

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3 ioncsatorna szerepe humán epidermális keratinociták gyulladásos folyamatainak szabályozásában

Dr. Vasas Nikolett

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

**A tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3 ioncsatorna szerepe
humán epidermális keratinociták gyulladásos folyamatainak
szabályozásában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Vasas Nikolett
általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok:	Dr. Szűts Viktória, PhD
	Dr. Szőőr Árpád, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,
Élettani Intézet
2020. október 29. 14:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina, PhD
Dr. Dajnoki Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok:	Dr. Szűts Viktória, PhD
	Dr. Szőőr Árpád, PhD
	Dr. Körmöndiné Dr. Buzás Krisztina, PhD
	Dr. Dajnoki Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és
Nőgyógyászati Intézet Tanterme
2022. december 02. 13:00

BEVEZETÉS

Napjainkban nagy figyelem helyeződik esztétikai megjelenésünkre, melyen belül nagy hangsúlyt fektetünk a rendszeres bőrápolásra, ami a mindennapi rutinunk része. Ehhez a szépségipar a kozmetikumok kimeríthetetlen tárházát kínálja a felhasználóknak. A kozmetikai készítményeken feltüntetett összetevők számos jótékony hatással „kecsegtetnek” a szebb, egészségesebb bőr eléréséért. Ahhoz azonban, hogy egy bőrápoló ágens piaci forgalomba kerüljön és biztonsággal alkalmazható legyen, számtalan klinikai és molekuláris biológiai kutatás és eredmény szükséges. Manapság lehetőség van nemcsak szöveti, hanem sejt szinten is vizsgálni a különböző hatóanyagokat - milyen receptoron hatnak, hogyan befolyásolják a sejtek normál működését, ezen hatásait milyen jelátviteli útvonalon fejtik ki -, továbbá magukon a sejteken lévő receptorok feltérképezését és biológiai folyamatokban betöltött szerepét is számos molekuláris módszerrel vizsgálhatjuk. A világon számtalan kutatócsoport foglalkozik a bőr biológiájának pontos megismerésével, hiszen ez az a „szervünk”, mely közvetlenül ki van téve a környezeti ártalmaknak, ugyanakkor a bőrbetegségek esetén is a terápiás lehetőségek nem csak szisztémásan, hanem topikálisan, közvetlenül az érintett bőrterületen is alkalmazhatóak. Laboratóriumunk - részben kozmetikai cégekkel együttműködve - évek óta szerepet vállal ezen kutatásokban.

Kutatócsoportunk fő profilja az endokannabinoid rendszer (ECS) vizsgálata, mely az elmúlt évtizedek kutatásainak köszönhetően nagy mértékben kibővült. Az ECS részét képező ionotróp receptorokon belül a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák

vanilloid alcsaládjának több tagját azonosítottuk a bőr számos alkotóelemén (szőrtüsző, piloszebéceus egység, keratinociták).

Az elmúlt évek kutatásainak köszönhetően kiderült, hogy bizonyos rágszálók szőrtelen fenotípusát és bőrbetegségét okozó mutáció a *Trpv3* gént kódoló régióban található, továbbá a hasonló fenotípussal és tünetekkel rendelkező Olmsted-szindrómás betegekben több más mutáció mellett ugyanezt a régiót érintő mutációk is kimutathatók. Jelen munkánk során a tranzien receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna vizsgálatát végeztük a bőr legkülső rétegét alkotó epidermális keratinocitákon. Az egészséges szöveteken, és azokból izolált keratinocitákon végzett kísérleteinket kiterjesztettük az egyik leggyakoribb bőrbetegség, az atópiás dermatitiszes (AD) betegekből származó mintákra is. Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a TRPV3 ioncsatorna milyen mértékben expresszálódik az egészséges és AD-s keratinocitákban, funkcionálisan aktív formában van-e jelen és az aktivált csatorna szerepet játszik-e a bőr gyulladásos folyamatainak kialakulásában, fenntartásában. Amennyiben a csatorna aktívan részt vesz ezen biológiai folyamatokban, úgy a TRPV3 ioncsatorna aktivációja vagy gátlása hatékony terápiás célpont lehet a gyulladásos bőrbetegségek kezelésében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)-3 ioncsatorna

A tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna talán az egyik legkülönlegesebb tagja a vanilloid alcsaládnak. Kb. 43 %-os szekvencia-homológiát mutat az alcsalád elsőként leírt tagjával a TRPV1-gyel. Az eredetileg termoszenzitív – fiziológiás hőtartományon aktiválódó ($<33\text{ }^{\circ}\text{C}$) – ioncsatorna hasonlóan a többi TRP-csatornához homo-, vagy heterotetramer formát képez, melyen belül az alegységek 6 transzmembrán doménnel rendelkeznek. Az intracellularis amino-terminális vég 6 ankyrin ismétlődést tartalmaz, létrehozva az „ankyrin repeat domain”-t (TRPV3-ARD), mely igen csekély mértékben tér el a TRPV1-ARD-től. A TRPV1-hez hasonlóan az AR2 és AR3 közötti konzervált régió vesz részt az ATP és kalmódulin (CaM) kötésében. Mindemellett a TRPV3 tartalmaz egy hőre aktiválódó, egy Ca^{2+} -szenzitív régiót, valamint 2-APB kötőhelyet.

A TRPV3 elsősorban egy nem szelektív kationcsatorna, aktivációja során a kation permeábilis pórusa dilatál, valamint a pórusban lévő negatív töltésű aminosavak is elősegítik a nagyobb méretű kationok átjutását.

A TRPV-csatornák közül a TRPV3 az egyetlen, melynél endogén modulátor vagy ligand nem került leírásra, azonban több exogén, köztük szintetikus és a természetben is előforduló, elsősorban aromás vegyület aktivátora a csatornának. A szintetikus vegyületek közül a legismertebb aktivátora a 2-APB, valamint a drofenine. Természetes aktivátorai közé számos aromás vegyület tartozik, melyek egyben kellemes meleg érzetet keltenek, ezáltal a TRPV3 hőmérsékletre adott válaszát is potenciózzák, ilyenek például a kámfor, carvacrol, timol, eugenol, mentol.

A többi TRP-csatornával ellentétben a TRPV3 alacsony expressziót mutat szenzoros neuronokon. Több szervben is kifejeződik, ilyenek az agy, nyelv, herék, szaruhártya, disztális colanfél, gége és belső fül, azonban az egyik legmagasabb expressziója a bőrben jellemző, elsősorban az epidermális keratinocitákon és a szőrtüsző sejteiben.

Bőrünk elsődleges védelmi rendszere: az epidermális barrier

Az emberi bőr egyik legfontosabb funkciója a barrier kialakítása, mely egy elsődleges védelmi rendszer a külső környezet káros hatásaival szemben. Bőrünk barrier rendszerét igen komplex, több funkció együttese hozza létre, kialakításában a bőr dermális és epidermális rétege egymással összehangoltan vesz részt, ezen belül is az epidermiszt alkotó keratinociták kulcsfontosságú szerepet töltenek be, elsősorban a *stratum corneum* rétegében. Ennek a komplex, összehangolt szabályozást igénylő rendszernek a legfőbb tagjai a kommenzális flóra által kialakított *biológiai barrier*; a bőr hidratáltságát, folyadékegyensúlyát és megfelelő pH-ját biztosító *kémiai barrier*; a bőr szilárdságát adó és a mechanikai hatásoknak ellenálló *fizikai*, vagy *mechanikai barrier*; valamint a patogén kórokozók felismerését és elpusztítását biztosító *immunológiai barrier*.

Az epidermális barrier egyensúlyát érintő betegségek „prototípusa”: az atópiás dermatitisz

Az atópiás dermatitisz (AD) az egyik leggyakoribb krónikus, gyulladásos bőrbetegség; tüneteit tekintve leginkább a kiújuló ekcémával, száraz bőrrel és erős viszketéssel jellemezhető, ennek következtében világszerte emberek millióinak életminőségét rontja. Nagyon gyakran a barrier betegségek „prototípusának” tekintik,

mivel az epidermális barrier valamennyi résztvevője zavart szenved, továbbá a bőr gyulladása és az erőteljes viszketés is nagyban hozzájárul a betegség kialakulásához, progressziójához és krónikussá válásához. Kiemelendő, hogy a gyulladás, a barrier diszfunkció és a viszketés is egymással összefüggő, egymást erősítő folyamatok, melyek együttesen felelősek a betegség kialakulásáért.

A TRPV3 ioncsatorna és a bőr kapcsolata

Bár a TRP ioncsatornák jelenlétét először neuronokon írták le, az elmúlt évtizedek kutatásai igazolták, hogy számos TRP-csatorna nem neuronális sejttypuson is expresszálódik. Az újonnan megjelenő eredmények rávilágítottak a TRP-csatornák szerepére a bőrben, ahol kimutatták, hogy számos, a bőrsejtekben lejátszódó folyamatokban fontos szerepet töltenek be. Ebből a szempontból az egyik legérdekesebb a TRPV3 ioncsatorna, amit először keratinocitákon írtak le.

A TRPV3 expresszió élettani jelentőségét a bőrben az az eredmény igazolja, hogy a DS-Nh egértörzs szőrtelen fenotípusát a keratinocitákban egyetlen pontmutáció okozza a *TRPV3* gént kódoló régióban, nevezetesen a Gly573Ser pontmutáció, mely egy „gain-of-function” (funkciónyerés) mutációhoz vezet. Az érintett egerekben nemcsak a szőrtelen fenotípus jellemző, hanem számos bőrelváltozás is, úgymint a spontán dermatitisz, viszketés és hiperkeratózis, mindemellett kiemelendő a *Staphylococcus aureus* kolonizáció, magasabb IgE és IL-4 szintek, valamint a fokozott CD4⁺ T sejt infiltráció, melyek arra engednek következtetni, hogy a TRPV3 ioncsatornának komplex szerepe lehet a bőr patofiziológiájában.

Ezen eredmények jelentőségét tovább hangsúlyozza az a bizonyíték, hogy emberben ugyanez a Gly573Ser pontmutáció, valamint több missence mutáció a TRPV3

ioncsatornát kódoló génben egy nagyon ritka rendellenesség, az Olmsted-szindróma kialakulásához vezet. A betegségben a leggyakoribb tünetek közé tartozik a palmoplantáris keratoderma, a perioroficiális hiperkeratózis, diffúz szőrhiány, kopaszság és viszketés. Az egyidejű szövettani leletek hiperkeratózist, parakeratózist és pszoriáziform léziókat írnak le hízósejt infiltrációval a dermisz felső részében, amik hasonlóak a fentebb említett egerben leírt tünetekkel. Mindemellett molekuláris szinten kimutatták, hogy a TRPV3 aktivációja a keratinocitákban olyan jelátviteli molekulák felszabadulását eredményezi (mint pl.: prosztaglandin E2, ATP, NGF és TSLP), amelyek gyulladást és viszketést okoznak a bőrben.

Ezen eredményekkel összhangban, munkacsoportunk korábban a TRPV3 szerepét vizsgálta szőrtüszőkön és külső gyökérhüvely keratinocitákon, ahol funkcionálisan aktív formában fejeződnek ki, továbbá aktivációjuk gátolja a szőrnövekedést és a sejtproliferációt, valamint sejthalált indukál.

Kutatási témánk szempontjából fontos jelentőségű, hogy a TRPV3 megemelkedett expressziót mutat mRNS-szinten AD-ben szenvedő betegek léziós bőrében, továbbá a TRPV3 különböző vegyületek általi gátlása bizonyítottan hatékony az AD-szerű tünetek enyhítésében állatmodellekben. Ezen ismeretek újabb eredményekkel bővültek, melyek kimondják, hogy a TRPV3 expresszió fehérje szinten is megemelkedik AD léziókban, valamint az AD-betegek léziós bőréből izolált keratinociták fokozott hőérzékenységet mutatnak TRPV3 függő módon, ami pruritogének felszabadulását eredményezi.

Érdekes módon, a korábbi eredmények ellenére még nem rendelkezünk kellő információval a TRPV3 sejt szintű szerepéről és működéséről keratinocitákon, valamint az eddigi tanulmányok nem vizsgálták részletesen, hogy a TRPV3 expressziója és

funkciója megváltozik-e AD betegek nem-lézionális bőrében, amely vélhetően különbözik az egészséges bőrtől a terminális differenciálódás és bizonyos immunfolyamatok tekintetében.

CÉLKITŰZÉS

A TRPV3 ioncsatorna aktivációjának hatása még nem teljesen tisztázott humán epidermális keratinocitákon, ezért munkánk során célul tűztük ki:

1. A TRPV3 ioncsatorna expressziójának és funkcionális aktivitásának molekuláris szintű vizsgálatát humán epidermális keratinocitákon.
2. A TRPV3 ioncsatorna klasszikus agonistáival történő aktivációja során az epidermális keratinociták gyulladásos folyamataiban betöltött szerepének vizsgálatát, és a folyamatokban részt vevő jelátviteli útvonalak feltérképezését.
3. A TRPV3 ioncsatorna expressziós és funkcionális jellemzőinek felmérésére és összehasonlítására törekedtünk nem-lézionális és lézionális területről származó AD-s betegek mintáiban, valamint egészséges bőrből származó szöveteken.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Egészséges és AD-s betegekből származó epidermális keratinociták izolálása és tenyésztése

Az egészséges bőrmintákat bőrgyógyászati szempontból egészséges, sebészeti beavatkozáson átesett önkéntesekből nyertük. Atópiás egyénekből csupán a felső epidermális réteg került eltávolításra megfelelő érzéstelenítést követően borotva segítségével, mind az érintett bőrelváltozás területéről, valamint az egészségesnek tűnő régióból is. A kísérletek a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásaitikai Bizottság engedélyének megszerzését követően történtek (protokollszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012 ügyiratszám: IX-R-052/01396-2/2012), valamint a Helsinki Deklaráció irányelveinek betartásával.

A mintákat 3-5 mm²-es négyzetekre daraboltuk fel. Az egészséges egyénekből származó szövetdarabokat 2,4 U/ml diszpáz oldatban emésztettük egy éjszakán keresztül, majd csipesz segítségével választottuk szét a dermo-epidermális réteget. Mind az egészséges, mind az atópiás epidermiszt 0,1% tripszin-0,2% EDTA keverékével emésztettük egy órán keresztül 37 °C-on. A sejtek szétválásának mechanikai elősegítésére vortexelést végeztünk. A tripszin inaktiválására 5x-ös térfogatú 10 v/v %-os embrionális borjúsérummal (FBS) és penicillin, streptomicyannel kiegészített DMEM oldatot használtunk. A sejteket 1000 fordulat/perc-el centrifugáltuk 8 percen keresztül, majd az így nyert epidermális keratinocitákat DMEM/HAM F12 3:1 arányú, meghatározott anyagokkal kiegészített keverékében tenyésztettük 2 napon keresztül. A tenyésztést 5% CO₂-tartalmú, párasított légterű, 37°C-os termosztátban végeztük. A sejtek letapadását követően (donortól függően 2-5 nap múlva) a keratinociták

tenyésztését szérumban mentes EpiLife oldatban folytattuk, a tenyésztőoldatot 5 v/v %-os humán keratinocita növekedési faktorral (HKGS) egészítettük ki. A sejteket kb. 80 %-os konfluencia szintnél passzáltuk megelőzve ezzel a sejtek konfluencia-indukált differenciálódását.

Immunhisztokémia

A paraffinba ágyazott szövetdarabokból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Deparaffinálást és antigén feltárást követően a metszeteket elsődleges humán TRPV3 elleni antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Az elsődleges antitesttel történő festést követően a metszeteket biotinilált kecske ellenes IgG-vel inkubáltuk. Az immunreakció kimutatására diaminobenzidint (DAB), míg a magfestésre hematoxilint alkalmaztunk. A jelölési eljárás ellenőrzése végett az elsődleges antitest elhagyása történt a negatív kontrollokban. Az immunfestést Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és értékeltük.

Immuncitokémia

A keratinocitákat üveg fedőlemezre szélesztettük és a megfelelő konfluencia eléréséig tenyésztettük. Acetonos fixálását követően a sejteket permeabilizáltuk, majd a vizsgálni kívánt elsődleges antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. A fluoreszcens festéshez a fedőlemezeket fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 60 percen keresztül. A sejtmagok festésére 4',6-diamidino-2-fenilindol-t (DAPI) alkalmaztunk. A jelölési eljárás ellenőrzése végett az elsődleges antitest elhagyása történt a negatív kontrollokban. Az immunfestést Olympus Xcellence RT fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és értékeltük.

Génexpressziós változások vizsgálata

Kísérleteink során a különböző gének expressziós változásait reverz transzkripciót követő, kvantitatív, „valós idejű” polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) vizsgáltuk. A teljes RNS tartalmat a gyártó utasításainak betartásával a TRIzol reagens alkalmazásával izoláltuk. Ezt követően a teljes RNS 1 µg-jából kiindulva reverz transzkripciót végeztünk High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et felhasználva. Az így előállított cDNS-ből kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció segítségével mutattuk ki a vizsgált gének specifikus transzkriptjét, TaqMan primerek és próbák felhasználásával.

TRPV3 fehérje szintű kimutatása (Western blot)

A homogenizált minták proteintartalmának meghatározását követően SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk. Majd a gélből a fehérjét nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat a vizsgálni kívánt elsődleges antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Másnap a membránokat másodlagos specifikus IgG antitesttel inkubáltuk 60 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az immunreakciók eredményét SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate-Enhanced Chemiluminescence kit segítségével tettük láthatóvá, a jeleket LAS-3000 Intelligent Dark Box, valamint KODAK Gel Logic 1500 Imaging System készülékek felhasználásával rögzítettük. Az optikai denzitás meghatározására ImageJ képelemző szoftvert alkalmaztunk.

Citokinfelszabadulás vizsgálata (ELISA)

A különböző kezeléseknek kitett keratinocita sejtek által termelt és felszabadult citokinek meghatározásához a sejtek felülcszóját összegyűjtöttük, majd a felszabadult

citokinek (IL-6 és IL-8) mennyiségét specifikus ELISA kitek segítségével határoztuk meg, a gyártó protokollját követve. A vizsgálat végén az abszorbanciát 450, vagy 405 nm-en mértük. A felszabadult citokin mennyiségét standard görbe segítségével határoztuk meg.

Patch-clamp vizsgálat

A patch-clamp mérésekhez a keratinocitákat (NHEK, AD-NHEK és AD-HEK) 10 mm átmérőjű üveg fedőlemezre szélesztettük. A fedőlemezeket egy inverz mikroszkópra felszerelt perfúziós kamrába helyeztük és a sejteket folyamatosan Tyrode külső oldattal perfundáltuk. Az ionáramok rögzítésére egy Multiclamp-700B típusú intracelluláris erősítőt használtunk teljes-sejtes konfigurációban. A gigaseal ($> 1 \text{ G}\Omega$) ellenállást enyhe szívással, a teljes sejtes konfigurációt további enyhe szívással vagy 1,5 V-os, 1 ms-os elektromos impulzusokkal hoztuk létre. A mért ionáramokat az adott sejt kapacitására normalizáltuk, ennek meghatározásához -10 mV és -20 mV közötti depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az elektromos jeleket 10 kHz frekvenciával rögzítettük, az elemzést pClamp 10.3 szoftver segítségével végeztük.

Intracelluláris kalciumkoncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$) meghatározása

A keratinocita sejteket 10 000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96 lyukú fekete falú, átlátszó aljú lemezekre, majd az edényeket 24 órán át 37 °C-on tartottuk termosztátban. A mérés napján a sejteket 1 $\mu\text{mol/l}$ kalciumérzékeny fluoreszcens Fluo-4 acetoximetilészter formájával (Fluo-4 AM Hank oldatban oldva) inkubáltuk 37 °C-on 30 percen keresztül. A Fluo-4 AM-mel feltöltött sejtek Ca^{2+} -jelét FlexStation II fluoreszcens microplate reader segítségével mértük. A kinetikai mérések 30. másodpercében a műszerbe épített pipettorfej segítségével automatikusan adagoltuk a sejtekhez a

megfelelő koncentrációjú kezelőanyagokat. Az így bekövetkezett $[Ca^{2+}]_i$ változásokat 490 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhossz mellett detektáltuk.

Életképesség meghatározása (MTT assay)

A sejtek életképességének vizsgálatakor kolorimétrás MTT assay-t alkalmaztunk. A módszer alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje a sárga színű metilthiazol-tetrazólium (MTT) porban található tertrazólium gyűrűt hasítja, ennek hatására lila színű formazán kristályok keletkeznek, melyek mennyisége savas oldásukat követően kolorimetriásan mérhető. A megfelelő farmakonok különböző koncentrációival kezelt sejtekben keletkező formazán kristályokat „MTT szolubilizáló oldatban” feloldottuk, koncentrációjukat pedig kolorimetriás úton 550 nm-en mértük. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával, amit a kontroll százalékában adtunk meg.

Sejtprolifерáció vizsgálata (CyQuant assay)

A proliferáló sejtek nyomon követésére (mely az életképes sejtek arányát tükrözi) egy, a DNS tartalom meghatározásán alapuló fluoreszcens kimutatási eljárást, CyQuant assay-t alkalmaztunk. A felülúszó eltávolítását követően a lemezt -80 °C-ra helyeztük. A felolvasztást követően, a gyártó protokollja szerint elkészített munkareagenssel inkubáltuk a sejteket, majd 480 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhosszokon detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást FlexStation II 384 spektrofluorométer segítségével.

Apoptózis vizsgálata

Az apoptotikus folyamat megállapítására MitoProbe DilC1(5) Assay Kit-et használtunk. A mitokondriális membrán potenciál csökkenését az apoptózis korai jelének

tekintjük, melyen az eljárás is alapul. A mérés napján a sejteket 30 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on MitoProbe™ DiIC₁(5) munkareagenssel. A fluoreszcencia detektálása 630 nm-en történő gerjesztést követően 670 nm-en történt FlexStation II 384 készülék segítségével.

Nekrotikus folyamatok vizsgálata

A nekrozissal jellemezhető sejthalál detektálására SYTOX™ Green nukleinsav jelölő festéket alkalmaztunk. Az eljárás lényege, hogy a festék méreténél fogva csak a töredezett plazmamembránon keresztül képes a sejtbe penetrálni és a nukleáris DNS-hez kötődni, ami jelentős fluoreszcencia intenzitásbeli növekedést eredményez. A felülúszó eltávolítását, majd a sejtek mosását követően, a sejteket 1 μM SYTOX™ Green reagenssel inkubáltuk 30 percen keresztül 37 °C-on. A fluoreszcencia meghatározása 545 nm gerjesztési és 590 nm emissziós hullámhossz mellett történt FlexStation II 384 készülék segítségével.

TRPV3 RNS interferencia

A sejteket kb. 70 %-os konfluenciánál transzfektáltuk TRPV3-ra specifikus, kis interferáló RNS-sel és Lipofectamin 2000 Transzfekciós Reagens felhasználásával. Kontrollként a sejteket RNAi Negative Control duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk (scrambled siRNS). Az RNAi-által okozott fehérje expresszió csökkenést négy napig naponta ellenőriztük Western blot segítségével. Az immunreaktív sávok optikai denzitását a β-aktin jelre normalizáltuk, és a scrambled RNAi-kezelt sejtek értékére normalva fejeztük ki.

Statisztikai analízis

Mérési eredményeinket átlag $\pm$ SE formában, valamint a kontroll csoport százalékában adtuk meg. Hibasávban az eredmények standard hibájának átlagát (SEM) tüntettük fel, szintén a kontroll százalékában kifejezve. Az átlagok különbségét összetartozó minták esetén páros t – próbával, kettőnél több csoport esetén pedig egyszempontos variancia analízissel (ANOVA) vizsgáltuk, melynek során Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk a többszörös összehasonlításra és Dunett post hoc tesztet használtunk, amikor a kontroll csoporthoz viszonyítottuk az eloszlást. Az elemzésekhez SPSS 20.0 statisztikai szoftvert használtunk. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

EREDMÉNYEK

A TRPV3 kifejeződik a humán bőrben és primer epidermális keratinocita tenyészetben

Kísérleteink során először a TRPV3 expressziót határoztuk meg humán bőrben, melyhez egészséges páciensekből származó, punch biopszia segítségével eltávolított teljes vastagságú normál bőrt használtunk. Immunhisztokémiával kimutattuk, hogy a TRPV3 elsősorban a bőr legkülső, epidermális rétegében van jelen, melyen belül a TRPV3 homogén festődést mutat a *stratum basale* és a *stratum corneum* rétegekben. Ezekkel az adatokkal összhangban erős TRPV3 immunreaktivitás figyelhető meg normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteken immuncitokémiával, illetve Western-blottal prekonfluens (80%) és posztkonfluens (PC2) sejteken egyaránt. Ezen kívül qPCR technikával is sikeresen kimutattuk a TRPV3 mRNS szintű kifejeződését egészséges emberi bőrben, valamint izolált és tenyésztett pre- és posztkonfluens primer epidermális keratinocitákon.

A TRPV3 Ca^{2+} -permeábilis ioncsatornaként működik normál humán epidermális keratinocitákon

Ezt követően a TRPV3-csatorna funkcionalitását vizsgáltuk az epidermális keratinocita sejteken. A csatornafunkció vizsgálatára patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használtuk, a membránáramok vizsgálatára rámpa protokollt alkalmaztunk. Kontroll esetben, kifelé egyenirányító áramot mértünk $-46,1 \pm 1$ mV átlag reverzál potenciállal (átlag $\pm$ SEM, $n = 6$). Ezután áramméréseket végeztünk a rámpa protokoll négy pontján (-90 , -40 , $+40$ és $+90$ mV), majd az adatokat minden esetben normalizáltuk az aktuális sejtmembrán kapacitásra.

Érdekes módon, a TRPV3 agonista carvacrol 100 μM koncentrációjú kezelése jelentősen és szignifikánsan ($P < 0,05$) megnövelte mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramokat, amely hatás reverzibilisnek adódott.

A TRPV3 funkcionális aktivitásának további bizonyítására abból a jól ismert tulajdonságból indultunk ki, miszerint a TRPV3 (hasonlóan a legtöbb TRP-csatornához) többnyire, (de nem kizárólagosan) Ca -permeábilis csatorna. Fluoreszcens alapú Ca^{2+} -imaging technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy a TRPV3 agonisták dózis-függő módon szignifikánsan emelték a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját. További jelentőségű, hogy $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ lecsökkentése (1,8 mM-ról 0,02 mM-ra) szinte teljes mértékben kivédte a TRPV3 agonisták $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t növelő hatását. Ezeket a megállapításokat siRNS technikával is alátámasztottuk: a *Trpv3* gén csendesítése jelentősen csökkentette a carvacrol által kiváltott Ca jelet.

Ezen mérésekből kapott eredményeink azt a tényt támasztják alá, miszerint a TRPV3 ioncsatorna valóban funkcionálisan aktív formában expresszálódik a primer epidermális keratinocitákon és leginkább Ca^{2+} -ra permeábilis non-szelektív kationcsatornaként működik a sejtek plazmamembránjában, hasonlóan a már korábban leírt humán külső gyökérhüvely keratinocitákon és egér epidermális keratinocita populációkon.

A TRPV3-aktiváció gátolja a proliferációt és sejthalált indukál normál humán epidermális keratinocitákon

Ezt követően a TRPV3 aktiválásának sejtszintű hatásait vizsgáltuk a növekedés és túlélés szempontjából a humán epidermális keratinocita tenyészeteken. A sejteket a növényi eredetű carvacrol és a szintetikus 2-APB TRPV3 agonistákkal kezeltük, mely

során azt találtuk, hogy mind a carvacrol, mind a 2-APB dózis-függő módon csökkentették az NHEK sejtek életképességét és proliferációját.

A carvacrol és 2-APB TRPV3 specifikus hatását RNS interferencia technika alkalmazásával ellenőriztük és értékeltük, mely során azt kaptuk, hogy a TRPV3 sikeres gécnsendesítése szinte teljes mértékben képes volt kivédeni a fent említett káros hatásokat. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy ezek az agonisták valóban TRPV3 mediált útvonalon keresztül módosítják a sejtek életképességét és növekedését.

A sejthalál pontos formájának vizsgálatára kombinált DilC₁(5) – SYTOX Green festést alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy mind a carvacrol (300 μ M), mind a 2-APB (100 μ M) magas koncentrációban alkalmazva szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciált (ami az apoptózis egyik korai jele), ugyanakkor nem okozott SYTOX Green felhalmozódást. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a TRPV3-ioncsatorna aktivációja apoptótikus sejthalálhoz vezet. A calcium kötő EDTA alkalmazása nem befolyásolta a megfigyelt hatásokat, mely arra enged következtetni, hogy a carvacrol és 2-APB ezen hatása nem függ az extracelluláris térből történő Ca²⁺ mobilizációtól.

A TRPV3 aktiváció erős proinflammatorikus választ vált ki

Mivel a 24 órás kezelések csökkentik a sejtek életképességét és proliferációját, következő lépésben a TRPV3 aktiváció celluláris hatásait rövid távú kísérletekben vizsgáltuk. A vizsgálat során a kulcsfontosságú proinflammatorikus citokinek (IL-1 α , IL-6, IL-8 és tumor nekrosis faktor- α (TNF α)) expressziós változásait követtük nyomon.

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a TRPV3 agonisták szignifikáns módon fokozták a proinflammatorikus citokinek expresszióját, továbbá figyelemre méltó IL-6 és IL-8 felszabadulást váltottak ki az epidermális keratinocitákon. Ezen hatásokat a TRPV3 szelektív gécscsökkentése szinte teljes mértékben képes volt kivédeni, ami azt jelzi, hogy a carvacrol és a 2-APB proinflammatorikus hatásai valóban TRPV3 aktiváción keresztül valósulnak meg.

A TRPV3 indukálta proinflammatorikus hatások az NF- κ B jelátviteli útvonalat érintik

Ezt követően célul tűztük ki az intracelluláris jelátviteli útvonal azonosítását, melyen keresztül a TRPV3 aktiváció okozta proinflammatorikus hatások valósulhatnak meg. Ismert, hogy az NF- κ B útvonal aktivációja fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatok szabályozásában, ezért megvizsgáltuk ezt a mechanizmust. 30 perces carvacrol kezelés indukálta (ennél fogva inaktíválta) a gátló I κ B α foszforilációját, valamint indukálta (és ezáltal aktiválta) a p65 NF- κ B izoforma foszforilációját. Mindkét említett hatás kivédhető volt EDTA együttes alkalmazásával.

Az NF- κ B útvonal aktiválásának egyik jellemzője a p65 transzlokációja a sejtmagba, amit immuncitokémiával primer epidermális keratinocita sejteken is megvizsgáltuk. A kezeletlen kontrollhoz képest 300 μ M carvacrol kezelés szignifikánsan fokozta a nukleáris festődést, hasonlóan a pozitív kontrollként használt TLR-3 agonista poly I:C-hez, mely ismert NF- κ B transzlokáció induktor keratinocitákban.

Eddigi eredményeink együttesen a mellett érvelnek, hogy az NF- κ B jelátviteli útvonal döntő szerepet játszik a TRPV3 aktiválta gyulladásos folyamatokban humán epidermális keratinocitákon.

Mivel az NF- κ B útvonalról ismert, hogy elősegíti a sejtek túlélését keratinocitákban, eredményeink pedig igazolták, hogy a TRPV3 aktiváció csökkenti a sejtek proliferációját és életképességét, ezért szerettük volna megvizsgálni az NF- κ B útvonal szerepét ezekben a folyamatokban. Kérdésünk megválaszolására megvizsgáltuk, hogy a BAY11-7085 NF- κ B inhibitor hatással van-e korábbi eredményeinkre. Az inhibitor alkalmazása a TRPV3 aktivátor carvacrollal kombinációban tovább csökkentette a sejtek életképességét. Ez arra enged következtetni, hogy a TRPV3 aktivációja több, mint egy jelátviteli útvonalat aktivál, illetve az NF- κ B aktiválása részben ellensúlyozza a carvacrol életképességre gyakorolt negatív hatását.

A TRPV3 expressziója szignifikánsan megemelkedett AD-s betegek szövet mintáiban

Kísérleteink következő fázisában a TRPV3 szerepét szerettük volna vizsgálni az egyik leggyakoribb gyulladásos bőrbetegségben, atópiás dermatitiszben (AD). Vizsgálatainkban különös hangsúlyt fektettünk nemcsak a lézionális területek vizsgálatára, hanem a betegek nem-lézionális területeire egyaránt.

Elsőként TRPV3 immunfestést végeztünk AD-s betegek lézionális (AD-L) és nem-lézionális (AD-NL) bőrtünetéről, valamint egészséges önkéntesek punch biopsziával nyert mintáin. A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan azt találtuk, hogy a TRPV3 protein expresszió szignifikánsan magasabb volt a lézionális területeken az egészséges kontrollokhoz képest, továbbá új eredmény, hogy a nem-lézionális területekhez képest is magasabb kifejeződést mutatott. Ezen kívül, bár nem szignifikánsan, de a TRPV3 expresszió emelkedő tendenciája volt megfigyelhető a nem-lézionális területen az egészséges kontroll mintákkal összehasonlítva.

A TRPV3 molekuláris vizsgálatok során fokozott expressziót mutat AD-s betegek „epidermális szövetében”

Munkánk során lehetőségünk volt 3 AD-s páciensről érzéstelenítést követően borotva segítségével csupán az epidermális réteg eltávolításával mintát nyernünk, mind a lézionális, mind a nem érintett bőrterületekről, valamint 3 egészséges donortól is. Ezeket a mintákat 3 részre osztottuk: két részt azonnal feldolgoztunk és Western blot, valamint qPCR vizsgálattal kvantitatív fehérje és mRNS szintű expresszió meghatározást végeztünk az „epidermális szövetből”, míg a harmadik részből *in vitro* epidermális keratinocita tenyészeteket készítettünk. Ezt követően a tenyésztett sejteken további molekuláris (Western blot és qPCR) és funkcionális (patch-clamp) vizsgálatokat végeztünk a TRPV3 kifejeződésének pontosabb feltérképezésére.

qPCR vizsgálat során kiderült, hogy a TRPV3 mRNS szintű expressziója mindhárom donor esetén szignifikánsan magasabb volt a lézionális szövetben, az egészséges és a nem-lézionális epidermális szövethez képest egyaránt. 2 donor esetén a nem-lézionális szövetben szignifikánsan magasabb, míg a 3. esetben emelkedő tendencia volt megfigyelhető a TRPV3 mRNS szintű expressziójának tekintetében az egészséges kontrollokhoz képest. Érdekes módon Western blottal a TRPV3 fehérje szintű expressziója a detekciós szint alatt volt az egészséges donorok esetén. Ezzel szemben, markáns jelet sikerült detektálnunk mindhárom AD-s beteg szövetmintáiból, melyekben a nem-lézionális régiókban szignifikánsan magasabb TRPV3 fehérje szintű expresszió látszott az érintett régiókhoz képest. Tudomásunk szerint, ez az első olyan kísérleti eredmény, mely azt mutatja, hogy a TRPV3 nem csak a lézionális, hanem a nem-lézionális epidermiszben is overexpresszálódik.

A TRPV3 sejt szinten is emelkedett expressziót mutat AD-s betegek keratinocitáiban

Új eredményeinket *in vitro* kísérletekkel erősítettük meg, melyekben a korábbi kísérleteinkhez hasonlóan pre-, és posztkonfluens tenyészetekkel dolgoztunk. Érdekes módon, a prekonfluens (proliferáló) kultúrákban 1 donor esetén a TRPV3 mRNS szintű expressziója az egészséges kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb volt az AD-NHEK sejtekben, de az AD-HEK sejtekben nem, továbbá a másik 2 donornál mind az AD-NHEK, mind az AD-HEK sejtekben szignifikánsan alacsonyabb mRNS szintű expresszió volt az egészséges keratinocita tenyészetekhez képest. Ezzel szemben, jelentős volt a kontraszt a posztkonfluens, differenciált tenyészetekben (melyek sokkal inkább modellezik az *in vivo*-szerű körülményeket az epidermiszben, mint a prekonfluens tenyészetek), miszerint a TRPV3 mRNS szintű expressziója szignifikánsan magasabb volt AD-NHEK sejtekben mindhárom donorban és az AD-HEK donorok 2/3-ában, mint az egészséges keratinocitákban. Továbbá 2 donorban a TRPV3 expresszió szignifikánsan magasabb volt a lézionális keratinocitákban, mint a nem-lézionális sejtekben, míg a 3. donorban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nem-lézionális és egészséges keratinocitákban.

Érdekes módon, a szövetmintákból kapott Western blot eredményekkel ellentétében, az egészséges epidermális keratinocita tenyészetek jelentős mennyiségben detektálható fehérje szintű TRPV3-at expresszálnak, de még fontosabb, hogy ez az expressziós szint statisztikailag nem mutatott szignifikáns különbséget az AD-s beteg lézionális és nem-lézionális eredetű tenészetektől, függetlenül azok proliferációs (prekonfluens) vagy differenciált (posztkonfluens) állapotától.

A TRPV3 funkcionálisan is szignifikáns túlműködést mutat AD-s betegekben

Annak bizonyítására, hogy a TRPV3 funkcionálisan is overexpresszálódik AD-s bőrben, patch-clamp kísérletek elvégzésére törekedtünk egészséges, lézionális és nem lézionális epidermális keratinocitákon. A patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használva, valamint a már korábban ismertetett primer epidermális keratinocitákon kapott eredményeinket jelen vizsgálatainkban is megerősítettük és kiterjesztettük az AD-s tenyészetekre. Sajnálatos módon nem tudtunk stabil áramot létrehozni AD-HEK sejteken (annak ellenére, hogy több mint 150 sejten próbálkoztunk 3 különböző donorból), vélhetően ezen keratinocita sejtek fokozott sérülékenysége miatt. Azonban a nem-lézionális keratinocitákon az egészséges keratinocitákhoz hasonlóan azt láttuk, hogy mind a befelé, mind a kifelé irányuló áramok jelentősen és szignifikánsan ($p < 0,05$) megnövekedtek a TRPV3 agonista 100 μM carvacrol alkalmazása során, amely hatás alapos kimosás után reverzibilisnek bizonyult. Az áramokat 4 különböző membránpotenciálon (-90, -40, +40 és +90 mV) mértük és normalizáltuk az aktuális sejtmembrán kapacitásra NHEK és AD-NHEK esetén is.

Az áramerősségek statisztikai analízise szignifikáns áramerősséget mutatott mindkét sejtípusban +40 és +90 mV mellett, míg ez a változás -40 és -90 mV-nál csak az NHEK sejteken volt szignifikáns. A legfontosabb, hogy a carvacrol által kiváltott normalizált áramok szignifikánsan magasabbak voltak (-90 és +90 mV-on) AD-NHEK sejteken, mint az NHEK sejteken, ami arra utal, hogy a TRPV3 funkcionálisan túlműködést mutat a nem-lézionális sejtekben a primer egészséges keratinocitákhoz képest.

MEGBESZÉLÉS

A tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) egy nem szelektív, leginkább kalcium-permeabilis „termo” TRP-csatorna, melynek természetes aktivátora a fiziológiás hőtartomány (33-37 °C). Működése más TRPV-csatornához hasonló, vagyis egy komplex celluláris receptor, amit számos kémiai és a természetben is előforduló ágens aktivál. A legújabb kutatási eredmények kimutatták, hogy a DS-Nh egerek és az Olmsted-szindrómában szenvedő betegek fenotípusa mögött a *Trpv3* gén különböző mutációi állnak. Ez utóbbira a bőr súlyos rendellenességei jellemzők, úgymint palmoplantáris keratoderma, perioroficiális hiperkeratózis, diffúz szőrhiány, kopaszság és viszketés. Korábbi TRPV3-ról szóló tanulmányok elsősorban egerek megfigyelésére fókuszáltak, melyekben leírták, hogy (i) a TRPV3 „gain-of-function” mutációja magasabb Ca^{2+} beépülést és idegi növekedési faktor termelést mutat a mutáció nélküli DS egerekhez képest; (ii) a 2-APB már alacsonyabb koncentrációban is aktiválja a DS-Nh egerekből származó keratinocitákat, mint a kontroll keratinocitákat; valamint (iii) a TRPV3 aktiválása TSLP felszabaduláshoz vezet DS-Nh egerekben a kontroll TRPV3 knockout egerekkel összehasonlítva. Emberben pedig igazolt, hogy a TRPV3 expressziója megnövekedett AD-s betegek gyulladt (lézionális) keratinocitáiban. Bár a klinikai tünetek és a DS-Nh egér fenotípusa a TRPV3 gain-of-function mutációjával kapcsolható össze, ami egyértelműen amellett szól, hogy a csatorna központi szerepet játszik a bőr homeosztázisában, tudomásunk szerint jelenleg nincs olyan tanulmány, amely a humán TRPV3-csatornát vizsgálná molekuláris szinten. Eredményeink ezt a konkrét hiányt próbálják kiküszöbölni.

Kísérleteink során igazoltuk, hogy a TRPV3 mind fehérje, mind mRNS szinten kifejeződik humán epidermiszben, valamint primer, humán epidermális keratinocitákon, valamint a csatorna funkcionálisan aktív formában van jelen a keratinocitákon és Ca^{2+} -permeábilis csatornaként működik. Mivel a kalcium növekedés megszűnt az $\text{Ca}^{2+}_{\text{[EC]}}$ hiányában, így valószínűsíthető, hogy a TRPV3 membrán-csatornaként működik. Tudomásunk szerint korábbi tanulmányok még nem számoltak be arról, hogy a TRPV3 kifejeződik és funkcionálisan aktív membráncsatornaként van jelen primer humán epidermális keratinocitákon. A csatorna aktivációja carvacrollal vagy 2-APB-vel nemcsak az $\text{Ca}^{2+}_{\text{[IC]}}$ növekedését váltotta ki, hanem csökkentette a sejtek életképességét és proliferációját apoptózis indukciója révén. Ezen hatások a TRPV3 RNS interferencia általi géncsendesítése révén szignifikáns mértékben kivédhetőek voltak, ami arra utal, hogy a folyamatok dominánsan TRPV3 függőek. Összességében, ezek az eredmények összhangban vannak munkacsoportunk korábbi eredményeivel haj folliculusokon, melyen a TRPV3 aktivációja apoptózist és katagén regressziót indukál, valamint hasonló hatásokat tapasztaltunk külső gyökérhüvely keratinocitákon is.

Az irodalomban egy jól dokumentált folyamat a keratinociták általi gyulladásos mediátor termelés, amely összeköti az epidermiszt az általában immunológiaiilag aktívabb dermális részekkel. Munkánk során sikeresen igazoltuk, hogy az epidermális keratinocitákon a TRPV3 agonistával történő rövid távú kezelés proinflammatorikus citokinek képződését és felszabadulását indukálták. Ezen kívül kísérleteink kiterjednek az epidermális TRPV3-tól az immunsejtek aktivációját célzó folyamatokig, nevezetesen, hogy a keratinocitákon számos gyulladásos folyamat során döntőnek bizonyult, hogy a proinflammatorikus mediátortermelés indukciója az NF- κ B aktivációjától és

transzlokációjától függ. Kísérleteink során mi is sikerrel igazoltuk, hogy a gyulladásos mediátor termelés az NF- κ B jelátviteli út vonal aktivációján keresztül valósul meg.

Összességében elmondható, hogy eredményeink azt támasztják alá, hogy a TRPV3-ioncsatorna funkcionálisan aktív formában van jelen humán epidermális keratinocitákon, valamint aktivációjuk csökkenti a sejtek életképességét és proinflammatorikus mediátortermelést indukál az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül. Ráadásul eredményeink további (preklinikai és klinika) vizsgálatokat indíthatnak el, melyek a TRPV3-at célzó, farmakológiai terápiás potenciállal bíró eszközöket tárnak fel (leginkább olyanokat, melyek az ioncsatorna gátlását és/vagy down-regulációját indukálják) gyulladásos bőrbetegségek kezelésében, mint például AD-ben vagy allergének, irritáló anyagok vagy más ingerek okozta bőrgyulladásokban.

Miután eredményeink rávilágítottak, hogy a TRPV3-csatorna carvacrollal történő aktivációja szerepet játszik a gyulladásos mediátorok termelésének szabályozásában a humán epidermális keratinocitákon, kísérleteinket kiterjesztettük nem csak egészséges, hanem az egyik leggyakoribb gyulladásos bőrbetegségben, atópiás dermatitiszben betöltött szerepének vizsgálatára. Kísérleteink során lehetőségünk volt teljes vastagságú bőr, epidermális szövetminta és primer epidermális keratinocita tenyészetek vizsgálatára is.

Egy, a közelmúltban megjelent tanulmányban a TRPV3 szerepét vizsgálták egészséges, nem-lézionális és lézionális AD-s és pszoriázisos bőrben. RNS szekvenálás segítségével megállapították, hogy a TRPV3 transzkriptumok mindkét bőrbetegség érintett bőrterületében megnövekedtek, míg ezeknél a betegeknél a nem érintett

bőrterületeken statisztikailag csak jelentéktelen változások voltak megfigyelhetők. Ugyanebben a kéziratban a szerzők magasabb TRPV3 expressziót találtak a lézionális AD bőrben, alátámasztva mások korábbi vizsgálati eredményeit.

Jelen eredményeink újszerű megállapításaiból több következtetés is levonható. Valójában munkacsoportunk adja az első bizonyítékot, hogy a TRPV3 megnövekedett kifejeződést mutat nemcsak az AD-s betegek lézionális epidermiszében, hanem az egészségesnek tűnő, nem-lézionális epidermiszben is (egészséges bőrrel összehasonlítva), amely a terminális differenciálódás és bizonyos immunfunkciós rendellenességek tekintetében jelentősen eltér a normál bőrtől. Az emelkedett TRPV3 szintek fehérje és mRNA szinten is kimutathatóak voltak nem-lézionális és lézionális AD bőrből.

Mint gyakorlatilag minden humán minta esetén, mi is azt tapasztaltuk, hogy a különböző szöveti mintákon (teljes vastagságú bőr, epidermális szövetminta és primer keratinocita tenyészetek) és az alkalmazott kísérleti módszerekben (immunhisztokémia, Western blot, qPCR) jelentős donzorok közötti variabilitás figyelhető meg. Ezért az expressziós analíziseket kiegészítettük funkcionális módszerekkel (patch-clamp technika), amely az egyik legkiválóbb műszeres technológia, amely valódi bizonyítékot nyújthat egy ioncsatorna pontosabb funkciójának feltérképezésében. Talán a legfontosabb eredményünk az volt, hogy agonista által aktivált, TRPV3-csatorna által közvetített ionáramok szignifikánsan megnövekedtek tenyésztett nem-lézionális AD keratinocitákban az egészséges keratinocitákon mért áramokkal összehasonlítva, amely adatok kimondottan alátámasztják tanulmányunk kulcsüzenetét.

Eredményeinket összefoglalva, a TRPV3 expressziója megnövekedett nem csak az érintett, hanem a nem érintett AD-s bőrterületeken is, ezáltal értékes preklinikai adatokat szolgáltatnak azokhoz a transzlációs és klinikai tanulmányokhoz, amelyek célja a csatorna módosítása (legnagyobb valószínűséggel gátlása) atópiás dermatitisz valamint esetlegesen más gyulladásos bőrbetegségek kezelésében.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink első felében a tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna kifejeződését és gyulladásban betöltött szerepét vizsgáltuk humán epidermális keratinocitákon. Kimutattuk a TRPV3 ioncsatorna expresszióját humán bőrben és primer epidermális keratinocita tenyészetben. Sikeresen igazoltuk, hogy a csatorna Ca^{2+} -permeábilis ioncsatornaként funkcionál; carvacrollal, illetve 2-APB-vel történő aktivációja dózis-függő módon csökkenti az epidermális keratinociták proliferációját és apoptózis révén sejthalált indukál. Mindezen hatások TRPV3 specifikusnak mutatkoztak, mivel a folyamatok kivédhetőnek bizonyultak a TRPV3 specifikus gécscsökkentés segítségével. A csatorna rövidtávú aktivációja erős proinflammatorikus választ vált ki, amiért vélhetően az NF- κ B jelátviteli útvonal tehető felelőssé.

Ezt követően arra törekedtünk, hogy meghatározzuk a TRPV3 molekuláris és funkcionális expresszióját AD-s betegek nem-lézionális bőrében, ami a terminális differenciálódás és bizonyos immunfunkciós rendellenességek tekintetében jelentősen eltér az egészséges bőrtől. Vizsgálataink során elsőként bizonyítottuk, hogy a TRPV3 teljes vastagságú bőrben, valamint epidermális szöveti mintákon jelentősen megemelkedett expressziót mutat a nem-lézionális humán AD-s epidermiszben, hasonlóan a lézionális AD mintákhoz. További jelentőséggel bír, hogy patch-clamp technikával is igazoltuk, hogy a TRPV3 funkcionálisan is aktívabb formában expresszálódik a nem-lézionális AD keratinocitákon az egészséges keratinocitákhoz képest, amit a szignifikánsan magasabb (agonistával indukált) TRPV3-specifikus ionáramok igazolnak.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a TRPV3 kiemelkedő szerepet játszik a bőr gyulladásos folyamatainak szabályozásában, ezáltal potenciális terápiás célpont lehet gyulladásos bőrbetegségekben.

FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/57/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnárné Vasas Nikolett
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Molnárné Vasas, N.**, Péntes, Z., Kistamás, K., Nánási, P. P., Molnár, S., Szegedi, A., Szöllősi, A. G., Bíró, T.: Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Expression Is Increased In Non-Lesional Skin Of Atopic Dermatitis Patients.
Exp. Dermatol. [Epub ahead of print], 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14530>
IF: 3.96 (2020)
2. Szöllősi, A. G., **Molnárné Vasas, N.**, Angyal, Á., Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., Béke, G., Lisztes, E., Szegedi, A., Kawada, N., Yanagida, T., Mori, T., Kemény, L., Bíró, T.: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 138 (2), 365-374, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>
IF: 6.29

További közlemények

3. Orbán-Kálmándi, R. A., Szegedi, I., Sarkady, F., Fekete, I., Fekete, K., **Molnárné Vasas, N.**, Berényi, E., Csiba, L., Bagoly, Z.: A modified in vitro clot lysis assay predicts outcomes and safety in acute ischemic stroke patients undergoing intravenous thrombolysis.
Sci. Rep. 11 (1), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-92041-1>
IF: 4.379 (2020)
4. Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R. A., Nagy, A. C., Sarkady, F., **Molnárné Vasas, N.**, Sik, M., Láncki, L., Berényi, E., Oláh, L., Crișan, A., Csiba, L., Bagoly, Z.: Decreased clot burden is associated with factor XIII Val34Leu polymorphism and better functional outcomes in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis.
PLoS One. 16 (7), 1-16, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0254253>
IF: 3.24 (2020)





5. Szöllősi, A. G., Gueniche, A., Jammayrac, O., Papp, J., Blanchard, C., **Molnárné Vasas, N.**,
Andrási, M., Juhász, I., Breton, L., Bíró, T.: Bifidobacterium longum extract exerts pro-
differentiating effects on human epidermal keratinocytes, in vitro.
Exp. Dermatol. 26 (1), 92-94, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.13130>
IF: 2.608
6. Máté, G., Kertész, I., Enyedi, K. N., Mező, G., Angyal, J., **Molnárné Vasas, N.**, Kis, A., Szabó, É.,
Emri, M., Bíró, T., Galuska, L., Trencsényi, G.: In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13)
receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer 68Ga-NOTA-c(NGR).
Eur. J. Pharm. Sci. 69, 61-71, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.002>
IF: 3.773

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,25

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,25**

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

Debrecen, 2022.01.24.

