainkkal, miszerint a TRPV1 capsaicinnel történő aktivációja elősegíti az anagén-katagén átalakulást. Ezen eredmények azzal magyarázhatóak, hogy a TRPV1 aktivációja – csökkentve a szőrszál elongációját és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózist indukálva – katagén transzformációhoz vezet (mely fázisra a regresszió és az apoptotikus folyamatok beindulása jellemző). Úgy tűnik tehát, hogy (legalább is a TRPV1-mediált folyamatok vonatkozásában) az egér bőr és szőrtüsző vizsgálata jó modellként egészítheti ki a humán follikulus vizsgálatát célzó kísérleteket.

Eredményeink potenciális klinikai jelentőséggel is bírnak. Eszerint a TRPV1 farmakológiai aktiválása csökkentheti a bőr és a szőrtüsző sejteinek osztódását. Ezáltal különféle vanilloid agonisták hatásosan alkalmazhatók egyes bőrgyógyászati betegségek, így pl. a fokozott szőrnövekedéssel járó kórképekben (pl. hirsutismus). Hasonló logikát követve, a csökkent szőr- illetve hajnövekedéssel, illetve fokozott hajhullással járó állapotokban (pl. alopecia, effluvium) TRPV1 antagonistáknak lehet terápiás haszna.

A cannabinoid rendszer szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

A legújabb kutatások szerint a bőr és függelékei nem csupán barrier szerepet töltenek be, hanem felfoghatóak egy nem szokványos neuro-immuno-endokrin rendszernek is. Ennek mintegy „bizonyítékaként” kísérleteinkben kimutattuk, hogy az endocannabinoid AEA (mely eredményeink szerint önmagában a folliculusokban is termelődik) és a jól ismert exogén cannabinoid Δ^9 -THC számos biológiai funkciót befolyásol a humán szőrtüszőben. Így mindkét molekula – valószínűsíthetően CB1-mediálta útvonalon keresztül – csökkenti a hajszál elongációját és fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukál. Így a cannabinoid rendszer aktivációjakor a humán szőrtüszőben bekövetkező változások összhangban vannak azokkal a kutatásokkal, melyekben az AEA apoptotikus hatásáról számoltak be különböző szövetekben (pl. prostata).

Kísérleteink során kimutattuk azt, hogy a humán szőrtüszőben a CB1 mind protein, mind pedig mRNS szinten kifejeződik, valamint, hogy expressziója a katagén fázisban fokozódik. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a humán folliculus mind forrása, mind pedig célpontja az endocannabinoid AEA-nak, mely így a hajciklus egyik újonnan leírt

negatív regulátoraként funkcionál. Érdekes módon a másik endocannabinoid, a 2-AG csak igen alacsony koncentrációban volt megtalálható a szőrtüszőben. Ennek magyarázataként feltételezzük, hogy a follikulusban magas a 2-AG lebontásában szerepet játszó enzimek kifejeződése.

Korábbi irodalmi adatok bemutatták, hogy az AEA celluláris hatásait CB1, CB2 és/vagy (a szőrtüszőben ugyancsak proliferáció-gátlást okozó) TRPV1 mediálta útvonalon keresztül hozza létre (azaz mind endocannabinoid, mind endovanilloid funkciókkal rendelkezhet). Ezért munkánk egyik fontos célja volt meghatározni azt is, hogy az endocannabinoidok mely receptor(ok)on fejtik ki hatásukat. Az AEA elongációt csökkentő hatását teljes mértékben kivédte a CB1 specifikus antagonistá AM-251, ugyanakkor a TRPV1 antagonistá hatástalannak bizonyult. Feltételezhető tehát, hogy az AEA hatásait kizárólag a CB1 aktivációját keresztül fejtik ki. Az AEA és a TRPV1 agonista capsaicin együttes alkalmazásakor megfigyelt additív hatás tovább erősítette a fenti hipotézist. Elmondható tehát, hogy a szoros kapcsolatban levő, endogén cannabinoid és a vanilloid rendszerek egymástól függetlenül (de egymást „segítve”) befolyásolják a szőrtüszők biológiai funkcióit. Ezt a feltételezést tovább erősítik azon fent bemutatott eredményeink, melyek szerint a TRPV1 knockout egerekben a follikulus morfogenezise során szignifikánsan késik a katagén fázis kialakulása a vad típusú állatokhoz képest.

Habár kísérletes eredményeink szerint a szőrtüsző képes az endocannabinoidok termelésére (lehetőséget teremtve a follikulus folyamatainak parakrin-autokrin szabályozására), meglepő, hogy a CB1 antagonistá AM-251 önmagában nem befolyásolta a szőrszál elongációját. Ugyanakkor irodalmi adatokból tudjuk, hogy az endocannabinoidok szintje változhat különböző, pl. gyulladáso

bőrbetegségekben. Mivel ezen kórképekkel gyakran jár együtt hajhullás, ezért feltételezhető, hogy az endocannabinoidok expressziója fokozódik. Mivel a CB1 antagonisták kivédtek a cannabinoidok elongációt gátló hatását, ezért a hajhullással járó betegségek kezelésében a CB1 antagonistáknak jelentős terápiás szerepe lehet (akár TRPV1 antagonistákkal együtt alkalmazva). Ehhez hasonlóan, ugyancsak pl. vanilloid agonistákkal kombinálva, a fokozott szőrnövekedéssel járó betegségek gyógyításában a cannabinoid agonisták lokális alkalmazásának lehet nagy jelentősége.

A mechanoszenzitív csatornák aktivációjának hatása keratinocyták elektrofiziológiai sajátosságaira, proliferációjára és differenciálódására

A mechanoszenzitív csatornák vizsgálatokor kapott eredményeink azt mutatták, hogy az oldat tonicitásának csökkentése egyre negatívabb értékek felé "tolta el" a sejtek membránpotenciálját. Ez a hatás arra enged következtetni, hogy a keratinocyták felszínén mechanoszenzitív anion- (negatív töltésű ionok beáramlása → hyperpolarizáció) vagy kationcsatornák (pozitív töltésű ionok kiáramlása → hyperpolarizáció) találhatóak. Az extracelluláris Cl^- elvonása szignifikánsan csökkentette a hyperpolarizáció mértékét, ezért a tapasztalt membránpotenciálváltozás háttérében részben Cl^- -csatornák megnyílása és Cl^- beáramlása valószínűsíthető.

A mechanoszenzitív csatornák másik típusát a nem-specifikus kationcsatornák alkotják. Ezek egy része elsősorban Ca^{2+} -ra permeabilis, így megnyílásuk megnöveli az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t. Mivel Ca^{2+} -mentes körülmények között a hypotóniás oldatok által kiváltott kalciumtranziensek amplitúdója szignifikánsan csökkent, ezért feltételezhető, hogy az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése a membránban jelenlévő MSC-k megnyílásának és ezáltal az extracelluláris Ca^{2+} beáramlásának

a következménye. Megvizsgáltuk azt is, hogy az általunk regisztrált Cl^- -áram megjelenése az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésének a következménye. Mivel a Ca^{2+} -kelátor BAPTA jelenlétében elvégzett kísérletek eredményei nem mutattak jelentős eltérést a normál Ca^{2+} tartalmú oldathoz képest, ezért valószínű, hogy a Cl^- -csatornák aktivációja független az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tól.

Az osmotikus stressz, valamint az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megváltozása a sejtek proliferációját és differenciálódását is befolyásolja. Ismert, hogy a fent említett folyamatokban a PKC izoenzimek is jelentős szerepet játszanak. Kísérleteinkből az a következtetés vonható le, hogy a PKC rendszer aktivációja valószínűleg a mechanoszenzitív csatornák foszforilációja révén növelte a csatornák megnyílási valószínűségét, ezáltal nagyobb amplitúdójú Cl^- illetve Ca^{2+} -áramot indukál a keratinocytákon.

A kísérleteinkben alkalmazott hypotóniás oldat jól modellezi a sejteket érő mechanikai stresszhatást, mely által okozott keratinocytahyperproliferáció régóta ismert jelenség a bőrgyógyászatban (bőrkieményedés). Kísérletes eredményeink alapján elmondható, hogy a hirtelen hypotóniás stresszhatás fokozza az élő sejtszámot és csökkenti a differenciálódás mértékét keratinocytákban. Feltételezhető tehát, hogy valószínűleg nem a folyamatos mechanikai stresszhatás, hanem inkább a terhelés hirtelen változása okozza azon hyperproliferatív eltéréseket, amelyek esetenként klinikailag is jelentkező tünetekben nyilvánulhatnak meg. Ez összhangban van más kutatócsoportok tapasztalataival, akik szintén azt találták, hogy a periódikus mechanikai terhelés okozza a sejtek hyperproliferációját.

Összességében kísérleteinkből az a következtetés vonható le, hogy az ozmolaritás megváltozása, mint egyfajta mechanikai stressz, a keratinocyták hyperproliferációját és de-differenciálódását okozhatja. Ezen változásokat részben Cl^- -ra permeabilis MSC-k megnyílása alakítja ki, de a hosszútávú hatásokért az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megváltozása is felelős lehet.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben különféle jelátviteli mechanizmusok szerepét vizsgáltuk a bőr és függelékei biológiai folyamatainak szabályozásában. Munkánk során először írtuk le a transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) expresszióját egér bőr és szőrtüsző nem-neuronális sejtjein. Bemutattuk, hogy a TRPV1 kifejeződése egér bőrben (hasonlóan korábbi humán adatainkhoz) jelentős mértékben függ a hajciklus stádiumaitól. Megállapítottuk emellett, hogy a TRPV1 génhiányos állatok szőrtüszőinek fejlődése jelentős késést mutat a vad típusú egerekhez képest. Mindezen adatok a TRPV1-kapcsolt jelátviteli folyamatok gátló szerepére utalnak a szőrtüsző növekedésének szabályozásában.

A cannabinoid rendszer tanulmányozása során kimutattuk, hogy a humán szőrtüsző jelentős mennyiségű endocannabinoid anandamidot (AEA) termel. Bebizonyosodott az is, hogy AEA és a jól ismert exogén cannabinoid Δ^9 -THC – valószínűsíthetően cannabinoid receptor-1 mediálta útvonalon keresztül – csökkenti a hajszál elongációját és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint fokozott apoptózissal járó katagén transzformációt indukál. Bemutattuk továbbá, hogy a szoros kapcsolatban levő, endogén cannabinoid és a vanilloid (TRPV1-kapcsolt) rendszerek egymástól függetlenül (de egymást additív módon „segítve”) befolyásolják a szőrtüszők biológiai funkcióit.

Végezetül a mechanoszenzitív csatornák (MSC) szabályozó szerepét vizsgáltuk humán keratinocytákon. Megállapítottuk, hogy az ozmolaritás (főként hirtelen) megváltozása, mint egyfajta mechanikai stressz, a keratinocyták hyperproliferációját és de-differenciálódását okozhatja. Ezen változásokat részben Cl^- -ra permeabilis (és PKC szabályozott) MSC-k megnyílása alakítja ki, de a hosszútávú hatásokért az intracelluláris kalciumkoncentráció megváltozása is felelős lehet.

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 1) Bíró T, Bodó E, **Telek A**, Géczy T, Tychsen B, Kovács L, Paus R: Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2006; **126**:1909-1912. **IF: 4,535**
- 2) **Telek A**, Bíró T, Bodó E, Tóth IB, Borbíró I, Kunos G, Paus R: Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* 2007; **21**:3534-3541. **IF: 6,721**
- 3) Gönczy M, Szentandrassy N, Fülöp L, **Telek A**, Szigeti GP, Magyar J, Bíró T, Nánási PP, Csernoch L: Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol.* 2007; **16**:302-310. **IF: 2,449**

TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 4) Bodó E, Kovács I, **Telek A**, Varga A, Paus R, Kovács L, Bíró T. Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol.* 2004; **123**:410-413. **IF: 4,238**
- 5) Bodó E, Bíró T, **Telek A**, Czifra G, Griger Z, Tóth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L, Paus R: A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol.* 2005; **166**:985-998. **IF: 5,796**
- 6) Gönczi M, **Telek A**, Czifra G, Balogh A, Blumberg PM, Bíró T, Csernoch L: Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells. *Exp Dermatol.* 2007; (közlésre elfogadva) **IF: 2,449**
- 7) Józsa T, Dienes B, **Telek A**, Hargitai Z, Pór Á, Kiss Cs: Differential expression of androgen and estrogen receptors of appendix testis in patients with descended and undescended Testes. *Int J Urol.* 2007; (közlésre elfogadva) **IF: 0,692**

- 8) Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, **Telek A**, Gönczi M, Szűcs G, Csernoch L: Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch.* 2007; (közlésre elfogadva) **IF:2,251**

A közlemények összesített impakt faktora: 29,131

IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

- 1) Bodó E, Bíró T, **Telek A**, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Lázár J, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Pertile P, Kovács L, Paus R: A “hot twist” to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1) signalling in human hair growth control. *Exp Dermatol.* 2004; **13**:581
- 2) Bíró T, **Telek A**, Dajnoki A, Bodó E, Funk W, Kovács L, Paus R: Functional cannabinoid receptor-1 expression in human skin and hair follicle - a novel endogenously active player in skin and hair biology. *J Invest Dermatol.* 2005; **124**:A103-A103 617 Suppl. S
- 3) **Telek A**, Bíró T, Bodó E, Liotiri S, Tychsen B, Paus R: Functional involvement of vanilloid receptor-1 signaling in murine hair follicle cycling. *J Invest Dermatol.* 2005; **125**:A86-A86 507 Suppl. S
- 4) Bíró T, **Telek A**, Dajnoki A, Bodó E, Funk W, Kovács L, Paus R: Functional cannabinoid receptor-1 expression in human skin and hair follicle – A novel player in skin and hair biology. *J Invest Dermatol.* 2005; **125**:A86-A86 508 Suppl. S
- 5) Bíró T, Dajnoki A, **Telek A**, Bodó E, Tóth IB, Szöllősi A, Paus R, Kovács L: Human epidermal keratinocytes display a functional endocannabinoid/endovanilloid system and show novel signaling interactions between vanilloid receptor-1 and cannabinoid receptor-1. *Exp Dermatol.* 2006; **15**:254-254
- 6) Bíró T, Dajnoki A, **Telek A**, Bodó E, Dobrosi N, Tóth IB, Paus R: The endocannabinoid/endovanilloid anandamide regulates proliferation and apoptosis of human keratinocytes via novel signaling interactions between vanilloid receptor-1 (TRPV1) and cannabinoid receptor-1 (CB1). *J Invest Dermatol.* 2006; **126**:95-95 Suppl