

DEBRECENI EGYETEM, OEC, ÉLETTANI INTÉZET

---

***A VANILLOID RECEPTOR-1 (TRPV1) SZEREPE A HUMÁN  
SZŐRTÜSZŐ BIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK  
SZABÁLYOZÁSÁBAN***

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés**

Írta:  
Bodó Enikő

Témavezető:  
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens



**DEBRECEN  
2004**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>BEVEZETÉS</b>	4
<i>A szőrtüsző</i>	4
<i>A szőrtüsző funkcionális anatómiája</i>	4
<i>A hajciklus</i>	7
<i>A hajciklus szabályozása</i>	10
<i>A vanilloid (kapszaicin) receptor-1 (TRPV1), a molekula szerkezete</i>	12
<i>A TRPV1 exogén és endogén vanilloidok segítségével aktiválható</i>	14
<i>A TRPV1 nem kizárólag neuronális szöveteken fejeződik ki</i>	16
<b>PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b>	18
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	19
<i>Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése</i>	19
<i>Az ORS és HaCaT keratinocyták tenyésztése</i>	20
<i>Szövetteni és morfológiai vizsgálatok</i>	20
<i>Immunhisztó- és -citokémia</i>	21
<i>Western (immuno) blot analízis</i>	25
<i>Szemi-kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR (RT-PCR)</i>	26
<i>Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)</i>	27
<i>Intracelluláris kalciummérés</i>	28
<i>A sejtproliferáció vizsgálata</i>	29
<i>Áramlási citometria</i>	29
<i>Statisztikai elemzések</i>	30
<b>EREDMÉNYEK</b>	31
<i>A TRPV1 mind mRNS, mind fehérje szintjén kifejeződik a bőr számos epitheliális és mesenchymalis sejt típusán</i>	31
<i>Mind a bőrben in situ elhelyezkedő, mind az izolált és tenyésztett humán szőrtüszők számos sejtrétege kifejezi a TRPV1-et</i>	34
<i>A TRPV1-aktiváció dóziszfüggően és specifikusan gátolja a hajszál hossznövekedését szőrtüsző szervkultúrában</i>	38
<i>A kapszaicin által kiváltott TRPV1-aktiváció gátolja a márix keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál</i>	39
<i>A TRPV1 stimulálása anagén-katagén transzformációra jellemző morfológiai változásokat okoz</i>	41
<i>A TRPV1-aktiváció nem befolyásolja a differenciálódási marker filaggrin expresszióját</i>	44
<i>A TGFβ<sub>2</sub> jelátviteli útvonal részt vehet a hajnövekedést gátló TRPV1 szignalizációban</i>	45
<i>A TRPV1 az ORS keratinocytákban is megtalálható</i>	47
<i>A TRPV1, a HaCaT keratinocytákhoz hasonlóan az ORS keratinocytákban is funkcionális Ca<sup>2+</sup>-csatornaként működik</i>	49
<i>A TRPV1-aktiváció gátolja a proliferációt és apoptózist indukál tenyésztett ORS és HaCaT keratinocytákon</i>	50
<i>A TRPV1-aktiváció megváltoztatja a hajciklus szabályozó molekuláinak kifejeződését tenyésztett ORS keratinocytákban</i>	53

<b>MEGBESZÉLÉS</b>	54
<i>A TRPV1 kifejeződése humán bőrben és a bőr függelékeiben</i>	54
<i>A TRPV1 funkcionális szerepe a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában</i>	55
<i>A TRPV1 „kettős aktivációja” – Terápiás megfontolások</i>	61
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	64
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	65
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	75
<b>KÖZLEMÉNYEK</b>	76

## BEVEZETÉS

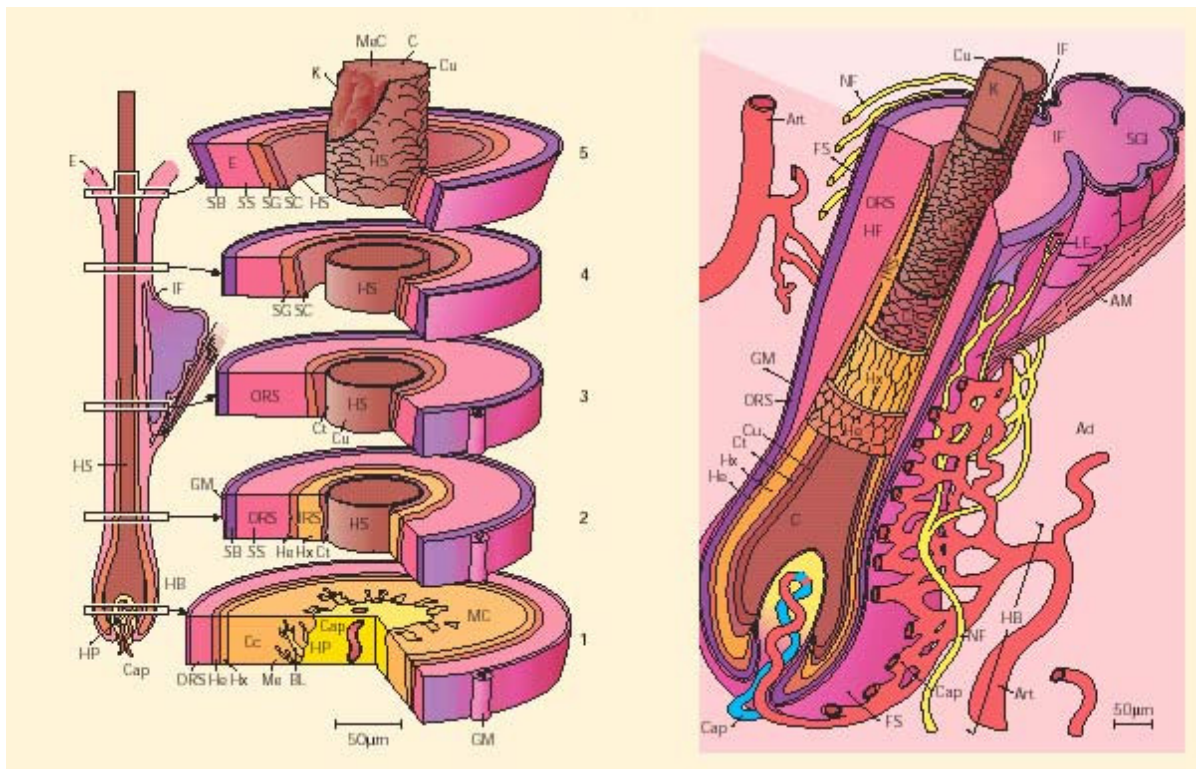
### *A szőrtüsző*

A szőrtüsző a bőr biológiájában egyedülálló szerepet betöltő epidermális eredetű „mini-orgánum”, mely a konvencionálisan ismert funkciók (mechanikai védelem, érzékelés, hőtárolás, szociális és szexuális jelzések) mellett más, a bőr biológiáján is tovamutató szereppel bír (Paus és Cotsarelis, 1999). A szőrtüsző egyik legfontosabb tulajdonsága a folyamatos regenerációra való képesség. Ezen regeneráció magában foglalja a proliferációs, differenciálódási és apoptotikus folyamatok szigorúan ellenőrzött összhangját különböző eredetű és funkciójú sejtrétegek kölcsönös kommunikációja révén (Paus, 1998). A folliculus sejt-reservoirként szolgál számos sejtípus kialakulásának, úgymint a bőr és a szőrtüsző immunfolyamataiban szerepet játszó Langerhans-sejteknek (Gilliam és mtsai, 1998), a melanocytáknak (Peters és mtsai, 2002b) és keratinocytáknak (Panteleyev és mtsai, 2001). A szőrtüsző által termelt növekedési faktorok, citokinek, neuropeptidek, enzimek és adhéziós molekulák termelése és leadása segíti a folliculus és járulékos képleteinek (őket ellátó erek, idegek, különféle mirigyek) finoman összehangolt működését (Stenn és Paus, 2001). A folliculusok említett sejtfolyamatainak tanulmányozása emellett lehetőséget nyújt a hajkutatáson tovamutató hasonló jelenségek értelmezésére is (pl. sebgyógyulás).

### *A szőrtüsző funkcionális anatómiája*

A szőrtüszők különböző típusaiban megfigyelhető finom eltérések ellenére azonos alapszerkezettel jellemezhetők (**1. ábra**), mely a folliculus fő tevékenységének, a környezettel összhangban lévő haj-, illetve szőrszáltermelésnek van alárendelve (Montagna és Ellis, 1958; Montagna és Parakkal, 1974; Dawber, 1997; Paus és Cotsarelis, 1999). A hajszál létrehozása a következő elv szerint történik: az epithelium egy betüremkedése (a bulbus) egy speciális mesenchymalis sejtcsoporttal (dermális papilla) való kommunikáció során létrehoz egy igen

ellenálló struktúrát, a hajszálat, amely azután a környező szövetek megsértése nélkül áthatol az epidermiszen.



### 1. ábra: A szőrtüsző anatómiája

Az ábrán a szőrtüsző különböző magasságban készített keresztmetszeti képeinek sematikus rajza látható. IF: infundibulum, Is: isthmus, HS: hajszál, HP: dermális papilla, Cap: kapillaris, ORS: külső gyökérhüvely keratinocyták, IRS: belső gyökérhüvely keratinocyták, HC: Henle réteg, HX: Huxley réteg, MC: mátrix keratinocyták, E: epidermisz, SG: faggyúmirigy, C: hajszál cortex, Cu: kutikula, NF: idegrost, AM: Arrector pili izom, GM: üvegmembrán, Ad: adipocyták, BL: bazális lamina, HF: hajfollikulus, SB: stratum basale, SS: stratum spinosum, SG: stratum granulosum, SC: stratum corneum, K: keratin, Ct: kutikula, MeC: medulláris sejtek, HB: bulbus, FS: folliculáris kötőszöveti réteg, Me: melanocytá, Art: arteriola

Ennek megfelelően a folliculust egy hagymához is szokták hasonlítani, melynek a legbelső burkai a dermális papillának (DP) felelnek meg, amit a bulbus epithelium több rétege héjszerűen vesz körül. A hagyma szára a folliculus belsejében elhelyezkedő, folyamatosan kifelé mozgó hajszál. A DP fölött található keratinocyták terminális differenciálódás során ún. trychocytákká alakulnak és a differenciálódási folyamatok részeként a szintén ezen a területen elhelyezkedő melanocytáktól melanint vesznek föl. A trychocyták folyamatosan fölfelé mozogva alakítják ki ezután a hajszál három rétegét; a kortextet, ahol a kénben gazdag

fehérjemátrixba ágyazódnak a teljesen keratinizált trychocyták kötegei; az ezt tetőcserépszerűen borító kutikulát, valamint a medullát. A belső gyökérhüvely (inner root sheath, IRS) keratinocyták terminálisan differenciálódott rétegei egy szilárd, ellenálló palástot képeznek a hajszál körül és vele együtt kifelé mozognak, elcsúszva a külső gyökérhüvely (outer root sheath, ORS) keratinocyták legbelső rétegén. Az IRS maga is több koncentrikusan rendeződő rétegből áll: Henle réteg, Huxley réteg és a kutikula. Ezen rétegek mindegyike eltérő epitheliális differenciáltsági mintázattal és jellegzetes szerkezeti fehérjékkel (pl. haj keratinok, trychohialin), mátrix molekulákkal és enzimekkel rendelkezik. A folliculus-epithelium morfológiai sokszínűségére utal továbbá, hogy a nyolc epitheliális réteg mindegyikében a keratin multigén család bizonyos tagjai és expressziós mintázata írható le (Powel és Rogers, 1997; Langbein és mtsai, 1999, 2001 és 2002).

*Az ORS keratinocyták alkotják a dermiszt és az IRS-t elválasztó és egyben összekötő réteget. Ezen sejtek folyamatos kapcsolatban és sejtkecserelődésben vannak az epidermisszel; erre utal az a tény is, hogy az epidermisz sérülés esetén az ORS sejtjeiből regenerálódhat (Taylor és mtsai, 2000). Az IRS-sel és a hajszállal ellentétben az ORS sejtjeinek egy részére lassú osztódási ráta és így a proliferáló keratinocyták keratin expressziós mintázata jellemző. A differenciálódás a bazális membrán irányából az IRS felé történik. Az ORS egyrészt sejt-reservoirként szolgál (Panteleyev és mtsai, 2001), másrészt a belsőbb sejtrétegek táplálását végzi (oxigén, energia-raktár), illetve számos olyan faktort és citokint termel, melyek a hajciklus (ld. később) szabályozásában játszanak szerepet.*

Úgy tűnik, hogy az ORS, IRS és hajszál *keratinocytái három prekurzor sejtpopulációból* jönnek létre, melyek egyrészt a musculus arrector pili csatlakozásának közelében (elsődleges sejtpopuláció), másrészt (másodlagosan) a bulbusban helyezkednek el (Panteleyev és mtsai, 2001). A fejlődő, aktív folliculus leggyorsabb ütemben osztódó

sejtpopulációja, a *mátrix keratinocyták*, melyek az Auber-féle vonal (a bulbus legszélesebb része, a dermális papilla maximális átmérője) alatt helyezkednek el.

A folliculus nagyságát és átmérőjét a *DP* határozza meg (Jahoda és Reynolds, 1996). A sérült DP teljes mértékben képes regenerálódni a folliculus legkülső burkából, a *proximális kötőszövetes burokból (CTS)* (Jahoda és Reynolds, 1996; Reynolds és mtsai, 1999). A DP sejtei egy olyan mátrixba vannak beágyazva, ami összetételében egy bazális membránra hasonlít. A növekedő fázisban lévő folliculus fibroblasztjai közvetlen kontaktusba tudnak lépni a mátrix keratinocytákkal, ami jelentősen leegyszerűsíti a köztük fennálló jelátvitelt (Jahoda és Reynolds, 1996; Jahoda, 1998). Feltehetőleg hasonló kommunikáció áll fenn a CTS/DP sejtek és a bőr alatti zsíresejtek között is (Jahoda és mtsai, 2003).

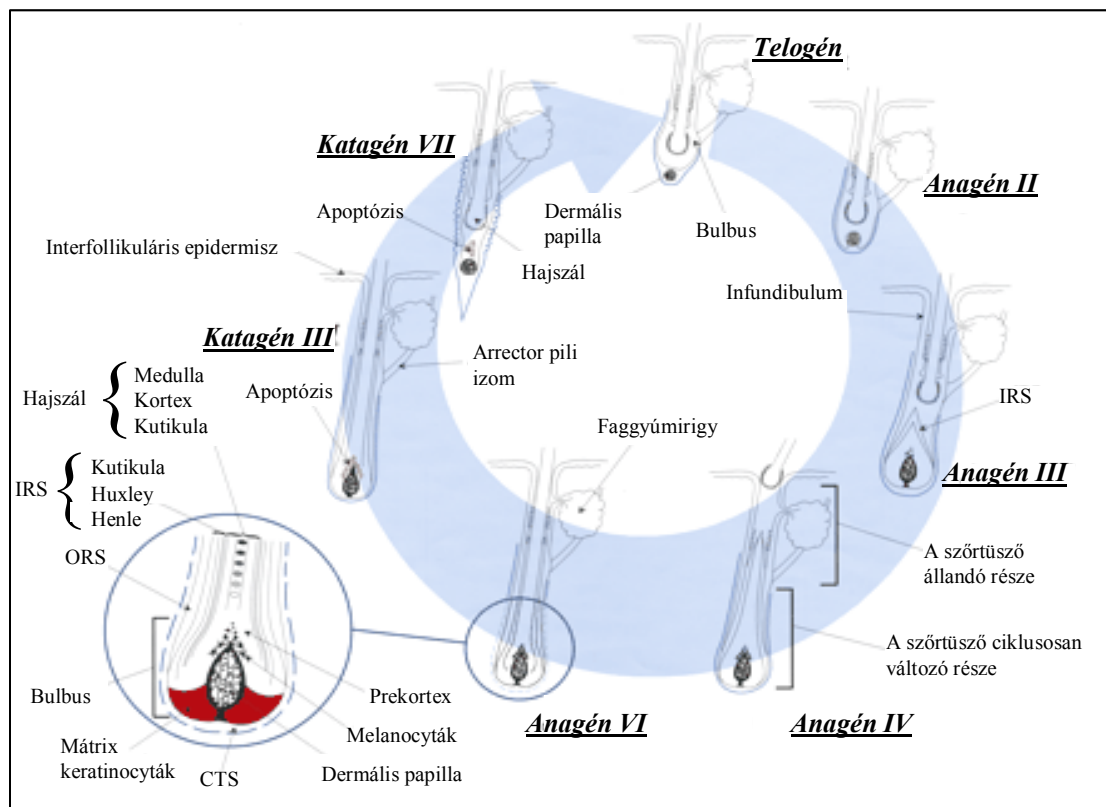
A növekedési fázisban lévő hajsál pigmentációjáért a proximális szőrtüszőben, a mátrix keratinocyták közt elszórtan elhelyezkedő terminálisan differenciálódott *melanocyták* felelősek (Tobin és Paus, 2001).

A musculus arrector pili szőrtüszőhöz való kapcsolódásának területe igen gazdag *szenzoros és vegetatív beidegzéssel* rendelkezik, ami egyrészt lehetővé teszi a szőrszál „tapintószervként” való működését, másrészt az itt termelt neurotranszmitterek, neurohormonok és neurotrofinok fontos szabályozó szerepet töltenek be (Botchkarev és mtsai, 1997; Peters és mtsai, 2001 és 2002; Paus és mtsai, 1997). A folliculus érellátása a dermális és bőr alatti plexusokból származik.

### *A hajciklus*

A szőrtüszőt az egész életen át váltakozó regressziós és regenerációs tevékenysége teszi egyedülállóvá a többi emlős szerv között. A regresszió és regeneráció ezen ciklikus váltakozását nevezzük *hajciklusnak (2. ábra)*, melynek három jellegzetes szakaszát különböztetjük meg. Az *anagén* fázisban aktív növekedés és fejlődés történik, a szőrtüsző

ebben a fázisban éri el maximális fejlettségét. A *katagén* fázisban a szőrtüsző növekedése megáll, regressziós folyamatok indulnak be. A nyugalmi *telogén* fázis pedig a tulajdonképpeni felkészülés a következő anagénra. Az anagén és katagén felosztható további alszakaszokra (anagén I-VI, katagén I-VIII), mely stádiumok jól elkülöníthető morfológiai kritériumokkal és molekuláris markerekkel jellemezhetők (Müller-Röver és mtsai, 2001; Panteleyev és mtsai, 2001; Stenn és Paus, 2001).



## 2. ábra: A hajciklus

Az emlős szőrtüsző nem folyamatosan ugyanabban a formában működik, hanem a hajciklus során egy ismétlődő változáson megy keresztül. A hajciklusban a szőrtüsző proximális részében strukturális újraképződés történik, mely az epithelialis és mesenchymalis kompartmenteket egyaránt érinti. Az aktív növekedési *anagén* és a regressziós *katagén* fázisokat a nyugalmi *telogén* választja el egymástól. Az anagén VI stádiumban éri el a szőrtüsző jellegzetes, komplex formáját, melyben a fejlődő hajszálat a gyökérhüvely keratinocyták több rétege táplálja és védi a maximális kiterjedésű dermális papilla kontrollja alatt. A katagén transzformáció a bulbus keratinocytáinak és melanocytáink apoptózisával, illetve a dermális papilla sejtszámbeli csökkenésével jár. A viszonylag rövid telogén fázis után a szőrtüsző ismét belép az anagénbe, vagyis képes lesz egy újabb hajszál kialakítására. (CTS: Külső kötőszöveti réteg).



A ciklus szempontjából a szőrtüszőt funkcionálisan két részre oszthatjuk: a felső, állandó részre, mely viszonylag változatlan formában marad, és az alsó részre, mely teljesen leépül, majd megújul a ciklus során.

A kis méretű *telogén folliculus*ban nem találunk IRS-t, a DP egy kompakt, golyó alakú sejtesomó, míg a szőrtüszőhöz az arányaiban igen nagy faggyúmirigy csatlakozik.

Az *anagén* kialakulása során a szőrtüsző alsó részében a proliferációs folyamatok kerülnek előtérbe, ami főleg az epithelialis sejtrétegeket érinti, de ezzel párhuzamosan morfológiai változások történnek a DP-ban is. A korai anagén stádiumok során a szőrtüsző egyre inkább meghosszabbodik és egyre mélyebbre nyúlik. A mátrix keratinocyták igen gyors proliferációja kialakítja a hajsztál és a belső gyökérhüvely egymást határoló rétegeit, miközben a bulbus keratinocytái egyre inkább körbeveszik a DP-t. Újra felépülnek az ORS tápláló rétegei is. Az utolsó, hatodik anagén stádiumban a szőrtüsző eléri jellegzetes, komplex formáját: létrejön egy új, folyamatosan növekvő hajsztál, melyet a gyökérhüvely keratinocyták és a CTS határol. A DP ebben a szakaszban eléri maximális nagyságát és aktivitását. Kialakul továbbá a beidegzés, érellátás, valamint a melanocyták proliferációja és melanintermelése által a pigmentáció is. Az emberi szőrtüsző 4-5 éven át ebben a formában működik a fejbőrben.

A *katagén* során a szőrtüsző „visszafejlődése” történik, amit az apoptotikus sejtfolyamatok beindulása kísér. A programozott sejtelhalás megfigyelhető mindkét gyökérhüvely rétegben, a mátrix keratinocytákban, illetve a melanocytákban is. Ennek megfelelően a katagén egymást követő stádiumaiban a bulbus egyre inkább elvékonyodik, valamint pozícióját tekintve egyre közelebb kerül az epidermiszhez. A hagyma alakú DP proximális irányba húzódik, a hajsztáltól (a késői katagénben ún. club hair) jelentősen eltávolodva. A késői katagénben a DP és a hajsztál között egy vékony epithelialis híd biztosít összeköttetést. A melanocyták apoptózisa miatt a pigment szemcsék mennyisége is lecsökken,

a proximális hajvég korábbi jelentős pigmenttartalma megszűnik. A rövid (2-3 hét) regressziós katagén stádium után a folliculus ismét a nyugalmi fázisba kerül, amivel a későbbiekben egy újabb ciklus indulhat be. Megemlítendő továbbá, hogy a hajciklus változásait a szőrtüsző járulékos képleteinek folyamatos átalakulása is kíséri.

#### *A hajciklus szabályozása*

A hajátültetési kísérletek során már hosszú ideje megfigyelték, hogy a hajciklus egy úgynevezett „belső órával” rendelkezik, amely valószínűleg vagy a szőrtüsző közelében, vagy magában a szőrtüszőben helyezkedik el (Chase, 1954; Paus és mtsai, 1990 és 1999; Stenn és Paus, 2001). Ez teszi lehetővé a szőrtüszők átoperálását, valamint az általunk is alkalmazott szőrtüsző szervkultúra bevezetését is. Ezen óra biológiai természetéről viszonylag keveset tudunk, ma azonban azt tartjuk valószínűnek, hogy a DP fibroblasztjaival állhat igen szoros kapcsolatban (Paus és mtsai, 1999). Az a nézet is elterjedt, hogy a szőrtüszőt körülvevő, jelátviteli molekulák által biztosított milliő irányított, gyors és lokális megváltozása okozza a ciklusban bekövetkező átalakulásokat (Hardy, 1992; Paus és mtsai, 1999; Stenn és Paus, 2001). Maga a szabályozás igen szigorú kontrollt követel meg, hiszen határt kell szabni mind a korai anagén aktív proliferációs folyamatainak, mind a katagénben megfigyelhető apoptotikus és differenciálódási folyamatoknak. Ez biztosítja például, hogy a regresszió során bekövetkező sejtelhalás a bulbusban kizárólag a (mátrix és gyökérhüvely) keratinocytákra, illetve a melanocytákra korlátozódjon (Lindner és mtsai, 1997; Tobin és mtsai, 1998; Müller-Röver és mtsai, 1999, Tobin és Paus, 2001). A dermális fibroblasztok számbeli csökkenésének ugyanis a CTS-be való kivándorlás az oka (Tobin és mtsai, 2003).

Érdekes kérdés, hogy melyek azok a molekulák, amelyek részt vehetnek a ciklus beindításában és fenntartásában. Számos növekedési faktorról, citokinről, hormonnól és egyéb molekuláról bizonyosodott már be, hogy a hajciklus valamelyik pontján képes beavatkozni

ebbe a folyamatba. Igen fontos szabályozási pont a telogén szakasz, s a fázis nyugalmi jelzője ellenére igen sokrétű regulatórikus folyamat zajlik ekkor (Chase, 1954; Paus és mtsai, 1990 és 1999; Stenn és Paus, 2001). Folyamatos ösztrogén alkalmazásával például egér szőrtüszőkben megakadályozható a telogén-anagén átalakulás, miközben a DP-ban jelentősen megemelkedik az ösztrogén-receptorok száma (Oh és Smart, 1996; Chanda és mtsai, 2000). Ez a jelenség is utalhat arra, hogy néhány faktornak a különböző stádiumok határain kiemelkedő szerepe lehet. A teljesség igénye nélkül példaként szolgálhatnak a hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF-I), stem cell factor (SCF) és vascular endothelial growth factor (VEGF), amelyek az anagén meghosszabítását idézik elő, vagyis őket a hajciklus pozitív regulátoraiként tartjuk számon (Philpott és mtsai, 1994a; Lindner és mtsai, 2000; Yano és mtsai, 2001; Botchkareva és mtsai, 2001). Ezzel szemben a fibroblast growth factor-5 (FGF5), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 (NT-4) és brain-derived neurotrophic factor (BDNF) citokinekről részben humán, részben egéren folytatott kísérletek során kiderült, hogy szerepük a katagén kialakításának elősegítése (negatív regulátorok) (Hébert és mtsai 1994; Philpott és mtsai, 1996; Botchkarev és mtsai, 1998a és 1998b; Foitzik és mtsai, 2000; Botchkareva és mtsai 1999 és 2001). Érdekes kiemelni a TGF $\beta_2$  szerepét a ciklus során. Ezen növekedési faktort már korábban leírták a szőrtüsző fejlődésében, mint a morfogenezist elősegítő kulcsmolekula (Foitzik és mtsai, 1999). A molekula ugyanakkor ellentétes szerepet játszik a hajciklus során; azaz elősegíti a regresszió beindulását (Soma és mtsai, 2002). Vagyis míg a szőrtüsző morfogenezise során a follikulus kialakulását, érését, növekedését segítette elő, addig a ciklus során megakadályozta ezen folyamatokat.

A hajciklus szabályozásának autonómitása mellett meg kell azonban említenünk azt is, hogy a hajfollikulus számos extrinsic hatás célpontja is. Szinte minden nagy hormonsaládról

leírták már például, hogy befolyásolja a szőrtüszők kialakulását és a hajciklust (ösztrógenek, androgének, tiroxin) (Ahsan és mtsai, 1998; Randall és mtsai, 2001; Thornton, 2002). Hasonló szerepet tulajdonítanak számos neuropeptidnek, neurotranszmitternek, neurotrofinnak és egyes stresszhatásokat kialakító molekulának. Egér hajfollikulusok estében például beszámoltak arról, hogy a P-anyag és az adrenokortikotropin (ACTH) igen hatékonyan módosítja a hajciklus eseményeit *in vivo* és *in vitro*, míg a stresszorok alkalmazása során tapasztalt szőrnövekedést gátló hatás is a P-agyag közvetítésével valósul meg (Paus és mtsai, 1994a és 1994b; Arck és mtsai, 2003).

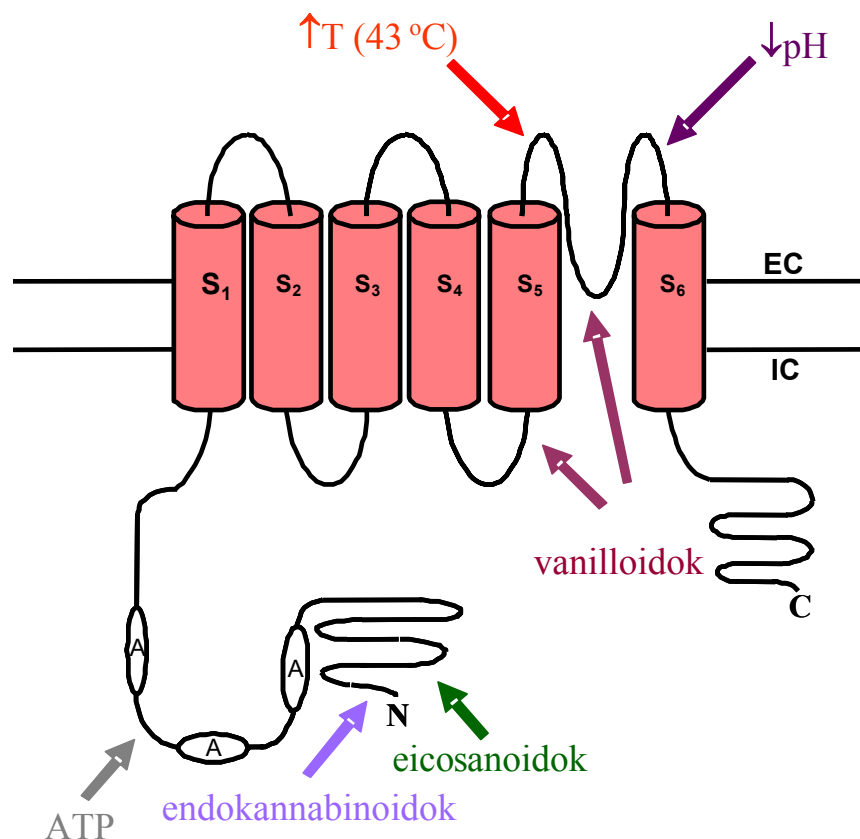
A szőrtüsző biológiájának, illetve a hajciklus szabályozásának logikájába való mélyebb betekintés nagyfokú klinikai relevanciával bír. A hajnövekedés problémáinak legtöbbje ugyanis a normál hajciklus valamilyen megváltozására vezethető vissza, ami azt jelenti, hogy a funkcióképes szőrtüszők „biológiai órája” a kívátnál lassabban vagy gyorsabban jár.

#### *A vanilloid (kapszaicin) receptor-1 (TRPV1), a molekula szerkezete*

A kapszaicin receptor egy nem-specifikus kationcsatorna, melyet ma a nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekintünk.

A receptor klónozása és molekuláris karakterizálása Caterina és munkatársai nevéhez fűződik, akik 1997-ben patkány cDNS könyvtárat használva határozták meg a receptor pontos szerkezetét (**3. ábra**). A patkány TRPV1 esetében egy 2514 nukleotidból álló DNS szakasz kódolja a 838 aminosavból felépülő 95 kDa tömegű fehérjét (Caterina és mtsai, 1997). Strukturális sajátosságai alapján a TRPV1 nagyfokú homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* retinájában megtalálható TRP (transziens receptor potenciál) proteinnel, ezért a TRP receptor család egyik tagjának tekinthető (Caterina és Julius, 2001; Benham és mtsai, 2002). Ezen receptorokat a non-szelektív kationcsatornák nagycsaládjába sorolják, melynek

tagjai a TRP és vanilloid családon (TRPC, TRPM és TRPV) kívül a hiperpolarizáció-aktivált csatornák (HCN) és ciklikus-nukleotid kapuzott csatornák (CNG) is (Benham és mtsai, 2002). Közös jellemzőjük a nagy valószínűséggel tetramer formát kialakító 6-transzmembrán domén, melyek közül a TRPV1 esetében az ötödik és hatodik domén között található „hurok” hozza létre a csatorna pórusát. Ezen receptorcsaládra jellemző továbbá, hogy mind az N-, mind a C-terminális intracellulárisan helyezkedik el (Kedei és mtsai, 2001; Benham és mtsai, 2002).



**3. ábra: A TRPV1 szerkezete és működését befolyásoló molekulák**

A TRPV1 szerkezetét tanulmányozva megállapították, hogy számos kötő- és szabályozóhellyel bír, mint pl. az intracelluláris N-terminális szakaszon megtalálható 3 db ankyrin repeat domén (mint potenciális protein kináz A foszforilációs helyek) (Caterina és mtsai, 1997; Kwak és mtsai, 2000; Kedei és mtsai, 2001), az ugyancsak az intracellulárisan elhelyezkedő vanilloid (azaz a kapszaicint és ultrapotens analógját, a resiniferatoxint, RTX,

felismerő) kötőhely, vagy az extracelluláris oldalon található allosztérikus modulációs helyek (Garcia-Martinez és mtsai, 2000; Jordt és mtsai, 2000; Welch és mtsai, 2000). Kimutatták továbbá, hogy a klónozott TRPV1 is funkcionális, nem-specifikus, főként  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokra permeábilis (relatív permeabilitása  $\text{Ca}^{2+}$ -ra nézve  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  közelítőleg 10) csatornaként működik (Caterina és mtsai, 1997).

#### *A TRPV1 exogén és endogén vanilloidok segítségével aktiválható*

Az első vegyület, mely összefüggésbe hozható a TRPV1 receptorral, a csípős paprikából (*Capsaicum annum*) izolálható kapszaicin (Tresh, 1846), mely a csípős paprika fogyasztását követő égő, fájdalmas érzést okozza. A kapszaicin tulajdonképpen már jóval a receptor leírását megelőzően ismert volt; részben nociceptív neuronokon való hatásait tanulmányozva jutottak arra a következtetésre, hogy léteznie kell egy olyan specifikus receptornak, ami a kapszaicin hatásait közvetíti (Jancsó, 1968). A kapszaicin celluláris hatásmechanizmusa ugyanis a szenzoros neuronokon három jól elkülöníthető folyamattal jellemezhető. Az első a kapszaicin adagolását követő excitáció, melynek során a kapszaicin megnöveli a sejtmembrán  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Na}^{+}$ -permeabilitását, ami depolarizációhoz vezet (Bevan és mtsai, 1993). Ezután egy deszenzitizáció lép fel, ahol a sejtek mind a kapszaicin (homológ deszenzitizáció) (Szolcsányi, 1977; Winter és mtsai, 1990), mind egyéb fájdalomkeltő anyagok (heterológ deszenzitizáció) (Jancsó, 1960; Holzer, 1991) iránt is érzéketlenné válnak. Végül a kapszaicint nagy koncentrációban, elég hosszú ideig alkalmazva a sejteken a harmadik jellegzetes folyamat, a citotoxicitás váltható ki, mely leginkább a megemelkedett intracelluláris kalciumszintnek, valamint ennek következtében kalcium-függő proteázok fokozott működésének tulajdonítható (Wood és mtsai, 1988; Winter és mtsai, 1990; Holzer, 1991).

A TRPV1 molekuláris biológiai leírását követően elvégzett nagyszámú kísérletnek köszönhetően kiderült az is, hogy ezen receptort nemcsak az exogén vanilloid vegyületek, hanem számos endogén, főként a fájdalom kialakításában központi szereppel bíró molekula is képes aktiválni (3. *ábra*). Ezek közül a TRPV1 legfontosabb endogén aktivátorának („ligandjának”) tekinthető az alacsony küszöbű (~ 43 °C) hőmérséklet-emelkedés, valamint a pH csökkenése (acidózis) (Caterina és mtsai, 1997; Tominaga és mtsai, 1998). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy ezen hatások mellett számos, leginkább gyulladásoz mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, extracelluláris ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, lipid-peroxidáció termékei, stb.) is képes a TRPV1 működésének pozitív befolyásolására (Hwang és mtsai, 2000; Tominaga és mtsai, 2001; Premkumar, 2001; Hwang és Oh, 2002; Di Marzo és mtsai, 2002). Ezen ágensek egyrészt direkt módon (azaz a TRPV1-hez közvetlenül kapcsolódva) aktiválhatják a receptort (pl. hő, acidózis), másrészt (főként metabotróp) saját receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kinázrendszerek, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a TRPV1 működését. Ilyen allosztérikus módosító hatás lehet az, hogy ezen anyagok a TRPV1 hőérzékenységi küszöbét csökkentik, azaz a receptor már fiziológiás hőmérsékleten is aktiválódik és fájdalomérzést vált ki (termális hyperalgesia) (Tominaga és mtsai, 1998, Caterina és mtsai, 2000). A TRPV1 szerepét bizonyítja a fenti folyamatokban a TRPV1 knock-out egerekkel végzett kísérletek eredménye is, miszerint ezen állatokban (természetesen a hiányzó vanilloid-érzékenység mellett) főként a termális/gyulladásoz hyperalgesia jelensége hiányzik (Caterina és mtsai, 2000). Mindezek alapján a TRPV1 a különféle (pl. kémiai, termális) nociceptív ingerek hatására kialakuló folyamatok egyik központi integrátor molekulájának tekinthető.

*A TRPV1 nem kizárólag neuronális szöveteken fejeződik ki*

A receptort autoradiográfiás, valamint különféle funkcionális vizsgálatok segítségével elsőként a primer szenzoros neuronok egy meghatározott alcsoportjában írták le (Szallasi, 1995; Szallasi és Blumberg, 1999), melyek sejtteste a spinális hátsó gyöki és trigeminális szenzoros ganglionokban helyezkedik el. Ezen neuronok a kapszaicin és rokon vegyületeikkel szemben mutatott érzékenységük miatt (Holzer, 1991; Szallasi és Blumberg, 1999) a kapszaicin-szenzitív neuron elnevezést kapták (Szolcsányi, 1982). A TRPV1-et kimutatták továbbá a gerincevelő hátsó szarvában (Guo és mtsai, 1999), ahol a TRPV1-immunreaktivitás főleg az I. laminára lokalizálódott. A kötődési vizsgálatok során ugyanakkor olyan központi idegrendszeri struktúrák is jelölődtek, amelyek nincsenek egyértelműen leírt közvetlen kapcsolatban a primer szenzoros neuronokkal (Ács és mtsai, 1996). Ilyen terület többek között a hipotalamusz, ahol a TRPV1 jelenlétét hipotermiás hatásaival hozták összefüggésbe (Jancsó-Gábor és mtsai, 1970; Szolcsányi és mtsai, 1971). Sasamura és munkatársai (1998) beszámoltak emellett arról, hogy az agy számos további helyén is (cerebellum, cortex, striatum, bulbus olfactorius, híd, hippocampus és thalamus) megtalálható a TRPV1.

A TRPV1-et vizsgáló kutatások egyik legizgalmasabb eredménye volt ugyanakkor, amikor kiderült, hogy a receptor elhelyezkedése és működése nem csupán neuronális szövetekre korlátozódik. Bíró és munkatársai például kapszaicin segítségével a hátsó gyöki ganglionokéhoz nagyon hasonló, TRPV1-specifikus kalcium-beáramlást idéztek elő hízósejteken és glióma sejteken (Bíró és mtsai, 1998a és 1998b). További kutatócsoportok emellett beszámoltak a kapszaicin specifikus hatásairól, többek között, humán polimorfonukleáris sejteken (Partsch és Matucci-Cerinic, 1993), timocitákon (Amantini és mtsai, 2004), bronchiális epitheliumon (Lundberg, 1993; Chitano és mtsai, 1994; Ellis és mtsai, 1997) és humán limfocitákon (Lai és mtsai, 1998). Végezetül bebizonyosodott, hogy a receptor funkcionális formája expresszálódik humán húgyhólyag epitheliális és intersticiális



sejtjeiben, valamint a simaizomban (Birder és mtsai, 2001; Ost és mtsai, 2002; Lazzeri és mtsai, 2004).

A legújabb felfedezések egyike volt, amikor TRPV1-et immunhisztokémia segítségével kimutatták humán bőr epidermiszén és tenyésztett epidermális keratinocytákon, amit RT-PCR módszerrel is alátámasztottak (Denda és mtsai, 2001). Inoue és munkatársai (2002) ezután beszámoltak arról, hogy a keratinocyták a receptor funkcionális formáját expresszálják. Kimutatták továbbá, hogy a kapszaicin és a savas közeg ezeken a sejteken is aktiválta a receptort, vagyis megemelte az intracelluláris kalciumkoncentrációt (Inoue és mtsai, 2002). További vizsgálatok megmutatták, hogy az epidermális eredetű HaCaT sejtvonalon kapszaicin-kezelést követően megemelkedett a ciklooxygenáz-2 expressziója, valamint interleukin-8 és prosztaglandin E2 felszabadulása (Southall és mtsai, 2003), ami arra utalhat, hogy az epidermális keratinocytákon megtalálható TRPV1 is szerepet játszhat a bőr gyulladásos folyamatainak kialakításában, illetve szabályozásában. Mindezen eredmények és az a tény, hogy a TRPV1 agonista kapszaicint már régóta alkalmazzák a klinikumban különböző bőrgyógyászati kórképek enyhítésére (Bíró és mtsai, 1997) (lásd Megbeszélés fejezet), irányították figyelmünket a TRPV1 bőr, illetve bőrfüggelékek biológiájában betöltött lehetséges szerepének vizsgálatára.

## **PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK**

Mindazon eredmények, melyek a TRPV1 számos neuroektoderma vagy mezoderma eredetű, nem-neuronális szövetekben – köztük természetesen az epidermális keratinocytaikon (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003) – való funkcionális (proliferációs, apoptotikus és differenciálódási folyamatok befolyásolása, citokintermelés szabályozása) megjelenéséről számoltak be, azt sugallták, hogy a TRPV1 biológiai szerepe sokkal szélesebb körű, mint azt korábban gondoltuk. Az irodalomban hiányoznak ugyanakkor azok a leírások, amelyek felvilágosítást adhatnának a TRPV1 bőr és bőrfüggelékek biológiájában betöltött lehetséges szerepéről.

Kísérleteink első leíró részében éppen ezért az volt a célunk, hogy meghatározzuk a TRPV1 pontos lokalizációját a bőr különböző eredetű és működésű sejtkompartimentjeiben, különös tekintettel a szőrtüszőre és a szőrtüsző eredetű sejtekre (pl. ORS keratinocytaik). Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a szőrtüszőben tapasztalt esetleges TRPV1 expressziós mintázat változik-e a hajciklus eseményeivel (anagén-katagén transzformáció) párhuzamosan.

Ezt követően a receptor funkcionális szerepének megismerésére fektettük a hangsúlyt. Vizsgálni kívántuk, hogy milyen hatással van a TRPV1 kapszaicinnal való aktiválása a folliculusok alapfunkciójára, a hajszáltermelésre, továbbá olyan sejtfolyamatokra, mint a folliculáris keratinocytaik osztódása, differenciálódása, a melanintermelés, illetve morfológiai tulajdonságok. A következő lépésben a hasonló sejtfolyamatok vizsgálatát (apoptózis, proliferáció, differenciálódás, citokintermelés) tűztük ki célul a tenyésztett humán szőrtüsző-eredetű ORS keratinocytaik szintjén. Végül szeretnénk volna felvilágosítást kapni a TRPV1 aktiválását követő események hatásmechanizmusáról is.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### *Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése*

A funkcionális kísérleteink alapjául szolgáló hajfollikulusokat plasztikai sebészeti operációk során visszamaradt, halántéki tájékról származó hajas fejbőrből izoláltuk, a bőrdarabok többnyire 50-80 éves női páciensektől származtak. A szőrtüszők eltávolítását és tenyésztését Philpott 1994-ben kidolgozott eljárása alapján végeztük (Philpott és mtsai, 1994b). A fejbőrt elsőként kb. 0,5x1 cm-es szeletekre vágtuk, majd a bőr felszínével párhuzamosan eltávolítottuk az epidermiszt és a dermisz nagy részét a dermisz-szubkutisz határának közelében. Ezután a follikulusokat csipesz segítségével izoláltuk a szubkutiszból, majd az ép szőrtüszőket szelektáltuk. A follikulusok tenyésztése 24-lyukú tenyésztőedényben történt, kiegészített (2 mM L-glutamin, (Invitrogen, Paisley, UK), 10 ng/ml hidrokortizon, (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Németország), 10 µg/ml inzulin (Sigma) és antibiotikum-antimikotikum (Invitrogen)) Williams' E tenyésztőoldatban (Biochrom, Cambridge, UK) 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-atmoszférában, 3, illetve 5 napon keresztül. A szőrtüszők hossznövekedését a fénymikroszkóp okulárjába beépített skála segítségével követtük nyomon, a szőrtüszőket naponta, egyesével mérve. A tenyésztés végén a szőrtüszőket foszfát-pufferben (phosphate-buffered saline, PBS) történő mosás után Cryochrom fagyasztó médiumba (Thermo Shandon, Pittsburg, UK) ágyasztuk be, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, végül belőlük 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk.

A plasztikai sebészeti operációkból kapott bőrdarabok szolgáltak a teljes bőrt reprezentáló 8 µm vastagságú fagyasztott és paraffinba ágyazott metszetek készítésére is, melyeket az alább részletezett módon immunhisztokémiai technikák segítségével vizsgáltuk.

### *Az ORS és HaCaT keratinocyták tenyésztése*

Az ORS keratinocyták tenyésztése osztódásukban meggátolt (24 órán át mitomicin-C-vel kezelt) (Sigma) fibroblasztok által kialakított tápláló rétegen történt (Limat és mtsai, 1986 és 1989). Az ORS keratinocytákat anagén VI follikulusokból nyertük, melyeket egy csipesz segítségével a szemöldök területéről távolítottunk el. A körülbelül 20 eltávolított szőrtüszőt háromszor mostuk  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$ -mentes steril PBS-ben, majd egy órán át 0,1% tripszin-0,2% EDTA (mindkettő Invitrogen) oldatban emésztettük 37 °C-on, melynek során a szőrtüszőről leemésztődtek az ORS sejtek. A tripszin szérumszertartalmú oldattal történő inaktiválása után a sejtuszpenziót pipetta segítségével többször trituráltuk, 10 percig 10000/perc fordulatszámon centrifugáltuk, végül a sejteket a tápláló rétegre szélesztettük. A tenyésztés Ham's F12 (Biochrom) és szérumszertmentes keratinocytá tenyésztő oldatok (SFM, Invitrogen) 1:3 arányú keverékében történt, mely a következő anyagokat tartalmazta kiegészítésként: 0,1 nM kolera toxin, 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 2,43 µg/ml adenin, 2 nM trijódotironin, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 1 mM aszkorbil-2-foszfát és antibiotikum (mind Sigma).

A HaCaT keratinocytákat 10% embrionális borjúsavót (Sigma), 2 mM L-glutamint és antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban (DMEM, Sigma) tenyésztettük.

### *Szöveti és morfológiai vizsgálatok:*

Az izolált és tenyésztett humán szőrtüszőkből 8 µm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk, szárítottuk, majd -20 °C-on acetonnal fixáltuk. A szőrtüszők morfológiai vizsgálatára a metszeteken hematoxilin-eozin festést végeztünk. A melanintartalom láthatóvá tételére a Fontana-Masson szöveti eljárást alkalmaztuk (Barbosa és mtsai, 1984).

## *Immunhiszto- és -citokémia*

Az immunhisztokémiai vizsgálataink során felhasznált antitestek, azok eredete, alkalmazott hígításuk, valamint az immunhisztokémiai módszerek összefoglalása az **I. táblázat**ban található.

**1. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során felhasznált elsődleges antitestek**

<i>Alkalmazott antitest</i>	<i>Eredet</i>	<i>Faj</i>	<i>Alkalmazott hígítás</i>	<i>Alkalmazott módszer</i>
TRPV1	Santa Cruz BT	Kecske	1:20 1:40 1:40 1:400	ABC-peroxidáz Immunfluoreszcens ABC-AP TSA
Triptáz	DAKO	Egér	1:50	ABC-AP
CD1a	Novocastra	Egér	1:20	ABC-AP
Ki-67	DAKO	Egér	1:20	Immunfluoreszcens
NKI/beteb	Cell Systems	Egér	1:20	Immunfluoreszcens
TGFβ <sub>2</sub>	Santa Cruz BT	Nyúl	1:50	Immunfluoreszcens
Filaggrin	Covance BT	Nyúl	1:100	Immunfluoreszcens

(ABC: avidin-biotin komplex, AP: alkalikus foszfatáz, TSA: tyramide signal amplification )

A TRPV1 humán bőrben történő kimutatására az avidin-biotin-komplex (ABC) eljárást alkalmaztuk (Paus, 1998). A szövetben előforduló endogén peroxidázok gátlására a metszeteket 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó 100%-os metanollal kezeltük. A 2% borjú szérum albumin (BSA, Sigma, PBS-ben, pH=7,6) oldattal való inkubáció az elsődleges antitest nem-specifikus kötődésének gátlására szolgált. A metszeteket az elsődleges TRPV1 ellenes antitesttel (1:20) egy éjszakán át inkubáltuk, amit a biotinilált kecske-ellenes másodlagos antitest (1:500, DAKO, Glostrup, Dánia) hozzáadása követett. Az avidin-konjugált torma-peroxidáz (1:400, DAKO) biotinhoz való kötődése után a peroxidáz-aktivitás kimutatására diamino-benzidint (DAB, Vector, Burlingame, CA, USA), illetve VIP SK-4600 (Vector) kromogéneket alkalmaztuk. A magfestésre a hematoxin Gill I (Surgipath Europe, Peterborough, UK) szolgált. A reakció specificitásának ellenőrzésére negatív kontrollként az

elsődleges antitestet szintetikus blokkoló peptiddel (Santa Cruz BT, Santa Cruz, CA, USA) inkubáltuk, illetve elhagytuk a TRPV1 ellenes antitestet. A patkánygerinc hátsó szarvából készített metszeteken látható TRPV1 immunreaktivitás szolgált pozitív szöveti kontrollként (Guo és mtsai, 1999). További ellenőrzésként (FITC konjugált másodlagos antitest felhasználásával) immunfluoreszcens TRPV1 festést végeztünk vad típusú C57BL/6J és TRPV1 knock-out B6.129S4-Trpv1 egereken (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA).

Humán bőrön készült kettős jelölések esetében a TRPV1-festés tekintetében a fent leírtakhoz hasonlóan jártunk el, majd ismét egy 2%-os BSA kezelést alkalmaztunk. A hízósejtek kimutatására a metszeteket egérből származó monoklonális triptáz-ellenes elsődleges (1:50, DAKO), majd egér-ellenes biotinilált másodlagos antitesttel (1:500, DAKO) inkubáltuk. Ezután alkalikus foszfátazzal jelölt streptavidin, majd szubsztrátként Fast Blue (Sigma) hozzáadása következett.

A dendritikus sejt-specifikus marker CD1a-val (Longley és mtsai, 1989) történő kettős festés során a TRPV1 jelölése és az egérben termeltetett CD1a-ellenes antitest alkalmazása után egér-ellenes másodlagos antitesttel (1:500, DAKO) és alkalikus foszfátazzal jelölt streptavidinnel való kezelés következett. Végül az immunreaktivitást Fast Blue (Sigma) oldattal tettük láthatóvá. Az endogén alkalikus foszfátázok blokkolása mindkét kettős jelölés során Levamisole oldattal történt (Sigma).

A TRPV1 izolált szórtüszőn való kimutatására a tyramide-substrate amplification (TSA) (Botchkarev és mtsai, 2000; Ito és mtsai, 2004) és az alkalikus foszfátáz alapú ABC (Panteleyev, 1999) módszereket használtuk. A TSA eljárás során az endogén peroxidázok gátlását (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS-ben) követően a nem-specifikus kötődéseket DAKO Protein Block (DAKO) és TNB oldatokkal (TSA kit, PerkinElmer, Boston, MA, USA) blokkoltuk. Az elsődleges TRPV1-ellenes antitesttel (1:400) való egy éjszakán át, majd a biotinilált

másodlagos kecske/egér/nyúl-ellenes disznó IgG-vel (1:200, DAKO) való 45 perces inkubálás után a streptavidin-konjugált torma-peroxidázzal (1:100 TNB pufferben, TSA kit) való jelölés következett. A jelerősítés utolsó lépéseként a metszeteket TRITC-tyramiddal (1:50 Amplification Diluent-ben, TSA kit) inkubáltuk 5 percig, majd magfestést végeztünk (DAPI, 1 µg/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország).

Az ABC-módszer alkalmazása során a 10%-os disznó normál szérummal (PBS-ben, DAKO) történő előinkubáció után az elsődleges TRPV1-ellenes antitestet (1:40) egy éjszakán keresztül alkalmaztuk. A biotinizált kecske/egér/nyúl-ellenes disznóban termeltetett másodlagos antitest (1:200, DAKO) használatát követően streptavidin-alkalikus foszfatáz jelölést használtunk. Az immunhisztokémiai jelölést a Fast Red (Sigma) segítségével tettük láthatóvá, melyet a hematoxilinnel történő magfestés zárt le.

A tenyésztett ORS keratinocytákban történő TRPV1 kimutatására egy egyszerű immunfluoreszcens festés szolgált, melynek során az acetone-fixált sejtek elsődleges TRPV1-ellenes antitesttel (1:40) való inkubációját a FITC-jelölt másodlagos antitesttel (1:400, Vector) való festés követte.

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 (Foitzik és mtsai, 2000; Lindner és mtsai, 2000). 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. A kettős festéshez a fagyasztott metszeteket 1%-os paraformaldehidben és etanol-jégecet 2:1 arányú oldatában fixáltuk. Első lépésként a metszeteket reakciópuffer – terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT) enzim (mindkettő ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit, Intergen, Purchase, NY, USA) 70-30%-os elegyével inkubáltuk 37 °C-on 60 percen keresztül, mely során a TdT enzim a

reakciópufferben található digoxigenin jelölt nukleotidokat az apoptótikusan fragmentált DNS 3' OH végeihez kapcsolta. A reakció leállítása és 10%-os kecske normál szérumos (DAKO, PBS-ben) kezelést követően a metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk egérben termeltetett Ki-67 ellenes antitesttel (1:20, 2% kecske normál szérum jelenlétében). Utolsó lépésként a digoxigenin-jelölt DNS-fragmentumokhoz FITC-konjugált digoxigenin-ellenes antitestet kapcsoltunk (TUNEL kit), a Ki-67 ellenes antitesthez pedig rodaminnel jelölt kecske-ellenes IgG-t (1:200, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, + 2% kecske normál szérum, DAKO) kötöttünk, végül DAPI-val magfestést végeztünk. A TdT enzim, illetve a Ki-67 ellenes antitest elhagyása szolgált a festés negatív kontrolljaként.

Szintén kettős jelölést alkalmaztunk a szőrtüszőkön annak eldöntésére, hogy a folliculáris melanocyta kifejezik-e az általunk leírni kívánt receptort: a specifikus melanocyta marker NKI/beteb (Vennegoor és mtsai, 1988) és TRPV1 azonos metszeten való kimutatását végeztük el. Első lépésként az aceton fixált metszeteket 10%-os nyúl normál szérummal kezeltük (DAKO, PBS-ben), majd egy éjszakán át inkubáltuk a kecskében előállított TRPV1-ellenes antitesttel (1:40). Ezt követte a kecske-ellenes rodamin-jelölt nyúl IgG-vel (1:200, Jackson Immuno Research) való inkubáció. A festés második részében a 10%-os kecske normál szérumos (DAKO, PBS-ben) blokkolás után az előzőekhez hasonlóan először az egér NKI/beteb-ellenes elsődleges, majd a kecskében termeltetett egér-ellenes, FITC-jelölt másodlagos antitesttel (1:200, Jackson Immuno Research) való inkubáció következett.

A  $TGF\beta_2$  immunhisztokémiai kimutatására (Botchkareva és mtsai, 1999) a folliculusokból készült fagyasztott metszeteket a 10%-os kecske normál szérumos blokkolás után  $TGF\beta_2$ -ellenes antitesttel inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd ez ellen kecskében termeltetett, FITC-kapcsolt másodlagos antitestet használtunk (1:200, Jackson Immuno Research), melyet magfestés követett (DAPI).



A differenciálódási marker filaggrin kimutatása során az előzőekben ismertetett lépéseket alkalmazva a filaggrin-ellenes antitesttel való inkubálás után a kecskében termeltetett FITC-jelölt másodlagos antitestet (1:200, Jackson Immuno Research) használtuk.

Összehasonlító hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálataink során a festések színintenzitásbeli különbségeinek mérésére az Image Pro Plus 4.5.0 szoftvert (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) használtuk. A kvantifikálás során csoportonként 20-30 folliculus előre meghatározott, rögzített nagyságú területeinek intenzitását mértük, majd feltüntettük és összehasonlítottuk azok átlagát.

#### *Western (immuno) blot analízis*

A TRPV1 protein szintű kimutatását a laboratóriumunkban általában alkalmazott protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai, 1998a; Boczán és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2003; Lázár és mtsai, 2003) az alábbiak szerint végeztük. A tenyésztett sejteket hideg PBS-ben mostuk, majd lízis-pufferben (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, 20  $\mu$ M leupeptin, pH 7.4 (Sigma)) homogenizáltuk, végül jégen ultrahangos feltárást végeztünk. A humán bőr esetében folyékony nitrogénban való porítás után hasonlóan jártunk el. Az így nyert lizátumok proteintartalmát módosított BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A fehérjetartalmat 2 mg/ml-re állítottuk be (a minta végtérfogatában 5%  $\beta$ -merkaptoetanol, 10% glicerin, 2% SDS, 0.062 M TRIS, 20 mM dithiothreitol, 0.002% brómfenolkék volt; mind Sigma), majd 10 perces főzéssel denaturáltuk, végül felhasználásig -20 °C-on tároltuk a mintákat. Kísérleteink során SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), mintánként 20-30  $\mu$ g proteint választottunk szét 8%-os gélen 100 V konstans feszültséggel. Ezután a fehérjéket nitrocellulóz membránra (BioRad, Wien, Austria) transzferáltuk, 2x45 percen keresztül, 100 V konstans feszültséggel. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-

ben (5% tej-PBS) 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránokat 5%-os tej-PBS-ben hígított elsődleges TRPV1 ellenes antitesttel (1:100) inkubáltuk egy éjszakán át. A membránok 30 perces mosását (PBST, 0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma) követően azokat nyúlban termeltetett kecske-ellenes, másodlagos, torma-peroxidázzal kapcsolt antitesttel (1:1000, BioRad) inkubáltuk 45 percen keresztül. Újabb, PBST-ben elvégzett mosást követően az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL Western blot detektáló kittel (Amersham, Little Chalfont, UK) tettük láthatóvá, amit röntgenfilmen rögzítettünk (AGFA, Brussels, Belgium). A Western blot analízis pozitív kontrolljaként a TRPV1-et expresszáló HaCaT és normál humán epidermális keratinocyták (NHEK) szolgáltak (Denda és mtsai, 2001; Southall és mtsai, 2003).

#### *Szemi-kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR (RT-PCR)*

A TRPV1 mRNS szintű meghatározására (Southall és mtsai, 2003) a bőrből folyékony nitrogén segítségével homogenizátumot készítve Trizol (Invitrogen) segítségével teljes RNS frakciót izoláltunk. A reverz-transzkripció során a teljes RNS 1 µg-ját 10 percre 70 °C-ra melegítettük, majd jégen gyorsan lehűtöttük és hozzáadtunk a következő oldatokat (mind Promega, Madison, WI, USA): 1x reverz transzkriptáz puffer (10 mM TrisHCl (pH=9), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 1 U/µl rekombináns RNasin ribonukleáz inhibitor, 15 U/ µl AMV reverz transzkriptáz és 0,5 µg/ml oligo(dT)<sub>15</sub> primer. A reakcióelegyet 42 °C-on 15 percig, 95 °C-on 5 percig, végül 4 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegy aliquotjait használtuk a PCR reakció templátjaként a következő, humán TRPV1-specifikus primerek segítségével: 5'-CTC CCT ACA ACA GCC TGT AC-3' és 5'-AAG GCC CAG TGT TGA CAG TG-3'(50-50 pmol). A PCR reakció során felhasznált hőprofil a következő volt: 94 °C 2 perc; 94 °C 45 másodperc, 57 °C 1 perc, 72 °C 2 perc 30 cikluson keresztül; 74 °C 10 perc.

A TGF $\beta_2$  mRNS szintű meghatározásához (Kjellman és mtsai, 2000) csoportonként 15 tenyésztett hajfollikulusból kiindulva a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével, a gyártó által javasolt protokollt követve nyertünk teljes RNS frakciót. Az RNS cDNS-sé való átírása a 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Boehringer) alkalmazásával, random primerek felhasználásával történt. A TGF $\beta_2$  és  $\beta$ -aktin DNS szakaszok amplifikálására a következő hőprofil alkalmaztuk: 94 °C 5 perc; 94 °C 30 másodperc, a TGF $\beta_2$  esetén 57 °C, a  $\beta$ -aktin esetén 55 °C 1 perc, 72 °C 1 perc 30 cikluson keresztül; végül 72 °C 10 perc. Az amplifikációt az alábbi primerek felhasználásával végeztük: TGF $\beta_2$ , 5'-ATC CCG CCC ACT TTC TAC AGA C-3' és 5'-CAT CCA AAG CAC GCT TCT TCC-3';  $\beta$ -aktin, 5'-CGA CAA CGG CTC CGG CAT GTG C-3' és 5'-CGT CAC CGG AGT CCA TCA CGA TGC-3'. A termékeket etidium-bromidot tartalmazó 1%-os agaróz gélen választottuk el.

#### *Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)*

A Q-PCR kivitelezése az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével történt, az 5' nukleáz módszer felhasználásával. A teljes RNS kivonására sejtkultúrák esetében Trizol (Invitrogen), szőrtüszők esetében RNA easy kitet (Qiagen) használtunk. A teljes RNS 3  $\mu$ g-jából kiindulva 15 U AMV reverz-transzkriptázt (Promega) és 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l random primert (Promega) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. A PCR amplifikáció TaqMan primerek és próbák alkalmazásával történt (Assay ID: Hs00218912\_m1 a humán TRPV1 esetében, Assay ID: Rn00583117\_m1 patkány TRPV1 esetében) a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (Applied Biosystems) alapján. Belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz szolgált (GAPDH, Assay ID: Hs99999905\_m1 a humán GAPDH esetében, Assay ID: Rn00576699\_m1 a patkány GAPDH esetében).

### *Intracelluláris kalciummérés*

A TRPV1 aktiválást követő intracelluláris kalciumkoncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) változásának mérésére a következő protokollt használtuk (Lázár és mtsai, 2003). A fedőlemezre szélesztett keratinocytákat 5  $\mu$ M kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával (fura 2-AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 60 percig inkubáltuk 37 °C-on. A fura 2-AM-rel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket ezután invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Tokió, Japán) 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 Gryniewicz és mtsai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk. Meghatároztuk a 340 ( $F_{340}$ ) és 380 nm-en ( $F_{380}$ ) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadosokat ( $R=F_{340}/F_{380}$ ). Felhasználva a disszociációs konstans ( $K_D$ ), a minimális ( $R_{min}$ ) és maximális ( $R_{max}$ ) ráció értékeket, valamint az emittált fluoreszcencia hányados értékeit nulla ( $F_{380}[0]$ ) és a festéket szaturáló ( $F_{380}[Ca]$ ) kalciumkoncentrációknál, a  $[Ca^{2+}]_i$  az alábbi képlet segítségével volt számolható:

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

Kalibrációs kísérleteinkben a  $K_D$ -t 76 nmol/l-nek találtuk  $R_{min} = 0,42$ ,  $R_{max} = 8,6$  és  $F_{380}[0]/F_{380}[Ca] = 15,3$  értékek mellett.

Kísérleteink során a sejteket lassú perfúzióval folyamatosan Tyrode oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g glükóz, pH 7,4; mind Sigma) mostuk. A vizsgált anyagokat a sejtek közvetlen közelébe helyezett gyors perfúziós rendszerrel adagoltuk. Kísérleteinket szobahőmérsékleten (22-23 °C) végeztük.

### *A sejtproliferáció vizsgálata*

A tenyésztett sejtek proliferációjának nyomon követésére a kolorimetriás bromodeoxyuridin (BrdU) assay kitet (Boehringer) használtuk (Bíró és mtsai, 1998a). Az eljárás azon alapul, hogy a timidin-analóg BrDU a sejtosztódás során beépül a proliferáló sejtek DNS-ébe. A BrDU ellenes antitesthez kapcsolt peroxidáz szubsztrátjaként tetra-metil-benzidint használunk, mely az enzimreakció során keletkezett színes terméké alakulva felvilágosítást ad a BrDU beépülés, vagyis a proliferáció mértékéről. A kísérlet során használt sejteket 96-lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük, a HaCaT keratinocyták esetében 5000 sejt/lyuk, az ORS sejteknél 10000 sejt/lyuk kiindulási sejtszámot használva (az ORS keratinocytákat 5000 sejt/lyuk sűrűségben szélesztett humán dermális fibroblaszt tápláló rétegen). A sejteket kitapadásukat követően (kb. 4 óra) 72 órán keresztül különböző anyagokkal kezeltük, ezt követően pedig további négy órán át 10  $\mu$ M-os BrDU-val inkubáltuk. A keratinocyták fixálása és DNS-ük denaturálása után a BrDU-ellenes antitesttel való inkubáció (90 perc), majd 30 perces tetra-metil-benzidín kezelés következett. Az enzim-szubsztrát reakció 1 M-os  $H_2SO_4$ -gyel történő leállítását követően a sejteket 450 nm-en fotometráltuk. Minden kezelést négyszeres ismétléssel végeztünk, majd az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában adtuk meg.

### *Áramlási citometria*

A TRPV1 aktiváció sejtproliferációra, differenciálódásra, apoptózisra, valamint a szőrtüsző kialakulását és fejlődését szabályozó molekulák kifejeződésére gyakorolt hatását áramlási citometria segítségével elemeztük. A kontroll és kapszaicin kezelt ORS keratinocyták jelölésére használt elsődleges antitestek a **2. táblázat**ban láthatóak. A megfelelő FITC-konjugált másodlagos antitestek (1:100, Vector) használata után a sejteket fixáltuk, majd azokat a Coulter EPICS XL-4 (Miami, FL, USA) készülék segítségével elemeztük:

antigénenként legalább 50000 sejtet használva meghatároztuk a teljes sejtszámra vonatkozó pozitív sejtek számát. Az apoptotikus sejtek kimutatására FITC-jelölt Annexin-V antitestet használtunk (Sigma), a kapott eredményeket hasonló módon elemezve.

**2. táblázat: Az áramlási citometriás vizsgálatok során felhasznált elsődleges antitestek**

<i>Alkalmazott antitest</i>	<i>Eredet</i>	<i>Faj</i>	<i>Alkalmazott hígítás</i>
Ki-67	DAKO	Egér	1:100
Proliferating cell nuclear antigen, PCNA	Novocastra	Egér	1:50
Filaggrin	Covance	Nyúl	1:100
Cytokeratin-14, CK-14	Novocastra	Egér	1:20
Cytokeratin-17, CK-17	Novocastra	Egér	1:20
Involukrin	Sigma	Egér	1:50
IGF-I	Santa Cruz BT	Nyúl	1:100
HGF	Santa Cruz BT	Nyúl	1:20
SCF	Santa Cruz BT	Egér	1:50
TGF $\beta_2$	Santa Cruz BT	Egér	1:50
IFN $\gamma$	Santa Cruz BT	Kecske	1:20
IL-1 $\beta$	Santa Cruz BT	Kecske	1:50
TNF $\alpha$	BD Pharmingen	Nyúl	1:20
FGF-5	Santa Cruz BT	Kecske	1:20

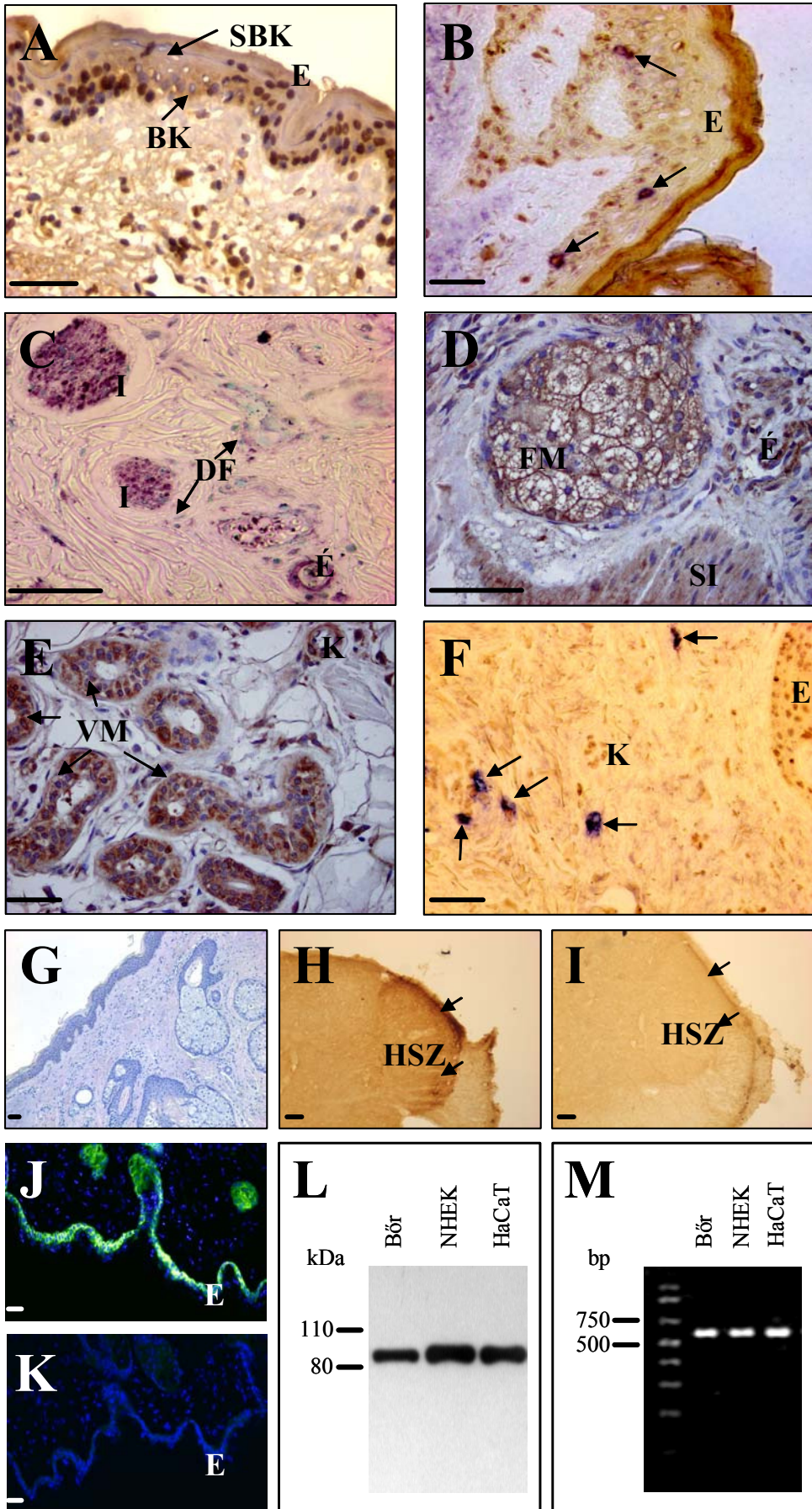
#### *Statisztikai elemzések*

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

## EREDMÉNYEK

*A TRPV1 mind mRNS, mind fehérje szintjén kifejeződik a bőr számos epitheliális és mesenchymalis sejtípusán*

Kísérleteink kiindulásaként arra voltunk kíváncsiak, hogy a TRPV1 a már leírt epidermális keratinocyták mellett más sejtípusokon is kifejeződik-e humán bőrben *in situ*. Hajas fejbőrből készült paraffinba ágyazott metszeteken specifikus TRPV1-ellenes antitesttel immunhisztokémiát végeztünk, és megállapítottuk, hogy a receptor a bőr számos sejtípusában megtalálható (**4. ábra**). Mint ahogy azt már korábban leírták (Denda és mtsai, 2001), igen kifejezett immunreaktivitást találtunk az epidermális keratinocytákon (**4. ábra, A**). Megfigyeltük azonban, hogy ez a kifejezett immunreaktivitás főleg a bazális, vagyis proliferáló keratinocyták rétegére korlátozódott, míg a felszíni, szuprabazális rétegekben a festés intenzitása csökkent. Az epidermisz vonatkozásában elmondható volt továbbá, hogy a keratinocyták mellett a CD1a-pozitív epidermális Langerhans-sejtek is expresszálják a TRPV1-et (**4. ábra, B**). Kimutattuk emellett, hogy a dermisz számos kompartmentje is pozitívan festődött; az itt elhelyezkedő TRPV1-pozitív szenzoros idegrostok a festés belső kontrolljaként (Guo és mtsai, 1999) is szolgáltak (**4. ábra, C**). Az említett neuronális elemek mellett erős immunreaktivitást találtunk a faggyúmirigyek és a verejtékmirigyek epitheliumán (**4. ábra, D, E**), az erek falában mind az endotheliumban, mind a simaizom rétegben, valamint a dermisz simaizom-kötegeiben (**4. ábra, C, D, E**). A hízósejt specifikus marker triptáz-TRPV1 kettős festés során megállapítottuk továbbá, hogy a dermális hízósejtek is a TRPV1-et expresszáló sejtek közé sorolhatók (**4. ábra, F**). Végezetül kimutattuk, hogy a hajas fejbőrben található számos szőrtüsző különféle sejtrétegeiben is (részletesen később) is megtalálható a TRPV1. Fontos eredményünknek adódott, hogy a kötőszöveti fibroblaszok nem mutattak TRPV1 pozitivitást (**4. ábra, C**).





#### **4. ábra: TRPV1 immunreaktivitás, valamint protein és mRNA expresszió a humán bőrben**

(A) TRPV1-immunoreaktivitás (TRPV1-ir) az epidermális keratinocytákon. Kifejezettebb festődés a bazális (BK), mint a szuprabazális keratinocytákon (SBK) (E: epidermisz). (B) TRPV1 (barna) és CD1a (kék) kolokalizáció az epidermális Langerhans-sejteken (nyíl). (C) TRPV1-ir az idegrostokban (I) és a dermális erek (É) endotheliumában és simaizomelemeiben. A dermális fibroblasztokban nem találtunk TRPV1-festődést (DF). (D) TRPV1-pozitív faggyúmirigyek (FM), érendothel és -simaizom (É), valamint dermális simaizom (SI). (E) TRPV1 expresszió a verejtékmirigy endotheliumában (VM, nyilak; K: kapillaris). (F) TRPV1 (barna) és hízósejt-specifikus triptáz (kék) kolokalizáció a dermális hízósejteken (nyilak) (E: epidermisz; K: kapillaris). (G) Negatív kontroll. A festések specificitását a TRPV1-ellenes antitest szintetikus blokkoló peptiddel való előinkubációjával ellenőriztük. (H) Pozitív kontroll. TRPV1-ir (nyilak) a patkány gerincoszlop hátsó szarvában (HSZ). (I) Negatív kontroll. A TRPV1-ellenes elsődleges antitest szintetikus blokkoló peptiddel való előinkubációja után hiányzó TRPV1-ir (HSZ: hátsó szarv). (J, K) TRPV1-ir a vad típusú (J) és knockout (K) C56BL/6J egérbőrön (FITC-konjugált másodlagos antitest használatával) (E: epidermisz). (A, C, D, E, G) Paraffinos metszetek. (B, F, H, I-K) Fagyasztott metszetek. A legtöbb esetben DAB-ot használtunk az enzimszubsztrát reakció előhívására, kivéve (C) esetben, ahol a VIP szubsztrátot alkalmaztuk. Eredeti nagyítások: A-F: 400x, G: 40x, H-K: 100x. (L) A TRPV1 protein (kb. 90 kDa) Western blottal történő kimutatása bőr homogenizátumból, HaCaT és normál humán epidermális keratinocytákból (NHEK). (M) A TRPV1-mRNA kimutatása RT-PCR-rel (Méret: kb. 680 bázispár, bp).

A festések specificitásának ellenőrzésére számos pozitív, illetve negatív kontrollt alkalmaztunk (4. ábra, G-K). Negatív kontrollként az elsődleges antitestet szintetikus blokkoló peptiddel inkubáltuk, mikoris nem tapasztaltunk TRPV1 immunreaktivitást a bőr eddig felsorolt kompartmentjének egyikében sem (4. ábra, G). Pozitív szövetként patkány gerincvelő hátsó szarva szolgált (4. ábra, H): az elsődleges antitest jelenlétében az irodalomból ismert laminákban (Guo és mtsai, 1999) TRPV1 pozitív festődés látható, míg az antitest szintetikus blokkoló peptiddel való előinkubálása után a metszet negatív volt (4. ábra, I). Vad típusú C57BL/6J és TRPV1 knock-out egerek bőréből készült fagyasztott metszeteken is elvégeztük a TRPV1-immunhisztokémiát: a vad típusú egérbőr epidermiszében kifejezett TRPV1-immunreaktivitást találtunk, míg a knock-out mintákon nem tapasztaltunk festődést (4. ábra, J, K). A bőr különféle sejttípusainak TRPV1 expresszióját, valamint annak mértékét a 3. táblázatban foglaltuk össze.

A TRPV1 fehérje szintű jelenlétére utal egy további módszerrel, Western blottal való kimutatása is (4. ábra, L). Az eljárás során a humán bőrből készült homogenizátumból kimutattuk a kb. 90 kDa nagyságú receptort. Ebben az esetben TRPV1-et bizonyítottan

expresszáló sejtípusokat (NHEK és HaCaT keratinocyták, Denda és mtsai, 2001; Southall és mtsai, 2003) használtunk pozitív kontrollként.

RT-PCR technika alkalmazásával szintén kimutattuk a kb. 680 bázispár nagyságú TRPV1-terméket, vagyis a receptor a bőrben mRNS szinten is jelen van (**4. ábra, M**). Pozitív kontrollként az előző módszerhez hasonlóan NHEK és HaCaT keratinocytákat használtunk.

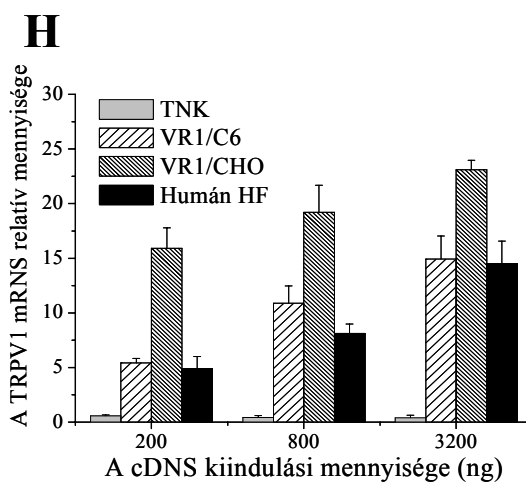
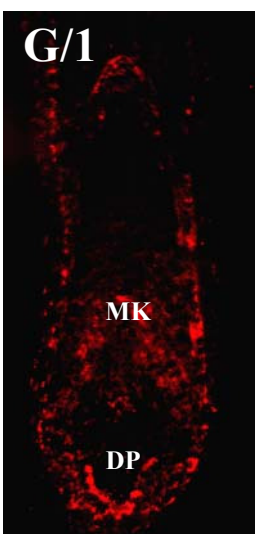
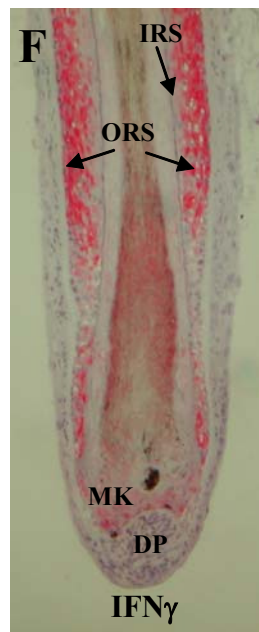
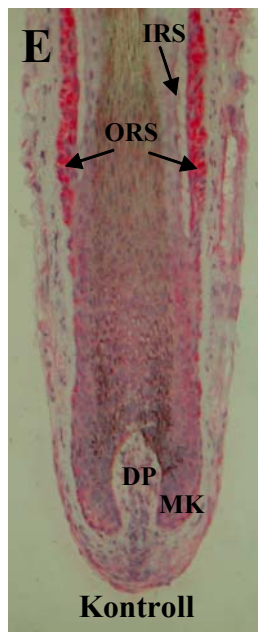
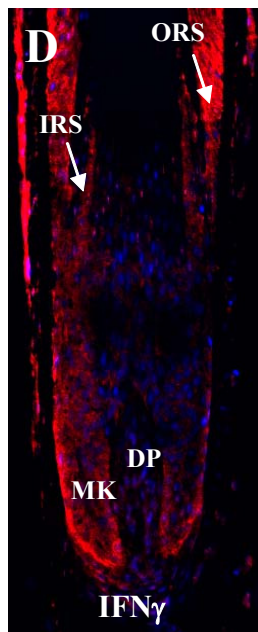
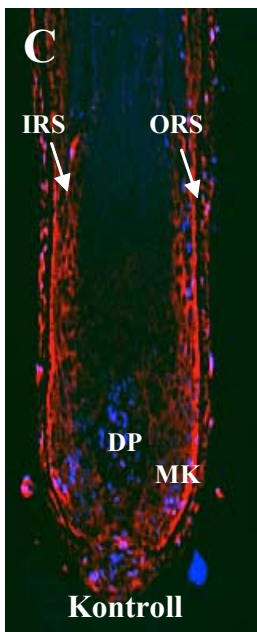
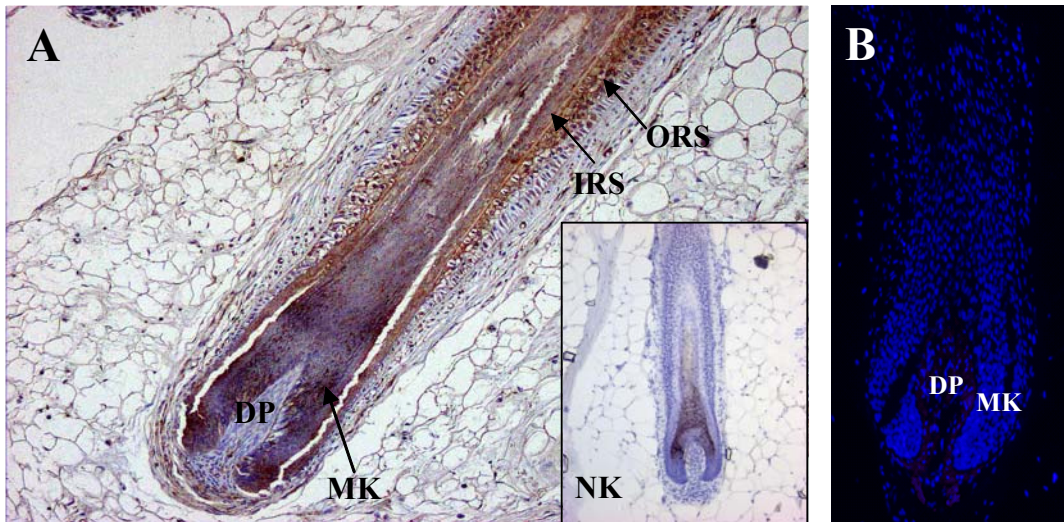
### 3. táblázat: TRPV1 immunreaktivitás (TRPV1-ir) a humán bőr különböző sejtípusain.

<i>Sejt</i>	<i>Eredet</i>	<i>TRPV1-ir</i>
<i>Epidermisz</i>		
Bazális keratinocyták	E	+++
Szuprabazális keratinocyták	M	+
Melanocyták	M	-
Langerhans sejtek	M	++
<i>Dermisz</i>		
Hízósejtek	M	++
Verejtékmirigy epithelium	E	+++
Endothel sejtek	E	+++
Faggyúmirigy sebocytái	M	++
Simaizom	M	+++
Kötőszöveti fibroblasztok	M	-

A TRPV1-immunreaktivitás intenzitása: -: nincs festődés, +: gyenge festődés, ++: közepes festődés, +++: erős festődés. E: neuroektodermális, M: mesenchymális

*Mind a bőrben in situ elhelyezkedő, mind a tenyésztett humán szőrtüszők számos sejtrétege kifejezi a TRPV1-et*

A paraffinba ágyazott humán fejbőr TRPV1-immunhisztokémiája során a fentiekén kívül megállapítottuk, hogy az aktív növekedési, anagén-VI fázisban lévő szőrtüszők is intenzív TRPV1-immunreaktivitást mutatnak (**5. ábra, A**). Kifejezett TRPV1-pozitivitást találtunk az ORS keratinocytákon, a folliculus teljes hosszában, valamint a külső gyökérhüvely minden sejtrétegében, homogén eloszlásban. Az IRS differenciálódott keratinocytáiban is kimutatható volt a TRPV1, bár ezen sejtréteg valamivel gyengébb immunreaktivitással volt jellemezhető.



### 5. ábra: TRPV1 immunreaktivitás tenyésztett és *in situ* szőrtüszőn

(A) TRPV1-ir az *in situ* szőrtüszőben. TRPV1-pozitív belső és külső gyökérhüvely (IRS és ORS) és mátrix keratinocyták (MK). (DP: dermális papilla) (A, inset, B) Negatív kontroll (NK). A festések specificitását a TRPV1-ellenes antitest szintetikus blokkoló peptiddel való előinkubációjával ellenőriztük ABC (A) és fluoreszcens (B) jelölés során. (DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocytá). TSA (C, D) és ABC-AP (E, F) módszerek segítségével kimutatott TRPV1-ir tenyésztett anagén (C, E) és INF- $\gamma$ -indukálta katagén (D, F) follikulusokon. (G) TRPV1 (piros, G/1) és NKI/beteb (zöld, G/2) párhuzamos immunfluoreszcens jelölése. Az NKI/beteb+ melanociták nem expresszálják a TRPV1-et. (B, C, D, G) DAPI magfestés (kék fluoreszcens), (A, E, F) hematoxilín-eozin magfestés (kékkel). Eredeti nagyítások: A: 100x, B-G: 200x. (H) A TRPV1 expresszió Q-PCR-rel történő kimutatása izolált hajfollikulusban. A TRPV1-expressziót az azonos szövetből izolált GAPDH expressziójára vonatkoztattuk, növekvő cDNS mennyiségből kiindulva. TNK: templát cDNS nélküli (negatív) kontroll; TRPV1/C6 és TRPV1/CHO: a rekombináns patkány TRPV1-t stabilan expresszáló C6 és CHO sejtvonalak (pozitív kontroll), HF: szőrtüsző. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM formában adtuk meg, a mérések háromszori ismétlésével.

A bulbus mátrix keratinocytáiban gyenge TRPV1 immunreaktivitást találtunk. Kimutattuk emellett, hogy a follikulust kívülről burkoló CTS, illetve az azzal kapcsolatban lévő DP speciális fibroblasztjai viszont – a bőr dermális fibroblasztjaihoz hasonlóan (lásd 4. ábra, C) – nem expresszálták a TRPV1-t.

A teljes bőrben készült festéssel azonos szöveti eloszlást mutatott a TRPV1 izolált, tenyésztett anagén VI fázisban lévő szőrtüszőkön. Két további, nagy érzékenyséű immunhisztokémiai eljárást, a TSA-t és az alkalikus foszfatázzal működő ABC technikákat alkalmazva (5. ábra, C, E) megállapítottuk, hogy igen kifejezett TRPV1-immunreaktivitás tapasztalható az ORS, IRS és mátrix keratinocyták rétegeiben (bár ebben az esetben az IRS TRPV1-pozitivitása talán kevésbé volt kifejezett, mint a bőrben *in situ*). A DP és CTS területe ismételt TRPV1-negatívnak adódott.

Nem találtunk TRPV1-expressziót a bulbus prekortikális melanocytáiban (5. ábra, G). Az általunk keresett vanilloid receptorral (G/1) párhuzamosan, azonos metszeten elvégeztük a specifikus melanocytá-marker NKI/beteb (G/2) immunfluoreszcens jelölését is. Azt tapasztaltuk, hogy a két molekula lokalizációja egymástól eltérő, vagyis hasonlóan az epidermális melanocytákhoz, a follikuláris melanocytákon sem található meg a TRPV1.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az általunk leírt TRPV1 expressziós mintázat változik-e a hajciklus morfológiai változásaival párhuzamosan. Ennek érdekében izolált

szőrtüszőket 1000 IU/ml IFN $\gamma$ -val kezeltünk, mely bizonyítottan képes katagént indukálni kísérleti körülmények között (Ito és mtsai, 2004). Az IFN $\gamma$ -kezelést követően a szőrtüszőkből fagyasztott metszeteket készítettünk, majd morfológiai és immunhisztokémiai elemzés után elkülönítettük a katagén fázisban lévőket. (Katagénként definiáltuk az alábbi morfogenetikai változásokkal jellemezhető szőrtüszőket: vékony, lehúzódt DP, apoptotizált mártix keratinocytá réteg, csökkent melanintartalom. Ezen szőrtüszők továbbá a kezeletlenekhez képest több apoptotizált, TUNEL-pozitív, illetve kevesebb proliferáló, vagyis Ki-67-pozitív keratinocytát tartalmaztak; Müller-Röver és mtsai, 2001; Stenn és Paus, 2001) (lásd alább).

A kezeletlen (anagén VI) és IFN $\gamma$ -kezelt (katagén I-II) follikulusokon TRPV1-festést végezve megállapítottuk, hogy a TRPV1-immunreaktivitás jelentősen megemelkedett az anagén-katagén transzformációt követően (**5. ábra, D, F**). Statisztikai elemzés során szignifikáns különbséget tapasztaltunk az anagén és katagén szőrtüszők ORS keratinocytáinak TRPV1 expresszójában: az immunhisztokémiai festések színintenzitásának denzitometriás analízise kimutatta, hogy a katagén follikulusokban a TRPV1 expresszió intenzitás mértéke  $32,3 \pm 6,8$  %-kal nagyobb volt (átlag  $\pm$  SEM, n = 20-30, p < 0,05) a kontroll (kezeletlen) csoport értékeihez viszonyítva.

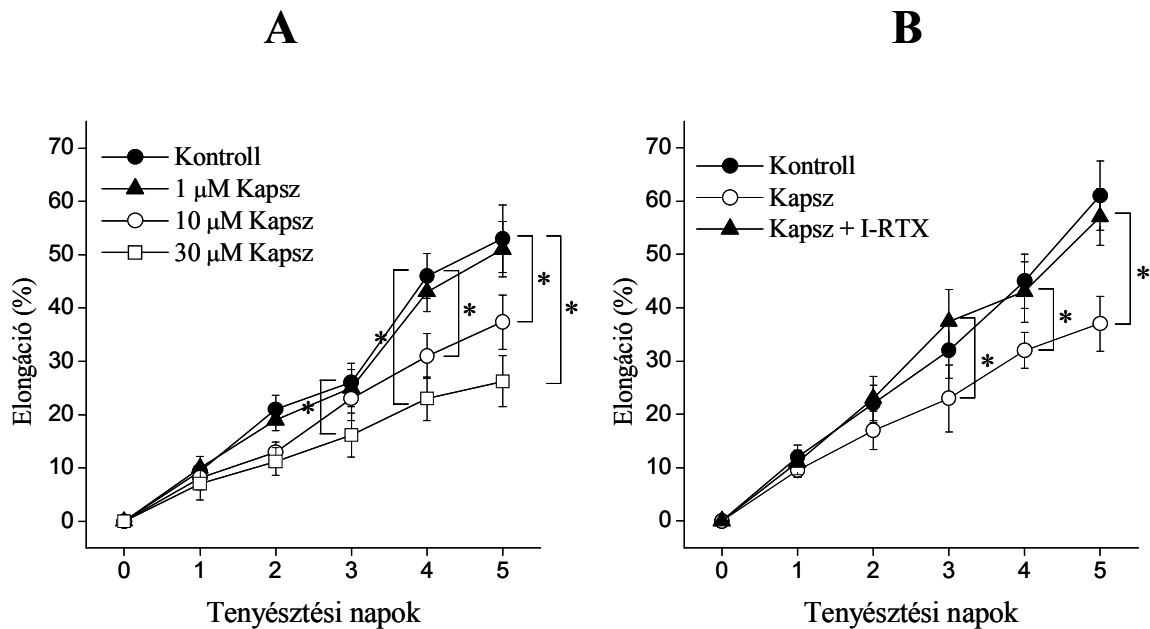
A TRPV1 humán hajfollikulusban történő fehérje szintű kimutatása után, kvantitatív Q-PCR felhasználásával, a TRPV1-mRNS-t is kimutattuk az anagén VI-os follikulusokból készült homogenizátumban (**5. ábra, H**). Ebben az esetben a TRPV1-et overexpresszáló, rekombináns patkány sejtvonalat (C6 és CHO) használtunk pozitív kontrollként (Lázár és mtsai, 2003 és 2004). Megállapítottuk, hogy a humán izolált hajfollikulusban a pozitív mintákkal összevethető mennyiségben van jelen a TRPV1.

*A TRPV1-aktiváció dózisfüggően és specifikusan gátolja a hajszál hossznövekedését szőrtüsző szervkultúrában*

A TRPV1 humán szőrtüszőben való jelenlétének leírása fölvetette azt a kérdést, hogy a receptor milyen funkcionális szerepet tölthet be a szőrtüsző különböző élettani folyamataiban. A kérdést tisztázandó első lépésként azt vizsgáltuk, milyen hatással van a TRPV1 aktiváció a szőrtüsző egyik legszembevetőbb folyamatára, a hajszál kialakítására. Izolált humán szőrtüszőket szervkultúrában öt napon át kezeltünk a TRPV1 aktivátor kapszaicin (Bevan és mtsai, 1993) három különböző koncentrációjával (1, 10, 30  $\mu\text{M}$ ). A kezelés során naponta mértük a hajszál hossznövekedését mind a kontroll, mind a kapszaicin-kezelt csoportokban. A hossznövekedési adatokból növekedési görbét készítettünk, ahol a növekedés mértékét a kezeletlen csoport izolálás napján mérhető átlagos hosszára vonatkoztattuk. A kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a kapszaicin, vagyis a TRPV1 specifikus stimulálása, dózisfüggően gátolta a hajszálak hosszirányú növekedését (**6. ábra, A**). A 30  $\mu\text{M}$ -os kapszaicin-kezelés során a kontrollhoz képest már a kezelés harmadik napján szignifikáns eltérést tapasztaltunk, míg a kezelés ötödik napjára a TRPV1-aktiválás a hossznövekedést a felére csökkentette. A kapszaicin 10  $\mu\text{M}$ -ban való alkalmazása kisebb mértékű növekedésgátlást okozott, ami a kezelés negyedik napjától már szintén szignifikánsnak bizonyult.

Hogy meggyőződjünk a kapott hossznövekedést gátló hatás specifikusságáról, vagyis, hogy a növekedésben tapasztalt visszaesés valóban a TRPV1-aktiválás hatására következett-e be, újabb szervkultúrákat készítettünk. Ezekben a kapszaicin egyik hatásos koncentrációjának (10  $\mu\text{M}$ ) kiválasztása mellett a specifikus TRPV1-inhibitor iodo-resiniferatoxint (I-RTX) (100 nM) alkalmaztuk (Wahl és mtsai, 2001), majd az előzőhöz hasonlóan növekedési görbét készítettünk. A növekedési görbe tanulmányozása során megállapítottuk, hogy az I-RTX alkalmazása teljesen kivédte a kapszaicin okozta TRPV1-aktiválás hatását, ami a TRPV1 hossznövekedés szabályozásában betöltött specifikus szerepére utal (**6. ábra, B**). Az

antagonista önmagában való alkalmazása a hossznövekedést kis mértékű, nem szignifikáns változását okozta (nem mutatva).



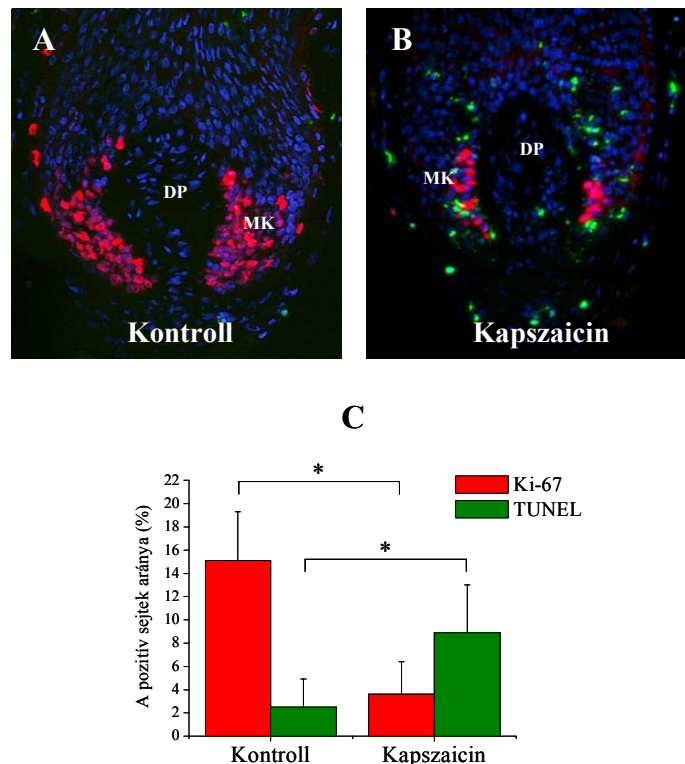
**6. ábra: A TRPV1-aktiváció dóziszfüggően és specifikusan gátolja a hajszál hossznövekedését szőrtüsző szervkultúrában**

(A) A hajfollikulusokat (csoportonként átlagosan 18) 5 napon keresztül a kapszaicin (Kapsz) különböző (1, 10, 30 µM) koncentrációjával kezeltük, míg kontrollként DMSO-s kezelést alkalmaztunk. (B) A hajszálak hossznövekedése DMSO (kontroll), 10 µM kapszaicin és 10 µM kapszaicin és 100 nM I-RTX-szel való 5 napos inkubációt követően. A hajszálakat naponta egyesével mértük, majd a hossznövekedést a kontroll hajszálak izolálás napján mért hosszára vonatkoztattuk. Az értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. \*: szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ). A kísérletet háromszori ismétléssel végeztük.

*A kapszaicin által kiváltott TRPV1-aktiváció gátolja a márix keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál*

A szervkultúrákban tenyésztett szőrtüszőket a kapszaicin-kezelés végeztével beágyaztuk, majd belőlük immunhisztokémiai célra metszeteket készítettünk. Mivel a TRPV1 aktiválását követően a szőrszál hossznövekedése jelentősen lecsökkent, kíváncsiak voltunk, hogy a szőrszál előállításában közvetetten résztvevő mártix keratinocyták egyes sejtfolymatai (proliferáció és apoptózis) változtak-e a kezelés hatására. A kontroll és kapszaicin-kezelt metszeteken a proliferáló és apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására

szolgáló Ki-67/TUNEL festéseket kivitelezve az Auberth-vonal alatt elhelyezkedő mátrix keratinocytákat vizsgáltuk (7. *ábra*).



**7. ábra: A TRPV1-aktiváció gátolja a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál**

A proliferáció (Ki-67, piros) és apoptózis (TUNEL, zöld) egyidejű jelölése kontroll (*A*) és 10  $\mu$ M kapszaicin-kezelt (*B*) tenyésztett hajfollikulusokon. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocyták. Eredeti nagyítás: 400x. (*C*) Az Auberth-vonal alatt található Ki-67- és TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya a teljes sejtszámra (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. Az értékeket átlag  $\pm$  SD formában tüntettük fel, illetve a Student-féle *t*-teszt segítségével értékeltük ki. \*: szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ). A kísérlet háromszori megismétlése hasonló eredményt adott.

A kontroll, vagyis a görbe szerint gyorsabban növekedő hajfollikulusok mátrix keratinocytáiban számos aktívan proliferáló sejtet találtunk, főként a dermális papillát közvetlenül határoló sejtrétegekben. A szőrtüsző bulbusában elhelyezkedő mátrixban emellett elhanyagolható számú apoptózizált keratinocytát mutattunk ki (7. *ábra, A*). A TRPV1 aktiválást követően (7. *ábra, B*) viszont megfordult a proliferáló és apoptotikus sejtek aránya: a sejtek kb. 10%-a TUNEL-pozitív volt, vagyis programozott sejthalálon ment keresztül, míg az osztódó sejtek aránya a kontrollhoz képest jelentősen lecsökkent (7. *ábra, C*). Mindez azt



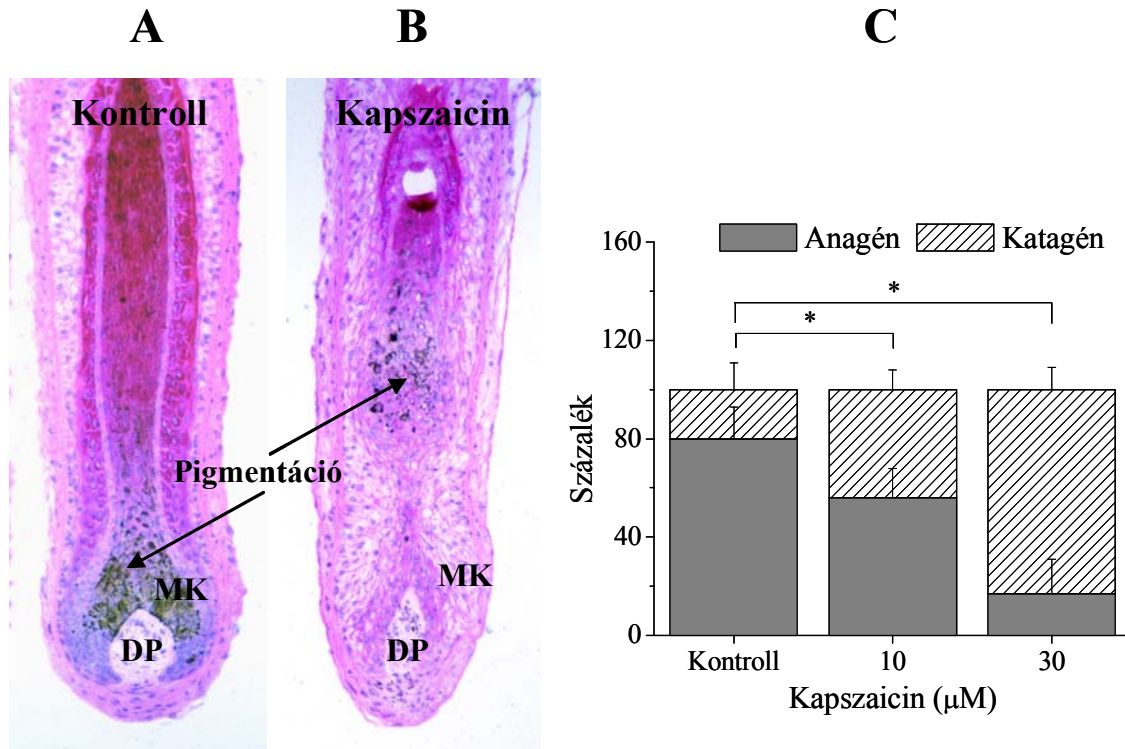
mutatja, hogy a TRPV1 aktiváció során bekövetkező gátolt hajszálnövekedést a mátrix keratinocyták apoptózisa és csökkent mértékű osztódása kíséri.

*A TRPV1 stimulálása anagén-katagén transzformációra jellemző morfológiai változásokat okoz*

A következő lépésben a szőrtüszőkből készült metszeteken hematoxilin-eozin festést készítve tanulmányoztuk a kapszaicin-kezelt és nem kezelt csoportok morfológiáját (**8. ábra**). A vizsgálat során anagén és katagén kategóriákat felállítva (Müller-Röver és mtsai, 2001; Stenn és Paus, 2001) a folliculusokat valamelyik csoportba besoroltuk, majd kifejeztük az anagén és katagén összes folliculusra vonatkoztatott arányát (**8. ábra, C**). Megállapítottuk, hogy a kontroll folliculusok nagy része az anagén VI stádiumban lévő szőrtüsző jellegzetes képét mutatta (**8. ábra, A**), míg a kapszaicin-kezelés eredményeként számos, a korai regressziós, vagyis katagén fázisra jellemző szövettani változás lépett fel (**8. ábra, B**). A TRPV1 aktiválás hatására a DP elvékonyodott, a dermális fibroblasztok lefelé vándoroltak, majd orsó alakú formát vettek fel. A mátrix keratinocyták rétege szintén elvékonyodott, a hajszál és a dermális papilla között így egy hídszerű sejtréteget alakult ki, a két kompartment ezáltal eltávolodott egymástól. Jellemző volt továbbá a pigmentáció jelentős csökkenése is a felhúzódott hajszálban.

Adataink statisztikai elemzése során kiderült, hogy míg a kontroll esetben a szőrtüszők kb. 80%-a anagén VI-os morfológiát mutatott, és csak a maradék kb. 20% volt a fenti morfológiai jegyekkel jellemezhető katagénben, addig a kapszaicin koncentrációjával párhuzamosan nőtt a katagén folliculusok aránya (**8. ábra, C**). A 10  $\mu$ M-os kapszaicin-kezelést követően az arány kb. 60-40%, míg a 30  $\mu$ M-os kapszaicin a folliculusok kb. 80%-ában indukált korai katagén regressziót.

A TRPV1-stimulációt követő morfológiai változásokat, vagyis az anagén-katagén indukciót támasztják alá a korábbiakban leírt, Ki-67/TUNEL festéssel kapott eredményeink is (7. ábra). Ennek megfelelően a katagén indukció a proliferáció és hossznövekedés gátlásával, valamint az apoptózis indukciójával járt együtt.

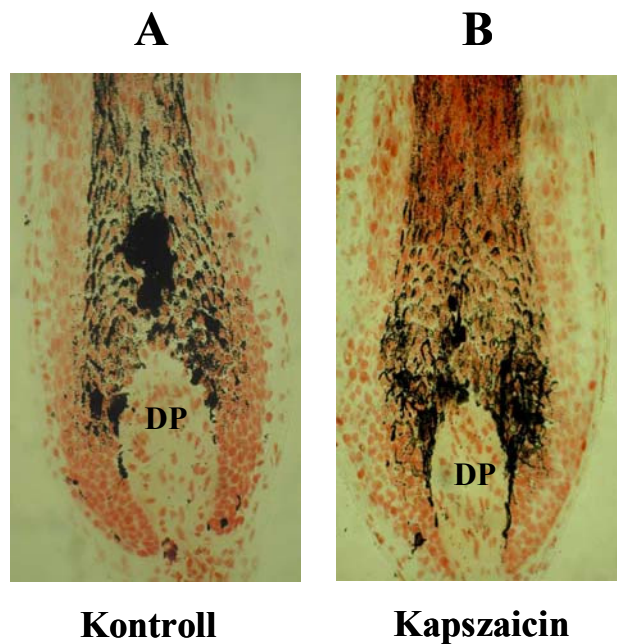


**8. ábra: A TRPV1-stimuláció katagén transzformációt indukál a tenyésztett szőrtüszőkben**

Izolált szőrtüszőket 5 napon keresztül 10 µM kapszaicinnal kezeltünk (B), majd a belőlük készült metszeteken hematoxin-eozin festést végezve meghatároztuk (C) az anagén illetve katagén százalékos arányát a kontroll folliculusokhoz (A) képest. Az anagén-katagén elkülönítése az irodalomban meghatározott kritériumok szerint történt (csökkent pigmentáció, elvékonyodott mátrix keratinocytá, MK és leszálló dermális papilla, DP réteg). Eredeti nagyítás: 100x. Az adatokat átlag ± SEM formában tüntettük fel. \*: szignifikáns eltérés ( $p < 0,05$ ).

Mínt hogy a kapszaicin-kezelést követően a szőrtüszőkben a korai katagén kialakulásával jelentős pigmentáció-csökkenést tapasztaltunk, szeretnénk kideríteni, hogy ez elsődlegesen a katagén-indukció, vagy a direkt TRPV1-stimuláció miatt következett-e be. Ennek érdekében egy újabb szervkultúrát indítottunk. A folliculusokat 30 µM kapszaicinnal kezeltük, majd naponta belőlük kb. 20-at beágyasztunk, metszünk, hematoxin-eozinnal megfestünk és vizsgáltuk a nulladik naphoz képest bekövetkező morfológiai változásokat.

Azt tapasztaltuk, hogy körülbelül a harmadik napon kezdenek megjelenni a katagén későbbi kialakulására utaló finom morfológiai változások. Ezért a két napig tenyésztett folliculusokból készült metszeteket használtuk további vizsgálatainkra, melyek még biztosan anagén VI-os fázisban vannak, és nem láthatók rajtuk a katagén transzformáció jegyei. A kiválasztott metszeteken ezután a melanin-szemcsék láthatóvá tételére a Fontana-Masson festést alkalmaztuk (**9. ábra**).



**9. ábra: A TRPV1-aktiválás közvetlenül nem befolyásolja a pigmentációt**

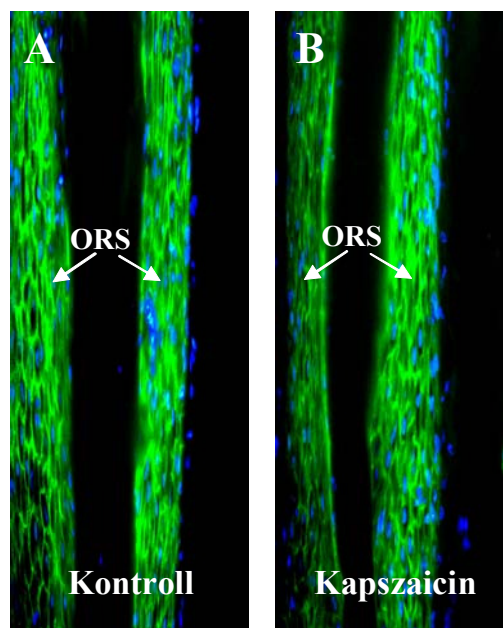
A TRPV1-aktivációt követően (**B**) nem változik meg szignifikánsan a Fontana-Masson eljárás segítségével kimutatott pigmentációs mintázat a tenyésztett, izolált folliculusokban a kontrolléhoz képest (**A**). Eredeti nagyítás: 100x. DP: dermális papilla

Összehasonlítottuk a kezeletlen (**9. ábra, A**) és két napos kapszaicin-kezelt (**9. ábra, B**) folliculusokban a feketére festődött melanin mennyiségét, és azt tapasztaltuk, hogy nincs szignifikáns eltérés a két csoport között. Ez arra enged következtetni, hogy a pigmentáció csökkenése inkább a katagén fázis kialakulásával párhuzamosan zajló, általában megfigyelhető morfológiai változásokra vezethető vissza, és nem a TRPV1-stimuláció elsődleges hatásaként jön létre. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is (ld. **5. ábra, G**),

miszerint a tenyésztett szőrtüszőkben a pigmentáció kialakításáért felelős melanocytákon nem tudunk TRPV1expressziót kimutatni.

*A TRPV1-aktiváció nem befolyásolja a differenciálódási marker filaggrin expresszióját*

A kapszaicin hatására bekövetkezett morfológiai változások és katagén kialakulása felvetette annak a lehetőségét is, hogy a TRPV1-aktiváció a keratinocytákban differenciálódási folyamatokat indíthat be. A differenciálódás során a keratinocyták génexpressziós mintázata megváltozik, mely folyamat során néhány molekula expressziója megnő. Ilyen pl. a filaggrin is, amit ezért a differenciálódási markerként tart számon az irodalom (Lenoir és mtsai, 1988).



**10. ábra: A TRPV1-aktiváció nem befolyásolja a differenciálódási marker filaggrin expresszióját**

A differenciálódási marker filaggrin immunfluoreszcens jelölése kontrol (A) és kapszaicin kezelt (B; 10  $\mu$ M, 3 nap) szőrtüsző külső gyökérhüvely keratinocytáiban (ORS) az istmus régióban. Eredeti nagyítás: 100x. A festések nem mutatnak szignifikáns különbséget a két csoport között (denzitometriás értékek a szövegben).

Ebben a kísérletben is azokat a follikulusokat használtuk, melyek még nem mutattak katagénre utaló morfológiai jegyeket, hiszen a katagén-transzformáció is együtt járhat a follikulus-epithelium differenciálódási folyamatainak megváltozásával. Kapszaicin kezelt és

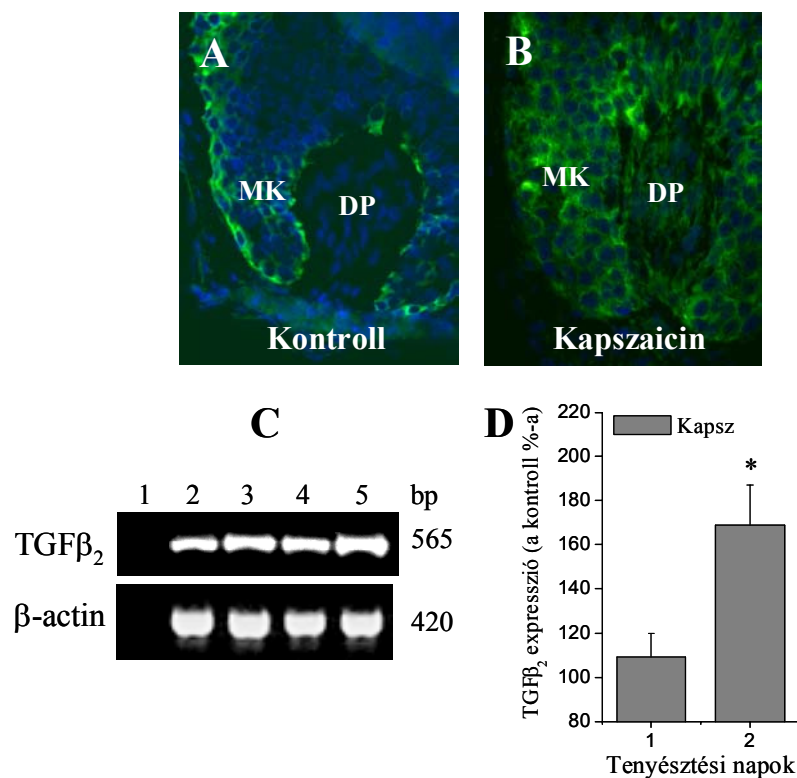
kontroll szőrtüszőkön elvégeztük a filaggrin immunfluoreszcens jelölését (**10. ábra, A, B**). Mindkét esetben hasonló volt a filaggrin expressziós mintázata; immunreaktivitást találtunk a terminálisan differenciálódott ORS keratinocytákon, az IRS keratinocyták minden rétegében, de nem festődtek a mártix keratinocyták aktívan proliferáló és még nem differenciálódott sejtjei. A filaggrin expresszió kvantitatív összehasonlítására az ORS keratinocyták területén mindkét csoportban azonos nagyságú területeket jelöltünk ki, majd elemeztük az ott talált festés színintenzitását. A denzitometriás adatok azt mutatták, hogy nincs szignifikáns eltérés a két csoport között. A kontroll folliculusok esetében a mért denzitometriás érték  $76,8 \pm 6,3$  a kezelést követően  $80,3 \pm 4,8$ -ra „változott” (átlag  $\pm$  SEM,  $n = 15$ ,  $p > 0,5$ ). Mindebből arra következtethetünk, hogy a TRPV1-aktiváció nem befolyásolja lényegesen a folliculáris epithelium differenciálódási folyamatait; a katagén indukció során bekövetkező morfológiai változások és a hossznövekedésben tapasztalt visszaesés valószínűleg inkább a keratinocyták proliferációjának gátlásán és közvetlen apoptózis-indukción alapulhat.

#### *A TGF $\beta_2$ jelátviteli útvonal részt vehet a hajnövekedést gátló TRPV1 szignalizációban*

A TGF $\beta_2$  a hajciklus negatív regulátoraként számon tartott molekula (Philpott és mtsai, 1994b; Foitzik és mtsai, 2000; Soma és mtsai, 2002); azaz gátolja a hossznövekedést az érett anagén VI folliculosokban *in vitro*, ami anagén-katagén transzformációval, illetve apoptózis-indukcióval jár. Mivel ezek a hatások igen hasonlóak azokhoz, amit mi a TRPV1-stimuláció során tapasztaltunk, felmerült az a lehetőség, hogy a TGF $\beta_2$  esetleg szerepet játszhat a TRPV1-aktiválás során tapasztalt jelenségek kialakulásában.

Rövid idejű kapszaicin kezelést követően ezért immunfluoreszcens technika segítségével megvizsgáltuk a TGF $\beta_2$  kifejeződését a kontroll folliculusokhoz viszonyítva (**11. ábra**). A kezeletlen folliculusokban (**11. ábra, A**) a TGF $\beta_2$  fehérje főleg az ORS

keratinocytákra lokalizálódott, ugyanakkor elhanyagolható immunfluoreszcens expresszió volt tapasztalható a mátrix keratinocyták régiójában (a DP fibroblasztjain nem volt immunjel).



**11. ábra: A TRPV1-stimuláció hatására megnő a TGFβ<sub>2</sub> expressziós szintje *in vitro***

A TGFβ<sub>2</sub> immunfluoreszcens kimutatása kontroll (**A**) és kapszaicin-kezelt (**B**; 10 μM, 3 nap) szőrtüszőn. Megemelkedett TGFβ<sub>2</sub> expresszió látható a kapszaicin-kezelt folliculusok mátrix keratinocytáiban (MK) és dermális papillájában (DP). A kék fluoreszcens szín a DAPI-val történt magfestést jelöli. Eredeti nagyítás: 400x. (**C**) A TGFβ<sub>2</sub> mRNS szintű összehasonlítása kontroll és kezelt folliculusokban RT-PCR módszerrel. Belső kontrollként β-aktint használtunk. Sávok: 1: cDNS nélküli reakció (negatív kontroll), 2: 1 napos kontroll, 3: 1 napos kapszaicin kezelt (10 μM), 4: 2 napos kontroll, 5: 2 napos kapszaicin-kezelt minta. Bp: bázispár. (**D**) Az mRNS mennyiségét a β-aktinra vonatkoztatva denzitometriásan elemeztük. A kapszaicin-kezelt csoportoknál kapott értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel. \*: szignifikáns eltérés (p < 0,05).

A TRPV1-stimulációt követően (**11. ábra, B**) azonban jelentősen megváltozott a TGFβ<sub>2</sub> szöveti eloszlása. Igen aktív immunreaktivitást tapasztaltunk az említett ORS keratinocytákon kívül a bulbus mátrix keratinocytáin is, sőt a festések nagy részében a DP fibroblasztjain is megjelent a TGFβ<sub>2</sub>-fehérje. A TGFβ<sub>2</sub> expresszió intenzitását ismét denzitometriásan hasonlítottuk össze a két csoportban, ami azt mutatta, hogy a kezelt folliculusok szignifikánsan (p < 0,001) intenzívebb, 132,8 ± 13%-kal nagyobb expresszióval jellemezhetők (átlag ± SEM, n = 15). Hasonló eredményt kaptunk a TGFβ<sub>2</sub> mRNS szintű

összehasonlításakor is (**11. ábra, C**). A két napos kapszaicin-kezelést követően szignifikáns módon megemelkedett a TGF $\beta$ <sub>2</sub>-mRNS szintje a kontroll, illetve az egy napos kapszaicin-kezelés értékeihez képest is (**11. ábra, D**).

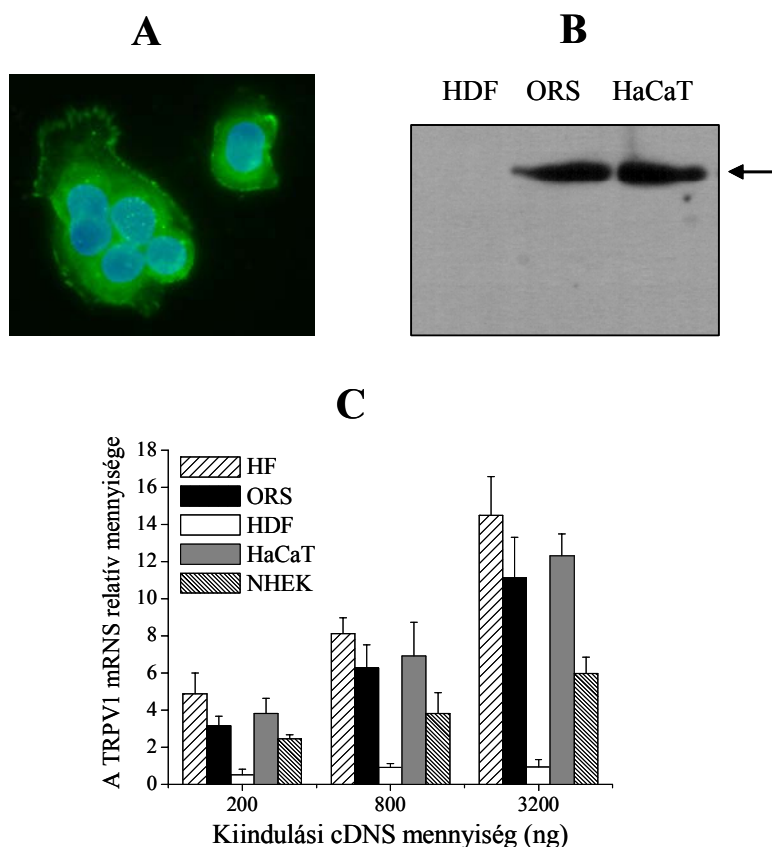
Következő szervkultúránkban a szórtüszőket a kapszaicinnal együtt TGF $\beta$ <sub>2</sub>-ellenes neutralizáló antitesttel inkubáltuk annak kiderítésére, hogy mennyiben felelős a TGF $\beta$ <sub>2</sub> a kapszaicin által kiváltott hatások közvetítésében. Növekedési görbét készítve azt tapasztaltuk, hogy a neutralizáló antitesttel végzett kezelés csak részben volt képes kivédeni a kapszaicin által kiváltott hossznövekedést gátló hatást ( $35,2 \pm 6\%$ -os csökkenés a kapszaicin gátló hatásában, átlag  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) (ábrán nem mutatva) Feltételezhető tehát, hogy az általunk megfigyelt jelenségek egy része a TGF $\beta$ <sub>2</sub> felszabadításának közvetlen következménye lehet, míg más, ettől eltérő szabályozási utakkal is számolnunk kell (lásd alább).

#### *A TRPV1 az ORS keratinocytákban is megtalálható*

Eddigi funkcionális kísérleteink során izolált, tenyésztett szórtüszőket használtunk kísérleti modellként, mely segítségével a TRPV1-aktiváció hatásait vizsgáltuk a miniszerv különböző élettani folyamataira *in vitro*. A továbbiakban a TRPV1-stimuláció celluláris hatásait kívántuk tanulmányozni, részben eddigi eredményeink megerősítésére, részben további, főleg a kapszaicin hatásmechanizmusával kapcsolatos kérdések tisztázására. Sejtszintű kísérleteinket az ORS keratinocytákból készített primer kultúrán végeztük, párhuzamosan az immortalizált, epidermális eredetű, TRPV1-et bizonyítottan (Southall és mtsai, 2003) expresszáló HaCaT keratinocytákkal.

Mind immunhisztokémia, mind Western blot segítségével sikerült kimutatnunk a TRPV1-t tenyésztett ORS sejteken (**12. ábra, A, B**). A Western blot során megállapítottuk, hogy a pozitív kontrollként használt HaCaT sejtekkel összevethető mennyiségben fejeződik ki

a TRPV1 az ORS keratinocytákban, míg a humán dermális fibroblasztok esetében nem találtak meg a TRPV1 jelenlétére utaló immunsávot. Kapott eredményeink ellenőrzésére, illetve a receptor mRNS szintű kimutatására ismét Q-PCR-t végeztünk (12. ábra, C). A reakciót a már korábban is használt humán hajfolliklus, normál humán epidermális és HaCaT keratinocyta, valamint dermális fibroblaszt mintákkal párhuzamosan futtattuk. A Western blot kísérletek során tapsttaltakkal megegyezően kimutattuk, hogy a follikulussal és keratinocyta tenyészetekkel összehasonlítható mennyiségben fejeződik ki a TRPV1-mRNS az ORS homogenizátumban (a növekvő cDNS- mennyiségnek megfelelően nőtt a felszorzott PCR termékek mennyisége).



### 12. ábra: A TRPV1 kifejeződik a tenyésztett ORS keratinocytákban

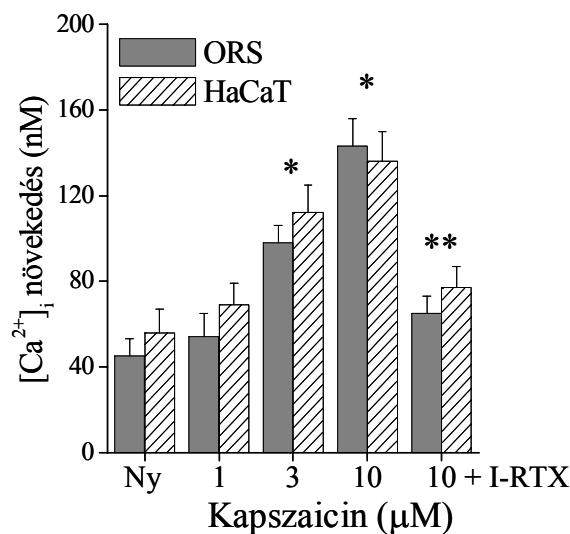
(A) TRPV1-ir (zölddel) tenyésztett ORS keratinocytákban. A magok (kékkel) festése DAPI-val történt. Eredeti nagyítás. 630x. (B) A TRPV1 Western blottal történő kimutatása ORS és HaCaT keratinocyták, valamint humán dermális fibroblasztok (HDF) homogenizátumából. A nyíl a fehérjesávok becsült molekulásúlyát jelöli (kb. 90 kDa). (C) A TRPV1 expresszió Q-PCR-ral történő vizsgálata humán hajfollikulusban és tenyésztett sejtekben. Az expresszió értékeit a GAPDH mennyiségére normáltuk. NHEK: normál humán epidermális keratinocyták, HF: szőrtüsző. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM formában adtuk meg, a mérések háromszori ismétlésével.



A tenyésztett sejtek esetében megfigyelt eredményeink tehát összecsengenek mind a bőrben, mind a tenyésztett szőrtüszőkkel végzett fent bemutatott kísérletek adataival, hiszen a keratinocyták különféle típusaira, illetve rétegeire jellemző volt a TRPV1 expresszió, míg a fibroblasztok nem fejezték azt ki.

*A TRPV1, a HaCaT keratinocytákhoz hasonlóan az ORS keratinocytákban is funkcionális  $Ca^{2+}$ -csatornaként működik*

A TRPV1 számos neuronális és non-neuronális sejten, többek között a HaCaT keratinocytákon is funkcionális  $Ca^{2+}$ -permeábilis csatornaként működik (Inoue és mtsai, 2002). Ezért további kísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen hatással van a TRPV1-aktiváció az ORS sejtek  $Ca^{2+}$ -homeosztázisára. Az ORS keratinocyták mellett méréseinket pozitív kontrollként a HaCaT-tenyészetben is elvégeztük (**13. ábra**).



**13. ábra: A TRPV1 aktiválása az  $[Ca^{2+}]_i$  növekedését eredményezi az ORS sejtekben**

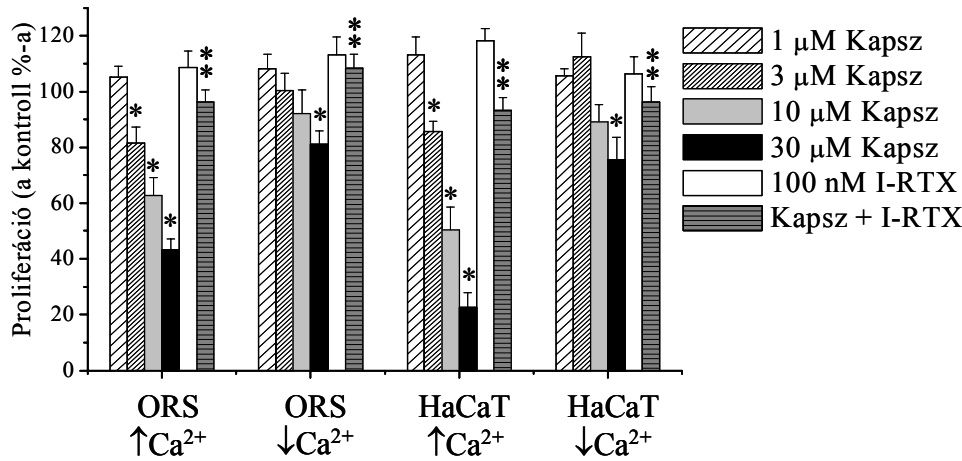
A fura 2-AM-töltött sejteket kapszaicin különböző koncentrációival (1, 3, 10 μM) kezeltük illetve 10 μM kapszaicin és 100 nM I-RTX együttes kezelését alkalmaztuk 1,8 mM  $Ca^{2+}$ -tartalmú Tyrode-oldatban, majd meghatároztuk az  $[Ca^{2+}]_i$ -t. Az adatok átlag ± SEM formában láthatók. Átlagosan 15-20 sejtet mértünk minden csoport esetében. \*: szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség a nem kezelt és kapszaicin-kezelt sejtek között, \*\*: szignifikáns különbség a kapszaicin+I-RTX-kezelt és 10 μM kapszaicin-kezelt sejtek  $[Ca^{2+}]_i$  szintje között.

A fedőlemezre szélesztett keratinocytákat folyamatosan 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú Tyrode oldattal mostuk, majd a sejteket 1, 3 és 10  $\mu\text{M}$  kapszaicinnal kezeltük, végül mértük a kapszaicin hozzáadását követő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változást. Megállapítottuk, hogy a kapszaicin mind az ORS, mind a HaCaT keratinocytákban hasonló módon változtatta meg a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t: a növekvő mennyiségű kapszaicinnal párhuzamosan nőtt az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mennyisége. Kimutattuk továbbá, hogy a TRPV1-antagonista I-RTX mindkét sejtípus esetében megakadályozta a 10  $\mu\text{M}$  kapszaicin által okozott  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedést, ami ismét a TRPV1 direkt, specifikus aktiválódására utal. Fontos megjegyezni, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Tyrode oldatban végzett méréseink során egyik kapszaicin koncentráció sem váltott ki  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változást (nem mutatva), ami ugyancsak a TRPV1-on keresztüli specifikus  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásra utal.

*A TRPV1-aktiváció gátolja a proliferációt és apoptózist indukál tenyésztett ORS és HaCaT keratinocytákon*

A szőrtüsző szervkultúrán végzett kísérleteink során arról számoltunk be, hogy a TRPV1-stimuláció a regressziós fázis jellegzetes morfológiai jegyeinek megjelenésével párhuzamosan a szőrtüsző mártix keratinocytáiban, illetve az ORS rétegben apoptózist indukált és gátolta a sejtproliferációt. Ezen sejt folyamatok vizsgálatát lehetőségünk volt tenyésztett ORS és HaCaT keratinocytákon is elvégezni, arra a kérdésre fókuszálva, hogy milyen mechanizmuson keresztül valósulhatnak meg ezek a hatások.

Az ORS és HaCaT keratinocyták proliferációjának BrdU ELISA módszerrel való nyomonkövetése során kiderült, hogy a kapszaicin (a korábbiakban tapasztaltakkal összhangban) szignifikánsan, dózisfüggően csökkentette az osztódó ORS és HaCaT keratinocyták számát 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú SFM oldatban (**14. ábra**). Az eddigiekhez hasonlóan megállapítottuk továbbá, hogy a TRPV1 antagonistá I-RTX hatásosan kivédte a kapszaicin proliferációt gátló hatását.



#### 14. ábra: A TRPV1-stimuláció $[Ca^{2+}]_e$ -függően gátolja a sejtproliferációt

A HaCaT és ORS keratinocytákat 96-lyukú lemezen négyszeres ismétléssel tenyésztettük és a kapszaicin különböző koncentrációival (1, 3, 10, 30  $\mu$ M) illetve 30  $\mu$ M kapszaicinnal és 100 nM iodo-RTX-szel (I-RTX) együttesen kezeltük 72 órán keresztül. Ugyanazon kísérletet magas (2 mM) és alacsony (0,4 mM)  $Ca^{2+}$  jelenlétében is elvégeztük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában fejeztük ki a kezeltlen sejtek értékeinek százalékában. \*: szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbség a nem kezelt és kapszaicin-kezelt sejtek között, \*\*: szignifikáns különbség a kapszaicin+I-RTX-kezelt és 30  $\mu$ M kapszaicin-kezelt sejtek értékei között.

Ugyanezt a kísérletet alacsony, 0,4 mM  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban is elvégeztük (14. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az alacsony  $Ca^{2+}$ -tartalmú oldatban a kapszaicin proliferációt gátló hatása kevésbé érvényesül. Azaz, míg a magasabb  $[Ca^{2+}]_e$  jelenlétében már a kapszaicin 3  $\mu$ M-os koncentrációja is szignifikáns eltérést okozott, addig alacsony  $[Ca^{2+}]_e$  mellett ugyanezt a hatást csak tízszeres agonista koncentráció alkalmazásával tudtuk elérni mind ORS, mind HaCaT keratinocyták esetében. Ezen eredményekből levonható a következtetés, hogy az ORS és HaCaT keratinocytákban a VR1-stimulációt követő proliferáció csökkenés valószínűleg az (extracelluláris eredetű)  $[Ca^{2+}]_i$  növekedése által valósul meg. Feltételezhető továbbá, hogy, és ezen mechanizmus szerepet játszik a hajfollikulusokban tapasztalt jelenségek kialakulásában is.

Az ORS keratinocyták proliferációs és apoptotikus markereinek szélesebb körű tanulmányozására szolgált az áramlási citometriás mérésorozatunk is. A magas kalciumtartalmú SFM-ben tenyésztett ORS keratinocytákat 2 napon át 10  $\mu$ M kapszaicinnal kezeltük, majd elvégeztük a citometriás mérést. A proliferációs marker Ki-67 és PCNA

kapszaicin- kezelést követő szignifikáns csökkenése (**4. táblázat**) eddigi eredményeinket támasztja alá, miszerint a TRPV1 aktiváció ezen sejtekben a sejtosztódás ütemének csökkenésével jár. Ezzel párhuzamosan az Annexin-V apoptózis marker szintje viszont megemelkedett (**4. táblázat**), ami szintén összhangban van a folliculus mátrix keratinocytáiban megfigyelt apoptotikus folyamattal (**7. ábra**).

#### 4. táblázat: A kapszaicin-kezelés hatása az ORS keratinocyták különböző markereire

Marker	A kapszaicin hatása a kontroll %-ában
<i>Proliferáció</i>	
<b>Ki-67</b>	73,8 ± 7* (↓)
<b>PCNA</b>	71,6 ± 9*(↓)
<i>Apoptózis</i>	
<b>Annexin-V</b>	143 ± 8* (↑)
<i>Differenciálódás</i>	
CK-14	94,2 ± 11
CK-17	98,3 ± 6
Filaggrin	102,3 ± 8
Involucrin	95,1 ± 13
<i>A hajnövekedést elősegítő faktorok</i>	
<b>HGF</b>	63,5 ± 81* (↓)
<b>IGF-I</b>	53 ± 9* (↓)
<b>SCF</b>	74,9 ± 6* (↓)
<i>A hajnövekedést gátló faktorok</i>	
FGF-5	95 ± 5
IFN $\gamma$	91,3 ± 9
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	143,7 ± 5* (↑)
<b>TGF<math>\beta_2</math></b>	128,6 ± 6* (↑)
TNF $\alpha$	98,6 ± 4

Az ORS keratinocytákat 2 napon keresztül 10  $\mu$ M kapszaicinnal kezeltünk magas Ca<sup>2+</sup>-tartalmú oldatban, majd az általunk kiválasztott markerek expresszióját áramlási citometria segítségével vizsgáltuk. A nem kezelt kontroll folliculusokban mért expressziós szinteket 100%-nak tekintve az adatokat átlag  $\pm$ SEM formátumban adtuk meg. \*-gal jelöltük a szignifikáns ( $p < 0.05$ ) változásokat.

Amint az a **4. táblázatban** is látható, a TRPV1 aktiválása áramlási citometriás vizsgálataink során sem okozott szignifikáns eltérést a cytokeratin-14, -17, filaggrin és

involucrin differenciálódási markerek expressziójában. Ez alátámasztani látszik azon korábban részletezett elképzelésünket, hogy a TRPV1-aktiválás valószínűleg direkt apoptózis-indukciót okoz, miközben nem módosítja a szőrtüszők differenciálódási programját.

*A TRPV1-aktiváció megváltoztatja a hajciklus szabályozó molekuláinak kifejeződését tenyésztett ORS keratinocytákban*

További áramlásos citometriás mérést végezve utolsó lépésként azokat a citokineket és növekedési faktorokat vizsgáltuk, melyeket a hajciklus pozitív vagy negatív regulátoraiként ismerünk (**4. táblázat**). Megállapítottuk, hogy a kapszaicin kezelést követően szignifikánsan csökkent a pozitív szabályozó HGF, IGF-I és SCF citokinek kifejeződése, míg a negatív regulátor IL-1 $\beta$  és a már említett TGF $\beta$ <sub>2</sub> megnövekedett mennyiségben volt kimutatható. Az általunk kiválasztott további molekulák (FGF-5, IFN $\gamma$ , és TNF $\alpha$ ) expressziójára a TRPV1 aktiváció nem gyakorolt szignifikáns hatást.

## MEGBESZÉLÉS

### *A TRPV1 kifejeződése humán bőrben és a bőr függelékeiben*

Az utóbbi években számos kutatócsoport számolt be arról, hogy a vanilloid receptor TRPV1 funkcionális formában kifejeződik a humán bőr epidermiszében, illetve az epidermális eredetű HaCaT sejtvonalban (Denda és mtsai, 2001; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003). Ezen megfigyelések sarkalltak minket arra, hogy megvizsgáljuk, hogy ez az expresszió csupán az epidermiszre korlátozódik-e, vagy előfordul a bőr más sejttypusaiban is.

Erre a kérdésre keresve a választ, vizsgálataink első részében a TRPV1-et sikerült kimutatnunk a már említett epidermális keratinocytákban (**4. ábra**), az eddig leírt irodalmi adatokat azzal kiegészítve, hogy a TRPV1-immunreaktivitás főleg a bazális, vagyis proliferáló keratinocytákban volt erős, a differenciálódással (vagyis a felszínes sejtrétegek felé haladva) a TRPV1 mennyisége csökkent (**4. ábra, A**). Az irodalomban elsőként mutattuk ki továbbá, hogy az epidermiszben a keratinocyták mellett a Langerhans-sejtek is kifejezik a TRPV1 antigént (**4. ábra, B**). A dermiszben elhelyezkedő szenzoros neuronokon kívül ugyanakkor számos más, nem-neuronális elem is megtaláltuk a receptort; úgymint a faggyúmirigyekben, verejtékmirigyek epitheliumán, az erek endotheliumában és simaizom sejtjeiben, a dermális simaizom kötegekben, valamint a dermális hízósejteken (**4. ábra, C-F**). A bőr epidermális keratinocytáihoz hasonlóan a szőrtüsző (mind a bőrben *in situ*, mind a szervtenyészetekben) különféle keratinocytáiban is detektálható volt a receptor (**5. ábra**): mind az ORS, mind az IRS, valamint a mátrix keratinocyták is kifejezték a TRPV1-et, szemben a fibroblasztokkal (CTS és DP) és melanocytákkal. Hasonló megfigyelésekről számolt be Ständer (Ständer és mtsai, 2004) tőlünk független munkájában. Fontos megjegyezni, hogy a mátrix, valamint gyökérhüvely keratinocyták esetében a TRPV1 expressziós mintázata szignifikáns módon megváltozott (megemelkedett) a folliculusok INF- $\gamma$

indukálta katagén transzformációját követően (**5. ábra, C-F**), mely arra utalhat, hogy a szőrtüszőben megfigyelhető ciklikus változások jelentős mértékben képesek a TRPV1 expressziójának szabályozására.

Eredményeink azt mutatják tehát, hogy a TRPV1 a bőr számos, akár eltérő eredetű és működésű sejtjén is jelen van. Ezzel tovább bővül a TRPV1-et expresszáló nem neuronális jellegű szövetek száma, hasonlóan más olyan receptorokhoz (pl. kolinerg, tachykinin, glutamát és kannabinoid receptorok), amelyeknek korábban csak idegrendszeri struktúrákban tulajdonítottak szerepet (Genever és mtsai, 1999; Nguyen és mtsai, 2001; Kanda és mtsai, 2002; Casanova és mtsai, 2003).

#### *A TRPV1 funkcionális szerepe a szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában*

A TRPV1 ilyen széleskörű kifejeződése a bőrben; az eltérő differenciáltsági fokú keratinocyták különböző expressziós mintázata; valamint a folliculusok katagén transzformációját követően a TRPV1 megnövekedett mértékű kifejeződése rögtön fölvetette a következő kérdést: mi lehet a receptor szerepe ebben a rendszerben?

Szőrtüsző szervkultúrát használva, a folliculusokat a TRPV1 agonista kapszaicinnal kezelve azt tapasztaltuk, hogy a TRPV1 aktiválása dóziszfüggő módon meggátolta a hajszál hossznövekedését (**6. ábra**). Ez a hossznövekedést gátló hatás kivédhető volt a TRPV1-antagonista I-RTX-nal, ami a jelenség specifikus mivoltát erősítette. Ezzel párhuzamosan morfológiai vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a hossznövekedés csökkenése együtt járt a korai katagén stádiumhoz hasonló jegyek kialakulásával (**7. ábra**). Vagyis a hajszál képződésének lelassulását feltehetőleg egy olyan komplex folyamat kísérte, amely a szőrtüsző számos kompartmentjére kiterjedő változásokra vezethetők vissza. Mint arról már számos szerző beszámolt, a katagén létrejöttét a főleg keratinocytákra és melanocytákra kiterjedő programozott sejtelhalás kíséri (Lindner és mtsai, 1997; Tobin és mtsai, 1998; Müller-Röver

és mtsai, 1999, Tobin és Paus, 2001). Hasonló jelenséget tapasztaltunk mi is kísérleteink során; vagyis a kapszaicin-kezelést követően a mátrix keratinocytákban számos TUNEL-pozitív, azaz apoptotizált sejtet detektáltunk, míg a proliferáló (Ki-67 pozitív) sejtek száma jelentősen lecsökkent (**7. ábra**). Ezen eredményünk összhangban van más kutatócsoportok által leírt megfigyelésekkel, miszerint a TRPV1 aktivációja *in vitro* apoptózis létrejöttét eredményezi számos sejttypusban, például glia sejtekben (Bíró és mtsai, 1998a), timocitákon (Amantini és mtsai, 2004), valamint a légutak (Veronesi és mtsai, 1999; Agopyan és mtsai, 2004) és az emlő epithelialis sejtjeiben (Kang és mtsai, 2003).

A kísérleteinkben tapasztalt hossznövekedés gátlása, valamint a katagén kialakulása, melyet a mátrix keratinocyták osztódási ütemének csökkenése és apoptózisa kísért, nagy meglepetésünkre nem járt együtt a filaggrin-expresszió által jelölt terminális differenciálódással, hiszen nem találtunk eltérést a kontroll és kapszaicin-kezelt szőrtüszők differenciálódási markerének expressziós mintázatának intenzitásában (**10. ábra**) (lásd alább). Eredményeink alapján ugyanakkor úgy tűnt, hogy összefüggés lehet a hajciklust negatívan szabályozó TGF $\beta_2$  és a TRPV1 jelátviteli útvonala között (**11. ábra**). A kapszaicin-kezelt folliculusok esetében ugyanis igen jelentős TGF $\beta_2$  expresszió-növekedést tapasztaltunk mind fehérje, mind mRNS szintjén. Mivel azonban a TGF $\beta_2$ -t neutralizáló antitest a kapszaicin növekedést gátló hatását csak részlegesen védte ki, azt kell feltételeznünk, hogy a TGF $\beta_2$  bár nagy valószínűséggel szerepet játszik a TRPV1 hatásainak közvetítésében, más jelátviteli útvonalak befolyásával is számolnunk kell. Mindazonáltal az irodalomban ez az első olyan megfigyelés, mely a TGF $\beta_2$  és a TRPV1 jelátviteli útvonalának konvergenciáját mutatja be. Ehhez hasonló, de más faktorok termelődését érintő összefüggésekről korábban már többen is beszámoltak; a TRPV1 aktivációjának hatására citokinek és más növekedést befolyásoló molekulák (interleukinek, prosztaglandinok) szabadulnak fel például hízósejtekből (Bíró és



mtsai, 1998b), bronchialis epitheliumból (Veronesi és mtsai, 1999), illetve keratinocytákból (Southall és mtsai, 2003).

Ezen megfigyelésünket erősítették a tenyésztett ORS keratinocytákkal kapott eredményeink is. Megállapítottuk, hogy az ORS sejtek kapszaicinnal való kezelése megváltoztatta számos, a hajciklus szabályozásában fontos szabályozó szerepet betöltő citokin és növekedési faktor kifejeződésének intenzitását (**4. táblázat**). Szignifikánsan csökkent a pozitív szabályozó HGF, IGF-I és SCF faktorok termelése, míg a negatív regulátor IL-1 $\beta$  és a már említett TGF $\beta$ <sub>2</sub> expressziója szignifikánsan megnőtt. Úgy tűnik tehát, hogy a TRPV1 aktivációja beavatkozik az ORS keratinocyták, így a hajfollikulusok citokinjeinek és növekedési faktorainak termelésébe, vagyis a TRPV1 a növekedés és fejlődés kulcsmolekulái expressziójának módosítása, valamint az apoptózis és proliferáció szabályozásán keresztül a szőrtüsző komplex biológiai folyamatainak is központi irányítója lehet.

Ezen hipotézist, miszerint a TRPV1 szignalizáció számos, korábban nem elemzett celluláris mechanizmust is befolyásol, további (egyelőre csak előzetes eredményként értelmezhető) adataink is alátámasztani látszanak. MicroArray alkalmazásakor – mely kísérletekben 1300, a dermatológiai kutatások során jelentős relevanciával bíró gén expresszióját vizsgáltuk – kimutattuk, hogy kapszaicin alkalmazása (szőrtüsző szervkultúra, 10  $\mu$ M kapszaicin, 2 napon keresztül) jelentősen megemelte a szőrtüsző növekedését gátló IGF-I binding protein-3 (Hembree és mtsai, 1999), a growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1/placental TGF $\beta$  (Welsh és mtsai, 2003), valamint az activin  $\beta$ A (Nakamura és mtsai, 2003) gének expresszióját. A TRPV1-aktiváció ugyanakkor nagymértékben lecsökkentette a matrix GLA-protein precursor (MGP) gén szintjét, melyről korábban bebizonyosodott, hogy a szőrtüszőben a bone morphogenic protein-2/TGF $\beta$  jelátviteli folyamatsor inhibitoraként működik (Nakamura és mtsai, 2003). Habár ezen kezdeti adataink további megerősítést (ismétlések, Q-PCR analízis) igényelnek, egyértelműen

rámutatnak a TRPV1-kapcsolt jelátviteli folyamatok sokkal széleskörűbb vizsgálatának szükségességére.

Kísérleteink során kitértünk annak tanulmányozására is, hogy a TRPV1 szerepet játszhat-e a szőrtüsző pigmentációs folyamatainak szabályozásában (**9. ábra**). Az öt napos kapszaicin-kezelést követően a katagén létrejöttével párhuzamosan ugyanis azt tapasztaltuk, hogy a pigmentációs mintázat is jelentősen megváltozott a kontrolléhoz képest. Mivel tudjuk, hogy a melaninképzés csökkenése és a melanocyták apoptózisa a katagén kialakulásával párhuzamosan következnek be (Müller-Röver és mtsai, 2001), kíváncsiak voltunk, hogy a pigmentáció csökkenése elsődlegesen a TRPV1 aktivációnak vagy a katagént kísérő folyamatoknak tudható-e be. A melanintartalmat ezért olyan kapszaicin-kezelt folliculusokon is meghatároztuk, amelyek még nem szenvedtek anagén-katagén transzformációt, de a TRPV1-aktiváció néhány napon át már kifejthette hatását. Ekkor nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll és kezelt folliculusok közt, vagyis a TRPV1 feltételezhetően nem játszik közvetlen szerepet a pigmentképzés szabályozásában. Ezt a tényt látszik alátámasztani korábbi megfigyelésünk is, miszerint a bőr epidermális és folliculáris melanocytái nem expresszálják a TRPV1-et (**4. és 5. ábrák**).

Kísérleteink során a TRPV1 sejtszintű szerepét is vizsgáltuk, tenyésztett ORS, illetve az epidermális immortalizált HaCaT keratinocytákat alkalmazva kísérleti modellként. A TRPV1 fehérjét, valamint a specifikus mRNS szakaszt sikerrel mutattuk ki tenyésztett ORS keratinocytákban, a pozitív kontrollként használt HaCaT keratinocytákéval összevethető mennyiségben; nem találtunk ugyanakkor immunreaktivitást a tenyésztett fibroblasztokon (**12. ábra**). Ezen kifejeződési mintázat jó összhangban volt a teljes bőrben, illetve szőrtüszőben látottakkal, ahol a különböző lokalizációjú keratinocytákban megtaláltuk a TRPV1-et (**4. és 5. ábrák**), míg a fibroblasztok különféle populációi konzekvensen negatívak voltak (**4. és 5. ábrák**).

A TRPV1 számos neuronális és non-neuronális sejten, többek között a HaCaT keratinocytákon is, funkcionális  $\text{Ca}^{2+}$ -permeábilis csatornaként működik (Caterina és mtsai, 1997; Bíró és mtsai, 1988a és 1998b; Szallasi és Blumberg, 1999; Veronesi és mtsai, 1999; Inoue és mtsai, 2002; Southall és mtsai, 2003; Karai és mtsai, 2004;). HaCaT keratinocytákat használva pozitív kontrollként megállapítottuk, hogy az ORS keratinocytákon a kapszaicin koncentrációjával egyenesen arányosan nőtt az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mennyisége, sugallva, hogy a kapszaicin aktiválja a TRPV1-et, aminek  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás a következménye (**13. ábra**). Ezt látszik alátámasztani az a megfigyelés is, hogy a kalciummentes térben történő mérések, illetve a TRPV1 antagonistá I-RTX alkalmazása során nem tapasztaltunk változást az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban. Megállapíthatjuk tehát, hogy az ORS keratinocyták is a receptor funkcionális formáját fejezik ki.

Milyen szerepet tölthet be a TRPV1 aktiválódása, illetve a következményes  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -növekedés az ORS keratinocyták sejtfolyamataiban? A proliferációs folyamatokat nyomon követve azt tapasztaltuk, hogy a kapszaicin-kezelés igen hatékonyan csökkentette a proliferáló ORS, valamint HaCaT keratinocyták számát (**14. ábra**). Ugyanezen kísérletet csökkentett kalcium-tartalmú oldatban is elvégezve nem tudtuk reprodukálni az előzőekben tapasztaltakat, vagyis arra következtethetünk, hogy közvetlen összefüggés lehet a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedése és a TRPV1 agonista proliferációt gátló hatása közt. Ezzel feltehetően betekintést nyertünk a TRPV1 aktiváció lehetséges celluláris hatásmechanizmusába a HaCaT és ORS keratinocyták proliferációja során, mely szabályozó kapcsolat a follikulusok biológiai folyamataiban is fontos szerephez juthat.

Érdekes megfigyelésünknek adódott ugyanakkor, hogy – hasonlóan a follikulus szervkultúrában végzett kísérleteink eredményeihez (**10. ábra**) – a TRPV1 aktiváció (és a következményesen kialakuló kalciumbeáramlás) nem befolyásolta tenyésztett ORS keratinocyták terminális differenciálódási folyamatait (**4. táblázat**), melyről korábban

bebizonyosodott, hogy jelentős kalciumfüggést mutat (Bikle és mtsai, 1996). Ezen jelenséget az alábbiakkal magyarázhatjuk: (1) a TRPV1 aktivációt követő apoptózis indukciója, a katagén átlakulás beindítása, valamint a proliferáció gátlása hamarabb bekövetkezett, mint a differenciálódási markerek kifejeződésében megfigyelhető esetleges változások; (2) a szórtüsző szervkultúra, valamint az ORS keratinocita tenyészetek fentartásához használt oldatok (szükségszerűen) igen magas kalciumtartalma (közel 2 mM) már önmagában jelentős mértékben megemelte a differenciálódási markerek expresszióját (a szórtüsző szervkultúrában, a filaggrin esetében lásd **10. ábra**), melyet a TRPV1 aktivációja által kialakított  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés tovább már nem volt képes növelni sem a follikulus szervkultúrában, sem tenyésztett ORS keratinocytákon (**10. ábra és 4. táblázat**); (3) a kapszaicin hatása a különféle sejtfolyamatokra jelentős dózis- és sejtfüggést mutat; azaz a TRPV1 aktivációja differenciált módon befolyásolja például a citokintermelést és -felszabadítást (keratinocytákban az IL-8, míg hízósejtekben az IL-4 felszabadítás fokozása) (Bíró és mtsai, 1998b; Suothall és mtsai, 2003), a sejthalált (kis koncentrációban az apoptózis indukciója timocitákon; az apoptózis indukciója glia sejteken, valamint a légútak és az emlő epithelialis sejtjeiben; ugyanakkor nekrotikus sejthalál beindítása neuronokon és nagy koncentrációban timocitákon) (Bíró és mtsai, 1998a; Szallasi és Blumberg, 1999; Veronesi és mtsai, 1999; Kang és mtsai, 2003; Agopyan és mtsai, 2004; Amantini és mtsai, 2004), valamint, ahogy saját megfigyeléseink is mutatják, a differenciálódást (jelentős hatás a differenciálódásra glia sejteken) (Bíró és mtsai, 1998a); (4) végezetül nem kizárt, hogy a kapszaicin-kezelés hatására kialakuló, a szórtüsző folyamatait szabályozó gének expressziós mintázatában bekövetkező komplex változások (**4. táblázat**) eredőjeként nem szükségszerűen indul be, illetve fejeződik be minden egyes, a TRPV1-aktiváció következményeként megemelkedett  $[Ca^{2+}]_i$  által potenciálisan befolyásolt sejtfolyamat.

### *A TRPV1 „kettős aktivációja” – Terápiás megfontolások*

A bőrben található szenzoros neuronok, valamint nem-neuronális sejttípusok (főként a hízósejtek, epidermális keratinocyták, szőrtüsző sejtpopulációi) között szoros anatómiai kapcsolat áll fenn (Williams és mtsai, 1995; Botchkarev és mtsai, 1997). Kimutatták, hogy ezen szenzoros neuronok szöveti excitációja különféle neuropeptidok (P-anyag, calcitonin gene-related peptide, CGRP) felszabadítása révén a szomszédos nem-neuronális elemek aktivációját (pl. hízósejt degranuláció; citokinek, növekedési faktorok, vasoaktív metabolitok felszabadítása) váltja ki (Krumins és Broomfield, 1992; Ansel és mtsai, 1993). A termelt anyagok ezután, specifikus receptoraikhoz kötődve, visszahatnak a szenzoros neuronokra, kialakítva a különféle fiziológiás és patológiás bőrfolyamatokban központi szerepet játszó kétirányú neuronális –nem-neuronális sejthálózatokat (Suzuki és mtsai, 1999).

A TRPV1 agonista, a fenti szenzoros neuronokat nagy affinitással aktiváló kapszaicint meglehetősen széles körben alkalmazzák különféle bőrgyógyászati megbetegedésekben (psoriasis, prurigo nodularis, notalgia paresthetica, pruritus ani, urémiás pruritus, stb.) a krónikus gyulladás, a fájdalom, valamint a kapcsolódó viszketés csillapítására/gyógyítására (összefoglalva Bíró és mtsai, 1997; Ständer és mtsai, 2001; Yosipovitch és Fleischer, 2003; Lysy és mtsai, 2003). Mindezen alkalmazások során úgy gondolták, hogy a kapszaicin a szenzoros neuronok deszenzitizációja (lásd Bevezetés fejezet), valamint az afferens végződések neuropeptid (pl. P-anyag) tartalmának kiürítése révén fejt ki a kívánt hatást, mintegy „felfüggesztve” a fent említett kétirányú neuronális – nem-neuronális sejthálózat működését (Twycross és mtsai, 2003; Yosipovitch és mtsai, 2003).

Jelen kísérletes adataink – jó összhangban korábbi, a TRPV1 funkcionális szerepét nem-neuronális sejteken egyértelműen tisztázó eredményekkel – ugyanakkor felvetnek egy jelentős klinikai relevanciával is bíró új hipotézist, amit nevezhetünk a TRPV1 „kettős aktivációjának”. Elképzelésünk szerint a bőr neuronális és nem-neuronális sejttípusain

egyaránt megtalálható TRPV1-en ható exogén (terápiásan alkalmazott) kapszaicin, valamint bizonyos endovanilloidok – azaz pl. a follikulusokban ugyancsak megtalálható eikosanoidok és prosztaglandinok (Müller-Decker és mtsai, 2003) – hatására a bőr szenzoros axonjaiból, valamint számos nem-neuronális sejtfeleségből (hízósejtek, epidermális és ORS keratinocyták, endothelium, Langerhans-sejtek) egyidejűleg szabadulnak fel neuropeptidek, illetve más anyagok (pl. hisztamin, gyulladáshoz vezető mediátorok, stb.). Mivel a legtöbb felszabadult ágens receptora mind a szenzoros afferenseken, mind a nem-neuronális elemeken megtalálható, a hatás eredőjeként jelentősen felgyorsulhat a kétirányú funkcionális sejhálózat működése. A szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozását tekintve ez pl. eredményezheti azt, hogy a hajciklus szabályozásában szerepet játszó (a szenzoros neuronokból a TRPV1 aktiváció hatására felszabaduló) P-anyag vagy CGRP (Paus és mtsai, 1994a, 1997; Peters és mtsai, 2001), valamint a follikulus növekedését ugyancsak szabályozó TRPV1-pozitív hízósejtek (Paus és mtsai, 1994; Maurer és mtsai, 1997; Bíró és mtsai, 1998b) együttesen jelennek meg, illetve aktiválódnak, ami további, TRPV1 és neurokinin receptorokon keresztüli hízósejt-degranulációt eredményezhet. A folyamatsor komplexitása, valamint számos részletének nem felderített volta magyarázhatja azt a (jelen eredményeink fényében ellentmondásosnak tűnő) korábbi megfigyelést is, hogy a kapszaicin-kezelés bizonyos körülmények között egerekben akár elő is segítheti a hajnövekedést, illetve telogén-anagén átalakulást okozhat (Paus és mtsai, 1994a).

Bemutatott eredményeink, valamint a fent vázolt hipotézis tükrében úgy gondoljuk, hogy nagy jelentőséggel bírhat a TRPV1 non-neuronális expressziós mintázatának meghatározása különféle bőrbetegségekben. Ez erősíti azon megfigyelés is, miszerint prurigo nodularisban – ahol az alkalmazott krónikus kapszaicin-kezelés mind a kórkép vezető tünetének számító viszketést, mind a kialakuló bőrtüneteket hatásosan gyógyította (Ständer és

mtsai, 2001) – jelentősen megemelkedett a TRPV1 expressziója az epidermális keratinocyták rétegeiben (Ständer és mtsai, 2004).

Végezetül megállapíthatjuk, hogy jelen eredményeink a szőrtüsző biológiai folyamatainak egy új, „tüzes” szereplőjét mutatják be, mely – a szőrnövekedést gátló természetéből fakadóan – különféle TRPV1-re ható szerek bőrgyógyászati alkalmazásának további potenciális lehetőségét sugallja (pl. TRPV1 agonisták adagolása hirsutismusban, illetve antagonisták kipróbálása effluviumban, valamint alopecia különféle formáiban). A TRPV1 exogén, avagy endogén aktivációja következményeként kialakuló anti-proliferatív hatás elemzése pedig olyan hiperproliferatív bőrgyógyászati kórképekben kecsegtet jó eredménnyel, mint pl. keratosisok, keratoacanthoma, vagy akár rosszindulatú bőrdaganatok (squamosus carcinoma).

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a vanilloid receptor-1 (TRPV1) funkcionális szerepét elemeztük a humán bőr és szőrtüsző biológiai folyamataiban. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 a humán bőr számos sejtípusában (epidermális keratinocyták és Langerhans-sejtek, dermális szenzoros neuronok, erek simaizma és az endothelium, dermális simaizomkötegek, hízósejtek, faggyúmirigyek és verejtékmirigyek epitheliuma) kifejeződik. A szőrtüszőkben szintén jelentős TRPV1 immunreaktivitást figyeltünk meg az ORS és IRS, illetve mártix keratinocytákon. Azonos expressziós mintázatot találtunk a tenyésztett anagén VI folliculusokban, ugyanakkor katagén szőrtüsző megemelkedett TRPV1 expressziót mutatott. Funkcionális kísérleteinkben megállapítottuk, hogy folliculus szervkultúrában a TRPV1 specifikus aktiválása az agonista kapszaicinnal a hajszál hossznövekedésének gátlását okozta. Bebizonyosodott az is, hogy ezen növekedés-gátlás együtt járt a folliculusok anagén-katagén transzformációjával, valamint a mártix keratinocyták apoptózisának indukciójával és proliferációjának csökkenésével. Ezen jelenségeket ugyanakkor nem kísérte a differenciálódási programok beindulása, illetve a pigmentképzés megváltozása. Kimutattuk azt is, hogy a kapszaicin-kezelést követően megemelkedett a hajciklus negatív regulátorának, a  $TGF\beta_2$  szintje. A tenyésztett ORS keratinocytákon megállapítottuk, hogy a TRPV1 aktiválása lecsökkentette a sejtek proliferációját, apoptózist indukált, de nem befolyásolta a differenciálódási markerek szintjét. Kimutattuk emellett, hogy a kapszaicin hatására megváltozott számos, a hajciklus szabályozásában résztvevő molekula mennyisége (a pozitív regulátorok szintje csökkent, míg a szőrnövekedést gátló faktorok expressziója emelkedett). Végezetül bebizonyosodott, hogy ezen celluláris hatások nagy valószínűséggel az  $[Ca^{2+}]_i$  TRPV1-függő növekedésén keresztül valósultak meg. Mindezen adataink a TRPV1 központi szerepére utalnak a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában.



## IRODALOMJEGYZÉK

- Ács G, Palkovits M, Blumberg PM. Specific binding of [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sci.* 1996; **59**:1899-1908
- Agopyan N, Head J, Yu S, Simon SA. TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2004; **286**:L563-572
- Ahsan MK, Urano Y, Kato S, Oura H, Arase S. Immunohistochemical localization of thyroid hormone nuclear receptor in human hair follicles and in vitro effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin. *J. Med. Invest.* 1998; **44**:179-184
- Amantini C, Mosca M, Luccarini R, Perfumi M, Morrone S, Piccoli M, Santoni G: Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 2004; **11**:1342-1356
- Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J. Immunol.* 1993; **150**:4478-4488
- Arck PC, Hadjiski B, Peters EM, Peter AS, Hagen E, Klapp BF, Paus R. Stress inhibits hair growth in mice by induction of premature catagen development and deleterious perifollicular inflammatory events via neuropeptide substance P-dependent pathways. *Am. J. Pathol.* 2003; **162**:803-814
- Barbosa AJ, Castro LP, Margarida A, Nogueira MF. A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain. Technol.* 1984; **59**:193-196
- Benham CD, Davis JB, Randall AD. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 2002; **42**:873-888
- Bevan SJ, Docherty RJ, Wood J. Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In *Capsaicin in the study of pain.* (Wood J ed) 1993; 27-44, Academic Press, New York
- Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, Harris J, Pillai S. Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J. Clin. Invest.* 1996; **97**:1085-1093
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; **98**:13396-13401
- Bíró T, Ács G, Modarres S, Blumberg PM. Recent advances in understanding of vanilloid receptors: A therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1997; **2**:56-60

- Bíró T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Ács P, Blumberg PM. Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Mol. Brain Res.* 1998a; **56**:89-98
- Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Acs G, Acs P, Paus R, Blumberg PM. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood.* 1998b; **91**:1332-1340
- Bíró T, Szabó I, Hunyadi J, Kovács L, Csernoch L. Distinct sub-populations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch. Dermatol. Res.* 1998c; **290**:270–276
- Boczán J, Boros S, Mechler F, Kovács L, Bíró T. Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol.* 2000; **99**:96-104
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, Chen LH, Welker P, Paus R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB J.* 2000; **14**:1931-1942
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, van der Veen C, Lewin GR, Paus R. Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 1998a; **111**:279-285
- Botchkarev VA, Eichmüller S, Johansson O, Paus R. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J. Comp. Neurol.* 1997; **386**:379-395
- Botchkarev VA, Welker P, Albers KM, Botchkareva NV, Metz M, Lewin GR, Bulfone-Paus S, Peters EM, Lindner G, Paus R. A new role for neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am. J. Pathol.* 1998b; **153**:785-799
- Botchkareva NV, Botchkarev VA, Albers KM, Metz M, Paus R. Distinct role for nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in controlling the rate of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 1999; **114**:314-320
- Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA, Gilchrist BA. SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J.* 2001; **15**:645-658
- Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 2003; **111**:43-50
- Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann. Rev. Neurosci.* 2001; **24**:487-517
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; **288**:306-313

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin-receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**:816-824
- Chanda S, Robinette CL, Couse JF, Smart RC. 17 $\beta$ -estradiol and ICI-182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen receptor-alpha pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; **15**:2205-2214
- Chase HB. Growth of the hair. *Physiol. Rev.* 1954; **34**:113-126
- Chitano P, Di Blasi P, Lucchini RE, Calabro F, Saetta M, Maestelli P, Fabbri LM, Mapp CE. The effects of toluene diisocyanate and of capsaicin on human bronchial smooth muscle in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; **270**:163-173
- Dawber R (ed). *Diseases of the hair and scalp.* 1997; 606-625. Blackwell Science, Oxford
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem. Biophys. Commun.* 2001; **285**:1250-1252
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szállási Á. Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002; **12**:372-379
- Ellis JL, Sham JSK, Udem BJ. Tachikinin-independent effects of capsaicin on smooth muscle in human isolated bronchi. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1997; **155**:751-755
- Foitzik K, Lindner G, Müller-Röver S, Maurer M, Botchkareva N, Botchkarev V, Handjiski B, Metz M, Hibino T, Soma T, Dotto GP, Paus R. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta 1 in vivo. *FASEB J.* 2000; **14**:752-760
- Foitzik K, Paus R, Dortschman T, Dotto GP. The TGF-beta2 isoform is both required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Dev Biol.* 1999; **212**:278-289
- Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A: Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**:32552-32558
- Genever PG, Maxfield SJ, Kennovin GD, Maltman J, Bowgen CJ, Raxworthy MJ, Skerry TM. Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1999; **112**:337-342
- Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, Hammerberg C, Cooper KD. Human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that populate epidermis after UVB exposure. *J. Invest. Dermatol.* 1998; **110**:422-427
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**:3440-3450
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* 1999; **11**:946-958

- Hardy M. The secret life of hair follicle. *Trends. Genet.* 1992; **8**:55-61
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the human hair growth cycle: evidence targeted and spontaneous mutations. *Cell* 1994; **78**:1017-1025
- Hembree JR, Harmon CS, Nevins TD, Eckert RL. Regulation of human dermal papilla cell production of insulin-like growth factor binding protein-3 by retinoic acid, glucocorticoids, and insulin-like growth factor-1. *J. Cell. Physiol.* 1996; **167**:556-561
- Holzer P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 1991; **43**:143-200
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**:6155-6160
- Inoue K, koizumi, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M. Functional vanilloid receptor in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; **291**:124-129
- Ito T, Ito N, Bettermann A, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am. J. Pathol.* 2004; **164**:623-634
- Jahoda CAB. Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. *Exp. Dermatol.* 1998; **7**:235-48
- Jahoda CAB, Whitehouse J, Reynolds AJ, Hole N. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.* 2003; **12**:849-859
- Jahoda CAB, Reynolds AJ. Dermal-epidermal interactions: adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol. Clin.* 1996; **14**:573-584
- Jancsó N. Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp.* 1960; **7**:53-77
- Jancsó N: Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying functional pain receptors. In *Pharmacology of pain*. Lim RKS (ed), 1968; 33-55, Pergamon Press, Oxford.
- Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J, Jancsó N. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structure by capsaicin in rats. *J. Physiol.* 1970; **208**:449-459
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**:8134-8139
- Kanda N, Watanabe S. Substance P enhances the production of interferon-induced protein of 10 kDa by human keratinocytes in synergy with interferon-gamma. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **119**:1290-1297

- Kang HJ, Soh Y, Kim MS, Lee EJ, Surh YJ, Kim HR, Kim SH, Moon A. Roles of JNK-1 and p38 in selective induction of apoptosis by capsaicin in ras-transformed human breast epithelial cells. *Int. J. Cancer*. 2003; **103**:475-482
- Karai, L., Brown, D.C., Mannes, A.J., Connelly, S.T., Brown, J., Gandal, M., Wellisch, O.M., Neubert, J.K., Olah, Z., and Iadarola, M.J. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J. Clin. Invest.* 2004; **113**:1344-1352
- Kedei N, Szabó T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**:28613-28619
- Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, Salford LG, Sjogren HO, Widgren B. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. Cancer*. 2000; **89**:251-258
- Krumins SA, Broomfield CA. Evidence of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> tachykinin receptors and their involvement in histamine release in a murine mast cell line. *Neuropeptides* 1992; **21**:65-74
- Kwak J, Wang MH, Hwang SW, Kim TY, Lee SY, Oh U. Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J. Neurosci.* 2000; **20**:8298-8304
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**:680-685
- Lai J-P, Douglas SD, Ho W-Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J. Neuroimmunol.* 1998; **86**:80-86
- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Aoki N, Winter H, Schweizer J. A novel epithelial keratin, hK6irs, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath including specialized huxley cells (Fügelzellen) of the human hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **118**:789-799
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Beckhaus U, Rackwitz HR, Schweizer J. The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**:19874-19884
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Schweizer J. The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**:35123-35132
- Lázár J, Szabó T, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; **60**:2228-2240
- Lázár J, Szabó T, Marincsák R, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Sensitization of recombinant vanilloid receptor-1 by various neurotrophic factors. *Life Sci.* 2004; **75**:153-163

- Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D, Fausone-Pellegrini MS. Immunohistochemical Evidence of Vanilloid Receptor 1 in Normal Human Urinary Bladder. *Eur. Urol.* 2004; **46**:792-798
- Lenoir MC, Bernard BA, Pautrat G, Darmon M, Shroot B. Outer root sheath cells of human hair follicle are able to regenerate a fully differentiated epidermis in vitro. *Dev. Biol.* 1988; **130**:610-620
- Limat A, Hunziker T, Biollat C, Bayreuther K, Noser F. Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1989, **92**:758-762.
- Limat A, Noser F. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 1986; **87**:485-488.
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am. J. Pathol.* 1997; **151**:1601-1617
- Lindner G, Menrad A, Gherardi E, Merlino G, Welker P, Hadjiski B, Roloff B, Paus. Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J.* 2000; **14**:319-332
- Lundberg JM: Capsaicin-sensitive sensory nerves in the airways-implications for protective reflexes and disease. *Capsaicin in the Study of Pain* (Wood JN ed) 1993; 219-238, Academic Press, New York
- Lysy J, Sistiery-Ittah M, Israelit Y, Shmueli A, Strauss-Liviatan N, Mindrul V, Keret D, Goldin E: Topical capsaicin - a novel and effective treatment for idiopathic intractable pruritus ani: a randomised, placebo controlled, crossover study. *Gut.* 2003; **52**:1323-1326
- Maurer M, Fischer E, Handjiski B, von Stebut E, Algermissen B, Bavandi A, Paus R. Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Lab. Invest.* 1997; **77**:319-332
- Montagna W, Ellis RA (eds): *The biology of Hair Growth.* 1958; Academic Press, New York
- Montagna W, Parakkal FP (eds). *The Structure and Function of the Skin.* 1974; Academic Press, New York
- Müller-Decker K, Leder C, Neumann M, Neufang G, Bayerl C, Schweizer J, Marks F, Fürstenberger G. Expression of cyclooxygenase isozymes during morphogenesis and cycling of pelage hair follicles in mouse skin: precocious onset of the first catagen phase and alopecia upon cyclooxygenase-2 overexpression. *J. Invest. Dermatol.* 2003; **121**:661-668
- Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 2001, **117**:3-15

- Müller-Röver S, Rossiter H, Lindner G, Peters EM, Kupper TS, Paus R. Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1999; **4**:272-277
- Nakamura M, Matzuk MM, Gerstmayr B, Bosio A, Lauster R, Miyachi Y, Werner S, Paus R. Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin. *FASEB J.* 2003; **17**:497-499
- Nguyen VT, Ndoye A, Hall LL, Zia S, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kist DA, Zelickson BD, Lawry MA, Grando SA. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J. Cell Sci.* 2001; **114**:1189-1204
- Oh HS, Smart RC. An estrogen receptor mediated pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; **93**:12525-12530
- Ost D, Roskams T, Van Der Aa F, De Ridder D. Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J. Urol.* 2002; **168**:293-297
- Panteleyev AA, Botchkareva NV, Sundberg JP, Christiano AM, Paus R. The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation. *Am. J. Pathol.* 1999; **155**:159-171
- Panteleyev AA, Jahoda CAB, Christiano AM. Hair follicle predetermination. *J. Cell. Sci.* 2001; **114**:3419-3431
- Papp H, Czifra G, Lázár J, Boczán J, Gönczi M, Csernoch L, Bíró T: Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2003; **12**:811-824
- Partsch G, Matucci-Cerinic M. Capsaicin stimulates the migration of human polymorphonuclear cells (PMN) in vitro. *Life. Sci.* 1993; **53**:PL309-PL314
- Paus R: Principles of hair cycle control. *J. Dermatol.* 1998; **25**:793-802
- Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* 1999; **341**:491-497
- Paus R, Heinzlmann T, Schultz KD, Furkert J, Fechner K, Czarnetzki BM. Hair growth induction by substance P. *Lab. Invest.* 1994a; **71**:134-140
- Paus R, Maurer M, Slominski A, Czarnetzki BM. Mast cell involvement in murine hair growth. *Dev. Biol.* 1994b; **163**:230-240
- Paus R, Müller-Röver S, Botchkarev VA. Chronobiology of the hair follicle: hunting the 'hair cycle clock'. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1999; **4**:3338-3345
- Paus R, Peters EM, Eichmüller S, Botchkarev VA. Neural mechanisms of hair growth control. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1997; **2**:61-68

- Paus R, Stenn KS, Link RE. Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br. J. Dermatol.* 1990; **122**:777-784
- Paus R, van der Veen C, Eichmüller S, Kopp T, Hagen E, Müller-Röver S, Hofmann U. Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice. *J. Invest. Dermatol.* 1998; **111**:7-18
- Peters EM, Botchkarev VA, Müller-Röver S, Moll I, Rice FL, Paus R. Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J. Comp. Neurol.* 2002; **448**:28-52
- Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ, Paus R. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J. Invest. Dermatol.* 2001; **116**:236-245
- Philpott MP, Sanders DA, Bowen J, Kealey T. Effect of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor-alpha in alopecia areata. *Br. J. Dermatol.* 1996; **135**:942-948
- Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 1994a; **102**:857-861
- Philpott MP, Sanders DA, Westgate GE, Kealey T. Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *J. Dermatol. Sci.* 1994b; **7**:S55-72
- Powel BC, Rogers GE. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. In *Formation and Structure of Hair* (Joles P, Zahn H, Höcker H eds), 1997; 59-148, Birkhäuser, Basel
- Premkumar LS: Interaction between vanilloid receptors and purinergic metabotropic receptors: pain perception and beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; **98**:6537-6539
- Randall VA, Hibberts NA, Thornton MJ, Merrick AE, Hamada K, Kato S, Jenner TJ, de Oliveira I, Messenger AG. Do androgens influence hair growth by altering the paracrine factors secreted by dermal papilla cells? *Eur. J. Dermatol.* 2001; **11**:315-320
- Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CA. Transgender induction of hair follicles. *Nature.* 1999; **402**:33-34
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y: Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport.* 1998; **9**:2045-2048
- Soma T, Tsuji Y, Hibino T. Involvement of transforming growth factor beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **118**:65-68
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; **304**:217-222



- Ständer S, Luger T, Metze D: Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin. Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; **44**:471-478
- Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.* 2004; **13**:129-139
- Stenn K, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 2001; **81**: 449-494
- Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M, Bienenstock J. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. *J. Immunol.* 1999; **163**:2410-2415
- Szallasi A. Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptor in several species, including man. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 1995; **629**:1-68
- Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 1999; **51**:159-212
- Szolcsányi J, Joó F, Jancsó-Gábor A. Mitochondrial changes in preoptic neurones after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature* 1971; **299**:116-117
- Szolcsányi J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* 1977; **73**:251-259
- Szolcsányi J. Capsaicin type pungent agents producing pyrexia. In *Handbook of experimental pharmacology* (Milton AS ed) 1982; **60**, 437-478, Springer, Berlin
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; **102**:451-462
- Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp. Dermatol.* 2002; **11**:487-502
- Tobin D, Gunin A, Magerl M, Paus R. Plasticity and cytokinetic dynamics of the hair follicle mesenchyme during the hair growth cycle: implications for growth control and hair follicle transformations. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2003; **8**:80-86
- Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, Paus R. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J. Invest. Dermatol.* 1998; **110**:902-907
- Tobin DJ, Paus R. Graying. gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp. Geront.* 2001; **36**:29-54
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; **21**:531-543

- Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; **98**:6951-6956
- Tresh LT. Isolation of capsaicin. *Pharm. J.* 1846; **6**:941
- Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepietowski JC, Zyllicz Z. Itch: scratching more than the surface. *QJM* 2003; **96**:7-26
- Vennegoor C, Hageman P, Van Nouhuijs H, Ruiter DJ, Calafat J, Ringens PJ, Rumke P: A monoclonal antibody specific for cells of the melanocyte lineage. *Am. J. Pathol.* 1988; **130**:179-192
- Veronesi B, Oortgiesen M, Carter JD, Devlin RB: Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999; **154**:106-115
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* 2001; **59**:9-15
- Welch JM, Simon SA, Reinhart PH. The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**:13889-13894
- Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Brown DA, Liu T, Bauskin AR, Ward RL, Hawkins, NJ, Quinn DI, Russell PJ, Sutherland RL, Breit SN, Moskaluk LA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; **100**:3410-3415
- Westgate GE, Gibson WT, Kealey T, Philpott MP. Prolonged maintenance of human hair follicles in vitro in a serum free medium. *Br. J. Dermatol.* 1993; **129**:372-379
- Williams RM, Bienenstock J, Stead RH. Mast cells: the neuroimmune connection. *Chem. Immunol.* 1995; **61**:208-215
- Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, Bevan S. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* 1990; **520**:131-140
- Wood JN, Winter J, James IF, Rang HP, Yeats J, Bevan S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 1988; **8**:3208-3220
- Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair follicle growth and size by VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 2001; **107**:409-417
- Yosipovitch G, Fleischer A: Itch associated with skin disease: advances in pathophysiology and emerging therapies. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003; **4**:617-622.
- Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M: Itch. *Lancet* 2003; **361**:690-694

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Itt szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében.

Elsőként **Dr Kovács László** professzor úrnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette számomra, hogy az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Biológiai Laboratóriumában végezzem kísérleteimet.

Szeretném megköszönni **Dr Bíró Tamásnak**, témavezetőmnek munkám során nyújtott támogatását, tapasztalatát és megértését.

Szintén köszönettel tartozom **Dr Ralf Pausnak**, a Hamburgi Egyetem Dermatológiai Klinika professzorának optimizmusáért és meglátásaiért.

Köszönet továbbá a velem együtt dolgozó PhD hallgatóknak, **Telek Andreának**, aki rengeteg segítséget nyújtott a kísérletek elvégzésében, **Czifra Gabriellának**, **Griger Zoltánnak**, **Tóth István Baláznak**, **Franziska Conradnak**, **Birte Tychsennek**, **Sofia Liotirinek**.

A nélkülözhetetlen technikai segítségért hálával tartozom **Gundula Pilnitz-Stolze**, **Silvia Wegerich**, **Monika Dietrich** és **Dr Vargáné Kis Ibolya** asszisztensnőknek.

## KÖZLEMÉNYEK

### **AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:**

- 1) **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(2)**:410-413. **IF: 4,194**
- 2) **Bodó E**, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth IB, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Pertile P, 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.* 2004; (*in press*) **IF: 6,946**

### **TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:**

- 3) Papp H, Czifra G, **Bodó E**, Lázár J, Kovács I, Aleksza M, Juhász I, Ács P, Sipka S, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2004; **61(9)**:1095-1105. **IF: 4,995**
- 4) Conrad F, Ohnemus U, **Bodó E**, Bettermann A, Paus R: Estrogens and human scalp hair growth-still more questions than answers. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **122(3)**:840-842. **IF: 4,194**
- 5) Conrad F, Ohnemus U, **Bodó E**, Bíró T, Tychsen B, Bosio A, Gerstmayer B, Schmidt-Rose T, Altgilbers S, Bettermann A, Meyer W, Paus R: Substantial sex-dependent differences in the response of human scalp hair follicles to estrogen stimulation in vitro advocate gender-tailored management of female versus male pattern balding. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2004; (*in press*); **IF: 0,867**

### **IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:**

- 1) Bíró T, Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács L: Modification of protein kinase C alters proliferation and differentiation of immortalized human keratinocytes. *Rev. Oncol.* 2002; **4(1)**:82
- 2) Gönczi M, Papp H, **Bodó E**, Kovács L, Bíró T, Csernoch L: Effects of recombinant overexpression of PKC $\alpha$  and  $\delta$  on receptor-coupled calcium handling in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2002; **119(3)**:746
- 3) Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács L, Bíró T: Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* 2002; **89(1-3)**:348
- 4) Bíró T, Papp H, **Bodó E**, Lázár J, Czifra G, Kovács I, Gáspár K, Juhász I, Kovács L: Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Invest. Dermatol.* 2003; **121(1)**:218

- 5) *Bíró T, Papp H, Bodó E, Lázár J, Czifra G, Kovács I, Gáspár K, Juhász I, Kovács L.* Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Dermatol. Sci.* 2003; **32(2)**:A169
- 6) *Bodó E, Géczy T, Lázár J, Kovács I, Czifra G, Bettermann A, Kovács L, Paus R, Bíró T.* The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Invest. Dermatol.* 2003; **121(1)**:218, No. 823
- 7) *Bodó E, Géczy T, Lázár J, Kovács I, Czifra G, Bettermann A, Kovács L, Paus R, Bíró T.* The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Dermatol. Sci.* 2003; **32(2)**: 823
- 8) *Bíró T, Czifra G, Bodó E, Lázár J, Tóth IB, Papp H, Kovács I, Juhász I, Kovács L.* Cell and isoform specific roles of protein kinase C isoenzymes in regulating in vitro and in vivo proliferation of keratinocytes and skeletal muscle cells. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **123(2)**:A21
- 9) *Tychsen B, Conrad F, Bodó E, Kobayashi H, Bíró T, Paus R.* Cyclosporin A Induces Anagen and Increases the Number of Dermal Papilla Fibroblasts in Nude(Foxn1nu/nu) Mice. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **123(2)**:A76
- 10) *Paus R, Ito N, Ito T, Peters E, Bodó E, Liotiri S, Bíró T, Arck P.* Cutaneous neuroimmunology – lessons from the hair follicle. *Exp. Dermatol.* 2004 (*in press*)
- 11) *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 (*in press*)