

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

ÚJ MECHANIZMUSOK A HUMÁN HAJNÖVEKEDÉS BIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Írta:
Borbíró István

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
2011**

TARTALOMJEGYZÉK

<i>TARTALOMJEGYZÉK</i>	2
<i>KULCSSZAVAK/KEYWORDS</i>	6
<i>BEVEZETÉS</i>	7
<i>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</i>	8
A szőrtüsző.....	8
A szőrtüsző funkcionális anatómiája	8
A hajciklus	12
A hajciklus szabályozása	15
A szőrtüsző, mint „önálló” neuroendokrin rendszer?	16
A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna család	17
A hőérzékeny TRP csatornák.....	19
A TRPV csatornák és a bőr kapcsolata.....	21
A pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH)	23
A TSH szerepe az extratireoidális szövetekben.....	24
A pajzsmirigyhormonok és a szőrnövekedés	25
Célkitűzések.....	25
<i>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</i>	27
Felhasznált anyagok.....	27
Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése	27
A szőrtüszők szövettani előkészítése	28
Hisztomorfometriai vizsgálatok, melanintartalom-meghatározás.....	28
Proliferáló és apoptotizáló sejtek együttes kimutatása a szőrtüszőben	29
Külső gyökérhüvely (ORS) és HaCaT keratinocyták tenyésztése	30
Dermális papilla (DP) eredetű primer fibroblast tenyészet létrehozása.....	31
Szemikvantitatív reverztranszkriptáz PCR (RT-PCR) és termék szekvencia analízis.....	31
Microarray analízis	32
RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív PCR (q-PCR).....	33
Immunhiszto- és citokémia	34
Western blot	37
Az intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) meghatározása.....	39
Patch-clamp mérés	39
Az életképesség meghatározása	40
A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata.....	41
A citotoxicitás vizsgálata	42

RNS interferencia (RNSi)	42
cAMP szint meghatározása felülúszóból	43
Statisztikai elemzések	43
EREDMÉNYEK	44
A TRPV3 kifejeződik humán hajfolliculusokban és primer külső gyökérhüvely (ORS) keratinocyta tenyészetben.....	44
A TRPV3 stimuláció gátolja a szőrszál hossznövekedését és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózis-vezérelt korai regressziót okoz	46
A TRPV3 Ca ²⁺ -csatornaként működik az ORS keratinocytákban.....	49
A TRPV3-aktiváció gátolja a proliferációt és sejthalált indukál tenyésztett ORS keratinocytákban	51
A TSH receptor mRNS és fehérje szinten egyaránt kifejeződik az emberi fejbőr és a szőrtüsző mezenhimális területein	54
A TSH kezelés nem befolyásolja jelentősen az emberi szőrszál növekedését, a proliferáló és apoptotizáló sejtek arányát, valamint a pigmentációt	56
A TSH nem okoz jelentős változást az emberi szőrtüsző mezenhimális területeinek proliferációjában in situ	58
A TSH alkalmazása cAMP-szint emelkedést okoz.....	58
Az emberi szőrtüszők TSH kezelése nem indukál mérhető pajzsmirigyhormon szekréciót, de serkenti a klasszikus TSH célgénnek átírását.....	59
TSH stimuláció megváltoztatja az emberi szőrtüszők génexpressziós mintázatát.....	61
A tenyésztett emberi DP fibroblastok közvetlen célpontjai a TSH receptor-közvetített jelátvitelnek	64
MEGBESZÉLÉS	66
A TRPV3 szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában	66
A TSH receptor szerepe a humán szőrtüszők biológiai folyamatainak szabályozásában.....	69
ÖSSZEFOGLALÁS	75
SUMMARY	76
IRODALOMJEGYZÉK	77
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
KÖZLEMÉNYEK	98
Az értekezést megalapozó in extenso közlemények	98
További in extenso közlemények.....	98
Idézhető előadáskivonatok.....	99
MELLÉKLETEK	100
Az értekezést megalapozó in extenso közlemények kéziratai	100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-APB: 2-aminoetoxidifenil borát
ABC: avidin-biotin komplex (avidin-biotin complex)
ACTA2: simaizom α 2-aktin
ACTH: adrenokortikotróp hormon (adrenocorticotrophic hormone)
APM: szőrszálegyenésítő izom (musculus arrector pili)
B: dudor régió (bulge)
BALB/c: laborban kitenyésztett albínó egértörzs
BDNF: agyi eredetű növekedési faktor (brain-derived neurotrophic factor)
BSA: borjú szérum albumin
[Ca²⁺]_{IC}: intracellularis kalcium koncentráció
[Ca²⁺]_{EC}: extracellularis kalcium koncentráció
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát
CCCP: karbonil-cianid-3-klorofenil-hidrazon
CD90: fibroblast differenciálódási marker (cluster of difference)
CRH: kortikotropin felszabadító hormon (corticotropin-releasing hormone)
CTGF: kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor)
CTS: follikuláris kötőszövetes tok (connective tissue sheath)
DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol
 Δ CT: küszöbciklusok (threshold cycle) közötti eltérésen alapuló q-PCR értékelési módszer
DMSO: dimetil-szulfoxid
DP: dermális papilla
DS: DD egértörzsből laboratóriumban kitenyésztett törzs (DD Shionogi)
DS-Nh: DS egértörzsben mutáció során kialakult szőrtelen fenotípusú egértörzs
EDTA: etilén-diamin-tetra-ecetsav
EGTA: etilén-glikol-bisz(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra- ecetsav
FBS: embrionális borjúsérum (fetal bovine serum)
FGF: fibroblast növekedési faktor (fibroblast growth factor)
F-ICC: fluoreszcens immuncitokémia (fluorescent immunocytochemistry)
F-IHC: fluoreszcens immunhisztokémia (fluorescent immunohistochemistry)
FLIPR: fluoreszcens lemezolvasó (fluorimetric imaging plate reader)
FLNA: A α -filamin
FN: fibronektin
G6PDH: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GPX: glutation-peroxidáz
HaCaT: immortalizált humán keratinocita sejtvonal (**H**uman **a**dult low **C**alcium high **T**emperature keratinocytes)
HB: bulbus régió (hair bulb)
HDF: humán dermális fibroblast
HEPES: N-2-hidroxietyl-piperazin-N'-2-etán-szulfonsav
HGF: hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
IGF: inzulin-szerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IL: interleukin
IRS: belső gyökérhüvely (inner root sheath)
IU: nemzetközi egység (international unit)
IVL: involucrin
KRT: keratin
KRTAP: keratin-kapcsolt fehérje (keratin associated protein)
KRTHa: hajkeratin

MK: hajmátrix keratinocyták
 MTCO1: citokró-m-C oxidáz-1 (mitochondrial cytochrome-C oxidase-1)
 NK: negatív kontroll
 NT: neurotrofin
 ORS: külső gyökérhüvely (outer root sheath)
 PBS: foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
 PBST: Tween-20-at tartalmazó PBS
 PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
 PKM: (izom típusú) piruvát kináz (pyruvate kinase, muscle)
 PPIA: ciklofilin A
 q-PCR: kvantitatív PCR
 RNSi: RNS interferencia
 RT-PCR: reverz transzkripciót követő PCR
 SCF: összejt faktor (stem cell factor)
 SDS: nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
 SE: standard hiba (standard error)
 SGI: faggyúmirigy (sebaceous gland)
 SMA: simaizom aktin (smooth muscle actin)
 siRNS: kis interferáló RNS (small interfering RNS)
 T3: 3,5,3'-trijódtironin
 T4: tiroxin (3,5,3',5'-tetrajódtironin)
 TBS: Tris pufferelt sóoldat (tris buffered saline)
 TG: tireoglobulin
 TGF: transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
 TPO: pajzsmirigy peroxidáz (thyroid peroxidase)
 TRP: tranziens receptor potenciál
 TRPV: TRP család vanilloid (alcsalád)
 TSA: tiramid szubsztrát amplifikáció
 TSH: pajzsmirigy stimuláló hormon (thyroid stimulating hormon)
 TTF-1: pajzsmirigy transzkripció faktor-1 (thyroid transcription factor-1)
 TUNEL: apoptotikus DNS fragmentáción alapuló jelölés (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling)
 VEGF: vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
 VR: vanilloid receptor (TRPV1)
 VRL: VR-szerű fehérje (VR-like protein, TRPV2)
 WBN/Kob-Ht: laborban kitenyésztett szőrtelen patkánytörzs
 WNT: „wingless” típusú fehérje/jelátviteli út vonal

KULCSSZAVAK/KEYWORDS

Kulcsszavak:

- hajnövekedés/szőrnövekedés
- szőrtüsző szervkultúra
- hajciklus
- katagén átalakulás
- tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3)
- pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH)

Keywords:

- hair growth
- hair follicle organ culture
- hair cycle
- catagen transformation
- transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3)
- thyroid stimulating hormone (TSH)

BEVEZETÉS

Az utóbbi évek kutatásai rámutattak arra, hogy számos neuro-immuno-endokrin mechanizmus jelentős mértékben képes a szőrtüsző alapvető biológiai folyamatainak szabályozására, egerekben és az emberben egyaránt. Ezen terület ugrásszerű fejlődése annak is köszönhető, hogy a kutatóknak lehetőségük nyílt a szőrtüsző alapvető folyamatainak tanulmányozására *humán* szőrtüsző szervkultúrákban *in vitro*. Jelen munkánk alapját is ezen modellen nyert eredmények adják.

Munkacsoportunk korábban sikerrel igazolta a celluláris receptorként ismert tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák vanilloid alcsaládjába tartozó TRPV1 („kapszaicin receptor”) szerepet játszik az *egér* és *humán* szőrtüszők növekedésének szabályozásában. Az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően ugyanakkor a TRP család egy másik tagja, a meleg érzékeny TRPV3 is a figyelem középpontjába került. Bizonyos szőrtelen rágcsálótörzsek vizsgálatakor kiderült ugyanis, hogy a szőrtelen fenotípust okozó mutáció a *trpv3* gén kódoló régiójában található. Jelen munkánk célja a TRPV3 szerepének feltárása volt a *humán* szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában.

Az általunk is alkalmazott modell mélyreható vizsgálata vezetett szőrtüszők eddig ismeretlen endokrinológiai jelentőségének megismeréséhez is. Bebizonyosodott ugyanis, hogy a *humán* szőrtüsző nemcsak célpontja, hanem forrása is számos klasszikus hormonnak. Ezen túlmenően a *humán* piloszebáceus egység rendelkezik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely teljesen működőképes perifériás megfelelőjével is. Mivel mindezidáig nem vizsgálták a pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH) közvetlen szerepét a *humán* szőrtüsző élettani folyamatainak szabályozásában, munkánk második felében a TSH hatását kívántuk tanulmányozni izolált *humán* szőrtüsző szervkultúrában.

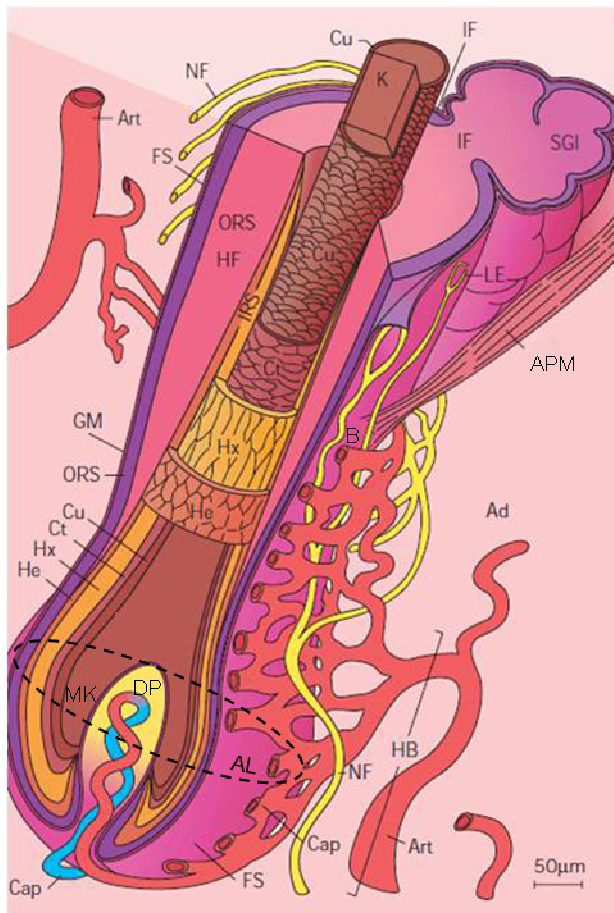
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szőrtüsző

A szőrtüsző a bőr biológiájában egyedülálló szerepet betöltő ektodermális eredetű miniszerv, mely a konvencionálisan ismert funkciók (mechanikai védelem, érzékelés, hőtárolás, szociális és szexuális jelzések) mellett más, a bőr biológiáján is túlmutató szereppel bír (Paus és Cotsarelis, 1999; Krause és Foitzik, 2006). Jelen dolgozatban – az angolnyelvű irodalomhoz hasonlóan – nem tettünk különbséget a fejbőrből (haj) és a test más területéről (szőr) származó follikulusok elnevezése között, minden esetben a szőrtüsző kifejezést alkalmaztuk. A szőrtüsző egyik legfontosabb tulajdonsága a folyamatos regenerációra való képesség. Ezen regeneráció magába foglalja a proliferációs, differenciálódási és apoptotikus folyamatok szigorúan ellenőrzött összhangját, mely különböző eredetű és funkciójú sejtrétegek kölcsönös kommunikációja révén alakul ki (Paus, 1998; Schneider és mtsai., 2009). A follikulus sejt-rezervoárként szolgál számos sejttípus például a bőr és a szőrtüsző immunfolyamataiban szerepet játszó Langerhans-sejtek (Gilliam és mtsai., 1998), a melanocyták (Peters és mtsai., 2002) és az epidermális keratinocyták esetében (Panteleyev és mtsai., 2001). A szőrtüsző által termelt növekedési faktorok, citokinek, neuropeptidek, enzimek és adhézións molekulák segítik a follikulus és járulékos képletei (ellátó erek, idegek, különféle mirigyek) finoman összehangolt működését (Stenn és Paus, 2001). A follikulusok említett sejtfolyamatainak tanulmányozása lehetőséget nyújt a szőrnövekedés kutatásán túlmutató jelenségek (pl. sebgyógyulás) megértésére is.

A szőrtüsző funkcionális anatómiája

A kifejlett szőrtüszők, különböző típusaiban megfigyelhető finom eltérések ellenére, azonos alapszerkezettel jellemezhetők, mely a follikulus fő tevékenységének, a környezettel



1. ábra: Anagén VI. fázisú szőrtüsző funkcionális anatómiája Paus és Peker (2003) munkája alapján

Rövidítések jegyzéke:

Ad: adipocyták

AL: Auber-féle vonal

APM: arrector pili izom

Art: arteriola

B: dudor

K: cortex (szőrszál)

Cap: kapillaris

Ct: kutikula (belső gyökérhüvely)

Cu: kutikula (szőrszál)

DP: dermális papilla

FS: follikuláris kötőszövetes tok (CTS)

GM: üvegmembrán

HB: bulbus

He: Henle réteg (belső gyökérhüvely)

HF: szőrtüsző

Hx: Huxley réteg (belső gyökérhüvely)

IF: infundibulum

IRS: belső gyökérhüvely

LE: idegvégződés

MK: mátrix keratinocyták

NF: idegrost

ORS: külső gyökérhüvely

SGI: faggyúmirigy

összhangban lévő haj-, illetve szőrszáltermelésnek van alárendelve (Montagna és Ellis, 1958; Montagna és Parakkal, 1974; Dawber, 1997; Paus és Cotsarelis, 1999; Schneider és mtsai., 2009). A szőrtüsző disztális vége az úgynevezett állandó rész, mely egyáltalán nem mutat ciklikus változásokat. Itt található az infundibulum (IF), ami a szőrcsatorna bőrfelületre nyíló része, valamint az isthmus, vagyis a faggyúmirigy (SGI) csatlakozása alatti terület, mely egészen a dudor (B) régióig húzódik, ahova az arrector pili (szőrszál egyenesítő) izom (APM) csatlakozik. A szőrtüsző proximális, ciklikusan váltakozó fele alkotja a szőrszálat létrehozó „gépezetet” (1. ábra). A szőrtüsző, a faggyúmirigy és az APM funkcionálisan együttműködő rendszerét pilosebáceus egységként is szokták említeni.

A szőrtüsző proximális végét hagymához (hajhagyma) lehet hasonlítani, melynek középpontjában a dermális papilla (DP) helyezkedik el, amit a bulbus (HB) epiteliális sejtrétegei, a mátrix keratinocyták (MK) több rétegben, héjszerűen vesznek körül (1. táblázat). A hagyma szára jelképezi a follikulus belsejében elhelyezkedő, folyamatosan kifelé

mozgó szőrszálat, és az azt körülvevő sejtrétegeket. A DP fölött található keratinocyták terminális differenciálódásuk során úgynevezett trychocytákká alakulnak és a differenciálódási folyamatok részeként a szintén ezen a területen elhelyezkedő melanocytáktól melanint vesznek fel. A trychocyták folyamatosan fölfelé mozogva alakítják ki ezután a szőrszál három rétegét: a központi medullát, ami a teljesen keratinizált trychocyták nagyon lazán kapcsolódó rétege; a kortextet, ahol a keratinizált sejtek – és a szőrszál pigmentáltságáért felelős melaninszemcsék – keratin filamentumokkal megerősített fehérjemátrixba ágyazódnak; valamint az egészet tetőcserépszerűen borító kutikulát. A belső gyökérhüvely (IRS) keratinocyták terminálisan differenciálódott rétegei egy szilárd, ellenálló palástot képeznek a szőrszál körül, és vele együtt kifelé mozognak, elcsúszva a külső gyökérhüvely (ORS) keratinocyták legbelső rétegén (**1. táblázat**). Az IRS maga is több koncentrikusan rendeződő rétegből áll, ezek a Henle réteg, a Huxley réteg és a kutikula. Ezen rétegek mindegyike eltérő epiteliális differenciáltsági mintázattal és jellegzetes szerkezeti fehérjékkel (pl. hajkeratinok, trychohialin), mátrix molekulákkal és enzimekkel rendelkezik. A follikulus-epitélium morfológiai sokszínűségére utal továbbá, hogy a nyolc epiteliális réteg mindegyikében a keratin család számos tagja és azok jellemző expressziós mintázata írható le (Powel és Rogers, 1997; Langbein és mtsai., 1999, 2001 és 2002; Schweizer és mtsai., 2006).

Az ORS keratinocyták alkotják a dermiszt és az IRS-t elválasztó és egyben összekötő réteget. Ezek a sejtek folyamatos kapcsolatban és sejtkecserélődésben vannak az epidermiszsel, erre utal az a tény is, hogy az epidermisz sérülés esetén az ORS sejtjeiből regenerálódhat (Taylor és mtsai., 2000). Az IRS-sel és a szőrszállal ellentétben az ORS sejtjeinek egy részére lassú osztódási ráta és a proliferáló keratinocyták keratin expressziós mintázata jellemző, a differenciálódásuk a bazális membrán irányából az IRS felé történik. Az ORS egyrészt sejt-rezervoárként szolgál az epidermisz számára (Panteleyev és mtsai., 2001), másrészt a belső

sejtrétegek táplálását végzi (oxigén- és energia-raktár), ezenkívül számos olyan faktort és citokint termel, melyek a hajciklus szabályozásában játszanak szerepet (lásd később).

Úgy tűnik, hogy az ORS, az IRS és a szőrszál keratinocytái három prekursor sejtpopulációból jönnek létre, melyek egyrészt az APM csatlakozásának közelében (elsődleges sejtpopuláció), másrészt (másodlagosan) a bulbusban helyezkednek el (Panteleyev és mtsai., 2001). A fejlődő, aktív follikulus leggyorsabb ütemben osztódó sejtpopulációját, a mátrix keratinocyták alkotják, melyek az Auber-féle vonal (AL, a bulbus legszélesebb része, a DP maximális átmérője, Auber, 1952) alatt helyezkednek el.

<i>Keratinocyta típusok</i>	<i>Jellegzetes tulajdonságaik</i>
mátrix keratinocyták (MK)	- a DP-t több rétegben veszik körül - az Auber-féle vonal alatti sejteket gyors osztódási ráta jellemzi - differenciálódásuk során trychocytákká alakulnak - a melanocytákból melanint vesznek fel - feladatuk a szőrszál létrehozása
belső gyökérhüvely (IRS) keratinocyták	- a keletkező szőrszálat ölelik körül - három rétegük különíthető el - differenciálódott sejtek rétegei alkotják - hajkeratinokat és trychohialint expresszálnak
külső gyökérhüvely (ORS) keratinocyták	- a keletkező szőrszálat és az IRS-t veszik körül - lassú osztódási ráta jellemzi őket - a sejtek folyamatos kapcsolatban vannak az epidermis-szel, sérülés esetén részt vesznek annak regenerálásában - a bazális membrántól az IRS felé differenciálódnak - feladatuk a belső sejtrétegek táplálása, valamint különféle faktorok, citokinek termelése

1. táblázat: A follicularis keratinocyták típusai és főbb jellegzetességeik

Alkamazott rövidítések: DP: dermális papilla, IRS: belső gyökérhüvely, ORS: külső gyökérhüvely, MK: mátrix keratinocyták.

A follikulus nagyságát és átmérőjét a DP határozza meg (Jahoda és Reynolds, 1996). A sérült DP teljes mértékben képes regenerálódni a follikulus legkülső burkából, a follikuláris kötőszövetes tokból (CTS) (Jahoda és Reynolds, 1996; Reynolds és mtsai., 1999). A DP sejtjei egy olyan mátrixba vannak beágyazva, ami összetételében a bazális membránhoz hasonlít. A növekedő fázisban lévő follikulus fibroblastjai közvetlen kontaktusba tudnak lépni a mátrix keratinocytákkal, ami jelentősen leegyszerűsíti a köztük fennálló jelátvitelt (Jahoda

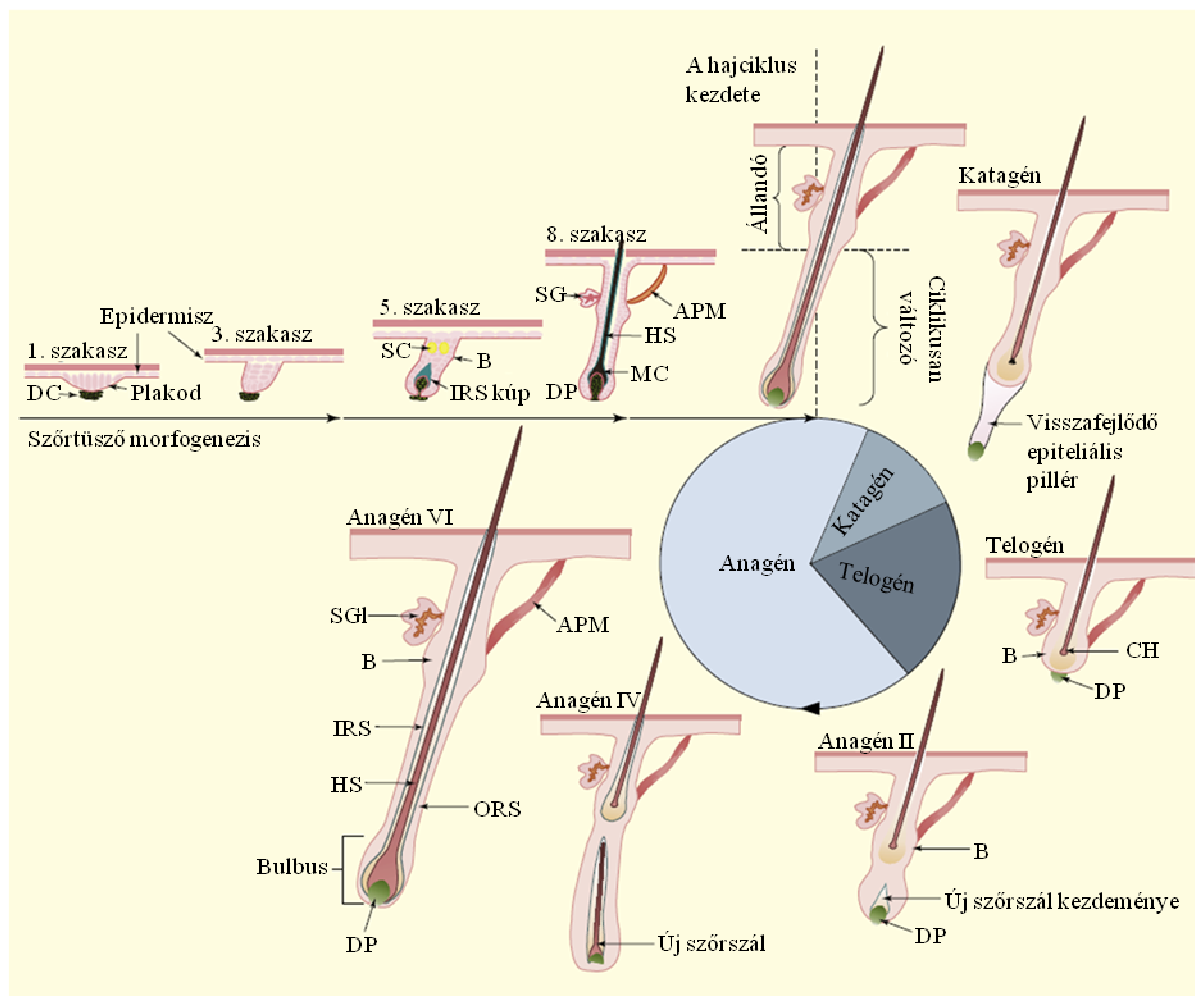
és Reynolds, 1996; Jahoda, 1998). Feltehetőleg hasonló kommunikáció áll fenn a CTS/DP sejtek és a hipodermális adipocyták között is (Jahoda és mtsai., 2003).

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

Az APM szőrtüszőhöz kapcsolódó területe, a dudor régió, igen gazdag szenzoros és vegetatív idegvégződésben, ami egyrészt lehetővé teszi a szőrszál „tapintószervként” való működését, másrészt az itt termelt neurotranszmitterek, neurohormonok és neurotrofinok fontos szerepet töltenek be a szőrtüsző különböző folyamatainak szabályozásában (Botchkarev és mtsai., 1997; Paus és mtsai., 1997; Peters és mtsai., 2001 és 2002; Paus és Peker, 2003).

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* szakaszban a növekedés megáll, regressziós folyamatok indulnak be, a nyugalmi *telogén* fázis pedig a tulajdonképpeni felkészülés a következő anagénre. 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).



2. ábra: A humán hajciklus fő szakaszai Schneider és mtsai. (2009) munkája alapján

A hajciklus három fázisból áll: anagén (növekedési fázis), katagén (regressziós fázis) és telogén (nyugalmi fázis). A posztnatális morfogenezis a szőrtüsző megnyúlásához és szőrszál létrehozásához vezet, amely kiemelkedik a bőrből. A szőrtüsző megérését követően belép a katagén fázisba, amelynek során az alsó, ciklikusan változó része visszafejlődik. Ez a folyamat emeli a DP-t a dudor régió közelébe, ahol a szőrtüsző összejte találhatóak. Az összejt és a DP közötti molekuláris kölcsönhatás megléte elengedhetetlen egy új szőrtüsző kialakításához. A dudor és DP közelségének fenntartásáról a nyugalmi telogén fázis gondoskodik. Amint a szőrszál növekedését aktiváló faktorok elérnek egy kritikus koncentrációt a szőrtüsző belép az anagén fázisban és egy új szőrszál kezd el növekedni. A születést követő első hajcikluson minden egyes szőrtüsző ugyanabban az időpontban halad át, míg az azt követő ciklusok már nem szinkronizáltak. Az ábra bal felső részén az embrionális fejlődés szakaszai (1-8.) láthatóak, amint folyamatos átmenetet képeznek az első születés utáni ciklussal. Rövidítések jegyzéke: APM: arrector pili izom, B: dudor, CH: szőrbunkó, DC, dermális kondenzátum, DP: dermális papilla (zöld), HB: bulbus, HS: Szőrszál (barna); IRS: belső gyökérhüvely (kék), MC: melanocyták, ORS: külső gyökérhüvely; SC : sebocyták (sárga) SGI: faggyúmirigy.

Életünk során a szőrtüsző visszafejlődések és regenerációk ciklikus folyamatain megy keresztül újra és újra. Amint az egyedfejlődés során létrejön az első haj- vagy szőrszál, a szőrtüszőn hamar jelentkeznek a gyors regresszió jelei, megkezdődik az első katagén fázis. A katagén fázisban, mely átlagosan 2-3 hétig tart, a szőrtüsző visszafejlődése során apoptotikus sejtfolyamatok indulnak be. Ez a programozott sejthalál megfigyelhető az ORS és IRS

rétegekben, a mátrix keratinocytákban, illetve a melanocytákban is. Ennek megfelelően a katagén egymást követő stádiumaiban a bulbus egyre inkább elvékonyodik, valamint egyre közelebb emelkedik az epidermiszhez. A hagyma közepét adó DP proximális irányba húzódik, majd a késői katagén fázis során egy epiteliális nyéllel el is távolodik a már nem-növekvő szőrbukótól. A melanocyták apoptózisa miatt a pigment szemcsék mennyisége is lecsökken, és a proximális szőrvég korábbi jelentős pigmenttartalma megszűnik. A viszonylag rövid regressziós, katagén stádium után a follikulus a nyugalmi, telogén fázisba kerül, melynek hossza átlagosan 3 hónap. A kisméretű telogén follikulusban nem találunk IRS-t, itt a DP egy kompakt, gömb alakú sejtcsoport a dudor régió közvetlen közelében. Lényegében ezen időszak készíti fel a szőrtüszőt arra, hogy a növekedési anagén fázisba lépve elinduljon a következő hajciklus.

Az anagén szőrtüsző kialakulása során a proximális területen a proliferációs folyamatok kerülnek előtérbe, ami főleg az epiteliális 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 szőrszál és az IRS egymást határoló rétegeit, miközben a bulbus keratinocytái egyre inkább körbeveszik a DP-t, és ezzel újra felépülnek az IRS tápláló rétegei is. Az utolsó, hatodik anagén stádiumban a szőrtüsző eléri jellegzetes hagyma formáját, létrejön egy új, folyamatosan növekvő szőrszál, melyet a gyökérhüvely keratinocyták és a CTS határol. A DP ebben a szakaszban eléri maximális nagyságát és aktivitását. Kialakul továbbá a beidegzés, vérellátás, valamint a melanocyták proliferációja és melanintermelése által a pigmentáció is. Az emberi szőrtüsző 2-6 éven át ebben a fázisban működik a fejbőrben, míg újra be nem indulnak a katagén átalakuláshoz vezető regressziós folyamatok (Stenn és Paus, 2001; Krause és Foitzik, 2006; Schneider és mtsai., 2009).

A hajciklus szabályozása

A hajátültetési kísérletek során már régóta ismert, 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; Paus és Foitzik, 2004). Ez teszi lehetővé az átoperált szőrtüszők „újraindulását”, valamint az általunk is alkalmazott szőrtüsző szervkultúra vizsgálati modell bevezetését. Ezen óra biológiai természetéről viszonylag keveset tudunk, ma azonban azt tartjuk valószínűnek, hogy a DP fibroblastjaival állhat igen szoros kapcsolatban (Paus és mtsai., 1999). Az a nézet is elterjedt, hogy a szőrtüszőt körülvevő jelátviteli molekulák által biztosított milió 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, 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 a gyökérhüvely keratinocytákra, illetve a melanocytákra korlátozódjon (Lindner és mtsai., 1997; Tobin és mtsai., 1998; Müller-Röver és mtsai., 1999; Tobin és Paus, 2001); a DP fibroblastok számbeli csökkenését azonban a sejtek CTS-be történő kivándorlása okozza (Tobin és mtsai., 2003).

Érdekes kérdés, hogy melyek azok a molekulák, amelyek részt vehetnek a ciklus beindításában és fenntartásában. Számos növekedési faktorról, citokinről, hormonról és egyéb molekuláról bizonyosodott már be, hogy a hajciklus valamelyik pontján képes beavatkozni ebbe a folyamatba. Már korábban megfigyelték, hogy fontos szabályozási pont a telogén szakasz. A fázis „nyugalmi” jelzője ellenére igen sokrétű regulatórikus folyamat zajlik ekkor, ami továbbvezet egy új anagén növekedési fázis felé (Chase, 1954; Paus és mtsai., 1990 és

1999; Stenn és Paus, 2001). Jónéhány olyan faktor ismeretes, ami közvetlenül képes az anagén fázisban lévő szőrtüszők befolyásolására. A teljesség igénye nélkül példaként szolgálhatnak a hepatocita növekedési faktor (HGF), az inzulin-szerű növekedési faktor-1 (IGF1), az őssejt faktor (SCF) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), amelyek a hajciklus pozitív regulátoraiként az anagén meghosszabítását idézik elő (Philpott és mtsai., 1990 és 1994; Lindner és mtsai., 2000; Botchkareva és mtsai., 2001; Yano és mtsai., 2001). Ezzel szemben a fibroblast növekedési faktor-5 (FGF5), az interferon- γ (IFN- γ), az interleukin-1 β (IL-1 β), a transzformáló növekedési faktor- β_1 (TGF β_1), a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), a neurotrofin-3 és -4 (NT-3 és -4), valamint az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) és bizonyos citokinek a katagén fázis kialakításában vesznek részt (negatív regulátorok) (Hébert és mtsai., 1994; Philpott és mtsai., 1996; Botchkarev és mtsai., 1998a és 1998b; Botchkareva és mtsai., 1999 és 2001; Foitzik és mtsai., 2000). Érdemes kiemelni a TGF β_2 szerepét a ciklus során. Ezen növekedési faktort már korábban leírták a szőrtüsző morfogenezisében, mint a fejlődést elősegítő kulcsmolekulát (Foitzik és mtsai., 1999). Az is kiderül ugyanakkor, hogy a későbbi hajciklusok során a katagén regresszió beindulását idézi elő (Soma és mtsai., 2002), tehát amíg a TGF β_2 a szőrtüsző morfogenezise során a folliculus fejlődését, növekedését segíti elő, addig a későbbi hajciklusok alatt megakadályozza ezen folyamatokat.

A szőrtüsző, mint „önálló” neuroendokrin rendszer?

A legújabb kutatások szerint a szőrtüsző kiemelkedő célszövege a legtöbb jelentős hormonális útvonalnak is. Többek között nemi hormonok, retinoidok, glükokortikoidok, pajzsmirigyhormonok, adrenokortikotróp hormon (ACTH), kortikotropin felszabadító hormon (CRH), melanokortinok, D3-vitamin, inzulin, prolaktin, P-anyag, melatonin, acetyl-kolin, endovanilloidok, endokannabinoidok, katekolaminok és prosztaglandinok (Deplewski és

Rosenfield, 2000; Slominski és Wortsman, 2000; Zouboulis és mtsai., 2002 és 2007; Philp és mtsai., 2004a és 2004b; Bodó és mtsai., 2005; Kobayashi és mtsai., 2005; Slominski, 2005; Foitzik és mtsai., 2006; Ohnemus és mtsai., 2006; Peters és mtsai., 2006; Colombe és mtsai., 2007 és 2008; Hasse és mtsai., 2007; Telek és mtsai., 2007) képesek befolyásolni a szőrtüsző alapvető biológiai folyamatait; azaz módosítják a növekedést, a hajciklust, a pigmentációt és a szőrszál kialakulását, továbbá növekedési faktorok, citokinek és hormonok termelését, felszabadulását idézik elő.

Kiderült az is, hogy maga a piloszebáceus egység, mint nem-klasszikus, perifériás hormontermelő terület az ismert szteroid hormonok, neuropeptidek és neurotrofinok egy meglepően széles skáláját képes előállítani (Botchkarev és mtsai., 2004; Bodó és mtsai., 2007). Mindemellett érzékeny célszervei és termelői a stresszválasz mediátorainak is, melyek elsősorban gátolják a szőrszál növekedését, valamint elősegítik a korai katagén regressziót és a szőrtüsző immunfolyamatait is képesek befolyásolni (pl. CTS hízósejt degranuláció, Slominski és mtsai., 2000; Arck és mtsai., 2006; Peters és mtsai., 2007).

Végül, de nem utolsó sorban a szőrtüsző egy teljes mértékben működőképes perifériás hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengellyel rendelkezik, ugyanis kimutatták a központi hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyre jellemző szabályozó visszacsatolási hurkok jelenlétét (CRH, ACTH és kortizol) (Ito és mtsai., 2004 és 2005; Krause és Foitzik, 2006; Paus és mtsai., 2006; Slominski és mtsai., 2007). Mindezek alapján nem túlzás kijelenteni, hogy a piloszebáceus egység egy aktív, autoregulált (neuro-) endokrin szervnek tekinthető.

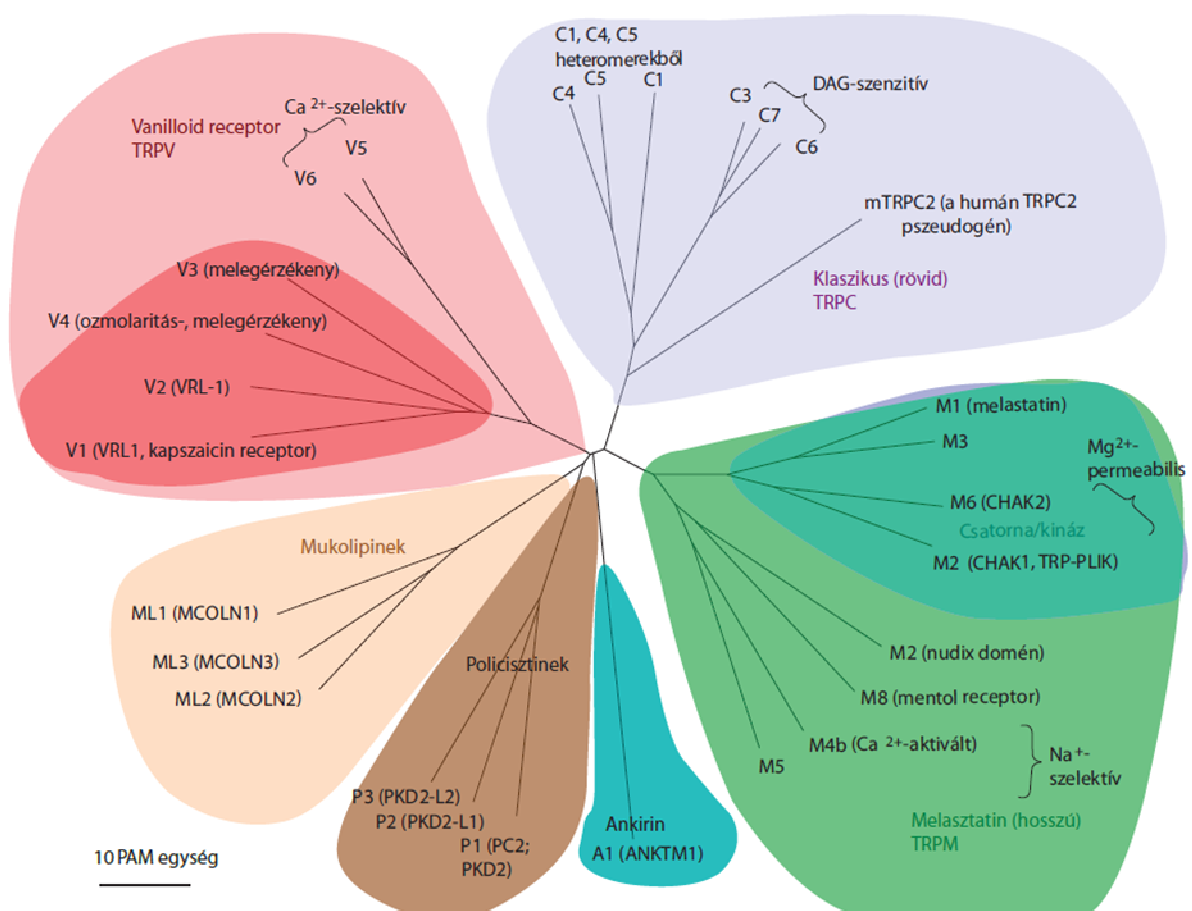
A tranziens receptor potenciál (TRP) ioncsatorna család

A cellularis szenzorként ismert TRP „szupercsaládba” tartozó molekulák nagyfokú homológiát mutatnak a *Drosophila melanogaster* retinájában található fotoreceptorként

funkcionáló TRP, azaz tranziens receptor potenciál fehérjével, amely a csoport névadó tagja lett (Clapham, 2003; Clapham és mtsai., 2003). A *Drosophila trp* gén klónozása óta (Montell és Rubin, 1989) már több mint 30 TRP csatornát írtak le, melyek nagy része emlősökben is expresszálódik.

A TRP csatornák az érzőrendszer fontos elemei, fizikai és kémiai változásokat érzékelő szenzorként működnek a sejtek külső és belső membránjaiban egyaránt. A TRP csatornák széleskörű funkciói közé tartozik például a hőmérséklet, az ozmolaritás és a folyadékáramlás érzékelése, valamint a transzeptitiliális Ca^{2+} és Mg^{2+} transzport, de emellett kiemelt szereppel bírnak a feromonok, ártalmas kémiai anyagok és a különféle ízek (édes, keserű, umami) érzékelésében is (Clapham, 2003; Huang, 2004).

A TRP „szupercsalád” tagjai aminosav szekvenciájuk és strukturális hasonlóságaik



3. ábra: Az emlős TRP receptorok családfája Clapham (2003) munkája alapján

Az evolúciós ágak hossza PAM egységben van megadva, ami az átlagos szubsztitúciók száma 100 aminosavra vonatkoztatva (Dayhoff és mtsai., 1978). DAG: diacilglicerol, PLIK: kináz domén.

alapján alcsaládokba sorolhatók (**3. ábra**). A klasszikus (TRPC) családba a *Drosophila* TRP-vel legnagyobb homológiát mutató receptorok tartoznak, melyek mindegyike G-proteinkapcsolt és tirozin kináz receptorok hatására aktiválódhat. A TRPV család a kapszaicin szenzitív vanilloid receptor-1-ről (TRPV1) kapta nevét. A TRPM család nevét adó fehérje a melasztatin (TRPM1), amiről először azt figyelték meg, hogy metasztatikus melanómasejtekben lecsökkent expressziót mutat a nem-metasztatikusakhoz képest. Külön családba sorolták a „mentol receptorral” (TRPM8) nagy homológiát mutató, és ankirin-szerű doméneket nagy számban tartalmazó TRPA1 fehérjét, ami a fájdalmas hideg érzékelésében vesz részt. Emellett a TRP szupercsaládhoz tartoznak még a policisztás vesebetegség kialakulásáért felelős policisztinek (TRPP) és az intracelluláris vezikulákhoz köthető mukolipinek (TRPML) is (Benham és mtsai., 2002; Clapham, 2003; Clapham és mtsai., 2003; Huang, 2004; Pedersen és mtsai., 2005; Nilius, 2007).

A TRP szupercsalád tagjainak sokszínűségük ellenére igen sok a közös vonásuk. A csatornafehérjék szerkezetére jellemző, hogy mindannyian hat transzmembrán doménnel rendelkeznek és homo- vagy heterotetramer formában kationpermeábilis pórust képeznek az 5. és 6. transzmembrán domén között található pórusformáló hurok révén (Clapham, 2003). Az amino- és karboxi terminális régiók citoplazmatikusan helyezkednek el. Az N-terminálison több család esetében 33 aminosavból álló ankirinkötő helyek találhatók, melyek fehérje-fehérje interakciókat mediálhatnak és akár citoskeletális horgonyként is szolgálhatnak. A C-terminálison található szabályozási pont a 25 aminosavból álló TRP domén, vagy más néven kináz vagy foszfatáz domén is számos családtagra jellemző (Huang, 2004).

A hőérzékeny TRP csatornák

A hőhatásokra aktiválódó TRP proteinek alkotják az úgynevezett hőérzékeny TRP („termo-TRP”) csatornák családját (Moran és mtsai., 2004). Elsőként a csípőspaprika

alkaloidjával, a kapszaicinnal aktiválható TRPV1-et (korábbi nevén vanilloid receptor-1, VR1) fedezték fel. Annak ellenére, hogy egy, a kapszaicinre reagáló specifikus molekula jelenlétét már az 1960-as években megjósolták (Jancsó és mtsai., 1967 és 1968), a receptor klónozására és molekuláris karakterizálására még hosszú évtizedekig kellett várni (Caterina és mtsai., 1997). A kapszaicinen kívül a TRPV1 aktivátora a 43°C feletti hőhatás és az alacsony pH ($\leq$ pH 5,9), de számos gyulladásos, fájdalmat kiváltó mediátor is fokozza az érzékenységet; így a TRPV1 a fájdalomérzés egyik központi integrátor molekulájának tekinthető (Caterina és Julius, 2001).

Újabb kutatások egyre több rokon szerkezetű peptidet írtak le, melyek kapszaicinnal nem aktiválhatók, viszont szintén hőérzékenyek (Moran és mtsai., 2004). Az első ilyen rokon fehérje az akkor még vanilloid receptor-szerű fehérje-1-ként (VRL1) azonosított TRPV2 volt, ami fájdalmas hőre ($>52^{\circ}\text{C}$) aktiválódik. Ezt követte a fiziológiás hőmérsékleti tartomány ($31-39^{\circ}\text{C}$) szenzora, a TRPV3 (Peier és mtsai, 2002; Smith és mtsai, 2002), majd a 25°C felett aktiválódó TRPV4 (Watanabe és mtsai., 2002). Ezeken kívül más TRP családba tartozó fehérjék is mutatnak hőérzékenységet, mint a hidegérzékeny ($8-28^{\circ}\text{C}$) TRPM8 és a fájdalmasan hideg ($<17^{\circ}\text{C}$) hőhatásokat detektálni képes TRPA1 (**4. ábra**) (Huang és mtsai., 2006).

Az utóbbi évek kutatásai során derült fény arra, hogy a TRP család hőérzékeny tagjai nemcsak a hőérzékelésben vesznek részt, hanem olyan, ugyancsak a bőrből kiinduló folyamatokban is, mint például a fájdalom és a viszketés érzékelése. Számos TRP csatornát vizsgálva kimutatták továbbá, hogy ezen „celluláris szenzorok” nemcsak neuronokon, hanem más nem-neurális sejtfeleségeken is kifejeződnek, mint például glióma sejtek (Bíró és mtsai., 1998), thymocyták (Amantini és mtsai., 2004), prosztata tumor sejtvonalak (Sanchez és mtsai., 2006) vagy bronhiális epitel sejtek (Veronesi és mtsai., 1999). Mivel a bőrben, a szenzoros neuronok szomszédságában, számos nem-neuronális sejtípus található, mindezen

adatok olyan kísérletsorozatokat indítottak el, melyek a termo-TRP csatornáknak a bőr sejtjeiben való vizsgálatát célozták meg.

A TRPV csatornák és a bőr kapcsolata

Munkacsoportunk korábbi munkái során bebizonyosodott, hogy a TRPV1 a humán bőr számos sejtfeleségén expresszálódik (Bodó és mtsai., 2004). Sikerrel igazoltuk a molekula jelenlétét humán epidermális keratinocytákon, Langerhans-sejteken, dermális hízósejteken, valamint a bőrfüggelékek (szőrtüsző, faggyúmirigy, verejtékmirigy) bizonyos sejtjein. Kimutattuk továbbá, hogy a TRPV1 központi szereppel bír a humán és egér hajciklus negatív szabályozásában, azaz az apoptózissal jellemezhető katagén fázis beindításában (Bodó és mtsai., 2005; Bíró és mtsai., 2006), valamint gátolja az epidermális keratinocyták növekedését és a faggyúmirigy sebocytáinak meghatározó folyamatait (faggyú- és citokintermelés) (Tóth és mtsai., 2009).

A vanilloid TRP család egy másik tagja, a TRPV4 szintén expresszálódik bőrben, főként az epidermális keratinocytákon (Chung és mtsai., 2004a és 2004b). Korábban leírták azt is, hogy a molekula – amellet, hogy fiziológias hőhatásra aktiválódik (Watanabe és mtsai., 2002) – szerepet játszik a bőr barrier funkciójának fenntartásában is, mint az epidermális sejtek speciális ozmoreceptora (Denda és mtsai., 2007).

A szőrtüsző vonatkozásában talán a legfontosabb molekula mégis a TRPV3. A csatorna bőrrel való potenciális kapcsolatát már az is „előrevetítette”, hogy a TRPV3 molekuláris leírása és karakterizálása nem szenzoros neuronokon, hanem keratinocytákon történt (Peier és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2002). BALB/c egértörzsből származó sejtvonalon (Yuspa és mtsai., 1983), valamint a humán *trpv3*-mal transzfektált sejteken kimutatták, hogy 23-36°C között emelve a környezeti hőmérsékletet nem-specifikus kationáram aktiválódik (Xu és mtsai., 2005 és 2006). TRPV3-at overexpresszáló sejteken

emellett megállapították, hogy a TRPV3 olyan, a bőrre kenve kisebb-nagyobb irritációt okozó terpenoidokkal is aktiválható, mint a szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) hatóanyaga, az eugenol; a kakukkfűből (*Thymus serpyllum*) származó thymol; a kámforfából (*Cinnamomum camphora*) izolálható kámfor; valamint az oregánó (*Origanum vulgare*) olajában jelentős mennyiségben megtalálható carvacrol (Moqrich és mtsai., 2005; Xu és mtsai., 2006). Bőr eredetű sejteken vizsgálva a TRPV3-at emellett leírták első szintetikus agonistáját, a 2-aminoetoxidifenil borátot (2-APB) is (Chung és mtsai., 2004a).

A legizgalmasabb eredményre ugyanakkor a TRPV3 funkcióját elemző állatkísérletek vezettek. Bizonyos szőrtelen rágcsláló törzsek (DS-*Nh* egér és WBN/Kob-Ht patkány) vizsgálatakor kiderült ugyanis, hogy ezen állatok szőrtelen (*Nh* – no hair, *Ht* – hairless type) fenotípusát a *trpv3* gén kódoló régiójába eső „*gain-of-function*” (azaz a TRPV3 csatorna fokozott aktivitású válfajának kifejeződését eredményező) mutáció okozza (*Nh*-mutáció: glicin/szerin csere az 573-as pozícióban; *Ht*-mutáció: glicin/cisztein csere az 573-as pozícióban) (Asakawa és mtsai., 2006; Yoshioka és mtsai., 2006; Imura és mtsai., 2007; Xiao és mtsai., 2008). Hisztológiai vizsgálatok kiderítették, hogy a DS-*Nh* egerek szőrtüszői kisebbek voltak és a felszínhez közelebb helyezkedtek el, mint az addigra már látható szőrrel rendelkező vad típusú DS egereké. Megállapították azt is, hogy az említett mutáció jelentősen lecsökkentette a hajciklus szabályozásáért felelős keratin-kapcsolt fehérje (KRTAP) 16-1, 16-3 és 16-9 expresszióját, melyek kifejeződése fiziológias körülmények között az anagén fázis végén emelkedik meg (és így hozzájárulhat az anagén-katagén transzformációhoz). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a TRPV3 mutációja korai anagén fázisban állította meg a szőrnövekedést.

Nemrégiben beszámoltak arról is, hogy különféle proinflammatorikus mediátorok és hormonok (pl. dihidrotesztoszteron) szintén fokozzák a TRPV3 aktivitását, illetve kifejeződésének mértékét (Xu és mtsai., 2006; Jariwala és mtsai., 2007), ezzel együtt azonban

egyáltalán nem rendelkezünk adatokkal a TRPV3 *humán* bőrben betöltött functionális szerepéről annak ellenére sem, hogy a TRPV3 fehérje jelenlétét már leírták *humán* epidermális keratinocytákon is (Gopinath és mtsai., 2005; Facer és mtsai., 2007).

A pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH)

Több mint 100 éve tudjuk, hogy a pajzsmirigyhormonok jelentős hatással vannak az anyagcserére (Magnus-Levy, 1895); a bazális metabolikus ráta meghatározását például sokáig egyedüli technikaként használták a pajzsmirigy állapotának feltérképezésére. A pajzsmirigy hormonok, úgymint a tiroxin (T4) és a 3,5,3'-trijódtironin (T3), az energia-homeosztázis fenntartása mellett több fontos anyagcsere folyamat regulációjában központi jelentőségűek, de kiemelkedő szerepet játszanak számos szövet és szerv növekedésének és differenciálódásának szabályozásában is (Oppenheimer és mtsai., 1987). A pajzsmirigyhormonok elválasztásának szabályozásában alapvető fontosságú a TSH vagy tireotropin, ami az agyalapi mirigy elülső lebenyében, az adenohipofízisben termelődik. A TSH a pajzsmirigy epithel sejtjein kifejeződő specifikus TSH receptoron keresztül képes pozitívan befolyásolni a pajzsmirigyhormonok szintézisét, szekrécióját, valamint a pajzsmirigy follikulusainak méretét és vaszkularizációját (Vassart és Dumont, 1992; Braverman és Utiger, 2005).

A TSH-termelés fő szabályozói a pajzsmirigyhormonok gátló visszacsatolása (Reichlin és Utiger, 1967), valamint a hipotalamusz parvocelluláris rétegének paraventriculáris magjának neuronjaiban termelődő peptidhormon, a tireotropin felszabadító hormon (TRH) stimuláló hatása (Hall és mtsai., 1970). Sokáig elfogadott volt az a nézet, hogy a pajzsmirigyhormonok gátló hatása csak a nukleáris T3 receptoron keresztül valósul meg; a T3 közvetlenül, a T4 pedig elsősorban indirekt módon (T3-má alakulva) fejtik ki hatását. Mára már biztosan tudjuk, hogy a T4 közvetlen útvonalon is képes a TSH expressziót gátolni (Bogazzi és mtsai., 1997). Míg mindkét pajzsmirigyhormon közvetlenül befolyásolja a TSH

termelődést az agyalapi mirigy szintjén, addig a TRH szintézisét és felszabadulását elsősorban a T4-ből a II-es típusú dejodináz segítségével lokálisan képződő T3 szabályozza (Schneider és mtsai., 2001). A TRH önmagában, a pajzsmirigy hormonok jelenlététől vagy hiányától függetlenül is kritikus szerepet tölt be a TSH szintézisének és felszabadításának szabályozásában (Chiamolera és Wondisford, 2009), másrészt a pajzsmirigyhormonokkal kölcsönhatásban képes azok TSH szekréciót gátló hatását potencírozni (Guillemin, 2005).

A TSH szerepe az extratireoidális szövetekben

Az utóbbi években a TSH receptor jelenlétét számos szövetben mutatták ki, mint például az agyban, a herében, a vesében, a szívben, a csontokban, a csecsemőmirigyben, valamint limphocytákban, zsírszövetben és fibroblastokon is (Davies és mtsai., 2002).

Ezek közül az egyik legjobban tanulmányozott példa a zsírszövet (Bell és mtsai., 2000; Sorisky és mtsai., 2000). Az már régóta ismeretes, hogy pajzsmirigy alulműködés esetén súlygyarapodás, túlműködés esetén pedig a pajzsmirigyhormonok hatására megnövekedő lipolízisnek köszönhetően súlyvesztés lép fel (Kennelly és Maynard, 1953). Az utóbbi évek kutatásai során kiderült, hogy a TSH közvetlenül szerepet játszik a humán fibroblastok preadipocytákká, majd érett zsírsejtekké történő differenciációjában a fehér és barna zsírszövetben egyaránt (Bell és mtsai., 2000; Murakami és mtsai., 2001). Sőt a Grave- Basedow kórban megfigyelhető exophthalmus kialakulásában is központi szerepet játszik a TSH receptor, mivel stimulációja aktiválja az adipogenezis korai szakaszát, de gátolja a terminális differenciálódást a szemkörüli zsírszövetben (Garrity és Bahn, 2006; Zhang és mtsai., 2006).

A pajzsmirigyhormonok és a szőrnövekedés

Évtizedek óta ismert, hogy a pajzsmirigy-rendellenességek (mind emelkedett, mind csökkent szérum pajzsmirigyhormon-szint esetén) összefüggésbe hozhatóak az emberi bőr és haj szerkezetét, valamint funkcióját érintő elváltozásokkal (Freinkel és Freinkel, 1972; Messenger, 2000; Leonhardt és Heymann, 2002; Safer, 2005a és 2005b). Számos klinikai és *in vitro* megfigyelés számol be például magasabb telogén arányról (Freinkel és Freinkel, 1972), megváltozott szőrszálmérőről (Jackson és mtsai., 1972), száraz, rideg, durva hajszálról (Safer, 2005a), lecsökkent hajhagyma sejtproliferációról (Schell és mtsai., 1991) és hajhullásról (effluvium/alopecia) pajzsmirigy-alulműködés esetén, valamint emelkedett sejtproliferációról a bulbusban (Schell és mtsai., 1991) és hajhullásról pajzsmirigy-túlműködés során (Safer, 2005b).

Mindemellett a tenyésztett humán szőrtüsző keratinocyták és DP fibroblastok egyaránt expresszálnak TSH receptor mRNS-t *in vitro* (Slominski és mtsai., 2002), és a normál emberi bőr fibroblastok is kifejeznek bizonyítottan funkcionális TSH receptort *in vitro* (Agretti és mtsai., 2005). Mivel a pajzsmirigy rendellenességek jellegzetesen nagy szérum TSH szint ingadozással járnak (Braverman és Utiger, 2005), különösen érdekes lehet a TSH emberi hajnövekedésre kifejtett közvetlen hatásainak tanulmányozása.

Célkitűzések

Jelen munkánk célja az volt, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a szőrtüsző biológiai folyamatainak regulációjába az alábbi két kérdéskörben:

1. Amint azt korábban bemutattuk, bizonyos TRPV3 mutációval rendelkező egerekben a folyamatosan aktív, mutáns TRPV3 csatorna szőrtelen fenotípus kialakulását okozta (Asakawa és mtsai., 2006). Mindezidáig azonban nem volt ismeretünk arról, hogy humán

szőrtüszőkben jelen van-e a TRPV3, illetve ha igen, akkor milyen biológiai szereppel bírhat. Ennek megismerése érdekében kísérleteink első felében az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- A TRPV3 kifejeződésének vizsgálata humán szőrtüszőkön, illetve szőrtüsző eredetű ORS keratinocita tenyészetekben (mRNS és fehérje szinten).
- A TRPV3 aktiváció hatásainak vizsgálata az izolált humán szőrtüszők biológiai folyamataira *in vitro* (hossznövekedés, a proliferáló és apoptotizáló sejtek aránya, anagén-katagén átmenet).
- A TRPV3 aktiváció hatásainak vizsgálata szőrtüsző eredetű primer ORS keratinocita tenyészet biológiai folyamataira *in vitro* (csatornafunkció, proliferáció, sejthalál; specifitás igazolása: RNSi technika).

2. Az utóbbi években számos hormonális jelátviteli útvonal jelenlétét vizsgálták humán szőrtüszőkben. Jelen munkánk második felében a TSH közvetlen hatásait vizsgáltuk a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában. Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

- A TSH receptor kifejeződésének vizsgálata humán fejbőrön és izolált szőrtüszőkön (mRNS és fehérje szinten).
- A TSH kezelés hatásainak vizsgálata izolált humán szőrtüszők biológiai folyamataira *in vitro* (hossznövekedés, a proliferáló és apoptotizáló sejtek aránya, anagén-katagén átmenet, pigmentáció).
- A TSH receptorhoz kapcsolódó jelátviteli folyamatok azonosítása izolált humán szőrtüszőkön és szőrtüsző eredetű DP fibroblastokon *in vitro* (cAMP felszabadulás vizsgálata, TSH receptor aktiváció célgénjeinek azonosítása).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

A kísérleteink során használt anyagokból ezerszeres töménységű törzsoldatokat készítettünk a gyártó leírásainak alapján. Ennek megfelelően dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk az eugenolt, a carvacrolt, a thymolt és a 2-aminoetoxidifenil borátot (2-APB), és vízben TSH-t (mind Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd a -20°C -on tárolt törzsoldatokból közvetlenül a kezelések előtt készítettük el a szükséges végkoncentrációkat, a megfelelő törzsoldatot tenyésztő oldatban, illetve Ca^{2+} -imaging esetén Hank oldatban 1:1000 arányban hígítva. Így az oldószer koncentrációja a kezelések folyamán minden esetben 0,1% volt. A kísérletek során kontrollként az önmagában alkalmazott oldószer azonos hígítását használtuk.

Humán szőrtüszők izolálása és tenyésztése

A funkcionális kísérleteink alapjául szolgáló hajfollikulusokat plasztikai sebészeti operációk során visszamaradt, halánték- (női „face lift”) és tarkótájékról (férfi hajtranszplantáció) tájról származó hajas fejbőrből izoláltuk. A telogén fázisú szőrtüszők vizsgálatára gluteális területről származó bőrmintát használtunk, amit szintén kozmetikai célú plasztikai sebészeti beavatkozásból kaptunk. A bőrdarabok többnyire 30-60 éves alanyoktól származtak és azokat a WHO Helsinki Deklarációjának megfelelően használtuk fel. A szőrtüszők eltávolítását és tenyésztését Philpott '90-es években kidolgozott eljárása alapján végeztük (Philpott és mtsai., 1990 és 1994). A hajas fejbőrt elsőként kb. 0,5x1 cm-es szeletekre vágtuk, a bőr felszínével párhuzamosan elmetsettük a dermisz-szubkutisz határ közelében, majd az epidermiszt és a dermiszt eltávolítottuk. A kiálló szőrtüszőket csipesz segítségével kiemeltük a szubkutiszból. Ezt követően az ép, anagén VI növekedési fázisban

levő szőrtüszőket hármassával 24-lyukú tenyésztőedénybe helyeztük. A follikulusok tenyésztését 9 napon keresztül 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában végeztük. A fenntartás során alkalmazott tenyésztőoldatot (Williams' E Medium, Invitrogen, Paisley, Egyesült Királyság) az alábbiakkal egészítettük ki: 2 mM L-glutamin (Invitrogen), 10 ng/ml hidrokortizon (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml inzulin (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml streptomycin (TEVA, Debrecen, Magyarország) és 50 U/ml penicillin (TEVA). A kezeléseket minden második napon az oldatcserék alkalmával hajtottuk végre. A szőrtüszők növekedését egy, az izoláló mikroszkóp okulárjába beépített mikrométer segítségével követtük nyomon (egy-két naponta, egyesével mérve).

A szőrtüszők szövettani előkészítése

A tenyésztés végén a szőrtüszőket Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) történő mosás után fagyasztó mátrixba (Cryochrom Embedding Medium, Thermo Shandon, Pittsburg, PA, USA) ágyasztuk be, majd folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, végül Cryotome-mal (Thermo Shandon) 6-8 µm vastagságú metszeteket készítettünk belőlük. A fagyasztott metszeteket -20°C-on acetonnal 10 percig fixáltuk.

Hisztomorfometriai vizsgálatok, melanintartalom-meghatározás

A hajciklus különböző stádiumainak elkülönítésére hematoxin-eozin festést követően hisztomorfometriai analízist alkalmaztunk. A fagyasztva metszett humán szőrtüszőket a fixálását követően hematoxinba helyeztük 5 percre, majd csapvizes mosást követően 10 percig eozinnal festettük (mindkettő Sigma-Aldrich). Az utolsó mosást követően a fedést

vizes alapú fedőmédiummal (DakoCytomation Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako, Carpinteria, CA, USA) végeztük.

A melanintartalom láthatóvá tételére a Fontana-Masson szövettani eljárást alkalmaztuk. Ennek során a metszeteket etanol-ecetsav 2:1 arányú elegyében 10 percig fixáltuk, majd tris pufferelt sóoldatban (TBS: 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) történő mosást követően 10%-os ezüstnitrát-oldatban 40 percig inkubáltuk 56°C-on, sötétben. Ezután 5%-os nátriumtioszulfát-oldatban tartottuk a metszeteket 1 percig, végül hematoxilinnel magfestést végeztünk (Barbosa és mtsai., 1984).

Proliferáló és apoptotizáló sejtek együttes kimutatása a szőrtüszőben

A tenyésztett szőrtüszőkön a proliferáló és az apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására a Ki-67/TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) kettős festést használtuk. Az eljárás során az osztódó sejtek jelenlétéről a Ki-67 proliferációs marker immunhisztokémiai kimutatása ad felvilágosítást, az apoptotizáló sejtek megjelenítése pedig a DNS-fragmentáció során keletkezett szabad 3' végek jelölésén alapul. A kettős festéshez a fagyasztott metszeteket 1%-os paraformaldehidben, majd etanol-ecetsav 2:1 arányú oldatában fixáltuk. Első lépésként a metszeteket Reakciópuffer – Terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT) enzim (mindkettő ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit, Invitrogen) 70:30 arányú elegyével inkubáltuk 37°C-on 60 percen keresztül, mely során a TdT enzim a reakciópufferben található digoxigenin-jelölt nukleotidokat az apoptotikusan fragmentált DNS 3'-OH végeihez kapcsolta. A reakció leállítását és 10%-os normál kecske szérumos (Dako, PBS-ben hígítva) blokkolását követően a metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk egérben termeltetett Ki-67 ellenes antitesttel (1:20 Dako, 2% normál kecske szérumot tartalmazó PBS-ben hígítva). Utolsó lépésként a digoxigenin-jelölt DNS-fragmentumokhoz FITC-konjugált, digoxigenin-ellenes antitestet kapcsoltunk (TUNEL kit), a

Ki-67 ellenes antitesthez pedig Texas-vörössel jelölt egér IgG F_C szakasza elleni kecskében termeltetett IgG-t (1:200, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 2% normál kecske normál szérumot tartalmazó PBS-ben hígítva) kötöttünk. Végül 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) magfestőt tartalmazó fedőmédiummal (Vector, Burlingame, CA, USA) lefedtük a tárgylemezeket. A festés során negatív kontrollként a TdT enzimreakció, illetve a Ki-67 ellenes antitest elhagyása szolgált.

Külső gyökérhüvely (ORS) és HaCaT keratinocyták tenyésztése

Az ORS keratinocytaikat anagén VI folliculusokból nyertük, melyeket egy csipesz segítségével a szemöldök területéről távolítottunk el (Limat és Noser, 1986, Limat és mtsai., 1989). A csoportonként 20-30 eltávolított szőrtüszőt háromszor mostuk steril PBS-ben, majd egy órán át 0,1% tripszin-0,2% EDTA (mindkettő Invitrogen) oldatban emésztettük 37°C-on. Az emésztőoldatot 10% embrionális borjúsérumot (FBS, Sigma-Aldrich) tartalmazó oldattal inaktiváltuk, majd a sejtszuspenziót többször trituráltuk. Végezetül 10 percig 1.000 fordulat/perc sebességen centrifugáltuk, és az így nyert ORS sejteket 0,4 µg/ml mitomycin-C (Sigma-Aldrich) oldattal egy éjszakán át előkezelt (osztódásában gátolt) humán dermalis fibroblast (HDF) tápláló sejtrétegre szélesztettük. A tenyésztés Ham's F12 és Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatok (mindkettő Invitrogen) 1:3 arányú keverékében történt, mely a következő anyagokat tartalmazta kiegészítésként: 10% Fetal Clone II (HyClone, Thermo Shandon), 0,1 nM koleratoxin, 5 µg/ml inzulin, 0,4 µg/ml hidrokortizon, 2,43 µg/ml adenin, 2 nM T3, 10 ng/ml epidermális növekedési faktor, 1 mM aszkorbil-2-foszfát (mind Sigma-Aldrich) és antibiotikumok (50 U/ml penicillin és 50 µg/ml streptomycin, TEVA).

A HaCaT keratinocytaikat 10% FBS-t, és a fent említett antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's tenyésztőoldatban (DMEM, Invitrogen) tenyésztettük.

Dermális papilla (DP) eredetű primer fibroblast tenyészet létrehozása

A DP fibroblast tenyészet kialakításához frissen izolált anagén VI szőrtüszőket alkalmaztunk Magerl és mtsai. (2002) munkája alapján. Az eljárás során az izolált szőrtüszőt hossz tengelyével párhuzamosan tartva, a bulbus fölötti régiónál csipesszel enyhén megszorítottuk, majd egy hegyes szikével a kötőszövetes tok proximális végét átvágtuk. Ennek köszönhetően szabaddá vált az intakt DP, amit egy csipesz segítségével 35 mm-es Petri-csészében gyűjtöttük, és megfelelő tenyésztőoldatban (Follikuláris DP Sejt Médium kiegészítve: 4% FBS, 5 µg/ml inzulin, 1 ng/ml FGF; mind PromoCell, Heidelberg, Németország) tartottuk, míg a DP fibroblast sejtek kinőttek a DP-ból. Az így nyert primer DP fibroblast sejtek 1-2 passzálását követően végeztük el kísérleteinket.

Szemikvantitatív reverztranszkriptáz PCR (RT-PCR) és termék szekvencia analízis

Első lépésként teljes RNS frakciót izoláltunk tenyésztett szőrtüszőkből RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével, majd az izolált RNS frakció 0,5 µg-jának reverz transzkripcióját hajtottuk végre SuperScript reverz transzkriptáz (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével a gyártó leírásának megfelelően. Az így kapott cDNS-t használtuk fel a következőkben leírt polimeráz láncreakciók (PCR) templátjaként. A TSH receptor esetében a forward primer: 5'-ATG AGG CGA TTT CGG AGG ATG GA-3', a reverz primer: 5'-ATG CAT GAC TTG GAA TAG TTC TC-3' (MWG Biotech, Ebersberg, Németország), hőprofil: 94°C 2 perc (p), 40 ciklus 94°C 30 másodperc (mp), 50°C 30 mp, 68°C 30 mp. A TSH receptor PCR elemzésének standardizálásához használt G6PDH háztartási gén esetében: a forward és reverz primer (Roche, Mannheim, Németország) nem nyilvános, hőprofil: 94°C 2 p, 40 ciklus 94°C 30 mp, 58°C 30 mp, 68°C 30 mp. A tireoglobulin (TG) esetében a forward primer: 5'-CCG CCG TCA TCA GCC ATG AG-3', a reverz primer: 5'-TGA GTC CTC GCC ACC CAG AGA A-3' (Integrated DNA Technology

Inc, Corallville, IA, USA), hőprofil: 95°C 2,5 p, 35 ciklus 94°C 30 mp, 64°C 30 mp, 72°C 30 mp, végül 72°C 5p. A pajzsmirigy transzkripció faktor-1 (TTF-1) esetében a forward primer: 5'- CAG TGT CTG ACA TCT TGA GT-3' , a reverz primer: 5'-AGC GCT GTT CCG CAT GGT GT-3' (Integrated DNA Technology Inc.), hőprofil: 95°C 2,5 p, 30 ciklus 94°C 30 mp, 58°C 30 mp, 72°C 30 mp, végül 72°C 5p. Az utóbbi két esetben 18S riboszómális RNS-t alkalmaztunk belső kontrollként, ebben az esetben a forward primer: 5'- TTC GGA ACT GAG GCC ATG AT-3', a reverz primer: 5'-TTT CGC TCT GGT CCG TCT TG, TG-3'(Integrated DNA Technology Inc.), hőprofil: 95°C 2,5 p, 25 ciklus 94°C 30 mp, 60°C 30 mp, 72°C 30 mp, végül 72°C 5p. A PCR termékeket etidium-bromidot tartalmazó 0,7%-os (TSH receptor) és 2%-os (TG, TTF-1) agaróz gélen választottuk el, majd a lefotózott sávokat ImageJ szoftver (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) segítségével elemeztük. A TG expresszió mértékét az ugyanazon mintában mért 18S RNS-re normalizálva adtuk meg, pozitív kontrollként agymintát használtunk. A negatív kontrollok az RNS elhagyásával készültek (nontemplát kontroll).

A TG cDNS amplifikációjának specificitását olvadási görbe analízissel, Light Cycler (Roche) segítségével vizsgáltuk. Emellett elvégeztük a TG cDNS szekvencia elemzését is dideoxy módszerrel a korábban használt forward és reverz primerekkel egyaránt 377 DNA szekvencia analízáló készülékkel (Applied Biosystems) (Sanger, 1981).

Microarray analízis

A microarray alapú génexpresszió analízishez két egyéntől származó szőrtüsző minták kerültek felhasználásra Human Whole Genome Oligo Microarray® (44K) chip-en. A vizsgálatot a Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch-Gladbach, Németország) végezte. A frissen izolált szőrtüszőket 24 órán keresztül kezeltük 100 mU/ml TSH-val és vivőanyaggal, majd teljes RNS frakciót izoláltunk TRIzol reagens (Invitrogen) segítségével. A kinyert RNS

minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) segítségével határozták meg. Ezt követően a teljes RNS 150 ng-jának lineáris amplifikációját követően Cy3- és Cy5-festékekkel jelölték a kontroll és kezelt mintákból származó RNS mintákat. Végül az említett microarray chipre hibridizált, jelölt mintákat az Agilent's Microarray Scanner (Agilent) chip-olvasóval szkennelték.

A célgének kiválasztása az alábbi kritériumok alapján történt: a mindkét egyénben megfigyelhető, azonos irányú, minimum 1,5-szeres változásokat $p < 0,0001$ esetben tekintettük szignifikáns expresszió-változásnak. A microarray vizsgálatok alapján kiválasztott célgének expresszióváltozásának megerősítésére q-PCR analízist is végeztünk egy újabb donorból nyert kontroll és 100 mU/ml TSH-val kezelt szőrtüszők, valamint DP fibroblastok segítségével.

RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív PCR (q-PCR)

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagens (Invitrogen) felhasználásával izoláltuk. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk 15 U AMV reverz transzkriptázt (Promega, Madison, WI, USA) és 0,025 µg/µl random primert (Promega) felhasználva. Az így előállított cDNS-ből kvantitatív polimeráz láncreakció (q-PCR) segítségével TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol (Applied Biosystems) alapján mutattuk ki a következőkben felsorolt transzkripteket TaqMan primerek és próbák alkalmazásával. A génexpresszió relatív mennyiségét a ΔCT módszerrel (Applied Biosystems) határoztuk meg. A q-PCR kísérleteket ABI Prism 7000 készüléken (Applied Biosystems) végeztük el. Kísérleteink során az egyes transzkriptek kimutatására az alábbi TaqMan Gene Expression Assay-eket (Applied Biosystems) alkalmaztuk: TRPV3 (azonosító Hs00376854_m1), kötőszöveti növekedési faktor (CTGF, azonosító Hs00170014_m1),

glutathion peroxidáz 3 (GPX3, azonosító Hs00173566_m1), izom típusú piruvát kináz 2 (PKM2, azonosító Hs00987255_m1), citokróm-C oxidáz 1 (MTCO1, azonosító Hs02596864_g1). Belső kontrollként gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH, azonosító Hs99999905_m1), valamint ciklofilin A (PPIA, azonosító Hs99999904_m1) transzkriptjeit határoztuk meg.

Immunhiszto- és citokémia

A TRPV3 kimutatása izolált szőrtüszőkben fluoreszcens immunhisztokémiai módszerrel történt. A fagyasztott metszeteket acetonnal fixáltuk (5 perc, -20°C), majd 5% borjú szérum albumint (BSA, Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldattal szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, ami az elsődleges antitest nem-specifikus kötődésének gátlására szolgált. A metszeteket az elsődleges TRPV3 ellenes antitesttel (**2. táblázat**) egy éjszakán át 4°C -on inkubáltuk. PBS-sel történő mosást követően Alexa Fluor 488 festékkel konjugált, nyúl IgG F_C szakasz elleni kecskében termeltetett másodlagos antitesttel (1:500, Invitrogen) szobahőmérsékleten végeztük a jelölést egy órás inkubációs idővel. Magfestőként DAPI-t (Vector) alkalmaztunk. A reakció specificitásának ellenőrzése blokkoló peptiddel (AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság), és/vagy az elsődleges antitest elhagyásával történt.

A TRPV3 és keratin 7 (KRT7) ORS keratinocytaikon történő immuncitokémiai kimutatásához a fedőlemezre szélesztett sejteket az előbbiekhöz hasonlóan acetonnal fixáltuk, majd PBS oldattal mostuk, és 5% BSA-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk (30 perc, szobahőmérséklet). Ezt követően a sejteket nyúlban termeltetett TRPV3 ellenes elsődleges antitesttel (**2. táblázat**) – és vele párhuzamosan – egérben termeltetett KRT7 ellenes antitesttel (**2. táblázat**) egy éjszakán keresztül 4°C -on inkubáltuk. Fluoreszcens mikroszkópiához a metszeteket 60 percig szobahőmérsékleten Alexa Fluor 488-cal konjugált kecskében termeltetett nyúl IgG F_C szakasz ellenes másodlagos antitesttel (1:500-os hígítás

PBS-ben) (Invitrogen), valamint Alexa Fluor 568-cal konjugált kecskében termeltetett egér IgG F_C szakasz ellenes másodlagos antitesttel (1:500-os hígítás PBS-ben) inkubáltuk. A sejtmagokat DAPI festés (Vector) segítségével tettük láthatóvá.

<i>Célfehérje</i>	<i>Eredet</i>	<i>Faj</i>	<i>Hígítás</i>	<i>Módszer</i>
ACTA2 (SMA, Skalli és mtsai., 1986)	Sigma-Aldrich,	egér	1:50	ABC
CD90	Dianova, Hamburg, Németország	egér	1:100	F-ICC
KRT5 (Langbein és mtsai., 2005)	PROGEN, Heidelberg, Németország	tengerimalac	1:500	ABC
KRT7	Novus Biologicals, Cambridge, Egyesült Királyság	egér	1:100	F-ICC
Ki-67	DAKO, Glostrup, Dánia	egér	1:20	direkt F-IHC
MTCO1	Mitosciences, Eugene, OR, USA	egér	1:50, 1:50	ABC, F-ICC
TRPV3	AbCam	nyúl	1:200	indirekt F-IHC, F-ICC
TSH receptor (Costagliola és mtsai., 1998)	InVivo BioTech Services, Henningsdorf, Németország	egér	1:200, 1:1000, 1: 100, 1:100	ABC, TSA, indirekt F-IHC, F-ICC

2. táblázat: Az immunjelölések során felhasznált elsődleges antitestek

Alkamazott módszerek rövidítései: ABC: avidin-biotin komplex, F-ICC: fluoreszcens immuncitokémia, F-IHC: fluoreszcens immunhisztokémia, TSA: tiramid szubsztrát amplifikáció.

A TSH receptor, a simaizom α 2-aktin (ACTA2), az MTCO1 és a keratin 5 (KRT5) proteinek immunhisztokémiai kimutatásához peroxidáz alapú avidin-biotin-komplexet (Vectastain ABC Kit; Vector) alkalmaztunk. Vizsgálatainkat plasztikai műtétek során nyert normál humán bőrmintákból és izolált szőrtüszőkből fagyasztva metszéssel készített 8 μ m vastag metszeteken végeztük, amelyeket acetonnal fixáltunk (5 perc, -20°C). A szövetben előforduló endogén peroxidázok gátlására a metszeteket 0,5% H₂O₂-ot tartalmazó metanollal kezeltük, majd 10% normál kecske szérumot tartalmazó PBS-ben (Sigma-Aldrich) inkubáltuk, hogy gátoljuk az elsődleges antitest nem-specifikus kötődését. A metszeteket a **2. táblázatban** felsorolt elsődleges antitestekkel egy éjszakán át 4°C -on inkubáltuk, amit az

elsődleges antitestnek megfelelően immunizált (egér illetve tengerimalac IgG F_C alegység ellenes) kecskéből származó, biotinilált másodlagos antitest (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories) hozzáadása követett. A streptavidin-konjugált torna-peroxidáz (Vectastain ABC Kit, Vector) biotinhoz való kötődése után a peroxidáz-aktivitás kimutatására peroxidáz szubsztrát kitet (AEC Peroxidase Substrate Kit, Vector) alkalmaztunk. A magfestéshez hematoxilint (Sigma-Aldrich) használtunk. A reakció specificitásának ellenőrzésére a TSH receptor immunhisztokémiai kimutatásánál pozitív kontrollként fagyasztva metszett pajzsmirigy mintát használtunk, valamint a belső negatív kontroll mellett az elsődleges antitest elhagyását is alkalmaztuk. Az ACTA és a KRT5 esetében pozitív kontrollként emberi bőrmintát használtunk, mivel az ACTA-t a vérerek és az verejtékmirigyek mioepiteliális sejtjei (Schon és mtsai., 1999; Scofield és mtsai., 2005), a KRT5-t pedig a bazális réteg epidermális sejtjei, valamint a külső gyökérhüvely keratinocyták (Langbein és mtsai., 2005) expresszálják.

Az izolált szőrtüszők TSH kezelés hatására megfigyelhető TSH receptor expresszióváltozásának kimutatásához tiramid szubsztrát amplifikációs (TSA) módszert alkalmaztunk. A TSA eljárás során az endogén peroxidázok gátlását (3% H₂O₂ PBS-ben, 15 perc) követően a nem-specifikus kötődéseket 10% normál kecske szérummal (TBS-ben) blokkoltuk. Az elsődleges TSH receptor-ellenes antitesttel (**2. táblázat**) egy éjszakán át (4°C), majd a biotinilált másodlagos egér IgG F_C szakasz ellenes kecske IgG-vel (1:200, Dako) 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat, majd streptavidin-konjugált torna-peroxidázzal (1:100 TNB pufferben, 30 perc, a TSA kit része, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) jelöltük. Utolsó lépésként a metszeteket tiramiddal (1:50 Amplification Diluent-ben, TSA kit, Perkin-Elmer) kezeltük 5 percig. Az eddigiekben felsorolt immunfestések intenzitásának kvantitatív elemzését ImageJ (NIH) szoftver segítségével végeztük el. A

kvantifikálás során csoportonként 20-30 follikulus előre meghatározott, rögzített nagyságú területének intenzitását mértük, majd feltüntettük és összehasonlítottuk azok átlagát.

A TSH receptor immuncitokémiai kimutatásához a DP fibroblastokat 24-lyukú tenyésztőedénybe helyezett steril fedőlemezre szélesztettük, és 60%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük. Acetonos fixálást követően (5 perc, -20°C) a sejteket TBS pufferrel mostuk, majd 10% normál kecske szérumot tartalmazó TBS-sel (Sigma-Aldrich) blokkoltuk. Következő lépésként 2% normál kecske szérumot tartalmazó TBS-ben hígított, egérben TSH receptor ellen termeltetett primer antitesttel (**2. táblázat**) 4°C -on egy éjszakán át inkubáltuk. A másodlagos, kecskében termeltetett, Rodamin vörössel konjugált egér IgG F_C szakasz ellenes antitestet (hígítás: 1:200 TBS-ben, Jackson ImmunoResearch Laboratories) szobahőmérsékleten 60 percig hagytuk a sejteken, végül a sejtmagokat DAPI-val (Vector) tettük láthatóvá.

A fibroblast marker CD90 és az MTCO1 immuncitokémiai kimutatását hasonló jelölési technikákkal hajtottuk végre, amihez egérben termeltetett anti-CD90 és anti-MTCO1 elsődleges antitesteket (**2. táblázat**) alkalmaztunk. A jel láthatóvá tételéhez mindkét esetben kecskében termeltetett FITC konjugált egér IgG F_C szakasz ellenes (1:200 TBS-ben, Vector) másodlagos antitestet használtunk, a magfestő szintén DAPI volt. A negatív kontrollok primer antitestek elhagyásával készültek.

Az immunfestésekről Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokió, Japán) fluoreszcens mikroszkóppal és Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) készültek a felvételek.

Western blot

Az ORS és HaCaT keratinocyták Western blot analízisét a laboratóriumunkban már korábban használt protokollnak megfelelően (Bíró és mtsai., 1998, Boczán és mtsai., 2000)

végeztük. A sejteket lízis pufferben arattuk le (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EGTA, proteáz inhibitor koktél 1:100-ban hígítva, mind a Sigma-Aldrich-tól), majd jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Ezt követően a lizátumok fehérjetartalmát módosított BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg, majd megfelelő hígítást követően (5% β -merkaptoetanol, 10% glicerol, 2% SDS, 62 mM TRIS, 20 mM ditiotritol, 0,002 V/V% brómfenolkék, mind Sigma-Aldrich) a fehérjék denaturálását 10 perces 100°C-on történő főzéssel hajtottuk végre. Az így elkészített mintákból azonos protein mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) 100 V konstans feszültségen. Az elektroforézishez 7,5%-os poliakrilamid gél készítettünk, majd 1-1 mintafelvívó vályúba 60 μ g proteint tartalmazó mintát vittünk fel. Ezt követően a gélből a fehérjét nitrocellulóz membránra (Whatmann, Maidstone, Egyesült Királyság) transzferáltuk, 100 V konstans feszültségen. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben 20 percig blokkoltuk szobahőmérsékleten, majd a vizsgálat során nyúlban termeltetett TRPV3 ellenes antitesttel (AbCam) 1:500 hígításban, 5% tejport tartalmazó PBS-ben inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. Az inkubációt követően a membránt 30 percig mostuk PBST-ben (0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma-Aldrich), majd egy torma peroxidázzal-konjugált nyúl IgG F_C szakasz ellenes másodlagos antitesttel (EnVision labeling, Dako) 60 percen keresztül inkubáltuk. Újabb 3x10 perc PBST-s mosást követően az immunreakciók eredményét kemilumineszcens szubsztrát kit segítségével (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce) tettük láthatóvá, a jeleket Kodak Gel Logic 1500 képalkotó rendszer (Kodak, Tokió, Japán) alkalmazásával detektáltuk. A negatív kontrollok primer antitestek elhagyásával készültek.

Az intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) meghatározása

Az ORS keratinocyta sejteket 20.000 sejt/lyuk sűrűségben 96-lyukú fekete falú, átlátszó aljú edényekbe (Greiner BioOne, Frickenhausen, Németország) osztódásukban gátolt HDF (900 sejt/lyuk) táplálórétegre szélesztettük, majd az edényeket 24 órán át 37°C-on tartottuk ORS keratinocyta tenyésztőoldatban. A mérés napján háromszori Hank oldatos (1% BSA, 2,5 mM Probenecid, 136,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81 mM $MgSO_4$, 1,26 mM $CaCl_2$, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM $NaHCO_3$, pH 7,2, mind Sigma-Aldrich) mosást követően a sejteket 2 μ M kalciumérzékeny fluoreszcens Fluo-4 festék acetoximetilészter formájával (Fluo-4 AM Hank oldatban oldva, Invitrogen) 30 percig inkubáltuk 37°C-on. A Fluo-4 AM-rel feltöltött sejtek Ca^{2+} -jelét FlexStation II³⁸⁴ (FLIPR, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) fluoreszcens microplate reader segítségével mértük. A kinetikai mérések 30. másodpercében a műszerbe épített pipettorfej segítségével automatikusan adagoltuk a sejtekhez a kezelőanyagokat. Az így bekövetkező $[Ca^{2+}]_{IC}$ változásokat 490 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhossz mellett detektáltuk. A számításokhoz négy kísérletben mért eredmények átlagát használtuk, az értékeket $\text{átlag} \pm \text{SE}$ formában tüntettük fel.

Patch-clamp mérés

A patch-clamp mérésekhez az ORS keratinocytákat 10 mm átmérőjű, 0,1 mm vastagságú fedőlemezre szélesztettük, a fedőlemezt 37°C-ra beállított hőmérsékletű perfúziós kamrába, egy Nikon inverz mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük. A mérésekhez Multiclamp-700A (Axon Instruments, Molecular Devices) típusú erősítőt használtunk teljes-sejtes konfigurációban (Hamill és mtsai., 1981). A 2-4 M Ω ellenállású boroszilikát pipettákat 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 5 mM HEPES és 3 mM K-ATP-tartalmú belső oldattal (pH 7,2) töltöttük fel. A fedőlemezeket 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl,

2,5 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glükóz tartalmú külső oldattal (pH 7,4) perfundáltuk. A kezelések során a törzsoldatokat minimum 10.000-szeres hígításban alkalmaztuk. A gigaseal (>1GΩ ellenállás) elérése után enyhe szívás alkalmazásával vagy 1,5 V-os 1 ms-os pulzusokkal hoztuk létre a teljes sejtes konfigurációt. Minden sejt esetében a mért ionáramokat az adott sejt kapacitására normalizáltuk, ennek meghatározásához -10 mV és -20 mV közötti depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. A sejtek átlagos lineáris kapacitása 34,5±2,5 pF-nak adódott, míg a soros ellenállás 5-10 MΩ volt, kompenzációt nem alkalmaztunk. Amennyiben a mérés első 5 percében a mért áramok instabilak vagy magasak voltak, esetleg emelkedett a soros ellenállás, a kísérlet adatait kihagytuk a további elemzésből. Az elektromos jeleket 10 kHz frekvenciával rögzítettük (Digidata 1322A, Axon Instruments), majd az elemzést pClamp 9.0 szoftver (Axon Instruments) segítségével végeztük.

Az életképesség meghatározása

A sejtek növekedését CyQuant sejtproliferációs kit (Invitrogen) segítségével a sejtek DNS tartalmának mérésével határoztuk meg. Az ORS keratinocita sejteket 10.000 sejt/lyuk sűrűségben osztódásukban gátolt HDF (900 sejt/lyuk) táplálórétegre 96-lyukú fekete falú, átlátszó aljú edényekbe (Greiner BioOne, Frickenhausen, Németország) szélesztettük, majd 72 órán keresztül tenyésztettük. A mérés napján a sejtekről a tápoldatot eltávolítottuk, PBS-sel mostuk, majd a maradék mosóoldat eltávolítása után az edényeket lefagyasztottuk. Végül a sejteket tartalmazó edényeket kiolvasztottuk, majd sejtlízis-pufferben oldott CyQuant festékkel (Invitrogen) 5 percig inkubáltuk. A festék fluoreszcenciáját 480 nm-es excitációs és 520 nm-es emissziós hullámhosszon mértük FlexStation II³⁸⁴ (Molecular Devices) spektrofluorométer segítségével. A mért fluoreszcencia arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg. A kontrollhoz viszonyított csökkenés esetén további

vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy csak a proliferáció gátlásáról vagy a sejtek elhalásáról van szó.

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legelső markere (Green és Reed, 1998; Susin és mtsai., 1998). Az ORS keratinocyták mitokondriális membránpotenciálját 24 órás kezelés után MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit-tel (Invitrogen) vizsgáltuk. Az alkalmazott koncentrációban a festék a jelentős membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokban halmozódik fel. Az apoptotikus folyamatok során a sejtek mitokondriális membránpotenciálja csökken, így a bennük felhalmozódó kevesebb festék halmozódik fel bennük, ami fluoreszcenciaintenzitás-csökkenés formájában vizualizálható. Pozitív kontrollként a mitokondriális membránpotenciál csökkenését karbonil-cianid-3-klorofenil-hidrazonnal (CCCP-vel) váltottuk ki, ami az F₀F₁ ATP szintáz funkcionális egységét képes szétkapcsolni (Williams és Dominy, 1990). Az ORS keratinocytákat fekete falú, átlátszó aljú 96-lyukú lemezekben (Greiner Bio-One) tenyésztettük 10.000 sejt/lyuk denzitásban (900 sejt/lyuk osztódásukban gátolt tápláló HDF sejtrétegen) és 3 napig kezeltük a TRPV3 aktivátorok különböző dózisaival. A felülúszók leszívása után a sejteket a gyártó utasításai szerint 1:200 arányban hígított DiIC₁(5) munkareagenssel 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk, és a DiIC₁(5) fluoreszcenciát 630 nm-es excitációs és 670 nm-es emissziós hullámhosszon mértük FlexStation II³⁸⁴ (Molecular Devices) spektrofluorométer segítségével. Az eredményeket ebben az esetben is a kontroll százalékában adtuk meg.

A citotoxicitás vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálatával párhuzamosan SYTOX Green (Invitrogen) jelölést is végeztünk. Ehhez a sejteket a két festékkel egyszerre inkubáltuk, majd a megfelelő hullámhosszokon mértük a fluoreszcencia intenzitást. SYTOX Green (Invitrogen) nagyméretű fluoreszcens festék, amely a sejtmagban a duplaszálú DNS-hez kötődik, azonban az ép sejtek membránján nem jut át. Így csak a ruptúrált membránú, nekrotikus sejtekbe jut be, ahol megfelelő gerjesztés esetén zölden fluoreszkál. A zöld fluoreszcencia intenzitásából a tenyészetben lévő citotoxikus folyamatokra következtethetünk. A vizsgálatok során a sejteket a fent említett denzitásban 96-lyukú, fekete falú, átlátszó aljú lemezen (Grenier Bio-One) tenyésztettük, és több napon keresztül kezeltük. A kezelések végeztével a sejteket tápoldatban hígított 1 μ M SYTOX Green DNS festékkel (Invitrogen) inkubáltuk 37°C-on 30 percen keresztül. Kétszeri PBS-ben történő mosást követően a SYTOX Green fluoreszcencia intenzitását az egyes lyukakban FlexStation II³⁸⁴ (Molecular Devices) spektrofluorométerrel határoztuk meg 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett. Az eredményeket a kontroll százalékában tüntettük fel.

RNS interferencia (RNSi)

Az ORS keratinocytákat Neon Transzfekciós Kit (Invitrogen) segítségével transzfektáltuk a gyártó utasításait követve. A letapadó sejtek felválasztását és PBS-sel történő mosását követően Reszuszipenziós pufferben (Neon Transzfekciós Kit, összetétel ismeretlen, Invitrogen) vettük fel azokat. Ehhez adtuk az RNSi kontrolljául szolgáló scrambled (Invitrogen) illetve a TRPV3-specifikus kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokat (ID: HSS136316 és HSS175965, Invitrogen) 40 nM-os végkoncentrációban, majd elektroporációval transzfektáltuk a sejteket (beállítások: 900 V, 20 ms, két impulzus). Végül a transzfektált sejteket 35 mm-es Petri-csészébe és 96 lyukú

lemezekre szélesztettük a további vizsgálatokhoz. Az RNSi mediált géncsendesítés hatékonyságát négy napig naponta ellenőriztük Western blot és Ca^{2+} -imaging technikákkal (nincs bemutatva). Két siRNS oligonukleotid esetében a TRPV3 géncsendesítés hatékonysága több mint 70% volt a transzfekciót követő 2. napon és az azt követő két napban is, ezért kísérleteinket a transzfekciót követő 2. napon végeztük el.

cAMP szint meghatározása felülúszóból

A cAMP szint meghatározáshoz a szőrtüszőket, valamint a DP fibroblastokat 24 órán keresztül kezeltük oldószerrel vagy 100 mU/ml TSH-val (Sigma-Aldrich) 0,45 mM 3-isobutil-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich) jelenlétében, ami a cAMP foszfodiészteráz hatékony gátlószere. Ezt követően a tenyészetek felülúszójából kvantitatív cAMP-szint mérést végeztünk kompetitív ELISA (Parameter Cyclic AMP Assay, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Németország) segítségével a gyártó leírásának megfelelően.

Statisztikai elemzések

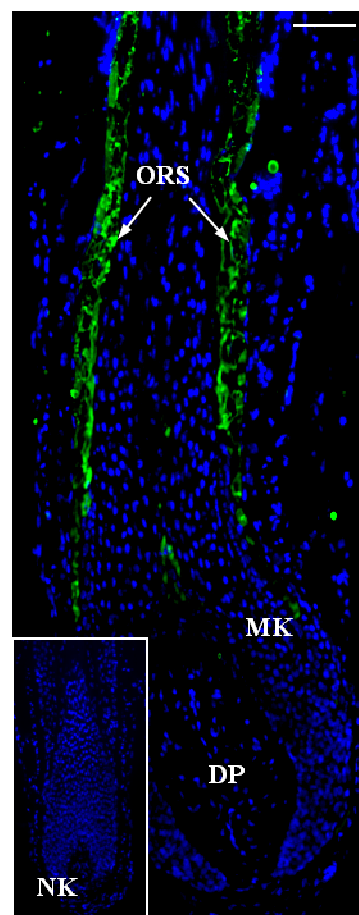
Mérési eredményeinket átlag $\pm$ SE formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szint mellett kétmintás párosítatlan *t*-próbát (patch-clamp mérések esetében párosított *t*-próba) alkalmaztunk. A 7. és 17.A ábrák esetében egyutas varianciaanalízist és Dunnett-tesztet is végeztünk.

EREDMÉNYEK

A TRPV3 kifejeződik humán hajfolliculusokban és primer külső gyökérhüvely (ORS)

keratinocyta tenyészetben

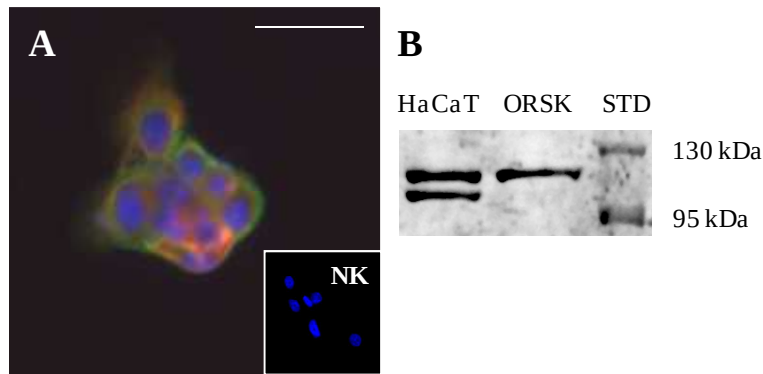
Korábbi irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy a TRPV3 expresszálódik a humán bőr interfollikuláris epidermális keratinocytáin (Facer és mtsai., 2007). Jelen kísérleteink során először meg kívántuk határozni a TRPV3 kifejeződését rutin plasztikai műtétekből származó teljes vastagságú, egészséges fejbőrből izolált, humán szőrtüszőkön. Immunhisztokémiai technikával kimutattuk, hogy a TRPV3 fehérje expresszálódik az anagén VI fázisban levő szőrtüszőkön; jelenléte elsősorban az ORS, valamint kismértékben a mátrix keratinocyták rétegére korlátozódik (**4. ábra**). Ezen megfigyelésekkel összhangban jelentős TRPV3 immunreaktivitást figyeltünk meg



4. ábra: A TRPV3 protein kifejeződése frissen izolált humán szőrtüszőben

TRPV3 specifikus immunhisztokémiai jelölés (zöld) frissen izolált anagén szőrtüszőben. Magfestőként DAPI-t (kék) alkalmaztunk. ORS: külső gyökérhüvely, MK: mátrix keratinocyták, DP: dermális papilla, NK: negatív kontroll. Méretvonal: 50 μ m.

KRT7 pozitív ORS keratinocyták primer tenyészetén mind immuncitokémia (**5.A ábra**), mind Western blot (**5.B ábra**) technikákat alkalmazva. Az immuncitokémiai vizsgálatok során az ORS keratinocytákat KRT7 expressziójuk alapján azonosítottuk, így egyértelműen elkülöníthetőek voltak a tápláló sejtekként alkalmazott HDF sejtektől, amelyek nem mutattak



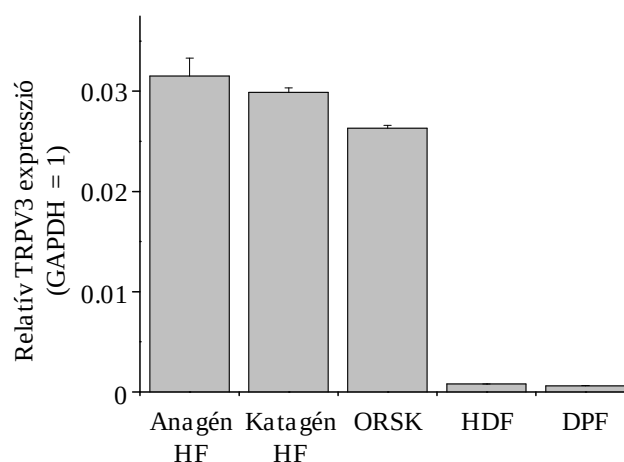
5. ábra: A TRPV3 protein expressziója primer ORS keratinocytákon

A: TRPV3 specifikus (zöld) immuncitokémiai jelölés KRT7 pozitív (vörös) ORS keratinocytákon, magfestőként DAPI-t (kék) alkalmaztunk. NK: negatív kontroll. Méretvonal: 10 μ m. **B:** A TRPV3 fehérje kimutatása Western blot technikával. HaCaT: humán immortalizált keratinocytá sejtvonala (pozitív kontroll), ORSK: ORS keratinocytá, STD: molekulatömeg standard.

KRT7 pozitivitást. Az immunjelölések megítéléséhez számos pozitív és negatív kontrollt alkalmaztunk (részletesen lásd *Anyagok és módszerek* fejezetben).

Frissen izolált szőrtüszőkből és ORS keratinocytá tenyészetéből kivont RNS mintákon q-PCR vizsgálatokat végeztünk a TRPV3 transzkriptek intraepiteliális jelenlétének ellenőrzése érdekében. A TRPV3 specifikus mRNS szakaszok egyértelműen azonosíthatóak voltak egészséges fejbőrből származó szőrtüszőkben, valamint ORS keratinocytákban (**6. ábra**).

Ezen kísérleteink további fontos eredménye volt az, hogy a TRPV3 immunreaktivitás és a specifikus mRNS nem volt kimutatható a szőrtüsző speciális, indukálható mezenhimális



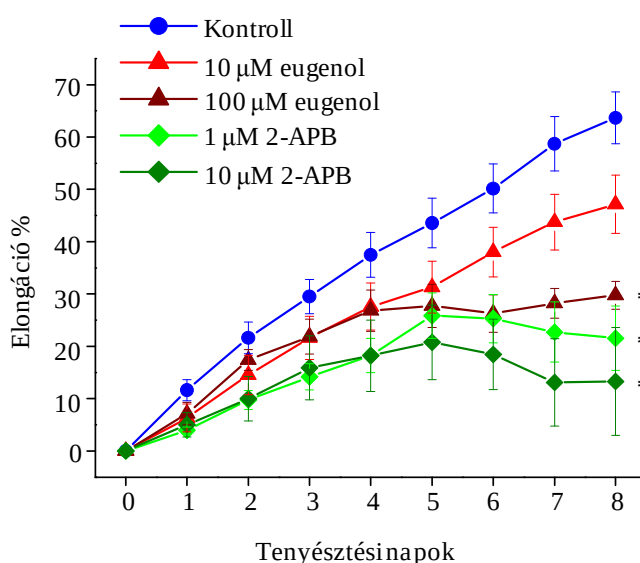
6. ábra: A TRPV3 mRNS expressziója izolált szőrtüszőkből és humán bőreredetű sejtekben

A TRPV3 specifikus mRNS transzkriptek expressziójának kimutatása reverz transzkripciót követő q-PCR-al. GAPDH: gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz (háztartási gén), HF: szőrtüsző, ORSK: ORS keratinocytá, HDF: humán dermális fibroblast, DPF: DP fibroblast. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, n=4.

területéről, a DP fibroblastjaiból, valamint az ORS keratinocyták tenyésztése során tápláló réteggént alkalmazott HDF-ből (4. és 6. ábra). Emellett úgy tűnik, hogy emberben a hajciklus folyamata nincs közvetlen hatással az ORS és a mátrix keratinocyták rétegben megfigyelhető TRPV3 kifejeződés mintázatára, mivel a TRPV3-specifikus mRNS átíratok mennyisége (6. ábra) és a megfigyelhető immunpozitivitás (nincs bemutatva) lényegében azonos volt az anagén és a spontán kialakuló katagén szőrtüszőkben.

A TRPV3 stimuláció gátolja a szőrszál hossznövekedését és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózis-vezérelt korai regressziót okoz

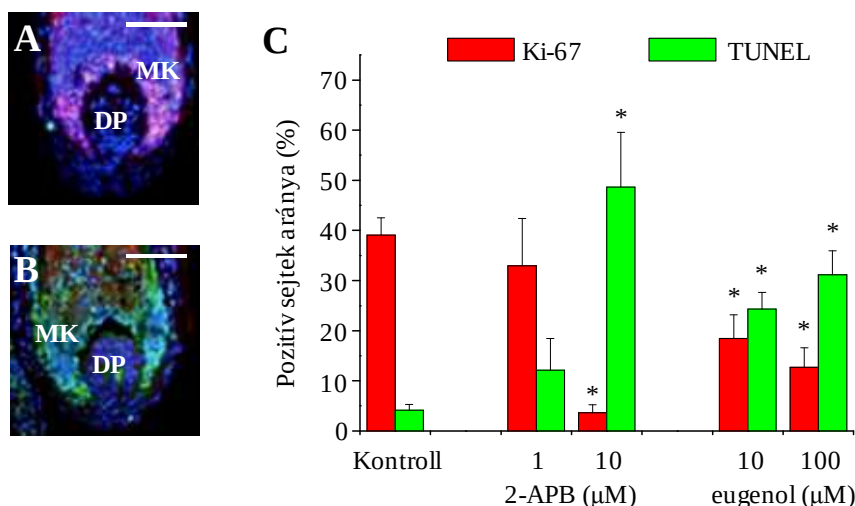
Miután igazoltuk a TRPV3 jelenlétét humán szőrtüszőben, a fehérje aktiváció funkcionális következményeinek megismerése érdekében a fiziológias körülményekhez legközelebb álló modellen, emberi fejbőrből izolált anagén VI fázisú szőrtüsző-szervkultúrán vizsgáltuk a TRPV3 agonisták hatásait *in vitro*. A nyolc napon át tartó kezelés során naponta mértük a szőrszál hossznövekedését mind a kontroll, mind a kezelt csoportokban, majd a mért adatokból növekedési görbét készítettünk. Megállapítottuk, hogy a növényi eredetű



7. ábra: A TRPV3 aktivátorok hatása az izolált szőrtüszők növekedésére

A szőrtüszőket 8 napon keresztül kezeltük eugenol és 2-APB különböző koncentrációival. Kontrollként vivőanyag kezelést használtunk (DMSO). A szőrszálak hosszát naponta mértük, majd a növekedést az izolálás napján mért hosszuk százalékában adtuk meg. Az értékeket átlag±SE formában tüntettük fel. *= $p < 0,05$ a vivőanyag kontrollhoz képest, $n = 18-24$.

hatóanyagok, mint például az eugenol (7. ábra), a thymol vagy a carvacrol (nincs bemutatva) és a szintetikus agonista 2-APB (7. ábra) idő- és dóziszfüggő módon jelentősen gátolták a szőrszál hossznövekedését.



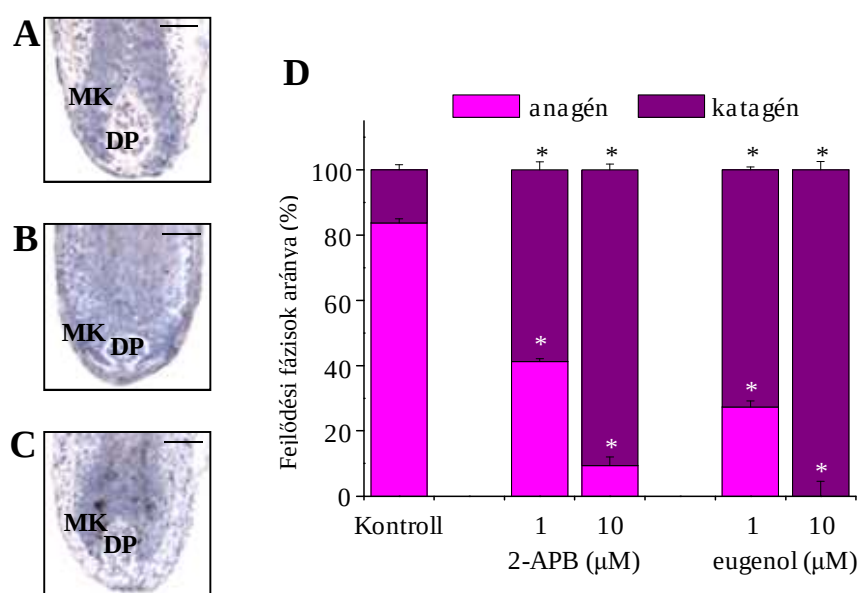
8. ábra: TRPV3 agonisták hatása az izolált szőrtüsző sejteinek proliferációjára és apoptózisára

A proliferáció (Ki-67, piros) és az apoptózis (TUNEL, zöld) egyidejű vizsgálata vivőanyag kontroll (A) és 100 μ M eugenollal (B) kezelt tenyésztett hajfollikulusokban. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocyták. Méretvonal: 50 μ m. C: A Ki-67 és TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya a teljes sejtszámra (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, $*=p<0,05$ a kontrollhoz képest, $n=18-24$.

A továbbiakban megvizsgáltuk a TRPV3 aktiváció hatását a szőrtüszők alapvető biológiai folyamataira. A kontroll és a kezelt csoportokból származó follikulusokból metszeteket készítettünk, majd a proliferáló sejtek kimutatására Ki-67 festést, az apoptotikus folyamatok láthatóvá tételére pedig TUNEL reakciót alkalmaztunk. A kapott eredmények összhangban álltak a korábban megfigyelt szőrnövekedést gátló hatással: az öt napig kezelt szőrtüsző szervkultúrában a korábban is alkalmazott növényi eredetű és szintetikus TRPV3 aktivátorok szignifikánsan csökkentették a Ki-67 pozitív keratinocyták arányát az anagén szőrtüsző bulbusában (8. ábra). Fontos megemlíteni azt is, hogy a fenti szerek jelentősen megnövelték a TUNEL pozitív keratinocyták számát is, ami a TRPV3 stimuláció okozta apoptózis beindulására utal (8. ábra).

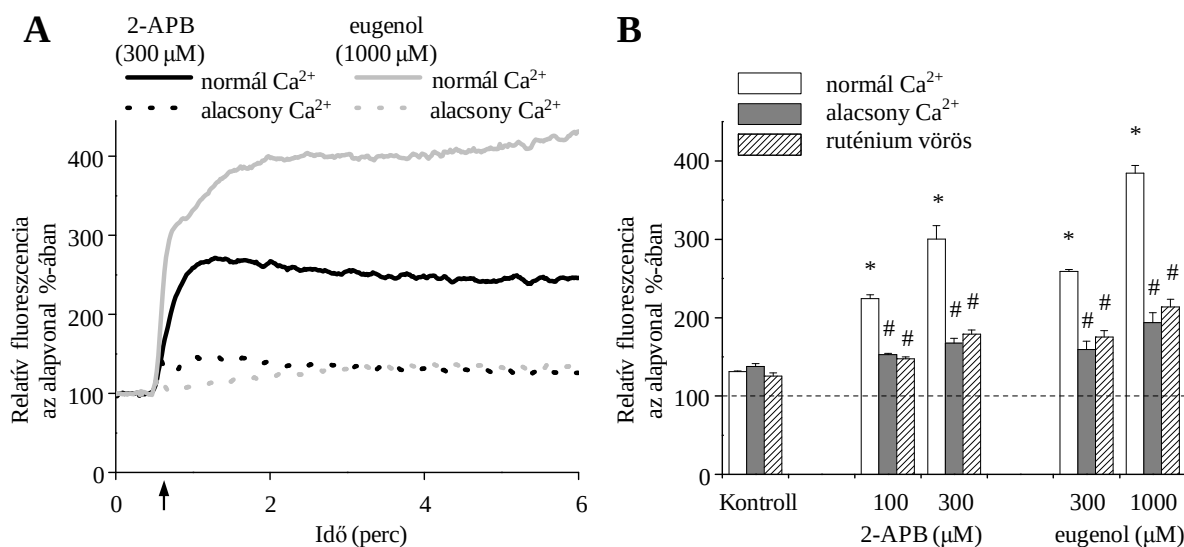
A TRPV3 agonisták hajciklusra kifejtett hatásának megismerésére ezután hematoxilin-eozin festést követő kvantitatív hisztomorfometriai vizsgálatokat végeztünk jól meghatározott

morfológiai kritériumok alapján (**9. ábra**) (Müller-Röver és mtsai., 2001; Stenn és Paus 2001). Ennek megfelelően a szőrtüszők anagén-katagén átmenetét vizsgáltuk, ami a keratinocyták apoptotikus folyamatainak túlsúlyával és a proliferációs folyamatok csökkenésével jellemezhető. Míg a kontroll szőrtüszők túlnyomó többsége (>80%) 8 nap után is anagén VI fázisban volt (a DP jól fejlett, csepp alakban helyezkedik el a szőrtüsző bulbuszában, a mátrix keratinocyták rétegei hagymahéjként veszik körül, **9.A ábra**), az eugenol és 2-APB kezelt szőrtüszők 60–100%-a lépett katagén stádiumba (a DP elvékonyodik, elkezd kiemelkedni a bulbuszból, a mátrix keratinocyták rétege szintén elvékonyodik, a szőrtüsző elveszti jellegzetes hagyma formáját, **9.B és C ábra**). Meg kell jegyezni azonban azt is, hogy ezek a TRPV3 agonisták jórészt csak korai katagén transzformációt voltak képesek indukálni; nagyon ritkán fordult elő, hogy a szőrtüszők késői katagén regresszió mentek keresztül (a DP hídszerű sejtréteggel kiemelkedve eltávolodik a mátrix keratinocytáktól) ezen szerek alkalmazását követően.



9. ábra: TRPV3 agonisták hatása a hajciklusra

Az izolált szőrtüszőkön vivőanyag (DMSO) kontroll (A), valamint 2-APB-vel (1 μM)(B) és eugenollal (10 μM) (C) való kezelés után hematoxilin-eozin festést végezve meghatároztuk az anagén és katagén szőrtüszők százalékos arányát (D). Az anagén-katagén fázis elkülönítése az irodalomban meghatározott kritériumok szerint történt (pl. elvékonyodott mátrix keratinocytá réteg, [MK] és zsugorodó dermális papilla, [DP] réteg). Az értékeket átlag±SE formában tüntettük fel, *=p<0,05 a kontrollhoz képest. Méretvonal: 50 μm, n=18-24.



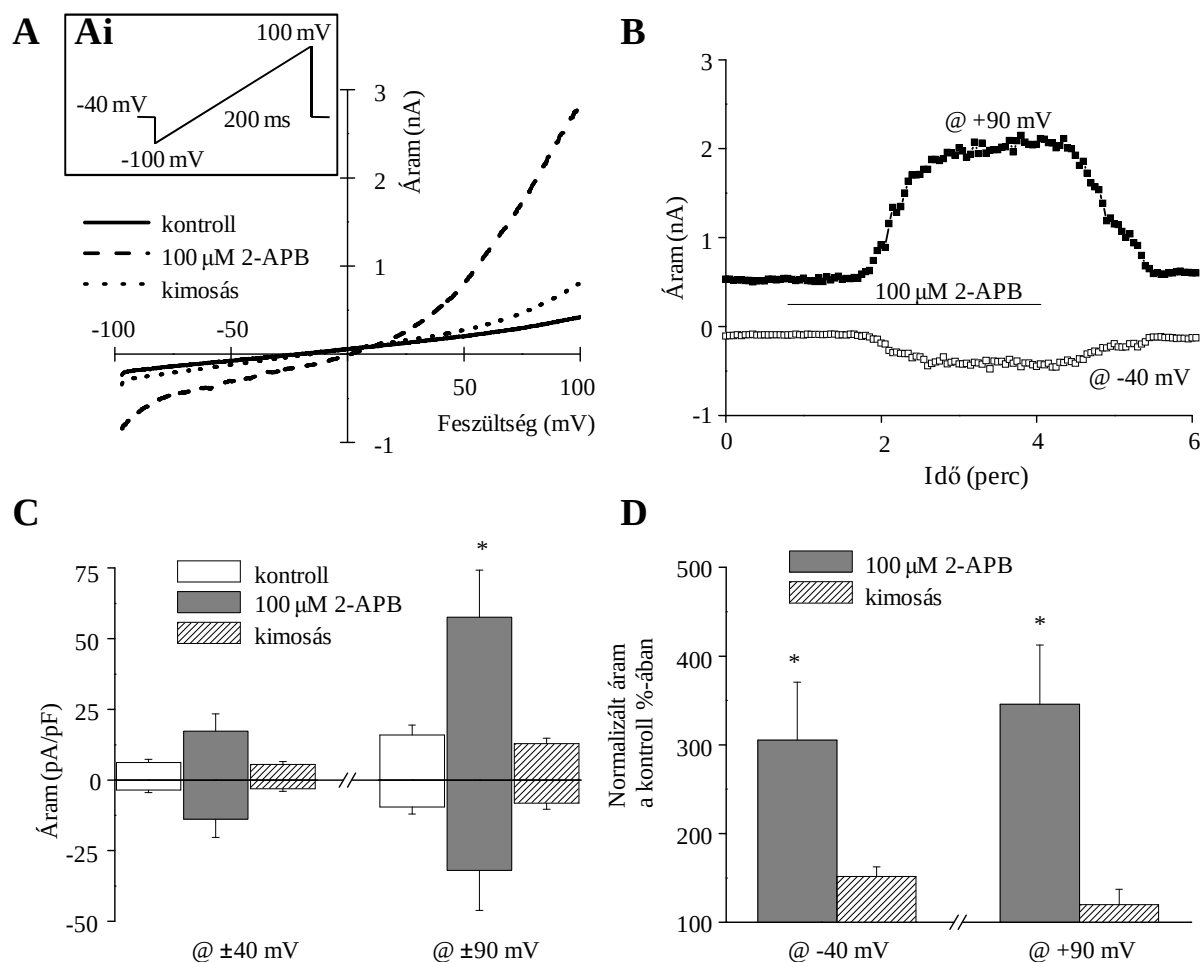
10. ábra: A TRPV3 aktivátorok hatására az ORS keratinocyták Ca^{2+} homeosztázisára

A: Fluo-4 AM Ca^{2+} -érzékeny festékkel töltött ORS keratinocytákon mért $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ változások reprezentatív analóg görbéi. A nyíl mutatja a 300 μ M 2-APB és az 1000 μ M eugenol alkalmazási időpontját normál (1,8 mM) vagy alacsony (0,02 mM) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ mellett. **B:** A TRPV3 agonisták által kiváltott Ca^{2+} jelek maximális amplitúdóinak statisztikai elemzése normál (1,8 mM) vagy alacsony (0,02 mM) Ca^{2+} tartalmú oldatban, illetve 10 μ M ruténium vörös jelenlétében (1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$). Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, *= $p < 0,05$ a kontrollhoz képest, #= $p < 0,05$ a kizárólag aktivátorral kezelt csoporthoz képest (1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$) $n > 3$.

A TRPV3 Ca^{2+} -csatornaként működik az ORS keratinocytákban

Bár a fenti adatok a TRPV3 „aktív” kifejeződésre utalnak a humán szőrtüsző keratinocytáiban, tovább kívántuk elemezni a TRPV3 csatorna funkcionalitását. Ehhez sejtelettani kísérleteket végeztünk primer humán ORS keratinocytákon, amelyek, mint már korábban említettük, mind mRNS, mind fehérje szinten (5. és 6. ábra) kifejezik a TRPV3 csatornát. FLIPR alapú Ca^{2+} -imaging technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy a TRPV3 agonisták jelentősen és dóziszfüggő módon megemelték a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját (10. ábra). Ezen felül az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ lecsökkentése (1,8 mM-ról 0,02 mM-ra), továbbá a nem-szelektív TRP csatorna blokkoló ruténium vörös (Amann és Maggi, 1991) 10 μ M-jának együttes alkalmazása szinte teljesen megakadályozta a TRPV3 agonisták $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -szint növelő hatását (10.B ábra).

A csatornafunkció további vizsgálatára patch-clamp technika teljes sejt konfigurációját alkalmaztuk (**11. ábra**). Mivel a négyszögimpulzusokkal kiváltott áramok gyors aktiváció mellett nem mutattak idő- és feszültségfüggő inaktivációt (nincs bemutatva), rámpa protokollt alkalmaztunk (3 másodpercenként) a membránáramok vizsgálatára (**11. A és B ábra**). Kontroll esetben, azaz a vivőanyag-kezelt ORS keratinocytákon kifelé egyenirányító áramot mértünk $-12,6 \pm 1,5$ mV (átlag $\pm$ SE, $n=7$) reverz potenciállal. Ezután áramméréseket végeztünk a rámpa protokoll négy pontján (-90 , -40 , $+40$ és $+90$ mV), majd az adatokat minden esetben normalizáltuk az aktuális sejtmembrán kapacitásra (rendre $-9,5 \pm 2,5$, $-3,5 \pm 1,0$, $6,2 \pm 1,0$ és $15,9 \pm 3,5$ pA/pF) (**11.C és D ábra**).



11. ábra: A 2-APB ionáramokat hoz létre ORS keratinocytákban

A: Patch-clamp rámpa protokollal (**Ai**) mért áramok reprezentatív áram-feszültség görbéi. **B:** 100 μM 2-APB-vel kiváltott áramok időfüggése -40 mV (üres négyzetek) és $+90$ mV (töltött négyzetek) feszültségnél. **C:** A membrán kapacitására normált áramok statisztikai elemzése -40 mV (balra lent), $+40$ mV (balra fent), -90 mV (jobbra lent) és $+90$ mV (jobbra fent) feszültségnél. **D:** Normalizált áramok statisztikai elemzése 100 μM 2-APB kezelés közben és az azt követő kimosás alatt -40 mV (balra) és $+90$ mV (jobbra). Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, $*=p<0,05$ a kontrollhoz képest, $n=7$.

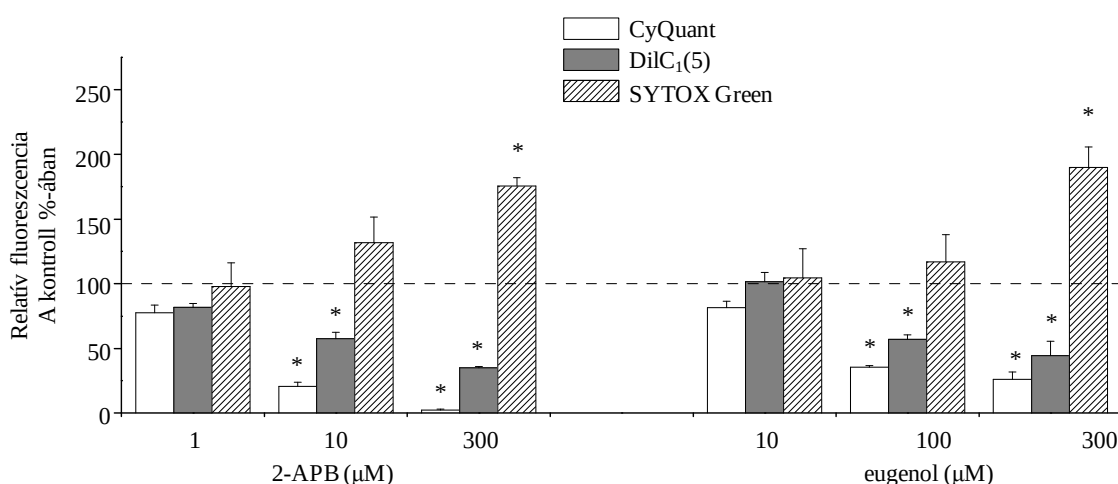
A 100 μM 2-APB kezelés jelentősen és szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövelte mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat (**11.A és B ábra**), amely hatás reverzibilisnek adódott. 2-APB jelenlétében a -90 , -40 , $+40$ és $+90$ mV-nál mért áramok a következőknek adódtak: $-31,9 \pm 14,2$, $-13,8 \pm 6,4$, $17,3 \pm 6,1$ és $57,7 \pm 16,6$ pA/pF (átlag $\pm$ SE, $n=7$, **11.C ábra**). A TRPV3 aktivátor 2-APB átlagosan mintegy háromszorosára növelte mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat a vizsgált feszültségek mindegyikénél (**11.C ábra**).

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az emberi szőrtüsző eredetű ORS keratinocyták valóban funkcionális TRPV3 csatornával rendelkeznek, amely Ca^{2+} -permeábilis (valószínűleg nem-szelektív) kationcsatornaként működik a sejtek felszínén, hasonlóan a korábban egér epidermális keratinocytákon publikált korábbi eredményekhez (Peier és mtsai., 2002; Chung és mtsai., 2004a és 2004b; Huang és mtsai., 2008; Cheng és mtsai., 2010).

A TRPV3-aktiváció gátolja a proliferációt és sejthalált indukál tenyésztett ORS

keratinocytákban

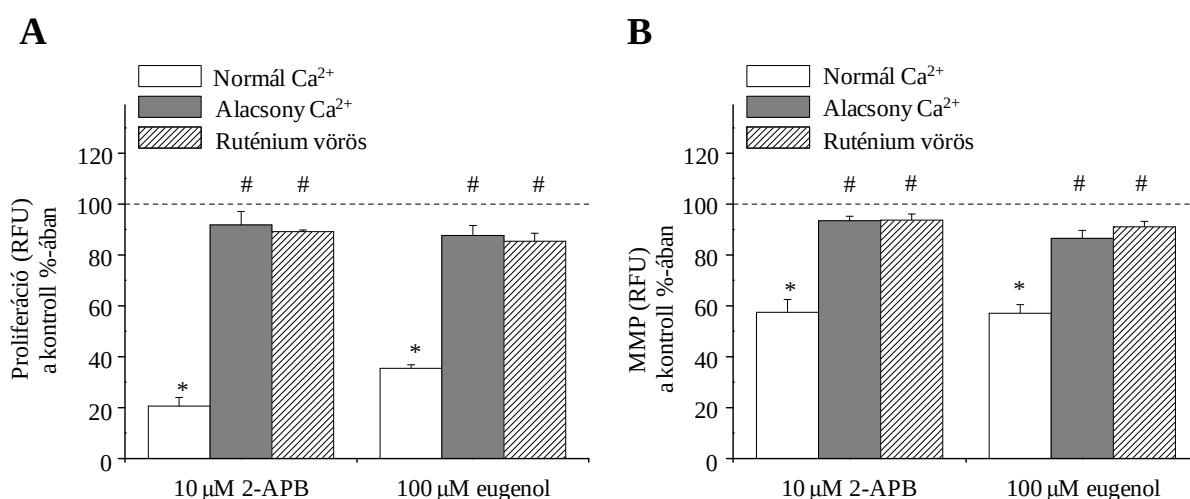
Mivel humán szőrtüsző szervkultúrában a TRPV3 stimulálása gátolta a szőrszál növekedését, és az intrafollikuláris proliferációt valamint apoptózist indukált (**7-9. ábra**), a



12. ábra: TRPV3 aktivátorok hatása az ORS keratinocyták életképességére, apoptotikus és nekrotikus folyamataira

Az ORS keratinocytákat különböző koncentrációjú TRPV3 aktivátorokkal kezeltük 48 órán keresztül 1,8 mM Ca^{2+} koncentrációjú tápoldatban. A proliferáció mértékét CyQuant technikával, az apoptotikus folyamatokat DiIC₁(5) mitokondriális membránpotenciál-érzékeny festékkel, a nekrotikus folyamatokat SYTOX Green-nel követtük nyomon. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel a vivőanyag kezelt kontroll %-ában, $*=p < 0,05$ a kontrollhoz képest, $n=8$.

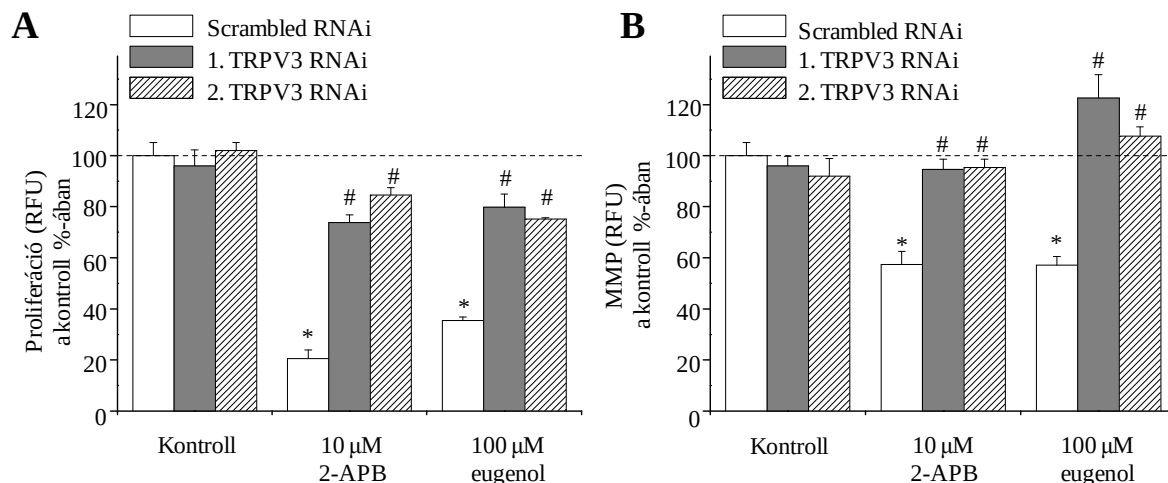
következő vizsgáltaink a TRPV3 aktiváció sejtnövekedésre és túlélésre kifejtett hatásainak feltérképezésére irányultak ORS keratinocytákon. Az eddigi adatokkal jó összhangban az eugenol és a 2-APB dóziszfüggő módon csökkentették az ORS keratinocyták proliferációját jelző DNS szintézist (CyQuant assay – **12. ábra**). Ezen túlmenően, a TRPV3 aktiváció jelentősen lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált (**12. ábra**), ami az apoptózis egyik legkorábbi markerének tekinthető (Green és Reed 1998; Susin és mtsai., 1998). Végül, a legmagasabb koncentrációban alkalmazott anyagok szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövelték a SYTOX Green felhalmozódását (**12. ábra**), ami érzékeny mutatója a nekrotikus, citotoxikus folyamatoknak.



13. ábra: A TRPV3 aktivátorok proliferációt csökkentő és apoptózist indukáló hatása kivédhető I.

Az ORS keratinocytákat 48 órán át kezeltük TRPV3 aktivátorokkal normál (1,8 mM), alacsony (0,02 mM) $[Ca^{2+}]_{EC}$ tápoldatban, valamint 10 μ M ruténium vörös (1,8 mM $[Ca^{2+}]_{EC}$) jelenlétében. A proliferáció mértékét CyQuant technikával (**A**), az apoptotikus folyamatokat DilC₁(5) mitokondriális membránpotenciál-érzékeny festékkel (**B**) követtük nyomon. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, a vivőanyag kezelt kontroll %-ában. *= $p < 0,05$ a kontrollhoz képest, #= $p < 0,05$ a TRPV3 aktivátorral kezelthez képest (1,8 mM $[Ca^{2+}]_{EC}$) $n=7$.

Bebizonyosodott mindemellett az is, hogy a TRPV3 aktivátorok növekedésgátló (**13.A ábra**) és sejthalált okozó (**13.B ábra**) tevékenységét jelentősen gátolta a tenyésztőoldat Ca^{2+} -tartalmának lecsökkentése (1,8 mM-ról 0,02 mM-ra), valamint 10 μ M ruténium vörös együttes alkalmazása. Ezen jelenségek alátámasztják azt a feltevést, miszerint az ORS keratinocytákon megfigyelhető celluláris folyamatok a sejtfelszíni TRPV3 ioncsatornák megnyitását követő Ca^{2+} -beáramlásnak köszönhetőek.



14. ábra: A TRPV3 aktivátorok proliferációt csökkentő és apoptózist indukáló hatása kivédhető II.

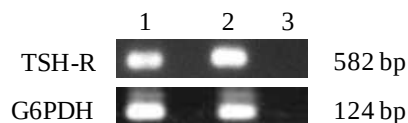
A scrambled kontroll, és TRPV3 specifikus siRNS-sel transzfectált ORS keratinocytákat 48 órán át kezeltük TRPV3 aktivátorokkal normál $[Ca^{2+}]_{EC}$ tápoldatban. A proliferáció mértékét CyQuant technikával (A), az apoptotikus folyamatokat $DilC_1(5)$ mitokondriális membránpotenciál-érzékeny festékkel (B) követtük nyomon. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, a vivőanyaggal kezelt scrambled kontroll %-ában. *= $p < 0,05$ a kontrollhoz képest, #= $p < 0,05$ a TRPV3 aktivátorral kezelt scrambledhez képest (1,8 mM $[Ca^{2+}]_{EC}$) $n=8$.

Több irodalmi adat bizonyítja, hogy a fenti ágensek, bár hatékony aktivátorai a TRPV3-nak, képesek aktiválni más TRP csatornákat is (Xu és mtsai., 2006; Bíró és mtsai., 2007). A TRPV3 farmakológiai vizsgálatát tovább nehezíti, hogy kereskedelmi forgalomban nem kapható megfelelően szelektív TRPV3 gátlószer. Az általunk használt ruténium vörös például mikromoláris koncentrációban nemcsak a TRPV csatornákat képes gátolni (Clapham és mtsai., 2003), hanem a rianodin receptort (Koulen és Thrower, 2001) és a TASK3 káliumcsatornát is (Czirják és Enyedi, 2003). Ezért annak érdekében, hogy a felsorolt cellularis válaszok TRPV3 specificitásáról meggyőződjünk, RNSi technikát alkalmaztunk, melyeket már sikerrel optimalizáltunk különböző humán bőr eredű sejteken (Griger és mtsai., 2007; Dobrosi és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2009).

Tökéletes összhangban a fenti adatokkal megállapítottuk, hogy a TRPV3 géncsendesítése kivédte az eugenol és a 2-APB növekedést gátló (14.A ábra) és apoptózist indukáló (14.B ábra) hatását, ami egyértelműen igazolja a TRPV3 specifikus szerepét az ORS keratinocyták biológiai folyamataiban.

A TSH receptor mRNS és fehérje szinten egyaránt kifejeződik az emberi fejbőr és a szőrtüsző mezenhimális területein

A következőkben a TSH receptorral kapcsolatos vizsgálatok eredményeit mutatjuk be. RT-PCR és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon a normál emberi fejbőr sejtes



15. ábra: A TSH receptor mRNS expressziója frissen izolált szőrtüszőkben

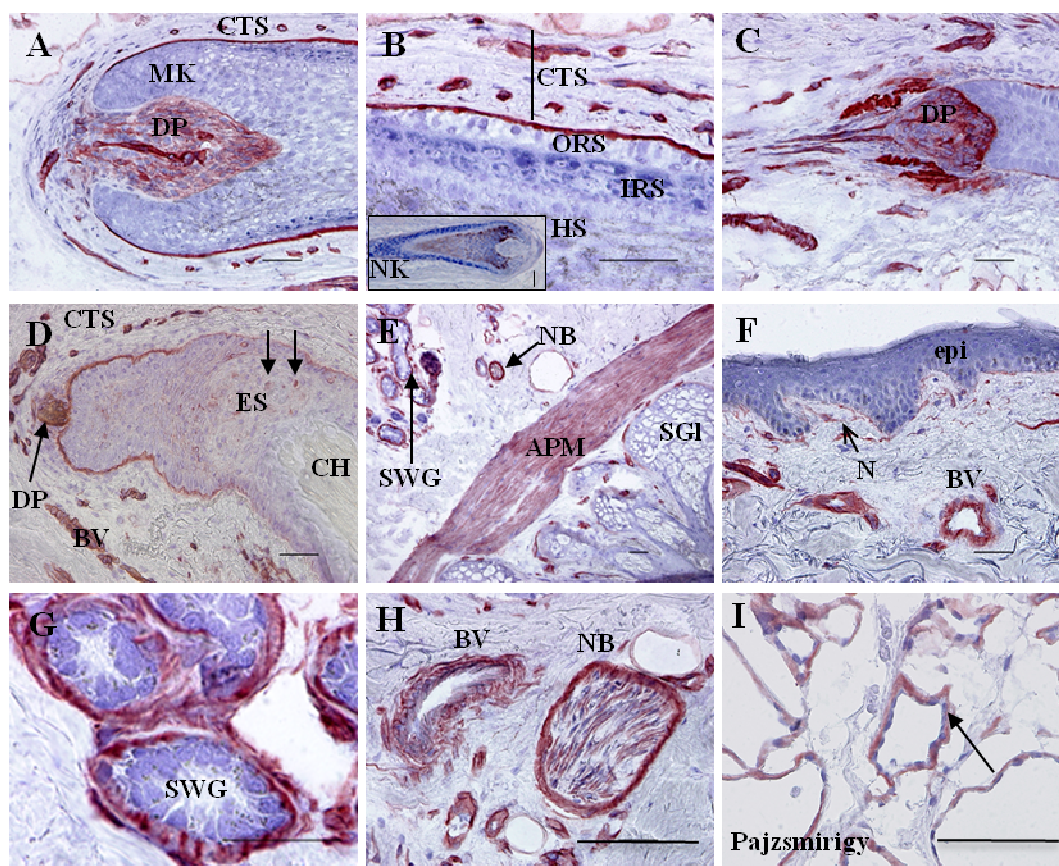
A TSH receptor (TSH-R) transzkriptek detektálása emberi szőrtüszőben reverz transzkripciót követő PCR (RT-PCR) technikával. 1: szőrtüszők (30 db/csoport), 2: pajzsmirigy, 3: nontemplát kontroll, G6PDH: háztartási gén.

elemei és a szőrtüszők expresszálják-e a TSH receptort mRNS és fehérje szinten *in situ*. Sikerrel bizonyítottuk a várt méretű (582 bp) TSH receptor specifikus transzkript jelenlétét az emberi fejbőrből frissen izolált anagén VI follikulusokból kivont RNS mintában (15. ábra). Az említett transzkripteknek megfelelően TSH receptor specifikus immunreaktivitást is tapasztaltunk az emberi fejbőrben és függelékeiben (pozitív kontrollként pajzsmirigy metszeteket használtunk, ahol a TSH receptornak megfelelő festődés csak a várt területeken volt megfigyelhető) (16.I ábra). Míg a pajzsmirigy esetében a TSH receptor kifejeződése a hámsejtekben volt megfigyelhető, addig az emberi fejbőrön úgy tűnik, jobbra a pilosebáceus egység mezenhimális területeire korlátozódott (pl. a DP, a CTS, valamint az APM), míg az interfollikularis dermális fibroblastokon nem volt megfigyelhető (16.A-C és E,F ábra).

Ezen túlmenően, a bőr nagy idegkötegei, az erek, a verejték és a faggyúmirigyek körüli mioepitél sejtek is TSH receptor immunpozitivitást mutattak *in situ* (16.G,H ábra).

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a TSH receptor kifejeződése mutat-e hajciklus-függő változásokat *in situ*. A katagén follikulusokon megfigyelhető TSH receptor immunreaktivitás meglehetősen hasonlónak bizonyult az anagén VI szőrtüszőkre jellemző mintázathoz (mezenhimális lokalizáció), de kissé intenzívebben festődött a DP és a visszahúzódó szőrtüsző bazális membránja (16.C ábra). Mivel kísérleteink során csak

gluteális régióból származó telogén szőrtüszőket vizsgálhattunk, a TSH festődésben az emberi fejbőrön tapasztaltakhoz képest megjelenő különbségek regionális eltérésekből is adódhattak. Az anagén VI szőrtüszőkhöz hasonló intenzitású TSH receptor festődés túlnyomórészt a mezenhimális elemeken volt megfigyelhető (DP, CTS). Emellett az említett telogén mintákon mi is megfigyeltünk néhány TSH receptor-pozitív sejtet a szőrtüszők hámlójában (16.D ábra). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy csak kisebb TSH receptor mintázatbeli változatosság



16. ábra: A TSH receptor expressziója humán bőrben és bőrfüggelékben

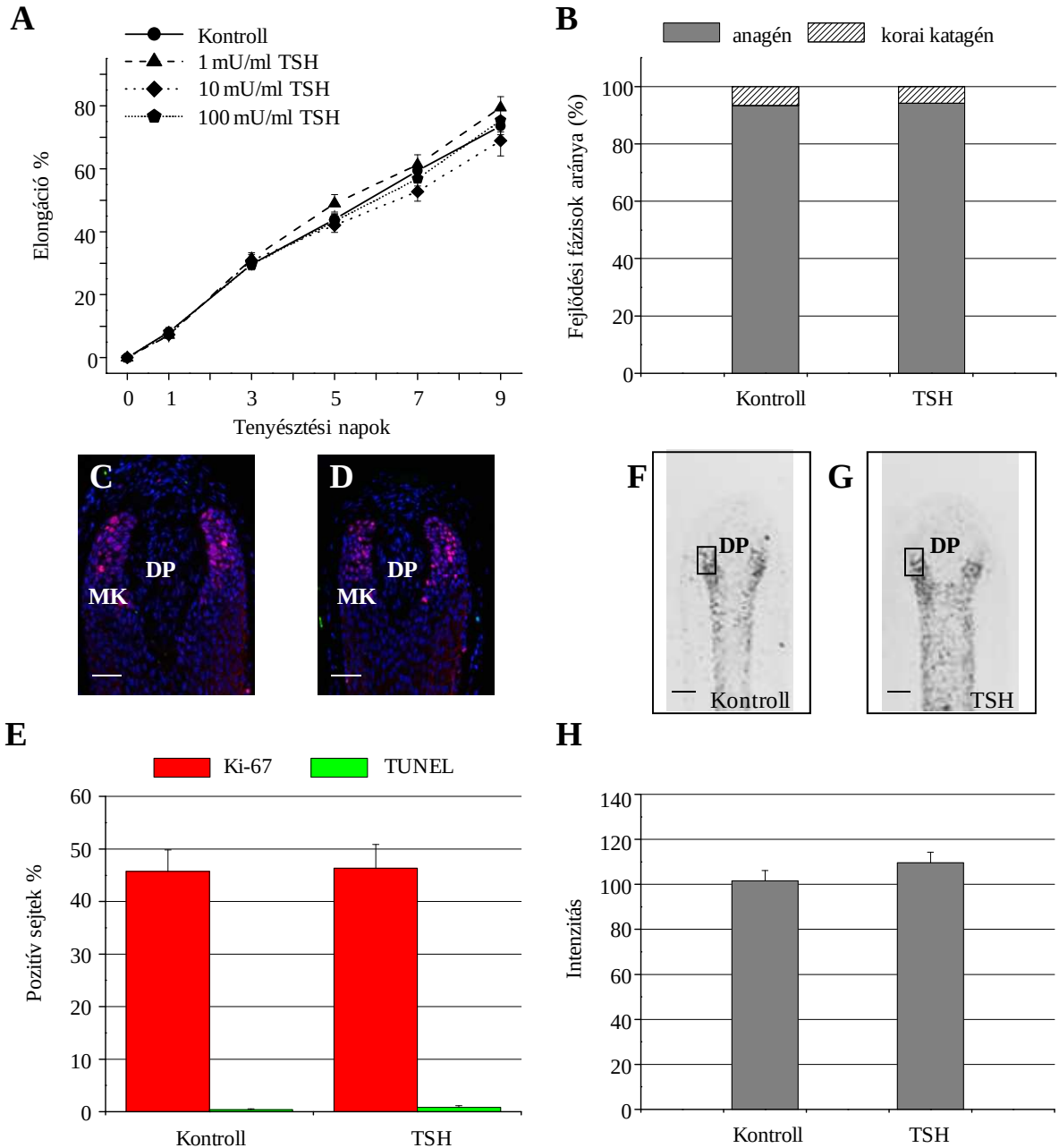
A: A TSH receptor specifikus immunreaktivitás a fejbőrben levő anagén VI szőrtüsző mezenhimális elemeire korlátozódik in situ, úgymint dermalis papilla (DP), kötőszövetes tok (CTS). MK: mátrix keratinocyták. B: A fejbőr follikuláris keratinocytái nem expresszálják a receptort. IRS: belső gyökérhüvely keratinocyták, ORS: külső gyökérhüvely keratinocyták, HS: szőrszál, NK: negatív kontroll (az elsődleges antitest elhagyásával). C: A fejbőr katagén szőrtüszői hasonló festődési mintát mutatnak, bár kissé intenzívebb immunreaktivitás látható a DP és a visszahúzódó bazális membrán területein. D: A gluteális régióból származó telogén szőrtüszőn tapasztalt TSH receptor immunreaktivitás főleg a mezenhimális elemeken volt megfigyelhető (DP, CTS) az anagén fázissal összevethető intenzitásban. Emellett néhány egyedi pozitív sejtet is megfigyeltünk a szőrtüszőhámlójában (nyilak). ES: epiteliális szál, CH: hajbunkó, BV, vérerek. E-F: Pozitív festődésű területek: arrector pili izom (APM), idegkötegek (NB), a verejték- (SWG) és faggyúmirigyek (SGI) körüli mioepiteliális sejtek, valamint a bőrben futó idegek (N) és vérerek (BV). epi: epidermisz. G-H: Nagyobb nagyításban a pozitívan festődő verejtékmirigyek (SWG), vérerek, (BV) és az idegkötegek (NB). I: A pajzsmirigy epiteliális sejtjeinek bazolaterális felszínén (nyíl) megfigyelt TSH receptor immunpozitivitás szolgált pozitív kontrollként, míg az immunreaktivitás apikális oldalon tapasztalt hiánya volt a „belső” negatív kontroll (Braverman és Utiger, 2005). Méretvonal: 50 µm.

figyelhető meg az emberi hajciklus során, azonban a fejbőről származó folliculusok esetében megfigyelhető TSH receptor festődési mintázat nem feltétlenül igaz az emberi kültakaró más területein elhelyezkedő szőrtüsző populációkra is.

A TSH kezelés nem befolyásolja jelentősen az emberi szőrszál növekedését, a proliferáló és apoptotizáló sejtek arányát, valamint a pigmentációt

A TSH közvetlen, funkcionális hatásainak tanulmányozása érdekében a szőrtüszők klasszikus „szőrbiológiai” paramétereit vizsgáltuk (pl. izolált szőrtüszők növekedése, hajciklus és a pigmentáció változása) kontroll és 1-100 mU/ml TSH (szérum-mentes tápoldatban) kezelt izolált anagén VI szőrtüsző szövettenyészetében. Az alkalmazott koncentrációk megfelelnek a sejt kultúrákban szokásosan alkalmazott TSH dózisnak és a legalacsonyabb vizsgált dózis mérsékelten magasabb a súlyosan hipotireoid betegek esetében mérhető TSH szintnél, ami elérheti akár a 0,5 mU/ml szintet is (Braverman és Utiger, 2005).

Az alkalmazott TSH koncentrációk egyike sem befolyásolta a szőrszál hossznövekedését (**17.A ábra**), és a mátrix keratinocyták proliferációját, valamint nem változott jelentősen az apoptotizáló sejtek aránya sem (**17.C-E ábra**). Az eddigiekhez hasonlóan, a TSH nem volt hatással az anagén és katagén szőrtüszők arányára, azaz nem befolyásolta közvetlenül az emberi hajciklust *in vitro* (**17.B ábra**). Emellett a TSH nem változtatta meg jelentősen az intrafollikuláris melanintermelést sem, amit Masson-Fontana hisztokémiai festés segítségével állapítottunk meg (**17.F-H ábra**).

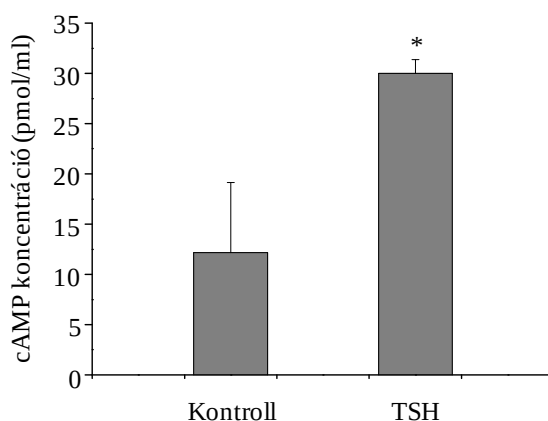


17. ábra: A TSH hatása az izolált szőrtüszők növekedésére, hajciklusára, a szőrtüsző keratinocyták proliferációjára és apoptózisára, valamint a pigmentációra in vitro

A: Az anagén VI szőrtüszőket a TSH három különböző koncentrációjával kezeltük. A szőrszálak hosszát minden második napon megmértük, majd a növekedést az izolálás napján mért hossz százalékában adtuk meg. **B:** A vivőanyag- vagy TSH-kezelt szőrtüszők anagén VI és a korai katagén szőrtüszőinek aránya látható (csak a 100 mU/ml TSH kezelés került bemutatásra, az 1 mU/ml és 10 mU/ml TSH kezelt ehhez hasonló volt). Az anagén-katagén fázis elkülönítése az irodalomban meghatározott kritériumok szerint történt (pl. elvékonyodott mátrix keratinocytá és leszálló DP réteg). **C-E:** A proliferáció (Ki-67, piros) és az apoptózis (TUNEL, zöld) egyidejű vizsgálata kontroll (**C**) és TSH (**D**) kezelt tenyésztett szőrtüszőkben. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocyták. **E:** A Ki-67- és TUNEL-pozitív sejtek százalékos aránya a teljes sejtszámra (DAPI-pozitív sejtek) vonatkoztatva. **F-H:** A melanin tartalom vizsgálata Masson-Fontana festéssel kontroll (**F**) és TSH (**G**) kezelt szőrtüszőkön. **H:** A festődés kvantitatív összehasonlítása kontroll és 100 mU/ml TSH-val kezelt szőrtüszőkben (jelölt referencia tartomány) ImageJ szofver segítségével. A kísérleteket háromszor ismételtük meg különböző alanyokból származó mintákon. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, Méretvon.al: 50 μ m, n=15-20 db/csoport.

A TSH nem okoz jelentős változást az emberi szőrtüsző mezenhimális területeinek proliferációjában in situ

Irodalmi adatok szerint a preíbiális, valamint a periorbitális bőrben található fibroblastok aktiválhatóak TSH receptoron keresztül (Porcellini és mtsai., 2003). Mivel a saját elemzéseink feltűnő TSH receptor kifejeződést mutattak a CTS fibroblastokban, külön ellenőrizni kívántuk a Ki-67 pozitív sejtek arányában megfigyelhető különbséget ebben a mezenhimális szőrtüsző kompartmentben, oldószer-kontroll és TSH-kezelt szőrtüszők között. Kvantitatív immunhisztomorfometriai mérések alapján a látótérben megfigyelhető osztódó sejtek száma nem különbözött jelentősen a kontroll és kezelt szőrtüszők között *in situ* (oldószer-kontroll: $2,03 \pm 1,21$ SE, TSH: $3,36 \pm 2,59$ SE, $p > 0,05$, ábrán nincs bemutatva).



18. ábra: A TSH kezelés hatása a szőrtüszők cAMP termelésére

Vivőanyag (Kontroll) és 100 mIU/ml TSH-val kezelt szőrtüszők felülúszójából határoztuk meg a tenyészet cAMP tartalmát. A TSH kezelés közel háromszoros növekedést indukált. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, $*=p < 0,05$ a kontrollhoz képest, $n=18-24$.

A TSH alkalmazása cAMP-szint emelkedést okoz

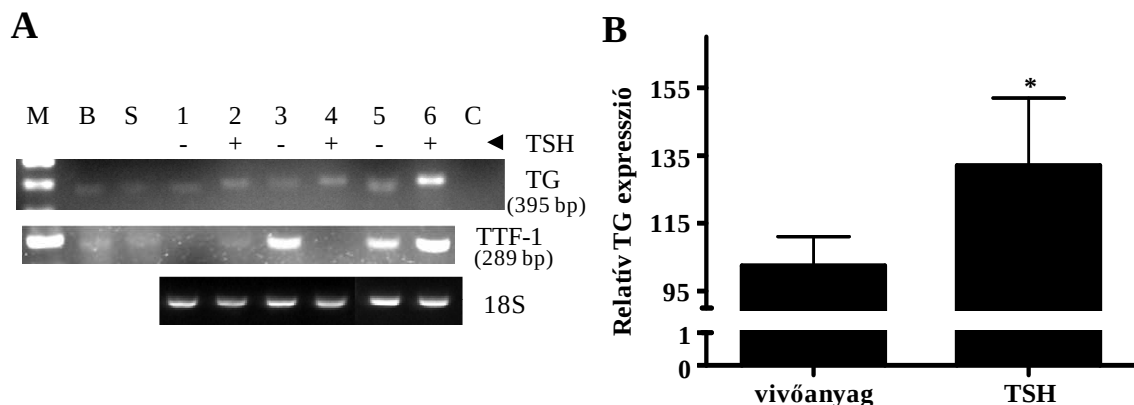
A következőkben megvizsgáltuk, hogy a TSH receptor nagy affinitású ligandjának bekötődése okoz-e bármilyen változást a cAMP, mint másodlagos hírvivő szintjében, hiszen a TSH receptor aktiválódást klasszikusan cAMP szint emelkedés követi (Povey és mtsai., 1976; Braverman és Utiger, 2005). Eredményeink szerint a TSH-kezelést követően a felülúszóban megjelenő cAMP szintje $30,02 \pm 2,38$ pmol/ml volt, amely háromszor magasabb cAMP szintet jelent, mint ami az oldószer-kontroll szőrtüszők felülúszójában mérhető volt a cAMP-t bontó

foszfodiészteráz enzimet gátló 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) jelenlétében (**18. ábra**). Ez határozottan arra utal, hogy az emberi szőrtüsző CTS-ben kifejeződő TSH receptor részt vesz bizonyos jelátviteli folyamatokban.

Az emberi szőrtüszők TSH kezelése nem indukál mérhető pajzsmirigyhormon szekréciót, de serkenti a klasszikus TSH célgének átírását

Ezután megvizsgáltuk, hogy a TSH receptor-kapcsolt jelátviteli útvonal aktivációja megváltoztatja-e a klasszikus TSH célgének transzkripcióját. Mivel a TSH legfontosabb funkciója a pajzsmirigyhormonok szintézisének és szekréciójának fokozása (Braverman és Utiger, 2005), első kérdésünk az volt, hogy az emberi fejbőr follikulusai rendelkeznek-e a pajzsmirigyhormonok előállításához és szekréciójához szükséges enzimatis apparátussal. Kísérleteink során nem tudtuk kimutatni a pajzsmirigy-hormon termelés egyik legfontosabb enzimét a pajzsmirigy peroxidáz (TPO) (Bravemann és Utiger, 2005), sem mRNS, sem fehérje szinten (nincs bemutatva). Továbbá nincs bizonyíték arra sem, hogy az emberi fejbőr szőrtüsző szervkultúra felülúszójában megtalálható lenne mérhető mennyiségű pajzsmirigyhormon (van Beek és mtsai., 2008). Ezek az adatok tehát azt mutatják, hogy az emberi szőrtüsző feltehetően nem képes a pajzsmirigy hormonok folyamatos vagy TSH stimulációt követő előállítására.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az izolált szőrtüszők TSH aktivációja modulálja-e a TSH receptor aktiváció klasszikus célgénjeit. A TSH specifikus transzkripciós faktorokon keresztül (pl. a pajzsmirigy-transzkripciós faktor 1, TTF-1) upregulálja a pajzsmirigyhormon-szintézis fő mátrix glikoproteinjének, a tireoglobulinnak (TG) a szintézisét és a tárolását (Suzuki és mtsai., 1998 és 1999; Braverman és Utiger, 2005). Ezért megvizsgáltuk a TTF-1 és TG transzkripció mértékét TSH stimulációt követően RT-PCR segítségével (**19.A ábra**).



19. ábra: A tireoglobulin (TG) és a pajzsmirigy transzkripció faktor-1 (TTF-1) mRNA kifejeződése frissen izolált szőrtüszőkből

A: TG és TTF-1 transzkriptek detektálása emberi szőrtüszőkből RT-PCR segítségével. M: DNS létra, B: agy (pozitív kontroll), S: teljes bőr, 1-6: 3 női alanyból származó szőrtüsző minták (18-20 db/csoport) vivóanyag (1, 3, 5) és TSH kezelést (2, 4, 6) követően. C: nontemplát kontroll, 18S: belső kontroll. **B:** A TG sávok a belsőkontrollra normált intenzitásának (szemi) kvantitatív vizsgálata. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel. $*=p<0,05$ a vivóanyag kontrollhoz képest, $n=18-20$.

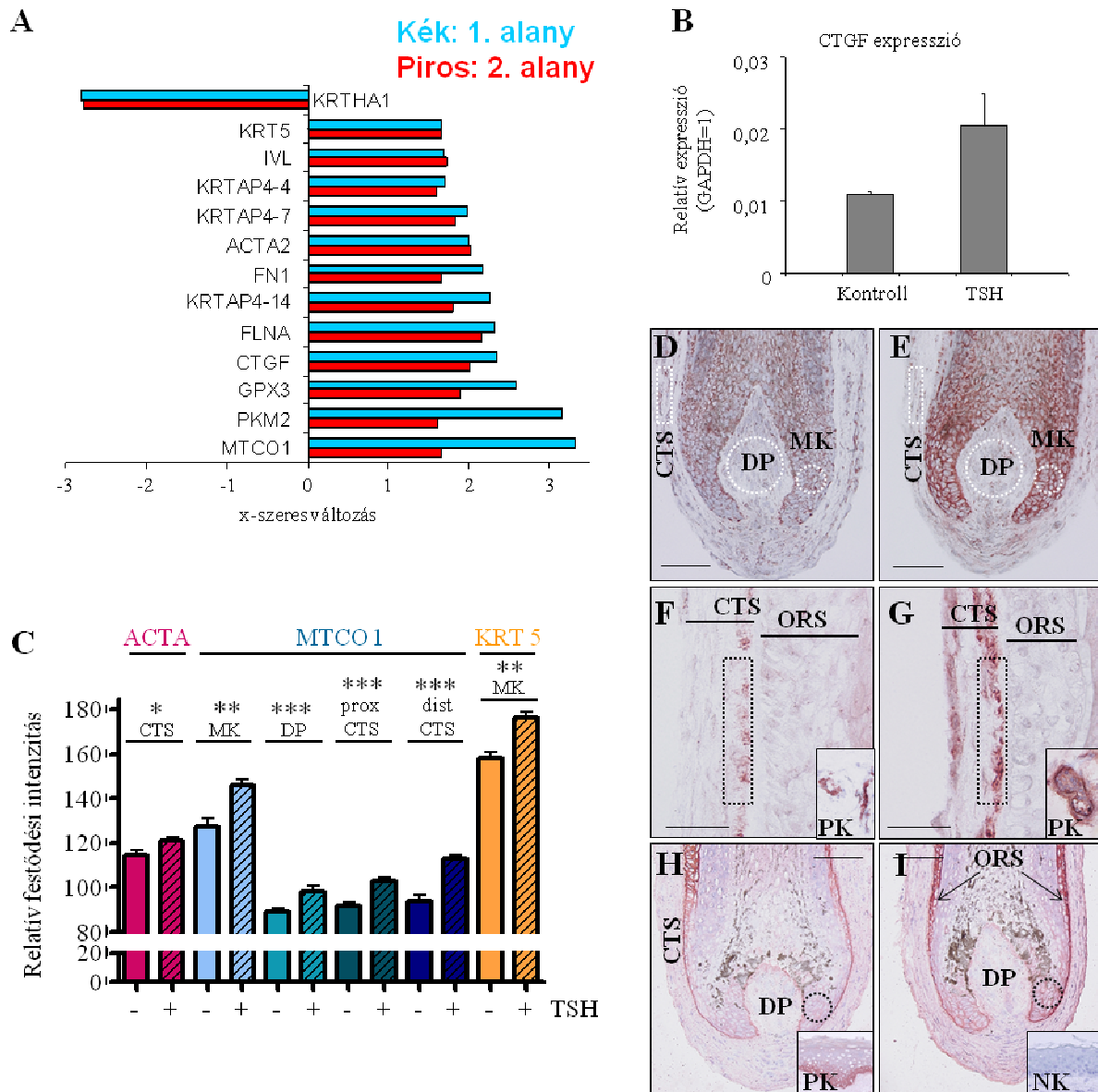
Annak ellenére, hogy a tireoglobulin (TG) mRNA kimutatható (RT-PCR) keratinocyták és melanoma sejtek kultúráiban *in vitro* (Slominski és mtsai., 2002), a TG pajzsmirigyen kívüli transzkripciójáról kifejezetten emberi bőrben még nem számoltak be korábban. Jelen kísérleteinkben mind frissen izolált szőrtüszőkből (nincs bemutatva), mind oldószer-kezelt kontroll szőrtüsző tenyészetből nyert RNS mintában kimutattuk a megfelelő méretű (395 bp) TG mRNA transzkript jelenlétét (**19.A ábra**). Az amplifikáció specificitását megerősítette a PCR termék szekvencia elemzése is, amely teljes mértékben egybeesett a legutóbb közétett emberi TG mRNA-szekvenciával (GenBank hivatkozási szám NM_003235) (nincs bemutatva). Kimutattuk azt is, hogy a TSH stimuláció ugyancsak képes volt a TG transzkriptek kiindulási szintjének megemelésére izolált szőrtüsző tenyészetben (**19.B ábra**).

Érdekes módon, több elsődleges antitest és eltérő másodlagos kimutatási rendszerek alkalmazása sem szolgáltatott elegendő immunhisztokémiai bizonyítékot a TG fehérje emberi fejbőrben történő kifejeződésére (a megfigyelt immunreaktivitás nem meggyőzően és reprodukálhatóan tért el a háttértől; nincs bemutatva). Bár a TG immunreaktivitás látszólagos hiánya az emberi bőrben módszertani okokra is visszavezethető lehet, eredményeink azonban arra utalnak, hogy a TG átírását nem követte transzláció.

Az említett szőrtüsző mintákban kimutathatóak voltak a pajzsmirigy transzkripció faktor-1 (TTF-1) specifikus transzkriptjei is (289 bp), amelyek egyensúlyi mRNS szintjei megemelkedtek TSH kezelés hatására háromból két vizsgált alany esetében (**19.A ábra**). Ez a TSH-indukálta TG transzkript upreguláció azt sugallja, hogy a TSH receptor emberi szőrtüszőkben valóban funkcionálisan aktív, és a TSH hatására intrafollikulárisan megjelenő TG transzkripció stimulációja a pajzsmirigyben megfigyeltékhez hasonló módon zajlik (pl. TTF-1-en keresztül) (Suzuki és mtsai., 1998 és 1999).

TSH stimuláció megváltoztatja az emberi szőrtüszők génexpressziós mintázatát

Annak érdekében, hogy a TSH receptor funkcionalitásáról és korábban ismeretlen TSH stimulációt követő pajzsmirigyen kívüli célgének kifejeződéséről további információkat szerezzünk, két független – azaz két különböző, egészséges női donorból nyert – emberi szőrtüsző szervkultúrát vizsgáltunk meg; TSH kezelt (100 mIU/ml) és oldószer kontroll mintákon DNS microarray vizsgálatot végeztünk. Szigorú kiválasztási kritériumokat alkalmaztunk a megváltozott génexpresszió elfogadására. Csak azokat az expresszióbeli eltéréseket tekintettük szignifikánsnak, melyek TSH kezelését követően minimum 1,5-szeres, azonos irányú változást mutattak mindkét vizsgált egyénből származó RNS mintában (p-érték <0,0001 esetén). Ezen kiválasztási szempontok alapján egy down- és tizenkét upregulált gént azonosítottunk: savas hajkeratin-1 (KRTHa1), keratin 5 (KRT5), involukrin (IVL), keratin-kapcsolt fehérje (KRTAP) 4-4, KRTAP 4-7, KRTAP 4-14, simaizom α 2-aktin (ACTA2), fibronectin 1 (FN1), A α -filamin (FLNA), kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), glutation peroxidáz 3 (GPX3), piruvát kináz (PKM2), citokróm-C oxidáz 1 (MTCO1) (**20.A ábra**).



20. ábra: A TSH kezelést követő génexpresszió változások humán szőrtüszőben

A: Két különböző alanyból (kék és piros) származó szőrtüszőket kezeltünk vivőanyaggal és 100 mU/ml TSH-val, amit microarray technikához használtunk fel. Az ábra a mindkét donorban bekövetkező génexpresszió-változást mutatja (kritériumok: azonos irányú, minimum 1,5-szeres, $p < 0,0001$). 13 ilyen gént azonosítottunk: savas hajkeratin-1 (KRTHa1, ma KRT31), keratin 5 (KRT5), involukrin (IVL), keratin kapcsolt fehérje (KRTAP) 4-4, KRTAP 4-7, KRTAP 4-14, simaizom α 2-aktin (ACTA2), fibronectin 1 (FN1), A α -filamin (FLNA), kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), glutation peroxidáz 3 (GPX3), piruvát kináz (PKM2), citokró-m-C oxidáz 1 (MTCO1). **B-I:** A TSH célgénének megerősítése. **B:** A CTGF relatív expressziójának vizsgálata kvantitatív PCR-al. A MTCO1 (**D, E**), ACTA (**F, G**) és KRT5 (**H, I**) fehérjeexpresszió kimutatása kontroll (**D, F, H**) és TSH kezelt (**E, G, I**) szőrtüszőkben immunfluoreszcenciával. PK: pozitív kontroll, NK: negatív kontroll, CTS: kötőszövetes tok, DP: dermális papilla, MK: mátrix keratinocyták, ORS: külső gyökérhüvely, epi: epidermisz. **C:** A szőrtüszők előre definiált, standardizált területeinek (körök és négyzetek) festődési intenzitása. prox: proximális, dist: disztális. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel. $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$, $***$ = $p < 0,001$ a vivőanyag kontrollhoz képest, Méretvonal: 50 μ m.

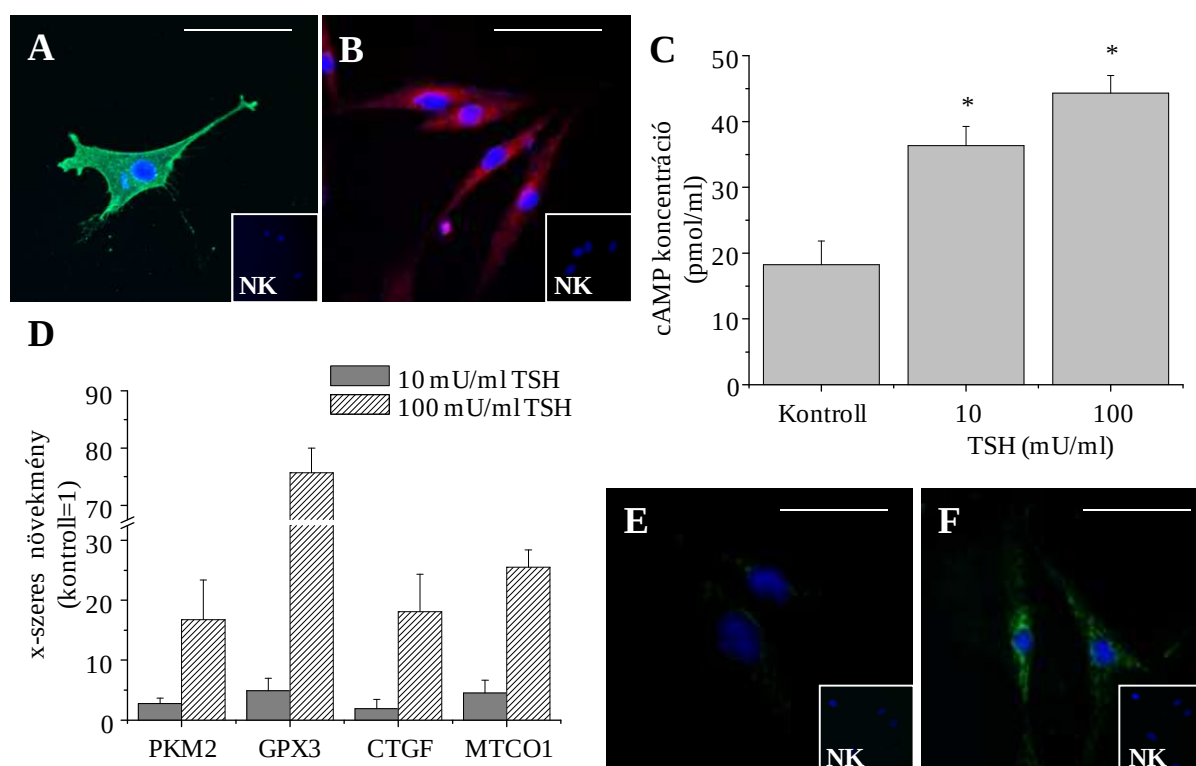
A kiválasztott gének TSH-indukálta génexpresszió változásának megerősítéséhez két újabb donorból származó szőrtüszőket vizsgáltunk reverz transzkripciót követő kvantitatív PCR (CTGF, GPX3 és PKM2, szőrtüsző homogenizátumból) és/vagy immunhisztokémia (KRT5, IVL, ACTA, FN (izoforma nem ismert), FLNA és MTCO1) technikákkal. Az olyan esetekben, amikor nem álltak rendelkezésünkre megbízható, elfogadott antitestek, akkor az adott proteincsalád egy közeli rokon fehérjéjét vizsgáltuk: ACTA, FN.

Amint az a **20. ábrán** látható, kvantitatív PCR technikával tudtuk igazolni, hogy a TSH kezelés képes upregulálni a CTGF transzkripciót (**20.B ábra**), míg a GPX3 és PKM2 transzkripció szintje változatlan maradt. Az MTCO1, ACTA és KRT5 esetében a kvantitatív immunhisztomorfometria egyértelműen megerősítette a megváltozott fehérje expressziót *in situ* (**20.C ábra**). A **20. ábra** szerint az izolált emberi szőrtüszők TSH stimulációját követően az MTCO1 upreguláció a szőrtüsző több területén megfigyelhető volt (mátrix keratinocyták, DP, proximális és disztális CTS; **20.D és E ábra**). Ezen túlmenően az ACTA intenzív immunhisztokémiai festődést mutatott humán CTS fibroblastokon *in vitro*, ami tovább emelkedett TSH stimuláció hatására (**20.F és G ábra**). A kiértékelés során a verejtékmirigy myofibroblastokon és ér-simaizmon *in situ* megfigyelhető TSH specifikus festődés szolgált pozitív kontrollként. Emellett a TSH kezelés jelentősen megemelte a KRT5-immunfestődést a szőrszál mátrix keratinocytáinak rétegében (**20.H és I ábra**).

Mindezen kísérleti adatok azt mutatják, hogy az egészséges emberi fejbőr szőrtüszőiben kifejeződő TSH receptor funkcionálisan aktív. Eredményeink emellett azt sugallják, hogy több új, TSH receptor mediált szignalizációs útvonalon keresztül közvetlenül vagy közvetetten szabályozott célgén is megtalálható a pajzsmirigyen kívüli emberi szövetekben, mint például a bőrben a CTGF, a MTCO1, az ACTA és a KRT5.

A tenyésztett emberi DP fibroblastok közvetlen célpontjai a TSH receptor-közvetített jelátvitelnek

Mivel minden eddigi leírt TSH-hatás egy összetett miniszerv-modellben vizsgáltunk, ami különböző eredetű és a funkciójú sejtpopulációkból épül fel, ellenőrizni kívántuk, hogy az izolált humán szőrtüsző TSH receptort expresszáló sejtpopulációi szintén képesek-e a TSH aktivációra válaszolni. Ezen kérdés megválaszolására korai passzálású (1-2.) primer humán DP fibroblast sejtkultúrát alkalmaztunk. A CD90 fibroblast marker immunreaktivitást mutató tenyésztett DP fibroblastokon (**21.A ábra**) TSH receptor-specifikus immunreaktivitást találtunk (**21.B ábra**) konfokális mikroszkóp segítségével. Kimutattuk azt is, hogy a TSH-kezelés szignifikánsan és dóziszfüggő módon megnövelte a fibroblast sejtek tápoldatban



21. ábra: A TSH receptor kifejeződése és a TSH kezelés hatása DP fibroblastokon

A CD90 pozitív (A) DP sejtek expresszálják a TSH receptort (B), magfestőként DAPI-t alkalmaztunk. NK: negatív kontroll. C: Kontroll és TSH kezelt DP sejtek felülszójából határoztuk meg a tenyészet cAMP tartalmát. A TSH kezelés több mint kétszeres cAMP szint növekedést indukál. D: A TSH kezelés dóziszfüggő módon emeli bizonyos mRNS transzkriptek expresszióját (q-PCR) DP fibroblastokon. PKM2: piruvát kináz, GPX3: glutation peroxidáz, CTGF: kötőszövetes tok növekedési faktor, MTCO1 citokróm-C oxidáz-1. A vivőanyag kontrollhoz képest (E) a MTCO1 immunreaktivitás szintén megemelkedett 100 mU/ml TSH kezelés hatására (F), magfestőként DAPI-t alkalmaztunk. NK: negatív kontroll. Méretvonal: 50 μ m. Az értékeket átlag $\pm$ SE formában tüntettük fel, *= $p < 0,05$.

megjelenő cAMP szintjét (**21.C ábra**). Hasonlóan a szőrtüsző kultúrákhoz, a DP fibroblastok TSH kezelése is jelentősen és dóziszfüggően upregulálta bizonyos mRNS transzkriptek kifejeződését; a PKM2, a GPX3, a CTGF, és az MTCO1 mRNS-ek expressziós szintje 16-75-ször magasabb volt a 100 mU/ml TSH-val kezelt mintákban, mint az oldószerrel kezelt kontroll DP sejteken (**21.D ábra**). A MTCO1 upregulációját immunfluoreszcens jelöléssel is ellenőriztük (**21.E és F ábra**).

MEGBESZÉLÉS

A TRPV3 szerepe a humán szőrtüsző biológiai folyamatainak szabályozásában

Bizonyos rágcsáló törzseken (DS-Nh egér és WBN/Kob-Ht patkány) végzett vizsgálatok során fény derült arra, hogy a kialakuló szőrtelen fenotípus megjelenéséért felelős mutáció a *trpv3* gén kódoló régióját érinti (Asakawa és mtsai., 2006). A DS-Nh egereken végzett további vizsgálatok rámutattak a TRPV3 egerek bőrében betöltött funkciójának fontosságára. Egyrészt bebizonyosodott, hogy a TRPV3 megfelelő működése elengedhetetlen a szőrtüszők normál fejlődéséhez (Imura és mtsai., 2007), másrészt az említett csupasz egértörzsben erőteljes viszketéssel járó spontán dermatitisz alakult ki (Yoshioka és mtsai., 2006 és 2009).

A rágcsálókön végzett kísérletek során bebizonyosodott, hogy a mutációnak köszönhetően folyamatosan aktív TRPV3 gátolta a szőrnövekedést (Xiao és mtsai., 2008). Arra nézve viszont nem voltak adataink, hogy a TRPV3 megtalálható-e humán szőrtüszőkön, illetve milyen szerepet játszik a humán hajciklus szabályozásában. Ezen kérdések sarkalltak minket arra, hogy vizsgálatokat végezzünk a TRPV3 expresszió feltérképezésére izolált humán hajfollikulusokon, illetve hogy kiderítsük milyen funkcionális szereppel bírnak a follikulusok biológiai folyamatainak szabályozásában.

Korábbi irodalmi adatok alapján ismeretes volt, hogy a TRPV3 expresszálódik humán epidermális keratinocytákon (Gopinath és mtsai., 2005; Facer és mtsai., 2007), de magán a humán szőrtüszőn még nem mutatták ki a jelenlétét. A TRP csatornák szerepének jellemzése az emberi bőr fiziológiás és patológias folyamataiban korántsem mondható kielégítőnek. Ezen molekulák nem-neuronális sejtek és szövetek szabályozási mechanizmusában betöltött szerepének feltárása napjainkban is zajlik (Szállási és Blumberg, 1999; Caterina és Julius, 2001; Clapham, 2003; Nilius és mtsai., 2006; Paus és mtsai., 2006; Bíró és mtsai., 2007).

Ebben az összefüggésben jelen kísérleteink szolgáltatták az első bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a TRPV3 – azáltal, hogy visszaszorítja a szőrtüsző keratinocyták proliferációját és apoptózis-vezérelt katagén regressziót indukál (**8-9. ábra**) – gátolja az emberi szőrszál növekedését *in vitro* (**7. ábra**). Tekintettel arra, hogy ezek a hatások egy olyan elfogadott emberi szervtenyészet-modellen jöttek létre, mely lehetővé teszi a szőrtüszők alapvető funkcióinak kvázi *in vivo* vizsgálatát, jelen megállapításaink élettanilag és klinikailag egyaránt relevánsnak tekinthetők. Ezért elmondhatjuk, hogy a bemutatott eredmények alapján a TRPV3 a humán szőrnövekedés és hajciklus újonnan megismert szabályozó molekulája, ami tökéletes összhangban áll az egér modelleken nyert korábbi adatokkal (Asakawa és mtsai., 2006; Imura és mtsai., 2007; Xiao és mtsai., 2008; Steinhoff és Bíró, 2009; Cheng és mtsai., 2010).

A TRPV3 funkcionális jelenlétét az emberi szőrtüsző epiteliális területein számos, primer ORS keratinocytá tenyészet vizsgálatából nyert bizonyítékkal támasztottuk alá; úgymint FLIPR alapú Ca^{2+} -imaging, patch-clamp mérések valamint életképesség és sejthalál vizsgálatok (**10-12. ábra**). Emellett a TRPV3 aktivátorokkal kiváltott ionáramok és az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ emelkedés gátolhatók voltak az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ lecsökkentésével vagy az általános TRP csatorna blokkoló ruténium vörös együttes alkalmazásával (**13. ábra**). A TRPV3 funkcionális szerepét meggyőzően támasztották alá az siRNS mediált géncsendesítést követő vizsgálataink is (**14. ábra**), amelynek során sikeresen gátoltuk a TRPV3 aktivátorok celluláris hatásait (pl. proliferáció gátlás, apoptózis indukció). Mindent összevetve, ezen adatok azt sugallják, hogy létezik egy olyan jelátviteli útvonal az emberi szőrtüszőkben, amely a TRPV3 csatorna megnyitásával Ca^{2+} beáramlást idéz elő, ami megakadályozza az ORS keratinocyták proliferációját és apoptózist indukál, ezzel gátolva a szőrnövekedést.

Korábban a TRPV3 funkcionális kifejeződését nagyrészt egér epidermális keratinocytákon írták le; sőt, TRPV3-specifikus hő- és farmakológiai ingerekkel aktivált

membránáramokat és $[Ca^{2+}]_{IC}$ emelkedést is tapasztaltak ezekben a sejtekben (Peier és mtsai., 2002; Chung és mtsai., 2004a és 2004b; Huang és mtsai., 2008; Xiao és mtsai., 2008; Cheng és mtsai., 2010). Ezen túlmenően a keratinocytákon a TRPV3 aktivációja különböző mediátorok felszabadulásához vezetett (pl. IL-1 α , prosztaglandin E2, ATP) (Xu és mtsai., 2006; Huang és mtsai., 2008; Mandadi és mtsai., 2009), amelyek fájdalom és/vagy viszketésérzékeny szenzoros afferensek „intercelluláris hírvivői” (Huang és mtsai., 2008; Mandadi és mtsai., 2009). Mivel ezen mediátorok gyulladásokkeltő hatása ismert a bőrben is (Bíró és mtsai., 1998 és 2007; Stenn és Paus, 2001; Paus és mtsai., 2006; Paus és Cotsarelis, 2008), így a keratinocytákon kifejeződő TRPV3 csatorna szerepet játszhat a bőr gyulladásos folyamataiban. Valójában a *trpv3* gén „*gain-of-function*,” mutációja epidermalis keratinocytákban történő overexpressziója nemcsak a viszketést, de súlyos bőrgyulladást is okoz DS-Nh egerekben (Yoshioka és mtsai., 2009). Emellett a mi előzetes adataink arra utalnak, hogy a TRPV3 aktivációja jelentősen csökkenti a humán epidermalis keratinocyták növekedését (Bíró és mtsai. előkészületben). Ezen megállapítások, valamint jelen eredményeink is hangsúlyozzák a TRPV3 csatorna és a hozzá kötődő (mindaddig meghatározatlan) endogén ligandok, valamint a kapcsolódó jelátviteli mechanizmusok élettani és kórélettani jelentőségét a szőrnövekedés szabályozásában.

A TRP csatornák összetett szerepét jól jelzi, hogy a most leírtakhoz nagyon hasonló szabályozási mechanizmusokat azonosítottunk a bőrben egy másik TRP izoforma esetében is. A TRPV1 aktivációja gátolta a szőrnövekedést és a follikuláris keratinocyták proliferációját, elősegítette a korai katagén regressziót emberi szőrtüszőben, humán epidermalis és ORS keratinocyták esetében apoptózist indukált, emellett proinflammatorikus gyulladásos citokinek felszabadulását okozta (Southall és mtsai., 2003; Bodó és mtsai., 2005; Bíró és mtsai., 2006). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TRPV1 és TRPV3-kapcsolt jelátviteli útvonalak (elvben) szinergikusan képesek szabályozni az emberi szőrszál növekedését és a hajciklust,

valamint feltehetően a bőr egyéb kulcsfontosságú biológiai folyamataiban is együttműködhetnek.

Összegezve kísérleteink eredményeit, azt a megállapítást tehetjük, hogy az izolált humán szőrtüszőkben jelenlévő TRPV3 fontos szereppel bír a szőrnövekedés és a hajciklus szabályozásában. A jelen munkánkban bemutatott TRPV3 aktiváció hatásosan gátolja az emberi szőrszál növekedését, mely arra utal, hogy a (pl. a helyileg alkalmazott) TRPV3 agonisták (akár TRPV1 aktivátorokkal együtt alkalmazva) a nemkívánt szőrnövekedés (pl. hipertrichózis, hirsutizmus) klinikai kezelésében alkalmazható új, jól tolerálható szerek kifejlesztésére adnak lehetőséget. A későbbiekben kifejlesztendő TRPV3 antagonisták jövőbeli vizsgálata szintén indokolt lehet a hajhullás különböző formáinak (pl. alopecia, effluvium) kezelésében. Végezetül adataink rávilágítanak a proinflammatorikus, pruritogén és anti-proliferatív TRPV3-kapcsolt jelátviteli útvonalak szisztematikus vizsgálatának jövőbeli fontosságára olyan kórképek kezelésében, mint például a pikkelysömör, egyes dermatitiszek vagy akár bőrdaganatok. A fentiek figyelembevételével érdemes átgondolni a TRPV3 aktivációt és/vagy szenzitizációt okozó anyagok (pl. a kámfor) (Peier és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2005) klinikai alkalmazásának lehetőségeit is.

A TSH receptor szerepe a humán szőrtüszők biológiai folyamatainak szabályozásában

Jelen munkánkban azt is be kívántuk mutatni, hogy az elsődlegesen a pajzsmirigyhormon-szintézis fokozásáért és a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HPT) tengely központi szabályozásáért felelős TSH számára az emberi fejbőr szőrtüszői is direkt célpontként szolgálnak. Mindez egy új, TSH receptor-mediált neuroendokrin jelátviteli útvonal azonosítására ad lehetőséget emberi bőrben. Lehetséges, hogy ezek a folyamatok állnak a közismert endokrin modulátorok emberi bőrben és szőrtüszőben kifejtett hatásainak hátterében, mint ahogy az a pajzsmirigyhormonok, az androgének és az ösztrogének esetében

már beigazolódott (Freinkel és Freinkel, 1972; Billoni és mtsai., 2000; Messenger, 2000; Stenn és Paus, 2001; Braverman és Utiger, 2005; Ohnemus és mtsai., 2006).

A hipotireoid betegeknél megfigyelhető szőrnövekedés változások (Freinkel és Freinkel, 1972) nagyobb valószínűséggel pajzsmirigyhormon-hatás eredményei, hiszen a (kísérletesen) megemelt TSH szint közvetlenül nem mutatott szignifikáns hatást az emberi szőrszálnövekedésre, hajciklusra és a mátrix keratinocyták proliferációjára női fejbőrből származó szőrtüsző szervkultúrában (**17. ábra**). Ezt az elképzelést az a nemrégiben bemutatott cikk is alátámasztja, mely szerint mind a T3, mind a T4 képes modulálni az anagén fázis hosszát emberi szőrtüsző szervkultúrában (van Beek és mtsai., 2008).

Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a TSH receptor kifejeződése kizárólag a fejbőr szőrtüszőinek mezenhimájában volt megfigyelhető, míg a normál emberi fej és gluteális bőr interfollikularis dermális fibroblastjai nem mutattak a TSH receptorra jellemző immunreaktivitást *in situ* (**16. ábra**). Mivel az emberi szőrtüsző mezenhimája, úgy tűnik, bizonyos mértékű védelmet élvez a kilökődési reakcióval szemben (Paus és mtsai., 2005), lehetséges allogén transzplantáció akár eltérő nemű páciensek esetében is (Reynolds és mtsai., 1999). Felmerül tehát, hogy a TSH receptor ellen kialakuló autoimmunitás, valamint az ennek következtében létrejövő pajzsmirigy megbetegedések ok-okozati összefüggésben lehetnek a szőrtüsző mezenhima említett elszigeteltségével és/vagy az immuntolerancia előzetes összeomlásával.

Az emberi haj szőrtüszőiben a TSH receptor szigorúan mezenhimális kifejeződése (az intrafollikuláris hám és a pigmenttermelő egység láthatóan nem mutat TSH receptor expressziót anagén VI és katagén fázisok alatt sem; **16. ábra**) is magyarázatul szolgálhat arra, hogy a TSH stimuláció miért nem befolyásolja a szőrnövekedést, a mátrix keratinocyták proliferációját és apoptózisát, valaminta pigmentációt.

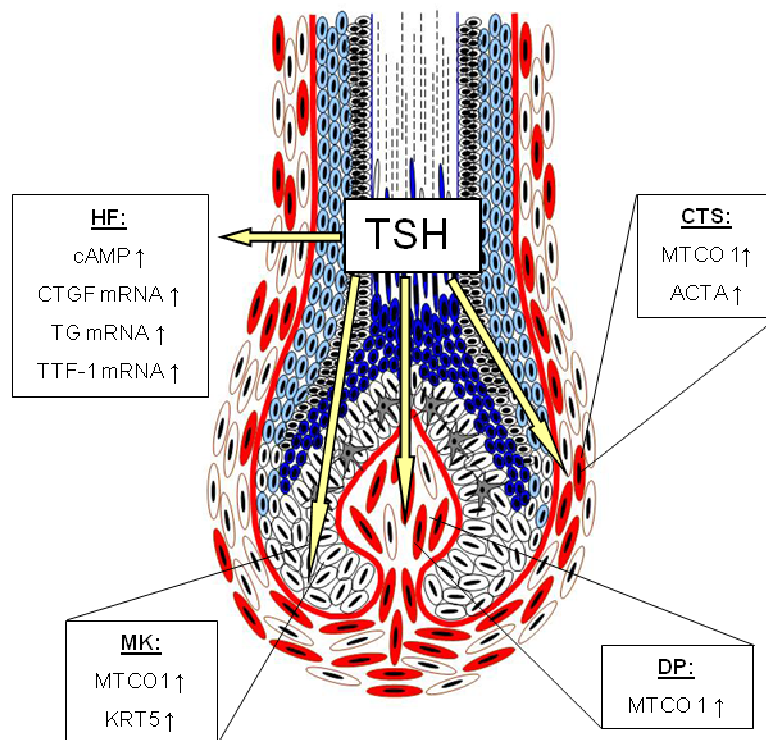
Furcsamód emellett az is igaz, hogy egyértelműen intraepiteliálisan kifejeződő célgénnek és/vagy géntermékek (pl. KRT5, KRTHa1 ami jelenleg KRT31 Langbein és Schweizer, 2005; lásd új keratin nomenklatura Schweizer és mtsai., 2006) expresszióját is módosította a TSH emberi izolált szőrtüsző tenyészetben. Ez a megállapítás azt sugallja, hogy a fejbőr szőrtüsző mezenhimális receptorainak stimulálása alapvetően közvetett úton befolyásolja a szőrtüsző hámsejtek működését. Így elképzelhető, hogy a szőrtüsző CTS-ében levő TSH receptorok stimulálása bizonyos diffúzibilis faktorok termelését és szekrécióját indukálja, mint például a CTGF-ét (**20. ábra**). Valószínűleg ezek a szőrtüsző mezenhimából származó faktorok a szőrtüsző epitéliumának különböző feladatait (mint például a hajkeratin termelését, ahogy azt a KRT5 és több KRTAP upregulációja is mutatja) parakrin módon befolyásolják. Így a központi és esetleg a perifériás TSH szekréció képes lehet bonyolult szabályozó hurkok aktiválására, amik például mezenhimális faktorok (mint a CTGF) toborzása révén közvetett módon modulálják a szőrtüsző hámsejtek funkcióit (**20, 22. ábra**). Ezen epiteliális-mezenhimális kölcsönhatások valószínűleg kissé eltérőek lehetnek a kültakaró különböző területein és a hajciklus különféle szakaszaiban, amint azt emberi gluteális régióból származó telogén szőrtüszőn kapott eredményeink mutatják, ahol néhány TSH receptor-pozitív sejt megjelent a szőrtüsző epitéliumában is (**16. ábra**). Ezzel együtt nem zárhatjuk ki a TSH közvetlen hatásának lehetőségét epidermális keratinocytákon, mivel a TSH receptor kifejeződik felnőtt és újszülött keratinocytákon, valamint aktivációja cAMP szintnövekedést okoz humán keratinocytákban (Slominski és mtsai., 2002).

A tény, hogy a két klasszikus TSH-célgén, a TG és a TTF-1 transzkripció szintje upregulálódott az emberi fejbőrön szőrtüszőkben TSH-kezelés után *in vitro* (**19. ábra**), újabb bizonyítékkal szolgál az intrafollikulárisan kifejeződő TSH receptor funkcionalitására. Emellett jól illeszkedik a TSH hatására klasszikusan bekövetkező cAMP jelátviteli útvonal aktivációhoz, ami jellemzően TSH receptor mediált folyamat (Povey és mtsai., 1976;

Braverman és Utiger, 2005). Habár korábban kimutatták TG transzkriptek jelenlétét humán keratinocytá (HaCaT) és humán melanoma sejtvonalakon *in vitro* (Slominski és mtsai., 2002), TG transláció jelenlétét korábban soha nem vizsgálták normál emberi bőrben *in situ*. Így a mi megfigyeléseink szolgáltatják az első bizonyítékot a TG transzkripcióra emberi bőrben és a fejbőr follikulusaiban arra, hogy a szőrtüszők ugyanazt a transzkripció faktort (pl. TTF-1) „használják” a TG upregulációhoz, amit a pajzsmirigy hámsejtjei is (Suzuki és mtsai., 1998 és 1999).

Bemutattuk azt is, hogy az emberi fejbőrből származó szőrtüsző egy könnyen kezelhető, élettanilag releváns eszközként szolgálhat új, nem-klasszikus TSH célgénak elemzéséhez. Ez a szokatlan, de jól tanulmányozható új modell korábban feltérképezetlen TSH funkciók megismerésének kulcsa lehet, ami jóval túlmutat a TSH-nak a bőr és a szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött szerepének megismerésén, hiszen a génexpressziót elemezve számos olyan új TSH-célgén azonosítottunk emberi fejbőr szőrtüszőiben, amit korábban nem vettek figyelembe a TSH/TSH receptor biológiai összefüggéseinek vizsgálatában (pl. KRTAP, CTGF, ACTA) (**20. ábra**). Több, a szőrtüszőben azonosított új TSH-célgén (CTGF, ACTA, MTCO1 és KRT5) mRNS és/vagy a fehérje szintű expresszió változásait további alanyokból származó minták egymástól függetlenül is megerősítették (kvantitatív PCR és kvantitatív immunohisztomorfometria technikák), míg más faktorok (FLNA, IVL) expressziós változásait, amelyeket a microarray analízis eltérőnek mutatott a két vizsgált alanyban, ilyen módon nem sikerült alátámasztanunk (**20, 22. ábra**).

Bár az említett új célgénak az emberi bőr és szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött funkcionális szerepének megismerése további vizsgálatokat igényel, a fenti eredmények alapján már most kijelenthetjük, hogy a TSH által gyakorolt új hatások jóval túlmutatnak a klasszikusan ismert folyamatok skáláján (pl. a pajzsmirigyhormon-termelés serkentése, a pajzsmirigy növekedése) (Kohrle, 1990; Braverman és Utiger, 2005). A TSH



22. ábra: TSH kezelés hatására számos epithelialis és mezenhimális faktor expressziója megváltozik

TSH receptor expresszió kizárólag a szőrtüszők (HF) mezenhimális területein volt megfigyelhető (piros szín). A TSH receptor aktiváció fokozott cAMP termelést, kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), tireoglobulin (TG) és pajzsmirigy transzkripció faktor-1 (TTF-1) transzkripciót okozott szőrtüsző szervkultúrában (HF). A TSH kezelés stimulálta a citokróm-c oxidáz 1 (MTCO1) mRNS és fehérje expresszióját a dermalis papilla (DP), valamint a kötőszövetes tok (CTS) fibroblastokban és a mátrix keratinocytákban (MK). Emellett a CTS-ben α 2-aktin (ACTA), a MK-ban pedig keratin 5 (KRT5) mRNS és fehérje szintű expresszió-növekedés volt megfigyelhető.

által szabályozott expressziójú FLNA például a normál kötőszöveti működés egy fontos eleme az emberi bőrben (Gómez-Garre és mtsai., 2006), míg a CTGF (együttműködve a „wingless” típusú fehérje (WNT) receptor komplexszel) modulálja a WNT jelátviteli útvonalat (Mercurio és mtsai., 2004; Mou és mtsai., 2006), a szőrtüsző morfogenezis és hajciklus egyik fő szabályozóját (Schmidt-Ullrich és Paus, 2005). A TSH hatására *in situ* megfigyelt follikuláris MTCO1 upreguláció pedig felveti az elméleti lehetőségét annak, hogy a TSH akár képes lehet közvetlenül befolyásolni a szőrtüsző energia metabolismusát (Sheehan és mtsai., 2004). Végezetül a humán DP fibroblastokon (a TSH receptor által közvetített stimuláció közvetlen célsejtjein) a TSH kezelést követően PKM2, GPX3, CTGF és MTCO1 upreguláció volt megfigyelhető (21, 22. ábra). Mindez arra utal, hogy szőrtüsző DP

fibroblastjaiban a TSH-jelátvitel közvetlen szerepet játszhat az anyagcsere és az oxidációs folyamatok szabályozásában.

Az viszont, hogy a TSH upregulálja a myofibroblast marker ACTA immunreaktivitását bőrben (**20. ábra**) azt sugallja, hogy a TSH is képes elősegíteni a fibroblastok myofibroblastokká történő átalakulását. Ez az átalakulás jellemzően sebgyógyulás és seblezárás idején fordul elő, amikor a normál bőr fibroblastok fenotípusa simaizom fibroblastokra jellemzően megváltozik; azaz kontraktilis fehérjéket expresszálnak és megváltozik az orientációjuk is (Tomasek és mtsai., 2002; Werner és Grose, 2003). Elképzelésünk szerint az ACTA upregulációja szőrtüsző eredetű fibroblastok mioepiteliális fenotípusúvá történő átalakulására utalhat (Goldberg és mtsai., 2007; Hinz, 2007; Lygoe és mtsai., 2007). Mivel a follikuláris CTS is kiemelkedő szerepet játszik a sebgyógyulásban (Jahoda és Reynolds, 2001; Gharzi és mtsai., 2003); és mivel a szőrtüsző szervkultúra létrehozása során a mikrodisszekció alkalmával a szőrtüszőt jelentős sérülés éri, az emberi szőrtüsző szervkultúra egy nem megszokott, de tanulságos modellként szolgálhat a TSH sebgyógyulásra, hegesedésre és a bőr megújulására kifejtett hatásainak további felderítésére is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink első felében sikerrel igazoltuk a tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) fehérje (immunhisztokémia) és mRNS szintű (q-PCR) jelenlétét humán izolált szőrtüsző tenyészetben. Kimutattuk, hogy a különböző TRPV3 aktivátorok dóziszfüggő módon gátolták a szőrszál növekedését és lecsökkentették a proliferáló (Ki-67 nukleáris proliferációs markert kifejező) sejtek számát, valamint növelték az apoptózis (DNS-fragmentációt kimutató TUNEL reakció) intenzitását, katagén transzformációt indukáltak. ORS keratinocyták tenyészetén is sikerrel igazoltuk a TRPV3 csatorna funkcionális jelenlétét, hiszen aktivációja hatására indukált membránáramokat, és megemelkedett $[Ca^{2+}]_{IC}$ -szintet mértünk, ami a sejtek proliferációjának csökkenéséhez és apoptózis kialakulásához vezetett. Az ORS keratinocytákon megfigyelhető hatások TRPV3 specifikusnak mutatkoztak, mivel a folyamatok kivédhetőnek bizonyultak TRPV3 specifikus géncsendesítés segítségével. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a humán szőrtüsző bizonyos sejtjei TRPV3 csatornával rendelkeznek, mely jelentős szerepet tölthet be a follikulus növekedésének (így a hajciklus folyamatainak) szabályozásában.

Ezek után a pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH) hatásait vizsgáltuk humán szőrtüszőben, ami az utóbbi idők kutatásai alapján egyedülállóan hormonérzékeny szövetnek bizonyult. A TSH receptor mRNS szintű jelenléte mellett a TSH receptor immunpozitivitás az emberi bőr mezenhimális területein volt kimutatható. A TSH receptor stimulációja szőrtüsző és DP fibroblast tenyészetekben a cAMP szint emelkedéséhez, és bizonyos klasszikus, valamint eddig ismeretlen TSH célgének expresszióváltozásához vezetett egyaránt. Habár a TSH emberi szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött szerepének megértéséhez további vizsgálatok szükségesek, eredményeink szerint a szőrtüsző egy új, pajzsmirigytől távoleső célpontja a TSH-nak.

SUMMARY

In the first part of our experiments the presence of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3), at both protein (immunohistochemistry) and mRNA levels (q-PCR), was identified in isolated human hair follicle cultures. We have shown that different TRPV3 activators inhibited hair growth, reduced the amount of the proliferating cells (Ki-67, nuclear proliferation marker), and stimulated apoptosis (TUNEL reaction, DNA fragmentation) in the hair bulb, and induced catagen transformation in a dose-dependent manner. The functional presence of TRPV3 in ORS keratinocytes cultures has also been successfully demonstrated; since the activation of the channel induced membrane currents and elevated Ca^{2+} levels, which lead to the suppression of cell proliferation and induction of apoptosis. These have proven to be TRPV3-specific on ORS keratinocytes, since TRPV3-specific gene silencing antagonized these actions. Based on these results, we can conclude that certain cells of the human hair follicles express TRPV3 channels, which play a significant role in the regulation of follicular growth and hence the processes of hair cycling.

The effects of thyroid-stimulating hormone (TSH) were then investigated on the human hair follicle, which – based on recent studies – is uniquely hormone sensitive tissue. The presence of the TSH receptor specific mRNA and immunoreactivity was detected in the mesenchymal areas of human skin. In addition, the stimulation of TSH receptor resulted in an increase in cAMP levels in cultures of hair follicles and DP fibroblasts, and led to a change in the expression levels of certain classical and so far unknown TSH target genes as well. Although further studies are required to fully understand of the exact function of TSH in the biological processes of human hair follicle, our novel findings introduce the hair follicles as an interesting, new extra-thyroid target for TSH.

IRODALOMJEGYZÉK

- Agretti P, De Marco G, De Servi M, Marocchi C, Vitti P, Pinchera A és Tonacchera M (2005): Evidence for protein and mRNA TSHr expression in fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) after adipocytic differentiation. *Eur J Endocrinol.* **152**:777-84.
- Amann R és Maggi CA (1991): Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life Sci.* **49**:849-56.
- Amantini C, Mosca M, Lucciarini R, Perfumi M, Morrone S, Piccoli M és Santoni G (2004): Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **11**:1342-56.
- Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EM és Paus R (2006): Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol.* **126**:1697-704.
- Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T és Sakata T (2006): Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol.* **126**:2664-72.
- Auber L (1952): The anatomy of follicles producing wool-fibers, with special reference to keratinization. *Trans R Soc Edinburgh* **62**:191-254.
- Barbosa AJ, Castro LP, Margarida A és Nogueira MF (1984): A simple and economical modification of the Masson-Fontana method for staining melanin granules and enterochromaffin cells. *Stain Technol.* **59**:193-6.
- van Beek N, Bodó E, Kromminga A, Gáspár E, Meyer K, Zmijewski MA, Slominski A, Wenzel BE és Paus R (2008): Thyroid hormones directly alter human hair follicle functions: anagen prolongation and stimulation of both hair matrix keratinocyte proliferation and hair pigmentation. *J Clin Endocrinol Metab.* **93**:4381-4388.

- Bell A, Gagnon A, Grunder L, Parikh SJ, Smith TJ és Sorisky A (2000): Functional TSH receptor in human abdominal preadipocytes and orbital fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279**:C335-40.
- Benham CD, Davis JB és Randall AD (2002): Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology.* **42**:873-88.
- Billoni N, Buan B, Gautier B, Gaillard O, Mahe YF és Bernard BA (2000): Thyroid hormone receptor beta1 is expressed in the human hair follicle. *Br J Dermatol.* **142**:645-52.
- Bíró T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Acs P és Blumberg PM (1998): Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Brain Res Mol Brain Res.* **56**:89-98.
- Bíró T, Bodó E, Telek A, Géczy T, Tychsen B, Kovács L és Paus R (2006): Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): evidence from TRPV1 knockout mice. *J Invest Dermatol.* **126**:1909-12.
- Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, Dobrosi N, Géczy T és Paus R (2007): TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta.* **1772**:1004-21.
- Boczán J, Boros S, Mechler F, Kovács L és Bíró T (2000): Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol.* **99**:96-104.
- Bodó E, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L és Bíró T (2004): Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J Invest Dermatol.* **123**:410-413.
- Bodó E, Bíró T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Tóth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovács L és Paus R (2005): A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol.* **166**:985-998.

- Bodó E, Kromminga A, Funk W, Laugsch M, Duske U, Jelkmann W és Paus R (2007): Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB J.* **21**:3346-54.
- Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S, Burelli A, Grasso L, Dell'Unto E, Manetti L és Martino E (1997): L-thyroxine directly affects expression of thyroid hormone-sensitive genes: regulatory effect of RXRbeta. *Mol Cell Endocrinol.* **134**:23-31.
- Botchkarev VA, Eichmuller S, Johansson O és Paus R (1997): Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J Comp Neurol.* **386**:379-395.
- Botchkarev VA, Botchkarev NV, Albers KM, van der Veen C, Lewin GR és Paus R (1998a): Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol.* **111**:279-285.
- Botchkarev VA, Welker P, Albers KM, Botchkareva NV, Metz M, Lewin GR, Bulfone-Paus S, Peters EM, Lindner G és Paus R (1998b): A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol.* **153**:785-799.
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Peters EM és Paus R (2004): Epithelial growth control by neurotrophins: leads and lessons from the hair follicle. *Prog Brain Res.* **146**:493-513.
- Botchkareva NV, Botchkarev VA, Chen LH, Lindner G, Paus R (1999): A role for p75 neurotrophin receptor in the control of hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* **216**:135-153.
- Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ, Botchkarev VA és Gilchrist BA (2001): SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J.* **15**:645-658.

- Braverman LE és Utiger RD (2005): The normal thyroid (Part I.). In: The thyroid, a fundamental and clinical text. (Braverman LE, Utiger RD, szerk.) 3-305. *Williams & Wilkins, PH, Lippincott*.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD és Julius D (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. **389**:816-24.
- Caterina MJ és Julius D (2001): The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*. **24**:487-517.
- Chase HB (1954): Growth of the hair. *Physiol Rev*. **34**:113-26.
- Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, Samie MA, Knoff J, Eisinger B, Liu ML, Huang SM, Caterina MJ, Dempsey P, Michael LE, Dlugosz AA, Andrews NC, Clapham DE és Xu H (2010): TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell*. **141**:331-43.
- Chiamolera MI és Wondisford FE (2009): Minireview: Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. *Endocrinology*. **150**:1091–1096.
- Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M és Caterina MJ (2004a): 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci*. **24**:5177-82.
- Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M és Caterina MJ (2004b): TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem*. **279**:21569-75.
- Clapham DE (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **426**:517-24.
- Clapham DE, Montell C, Schultz G és Julius D (2003): International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. **55**:591-6.

- Colombe L, Vindrios A, Michelet JF és Bernard BA (2007): Prostaglandin metabolism in human hair follicle. *Exp Dermatol.* **16**:762-9.
- Colombe L, Michelet JF és Bernard BA (2008): Prostanoid receptors in anagen human hair follicles. *Exp Dermatol.* **17**:63-72.
- Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M és Vassart G (1998): Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J Immunol* **160**:1458-1465.
- Czirják G és Enyedi P (2003): Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol Pharmacol.* **63**:646-652.
- Davies T, Marians R és Latif R (2002): The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest.* **110**:161–164.
- Dawber R (1997): Diseases of the hair and scalp. 606-625. *Blackwell Science, Oxford*
- Dayhoff MO, Schwartz RM és Orcutt BC (1978): A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff MO (szerk.): Atlas of Protein Sequence and Structure. 5. kötet, 3. mell. *Washington, DC: Natl Biomed Res Found*, p345-352.
- Denda M, Sokabe T, Fukumi-Tominaga T és Tominaga M (2007): Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* **127**:654-659.
- Deplewski D és Rosenfield RL (2000): Role of hormones in pilosebaceous unit development. *Endocr Rev.* **21**:363-392.
- Dobrosi N, Tóth BI, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Kovács L és Bíró T (2008): Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J.* **22**:3685-3695.
- Facer P, Casula MA, Smith GD, Benham CD, Chessell IP, Bountra C, Sinisi M, Birch R és Anand P (2007): Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related

- novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurol.* **7**:11.
- Foitzik K, Paus R, Doetschman T és Dotto GP (1999): The TGF-beta2 isoform is both a required and sufficient inducer of murine hair follicle morphogenesis. *Dev Biol.* **212**:278-289.
- Foitzik K, Lindner G, Müller-Röver S, Maurer M, Botchkareva N, Botchkarev V, Handjiski B, Metz M, Hibino T, Soma T, Dotto GP és Paus R (2000): Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *FASEB J.* **14**:752-760.
- Foitzik K, Krause K, Conrad F, Nakamura M, Funk W és Paus R (2006): Human scalp hair follicles are both a target and a source of prolactin, which serves as an autocrine and/or paracrine promoter of apoptosis-driven hair follicle regression. *Am J Pathol.* **168**:748-756.
- Freinkel RK és Freinkel N (1972): Hair growth and alopecia in hypothyroidism. *Arch Dermatol.* **106**:349-352.
- Garrity JA és Bahn RS (2006): Pathogenesis of graves ophthalmopathy: implications for prediction, prevention, and treatment. *Am J Ophthalmol.* **142**:147-153.
- Gharzi A, Reynolds AJ és Jahoda CA (2003): Plasticity of hair follicle dermal cells in wound healing and induction. *Exp Dermatol.* **12**:126-136.
- Gilliam AC, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, Hammerberg C és Cooper KD (1998): The human hair follicle: a reservoir of CD40+ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol.* **110**:422-427.
- Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC és Garner WL (2007): TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol.* **127**:2645-2655.

- Gómez-Garre P, Seijo M, Gutiérrez-Delicado E, Castro del Río M, de la Torre C, Gómez-Abad C, Morales-Corraliza J, Puig M és Serratosa JM (2006): Ehlers-Danlos syndrome and periventricular nodular heterotopia in a Spanish family with a single FLNA mutation. *J Med Genet* **43**:232-237.
- Gopinath P, Wan E, Holdcroft A, Facer P, Davis JB, Smith GD, Bountra C és Anand P (2005): Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibres and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. *BMC Womens Health*. **5**:2.
- Green DR és Reed JC (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**:1309-1312.
- Griger Z, Páyer E, Kovács I, Tóth BI, Kovács L, Sipka S és Bíró T (2007): Protein kinase C-beta and -delta isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells. *J Mol Med*. **85**:1031-1042.
- Guillemin R (2005): Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol*. **184**:11-28.
- Hall R, Amos J, Garry R és Buxton RL (1970): Thyroid-stimulating hormone response to synthetic thyrotrophin releasing hormone in man. *Br Med J*. **2**:274-277.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B és Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. **391**:85-100.
- Hardy MH (1992): The secret life of the hair follicle. *Trends Genet*. **8**:55-61.
- Hasse S, Chernyavsky AI, Grando SA és Paus R (2007): The M4 muscarinic acetylcholine receptor plays a key role in the control of murine hair follicle cycling and pigmentation. *Life Sci*. **80**:2248-2252.
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J és Martin GR (1994): FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*. **78**:1017-1025.

- Hinz B (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* **127**:526-537.
- Huang CL (2004): The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol.* **15**:1690-1699.
- Huang J, Zhang X és McNaughton PA (2006): Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol.* **17**:638-645.
- Huang SM, Lee H, Chung MK, Park U, Yu YY, Bradshaw HB, Coulombe PA, Walker JM és Caterina MJ (2008): Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. *J Neurosci.* **28**:13727-13737.
- Imura K, Yoshioka T, Hikita I, Tsukahara K, Hirasawa T, Higashino K, Gahara Y, Arimura A és Sakata T (2007): Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **363**:479-483.
- Ito N, Ito T, Betterman A és Paus R (2004): The human hair bulb is a source and target of CRH. *J Invest Dermatol.* **122**:235-237.
- Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH és Paus R (2005): Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *FASEB J.* **19**:1332-1334.
- Jackson D, Church RE és Ebling FJ (1972): Hair diameter in female baldness. *Br J Dermatol.* **87**:361-367.
- Jahoda CAB és Reynolds AJ (1996): DERMAL-EPIDERMAL INTERACTIONS: Adult Follicle-Derived Cell Populations and Hair Growth. *Dermatologic Clinics.* **14**:573-583.
- Jahoda CA (1998): Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. *Exp Dermatol.* **7**:235-248.

- Jahoda CA és Reynolds AJ (2001): Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing. *Lancet*. **358**:1445-1448.
- Jahoda CA, Whitehouse J, Reynolds AJ és Hole N (2003): Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol*. **12**:849-859.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A és Szolcsányi J (1967): Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*. **31**:138-151.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A és Szolcsányi J (1968): The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br J Pharmacol Chemother*. **33**:32-41.
- Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, Arasheben A, Tilley WD, Scher HI, Gerald WL, Buchanan G, Coetzee GA és Frenkel B (2007): Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol. Cancer* **6**:39.
- Kennelly és Maynard (1953): The interrelationship between thyroid activity, dietary fat and lipogenesis. *J Nutr* **49**: 599-608.
- Kobayashi H, Kromminga A, Dunlop TW, Tychsen B, Conrad F, Suzuki N, Memezawa A, Bettermann A, Aiba S, Carlberg C és Paus R (2005): A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *FASEB J*. **19**:1710-1712.
- Kohrle J (1990): Thyrotropin (TSH) action on thyroid hormone deiodination and secretion: one aspect of thyrotropin regulation of thyroid cell biology. *Horm Metab Res Suppl*. **23**:18-28.
- Koulen P és Thrower EC (2001): Pharmacological modulation of intracellular Ca(2+) channels at the single-channel level. *Mol Neurobiol*. **24**:65-86.

- Krause K és Foitzik K (2006): Biology of the Hair Follicle: The Basics. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. **25**:2-10.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-5.
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S, Beckhaus U, Rackwitz HR és Schweizer J (1999): The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J. Biol. Chem.* **274**:19874-19884.
- Langbein L, Rogers MA, Winter H, Praetzel S és Schweizer J (2001): 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.* **276**:35123-35132.
- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Aoki N, Winter H és Schweizer J (2002): 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.* **118**:789-799.
- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Cribier B, Peltre B, Gassler N és Schweizer J (2005): Characterization of a novel human type II epithelial keratin K1b, specifically expressed in eccrine sweat glands. *J Invest Dermatol.* **125**:428-444.
- Langbein L és Schweizer J (2005): Keratins of the human hair follicle. *Int Rev Cytol.* **243**:1-78.
- Leonhardt JM és Heymann WR (2002): Thyroid disease and the skin. *Dermatol Clin.* **20**:473-481, VII.
- Limat A és Noser FK (1986): Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. *J Invest Dermatol.* **87**:485-488.

- Limat A, Hunziker T, Boillat C, Bayreuther K és Noser F (1989): Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **92**:758-762.
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C és Paus R (1997): Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol.* **151**:1601-1617.
- Lindner G, Menrad A, Gherardi E, Merlino G, Welker P, Handjiski B, Roloff B és Paus R (2000): Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J.* **14**:319-332.
- Lygoe KA, Wall I, Stephens P és Lewis MP (2007): Role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation. *Biol Cell.* **99**:601-614.
- Magerl M, Kauser S, Paus R és Tobin DJ (2002): Simple and rapid method to isolate and culture follicular papillae from human scalp hair follicles. *Exp Dermatol.* **11**:381-385.
- Magnus-Levy A (1895): Über den respiratorischen Gaswechsel unter dem Einfluss der Thyroidea so wie unter verschiedenen pathologischen Zuständen. *Berl Klin Wochenschr.* **32**:650.
- Mandadi S, Sokabe T, Shibasaki K, Katanosaka K, Mizuno A, Moqrich A, Patapoutian A, Fukumi-Tominaga T, Mizumura K és Tominaga M (2009): TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Arch.* **458**:1093-1102.
- Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R és Smith JC (2004): Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development.* **131**:2137-2147.
- Messenger AG (2000): Thyroid hormone and hair growth. *Br J Dermatol.* **142**:633-634.

- Montagna W és Ellis RA (1958): The biology of Hair Growth. *Academic Press, New York*
- Montagna W és Parakkal FP (1974): The Structure and Function of the Skin. *Academic Press, New York*
- Montell C és Rubin GM (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. **2**:1313-1323.
- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andaházy M, Story GM és Patapoutian A (2005): Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*. **307**:1468-1472.
- Moran DS, Heled Y, Still L, Laor A és Shapiro Y (2004): Assessment of heat tolerance for post exertional heat stroke individuals. *Med Sci Monit*. **10**:CR252-CR257.
- Mou C, Jackson B, Schneider P, Overbeek PA és Headon DJ (2006): Generation of the primary hair follicle pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**:9075-9080.
- Müller-Röver S, Rossiter H, Lindner G, Peters EM, Kupper TS és Paus R (1999): Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *J Investig Dermatol Symp Proc*. **4**:272-277.
- Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS és Paus R (2001): A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*. **117**:3-15.
- Murakami M, Kamiya Y, Morimura T, Araki O, Imamura M, Ogiwara T, Mizuma H és Mori M (2001) Thyrotropin receptors in brown adipose tissue: thyrotropin stimulates type II iodothyronine deiodinase and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Endocrinology*. **142**:1195–1201.
- Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Vennekens R és Voets T (2006): The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J*. **25**:467-478.

- Nilius B (2007): Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg.* **162**:244-253.
- Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, Gustafsson JA és Paus R (2006): The hair follicle as an estrogen target and source. *Endocr Rev.* **27**:677-706.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NC és Freaque HC (1987): Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev.* **8**:288-308.
- Panteleyev AA, Jahoda CA és Christiano AM (2001): Hair follicle predetermination. *J Cell Sci.* **114**:3419-3431.
- Paus R, Stenn KS és Link RE (1990): Telogen skin contains an inhibitor of hair growth. *Br J Dermatol.* **122**:777-784.
- Paus R, Peters EM, Eichmüller S és Botchkarev VA (1997): Neural mechanisms of hair growth control. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **2**:61-68.
- Paus R (1998): Principles of hair cycle control. *J. Dermatol.* **25**:793-802.
- Paus R és Cotsarelis G (1999): The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* **341**:491-497.
- Paus R, Müller-Röver S és Botchkarev VA (1999): Chronobiology of the hair follicle: hunting the "hair cycle clock". *J Investig Dermatol Symp Proc.* **4**:338-345.
- Paus R és Peler S (2003): Biology of hair and nail. In: Bolognia JL, Jorizzo JL és Rapini RP, (szerk): *Dermatology. London: Mosby*, p1007–1032.
- Paus R és Foitzik K (2004): In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation.* **72**:489-511.
- Paus R, Nickoloff BJ és Ito T (2005): A 'hairy' privilege. *Trends Immunol.* **26**:32-40.
- Paus R, Theoharides TC és Arck PC (2006): Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends Immunol.* **27**:32-39.

- Pedersen SF, Owsianik G és Nilius B (2005): TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. **38**:233-252.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S és Patapoutian A (2002): A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*. **296**:2046-2049.
- Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ és Paus R (2001): Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J Invest Dermatol*. **116**:236-245.
- Peters EM, Tobin DJ, Botchkareva N, Maurer M és Paus R (2002): Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. *J Histochem Cytochem*. **50**:751-766.
- Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R és Scholzen TE (2006): Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*. **126**:1937-1947.
- Peters EM, Liotiri S, Bodó E, Hagen E, Bíró T, Arck PC és Paus R (2007): Probing the effects of stress mediators on the human hair follicle: substance P holds central position. *Am J Pathol*. **171**:1872-1886.
- Philp D, Goldstein AL és Kleinman HK (2004a): Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development. *Mech Ageing Dev*. **125**:113-115.
- Philp D, Nguyen M, Scheremeta B, St-Surin S, Villa AM, Orgel A, Kleinman HK és Elkin M (2004b): Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J*. **18**:385-387.
- Philpott MP, Green MR és Kealey T (1990): Human hair growth in vitro. *J Cell Sci*. **97**:463-471.

- Philpott MP, Sanders D, Westgate GE és Kealey T (1994): Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *J Dermatol Sci.* **7**:S55-S72.
- Philpott MP, Sanders DA, Bowen J és Kealey T (1996): Effects of interleukins, colony-stimulating factor and tumour necrosis factor on human hair follicle growth in vitro: a possible role for interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in alopecia areata. *Br J Dermatol.* **135**:942-948.
- Porcellini A, Messina S, De Gregorio G, Feliciello A, Carlucci A, Barone M, Picascia A, De Blasi A és Avvedimento EV (2003): The expression of the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor and the cAMP-dependent protein kinase RII beta regulatory subunit confers TSH-cAMP-dependent growth to mouse fibroblasts. *J Biol Chem.* **278**:40621-40630.
- Povey PM, Smith BR, Davies TF és Hall R (1976): Thyrotrophin receptor binding, intracellular cyclic amp levels and iodine release in isolated thyroid cells. *FEBS Lett.* **72**:251-255.
- Powel BC és Rogers GE (1997): 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 szerk.). 59-148, *Birkhäuser, Basel*
- Reichlin S és Utiger RD (1967): Regulation of the pituitary-thyroid axis in man: relationship of TSH concentration to concentration of free and total thyroxine in plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* **27**:251-255.
- Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM és Jahoda CA (1999): Trans-gender induction of hair follicles. *Nature.* **402**:33-34.
- Safer JD (2005a): The skin and connective tissue in hypothyroidism. In: *The thyroid, a fundamental and clinical text.* (Braverman LE, Utiger RD, szerk.) 769-773. *Williams & Wilkins, PH, Lippicott*

- Safer JD (2005b): The skin in thyrotoxicosis. In: The thyroid, a fundamental and clinical text. (Braverman LE, Utiger RD, szerk.) 553-558. *Williams & Wilkins, PH, Lippicott*
- Sanchez AM, Sanchez MG, Malagarie-Cazenave S, Olea N és Diaz-Laviada I (2006): Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis*. **11**:89-99.
- Sanger F (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*. **214**:1205-1210.
- Schell H, Kieseewetter F, Seidel C és von Hintzenstern J (1991): Cell cycle kinetics of human anagen scalp hair bulbs in thyroid disorders determined by DNA flow cytometry. *Dermatologica*. **182**:23-26.
- Schmidt-Ullrich R és Paus R (2005): Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*. **27**:247-261.
- Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL és Galton VA (2001): Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol*. **15**:2137-2148
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R és Paus R (2009): The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Current Biology*. **19**:R132-R142.
- Schon M, Benwood J, O'Connell-Willstaedt T és Rheinwald JG (1999): Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. *J Cell Sci*. **112**:1925-1936.
- Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA és Wright MW (2006): New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. **174**:169-174.
- Scofield VL, Montufar-Solis D, Cheng E, Estes MK és Klein JR (2005): Intestinal TSH production is localized in crypt enterocytes and in villus 'hotblocks' and is coupled to IL-

- 7 production: evidence for involvement of TSH during acute enteric virus infection. *Immunol Lett.* **99**:36-44.
- Sheehan TE, Kumar PA és Hood DA (2004): Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **286**:E968-E974.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D és Gabbiani G (1986): A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* **103**:2787-2796.
- Slominski A és Wortsman J (2000): Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* **21**:457-87.
- Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R és Solomon S (2000): Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev.* **80**:979-1020.
- Slominski A, Wortsman J, Kohn L, Ain KB, Venkataraman GM, Pisarchik A, Chung JH, Giuliani C, Thornton M, Slugocki G és Tobin DJ (2002): Expression of hypothalamic-pituitary-thyroid axis related genes in the human skin. *J Invest Dermatol.* **119**:1449-1455.
- Slominski A (2005): Neuroendocrine system of the skin. *Dermatology.* **211**:199-208.
- Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC és Paus R (2007): Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol.* **265-266**:143-149.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P és Davis JB (2002): TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature.* **418**:186-190.
- Soma T, Tsuji Y és Hibino T (2002): Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *J Invest Dermatol.* **118**:993-997.

- Sorisky A, Bell A és Gagnon A (2000): TSH receptor in adipose cells. *Horm Metab Res.* **32**:468-474.
- Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD és Travers JB (2003): Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* **304**:217-222.
- Steinhoff M és Bíró T (2009): A TR(I)P to pruritus research: role of TRPV3 in inflammation and itch. *J Invest Dermatol.* **129**:531-535.
- Stenn KS és Paus R (2001): Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* **81**:449-494.
- Susin SA, Zamzami N és Kroemer G (1998): Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta.* **1366**:151-165.
- Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A és Kohn LD (1998): Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:8251-8256.
- Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L és Kohn LD (1999): Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology.* **140**:5422-5430.
- Szállási Á és Blumberg PM (1999): Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* **51**:159-212.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun T-T és Lavker RM (2000): Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell.* **102**:451-461.
- Telek A, Bíró T, Bodó E, Tóth BI, Borbíró I, Kunos G és Paus R (2007): Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* **21**:3534-3541.
- Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA és Paus R (1998): Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J Invest Dermatol.* **111**:941-947.

- Tobin DJ és Paus R (2001): Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp Gerontol.* **36**:29-54.
- Tobin DJ, Gunin A, Magerl M és Paus R (2003): 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.* **8**:80-86.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C és Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:349-363.
- Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltsmann H, Kovács L, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R és Bíró T (2009): Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol.* **129**:329-339.
- Vassart G és Dumont JE (1992): The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev.* **13**:596-611.
- Veronesi B, Carter JD, Devlin RB, Simon SA és Oortgiesen M (1999): Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides.* **33**:447-456.
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G és Nilius B (2002): Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem.* **277**:47044-47051.
- Werner S és Grose R (2003): Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* **83**:835-870.
- Williams WP és Dominy PJ (1990): Control of excitation energy distribution in cyanobacteria: sensitivity to uncouplers and ATP synthase inhibitors. *BBA Bioenergetics.* **1015**:121-130.
- Xiao R, Tian J, Tang J és Zhu MX (2008): The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell Calcium.* **43**:334-343.

- Xu H, Blair NT és Clapham DE (2005): Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci.* **25**:8924-8937.
- Xu H, Delling M, Jun JC és Clapham DE (2006): Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* **9**:628-635.
- Yano K, Brown LF és Detmar M (2001): Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* **107**:409-417.
- Yoshioka T, Hikita I, Asakawa M, Hirasawa T, Deguchi M, Matsutani T, Oku H, Horikawa T és Arimura A (2006): Spontaneous scratching behaviour in DS-Nh mice as a possible model for pruritus in atopic dermatitis. *Immunology.* **118**:293-301.
- Yoshioka T, Imura K, Asakawa M, Suzuki M, Oshima I, Hirasawa T, Sakata T, Horikawa T és Arimura A (2009): Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol.* **129**:714-722.
- Yuspa SH, Kulesz-Martin M, Ben T és Hennings H (1983): Transformation of epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol.* **81**:162s-168s.
- Zhang L, Baker G, Janus D, Paddon C, Fuhrer D és Ludgate M (2006): Biological effects of thyrotropin receptor activation on human orbital preadipocytes. *Invest Ophthalm & Visual Sci.* **47**:5197-5203.
- Zouboulis CC, Seltsmann H, Hiroi N, Chen W, Young M, Oeff M, Scherbaum WA, Orfanos CE, McCann SM és Bornstein SR (2002): Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:7148-7153.
- Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K és Rosenfield R (2007): Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res.* **39**:85-95.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönetet mondok témavezetőmnek, **Dr. Bíró Tamásnak**, aki mindenben támogatott, munkámhoz felbecsülhetetlen segítséget nyújtott, és akitől nagyon sokat tanulhattam.

Külön köszönetet mondok **Dr. Kovács László professzor úrnak** és **Dr. Csernoch László professzor úrnak**, az Élettani Intézet egykori és jelenlegi vezetőjének, amiért lehetővé tették, hogy kutatómunkámat az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Élettani Laboratóriumában folytathassam.

Köszönetet mondok **Dr. Cserta Editnek**, az Abiol Kft. ügyvezető igazgatójának, hogy lehetőséget nyújtott kutatómunkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom kollaborációs partnereinknek, hogy segítségükkel és tudásukkal hozzájárultak munkám sikeréhez. Köszönöm **Dr. Ralf Pausnak** és **Dr. Bodó Enikőnek**, hogy a gyümölcsöző együttműködés lehetőségét biztosították számomra.

Közvetlen kollegáimnak, **Tóth István Balásznak**, **Czifra Gabriellának**, **Marincsák Ritának**, **Szöllősi Attilának**, **Oláh Attilának**, **Dobrosi Nórának** és **Géczy Tamásnak** köszönöm a sok segítséget, amelyet nap, mint nap nyújtottak, és köszönöm, hogy bármikor számíthattam rájuk.

Hálás köszönettel tartozom **Lisztes Erikának** és **Ambrus Lídiának** azért a sok közvetlen segítségért, amit TDK, majd PhD hallgatóként nyújtottak munkám során.

A nélkülözhetetlen technikai segítségért Dr. Vargáné Kiss Ibolyának, **Ibcsikének** tartozom hálával.

Végezetül köszönöm az **Élettani Intézet** és az **Abiol Kft. valamennyi dolgozójának**, **PhD és TDK hallgatójának** akik az évek során segítették munkámat.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények

- 1) **Borbíró I**, Lisztes E, Tóth IB, Czifra G, Oláh A, Szöllősi AG, Szentandrassy N, Nánási PP, Péter Z, Paus R, Kovács L és Bíró T (2011): Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J. Invest. Dermatol.* (közlésre elfogadva) **IF: 5,543** (2009).
- 2) Bodó E, Kromminga A, Bíró T, **Borbíró I**, Gáspár E, Zmijewski MA, van Beek N, Langbein L, Slominski A és Paus R, (2009): Human female hair follicles are a direct, non-classical target for thyroid-stimulating hormone (TSH). *J. Invest. Dermatol.* **129**:1126-1139; **IF: 5,543**.

További in extenso közlemények

- 1) Telek A, Bíró T, Bodó E, Tóth IB, **Borbíró I**, Kovács L, Kunos G és Paus R, (2007): Inhibition of human hair follicle growth by endo- and exocannabinoids. *FASEB J.* **21**:3534-3541; **IF: 6,791**.
- 2) Szikszai Z, Kertész Z, Bodnár E, Major I, **Borbíró I**, Kiss ÁZ és Hunyadi, J. (2010): Nuclear microprobe investigation of the penetration of ultrafine zinc oxide into intact and tape-stripped human skin. *Nucl. Instrum. Meth. B.* **268**:2160-2163., **IF: 1,156** (2009).
- 3) Mamo S, Kobolák J, **Borbíró I**, Bíró T, Bock I. és Dinnyés A. (2010): Gene targeting and Calcium handling efficiencies in mouse embryonic stem cell lines. *World J Stem Cells* **2**:127-140.

Idézhető előadáskivonatok

- 1) Páyer E, **Borbíró I**, Dobrosi N, Tóth IB, Szegedi A és Bíró T (2007): Transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) regulates cell growth and death of human and mouse epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **127**:S62.
- 2) **Borbíró I**, Géczy T, Paus R, Kovács L és Bíró T (2008): Activation of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) inhibits human hair growth. *J. Invest. Dermatol.* **128**:S151.
- 3) Gáspár E, Bodó E, Hardenbicker C, **Borbíró I**, Bíró T, Kromminga A és Paus R (2009): Thyrotropin-releasing hormone (TRH) as a novel, potent modulator of human hair follicle pigmentation and growth: reminiscences of our amphibian past? *J. Invest. Dermatol.* **129**:S103.
- 4) **Borbíró I**, Lisztes E, Ambrus L, Tóth BI, Czifra G, Kovács L és Bíró T (2009): Thermosensitive transient receptor potential vanilloid-3 ion channels regulate human keratinocyte biology. *J. Invest. Dermatol.* **129**:S65.

MELLÉKLETEK

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények kéziratai

- 1) Borbíró I, Lisztes E, Tóth IB, Czifra G, Oláh A, Szöllősi AG, Szentandrassy N, Nánási PP, Péter Z, Paus R, Kovács L és Bíró T (2011): Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *J. Invest. Dermatol.*
- 2) Bodó E, Kromminga A, Bíró T, **Borbíró I**, Gáspár E, Zmijewski MA, van Beek N, Langbein L, Slominski A és Paus R, (2009): Human female hair follicles are a direct, non-classical target for thyroid-stimulating hormone (TSH). *J. Invest. Dermatol.* **129**:1126-1139.