

## OTKA 63153 ZÁRÓJELENTÉS

### **A vanilloid receptor-1 (TRPV1) szerepe a bőr élettani folyamatainak szabályozásában fiziológiás és patológiás állapotokban**

A pályázat keretében – kombinált sejtélettani, molekuláris biológiai, valamint képalkotó eljárásokat alkalmazva – a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (vanilloid receptor-1, TRPV1) szerepét tanulmányoztuk a bőr és a függelékek *in vitro* és *in vivo* proliferációjának szabályozásában fiziológiás és patológiás körülmények között.

#### **I. Vizsgálatok sejt- és szövettenyészeteken**

##### A) A TRPV1 központi szereppel bír a humán faggyúmirigy biológiai folyamatainak szabályozásában

Mivel korábbi kísérleteinkben TRPV1-specifikus immunreaktivitást találtunk humán bőr faggyúmirigy sejtjein, kísérleteinkben először a TRPV1 funkcionális szerepét elemeztük a humán faggyúmirigy epitheliális sejtjein, a sebocytákon. Kimutattuk, hogy a TRPV1 agonista kapszaicin dózis-függően és szelektív módon lecsökkentette a sejtek bazális és arachidonsav (AA) által jelentősen fokozott lipidtermelését, mely a sebocyták differenciálódásának egyik legkarakterisztikusabb markere. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy a kapszaicin nem változtatta meg a sejtek életképességét és nem volt hatással az AA-indukált apoptózisra sem. Ezen hatásokkal jó összhangban az irodalomban elsőként mutattuk ki a receptor gén- és protein szintű jelenlétét humán immortalizált SZ95 sebocytákon. Megállapítottuk továbbá, hogy a kapszaicin hatását negymérékben kivédte a tenyésztőoldat kalciumkoncentrációjának csökkentése, mely a kalciumpermeabilis TRPV1-csatorna funkcionalitására utal. Ezt a feltevést erősítette azon megfigyelésünk is, hogy a TRPV1 antagonistá iodo-resiniferatoxin (I-RTX), valamint receptor RNS-interferencia (siRNS) által kiváltott „lecsendesítése” felfüggesztette a kapszaicin AA-indukált lipidszintézist gátló hatását. Érdekes volt ugyanakkor megfigyelnünk, hogy „TRPV1-csendesített” SZ95 sebocyták bazális lipidtermelése (hasonlóan a TRPV1 antagonistá I-RTX-kezelt sejtekhez) szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll sebocytáké. Kimutattuk azt is, hogy a sejtek kapszaicin-kezelése jelentősen

megváltoztatta számos olyan gén (pl. PPAR izoformák, nukleáris receptorok) expresszióját, melyek központi szereppel bírnak a lipidtermelés folyamatainak szabályozásában. Megállapítottuk továbbá, hogy a kapszaicin bifázisos módon változtatta meg SZ95 sebocyták proliferációját; azaz alacsony koncentrációban fokozta, míg magas koncentrációban gátolta a sejtek növekedési ütemét. Bebizonyosodott az is, hogy a proliferációt fokozó hatás TRPV1-en keresztül valósult meg, míg a sejtnövekedést gátló hatás a TRPV1-től függetlenül, apoptotikus és nekrotikus folyamatok beindításával alakult ki. Mindezen adatok azt sugallták, hogy a (feltehetően konstitutíven aktív) TRPV1-mediált szignalizáció jelentős szereppel bír a humán sebocyták proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában.

#### B) Az endokannabinoidok fokozzák a humán faggyúmirigy-eredetű sebocyták zsírtermelését

A kapszaicin hatásával párhuzamosan SZ95 sebocytákon vizsgáltuk az AA-származék „endovanilloid” TRPV1 agonista anandamid hatását is. Meglepetésre azt tapasztaltuk, hogy az anandamid (az „exovanilloid” kapszaicin hatásával ellentétben) jelentősen fokozta a sejtek zsírtermelését. Kimutattuk azt is, hogy ezen hatás nem volt kivédhető sem TRPV1 antagonistákkal, sem a TRPV1 siRNS-mediált „lecsendesítésével”. Mivel az anandamid egyben az endokannabinoidok egyik képviselője is, ezt követően megvizsgáltuk az endokannabinoid rendszer tagjainak jelenlétét a sejtekben. Kimutattuk, hogy a sebocyták jelentős mennyiségben termelnek endokannabinoidokat (pl. anandamid, 2-arachidonoil-glicerol), valamint, hogy a kannabinoid receptorok (CB) közül főként a CB2-t expresszálják (a CB1-et ugyanakkor alig). Kombinált farmakológiai és molekuláris biológiai kísérleteinkben (szintetikus agonisták, antagonisták, siRNS technika) megállapítottuk továbbá, hogy az endokannabinoidok zsírtermelést fokozó hatását a (feltehetően konstitutíven aktív) CB2 receptor közvetíti, számos intracelluláris jelátviteli mechanizmus (pl. a MAPK útvonal, PPAR és RAR magreceptorok) aktiválódásán keresztül. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a humán faggyúmirigyben egymással ellentétesen működő TRPV1/vanilloid (a zsírtermelést gátló) és CB2/kannabinoid (a faggyútermelést fokozó) rendszerek jelentőse valószínűsíthető.

### C) Az endokannabinoidok gátolják a humán szőrtüsző növekedését

Humán izolált szőrtüsző szervkultúrát felhasználó kísérleteinkben korábban kimutattuk, hogy a TRPV1 stimulálása kapszaicinnal jelentős mértékben gátolta a szőrszál *in vitro* növekedését. Hasonló kísérletes elrendezésben ezért tanulmányoztuk az endovanilloid/endokannabinoid vegyület anandamid hatását is, melyről bebizonyítottuk, hogy a szőrtüszőben is termelődik. Kimutattuk, hogy az anandamid – hasonlóan a kapszaicin korábban leírt hatásához – dózisfüggő módon gátolta a szőrszál növekedését és a szőrtüsző mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózist és regressziós átalakulást (katagén) indukált. Leírtuk azt is, hogy ezen hatás (részben meglepő módon) nem a TRPV1-en keresztül, hanem a szőrtüsző epitheliális sejtrétegeiben kifejeződő CB1 aktiválódásaként valósult meg. Ezzel jó összhangban megállapítottuk továbbá, hogy az exogén kannabinoid vegyület  $\Delta^9$ -tetra-hidro-kannabinol teljes mértékben „utánozta” az anandamid celluláris hatásait. Végezetül bebizonyosodott az is, hogy a TRPV1- és CB1-mediált mechanizmusok egymástól függetlenül és additív módon vesznek részt a szőrtüsző növekedési folyamatainak negatív szabályozásában.

### D) Az endokannabinoidok gátolják a humán epidermális keratinocyták növekedését

Korábbi kísérleteink során azt is kimutattuk, hogy a kapszaicin dózis-függően és TRPV1-specifikusan hatva gátolta humán epidermális keratinocyták proliferációját, valamint (ezzel párhuzamosan) apoptotikus sejthalált indukált. Kísérleteinkben ezt követően az endovanilloid/endokannabinoid vegyület anandamid hatását elemeztük. Megállapítottuk, hogy az anandamid (hasonlóan a kapszaicinhez) dózis-függő módon gátolta a sejtek növekedését és apoptózist váltott ki. Mindezen hatásokat ugyanakkor nemcsak a TRPV1 antagonistá I-RTX, hanem a CB1 antagonistá AM251 is kivédte (ugyanakkor a CB2 antagonistá AM630 nem befolyásolta azt). Ezzel jó összhangban bebizonyosodott, hogy a sejtek igen jelentős TRPV1 és CB1 expressziót mutatnak, míg a CB2 kifejeződése ennél sokkal alacsonyabb. Kombinált farmakológiai és molekuláris biológiai technikákkal végezetül kimutattuk, hogy az anandamid a receptorok szekvenciális (CB1  $\rightarrow$  TRPV1) aktiválása, valamint az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelése révén fejtette ki (a sejtproliferációt gátló és apoptózist kiváltó) celluláris hatásait.

### E) A TRPV1 aktiválása gátolja a humán dendritikus sejtek differenciálódását és érését

Korábbi *in situ* kísérleteinkben a humán bőrben sikerrel azonosítottuk a TRPV1 kifejeződését az epidermis dendritikus sejtjein (DS), a Langerhans-sejteken. Jelen kísérleteinkben a receptor funkcionális jelenlétét vizsgáltuk humán monocita eredetű DS-eken. Immuncitokémia és Western blot, valamint kvantitatív Q-PCR technikákkal sikerrel mutattuk ki a TRPV1 kifejeződését a DS-eken. Bebizonyosodott az is, hogy a receptor expressziója >10-szeresére nőtt a DS-ek citokinek által kiváltott differenciálódása során. Megállapítottuk azt is, hogy a TRPV1 funkcionális csatornaként működött, hiszen a TRPV1 agonista kapszaicin jelentős kalciumbeáramlás indukált a DS-ekbe. Ellentétben az egér DS-ek vizsgálatakor kapott korábbi adatokkal kimutattuk, hogy a kapszaicin nem váltotta ki a monociták DS irányú differenciálódását, valamint nem aktiválta az éretlen DS-eket sem. Érdekes módon bebizonyosodott ugyanakkor, hogy a TRPV1 agonista jelentősen és dózis-függő módon meggátolta a citokinek által kiváltott DS differenciálódást, lecsökkentett a sejtek fagocitotikus aktivitását, valamint kivédte a pro-inflammatórikus citokin-koktél által beindított DS aktivációt és érést. Mivel ezen hatások sem a TRPV1 antagonistá kapszazepin jelenlétében, sem az extracelluláris kalciumkoncentráció lecsökkentésekor nem voltak megfigyelhetők, eredményeink a humán DS-eken kifejeződő TRPV1 specifikus, a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok gátlásában betöltött szerepét valószínűsítik.

## **II. Állat- és szervkultúra kísérletek**

### A) A TRPV1 jelentős szereppel bír a szőrnövekedés *in vivo* szabályozásában

Kísérleteinkben egerek (C57BL/6) bőrén vizsgáltuk a TRPV1 kifejeződését. Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy a receptor kifejeződik az egér bőr epidermális keratinocytáiban, valamint a szőrtüsző epitheliális kompartmentjeiben. Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy az állatok szőrének ciklikus változása (hajciklus) során jelentős módosulások tapasztalhatók a TRPV1 expresszió intenzitásában; a legerősebb TRPV1-specifikus immunreaktivitást a regressziós (katagén) és nyugvó (telogén) szakaszokban mértük. Tanulmányoztuk továbbá a TRPV1 esetleges szerepét a hajciklus szabályozásában. TRPV1-knockout állatok vizsgálata során megállapítottuk, hogy (a vad típusú C57BL/6 egerekhez képest)

jelentős késés regisztrálható ezen állatok hajciklusának idejében; azaz mind az első katagén, mind az azt követő telogén szőrtüsző morfogenetikus fázis később következett be. Mindezen adataink (jó összhangban a laboratóriumunk által korábban közölt humán eredményekkel) arra utalnak, hogy a TRPV1 a katagén (regressziós) fázis kialakulásának serkentésében vesz részt.

#### B) A TRPV1 aktiválása gátolja a bőrsejtek *ex vivo* növekedését

A fenti állatkísérleteket kiegészítettük teljes vastagságú humán és egér bőrből indított *ex vivo* túlélő bőr szervkultúrák (skin organ-culture, SOC) elemzésével. Humán bőr, valamint vad típusú egér bőr SOC-n kimutattuk, hogy a TRPV1 agonista kapszaicin dózis-függő módon és jelentősen csökkentette mind az epidermális, mind a szőrtüsző keratinocyták proliferációját. Ezzel párhuzamosan megállapítottuk, hogy a kapszaicin mindkét sejtpopulációban igen kifejezett apoptózist, valamint a szőrtüszőben regressziós átalakulást (katagén) indukált. Bebizonyosodott az is, hogy mindezen jelenségek a TRPV1-en keresztül valósultak meg, hiszen (1) humán bőr, valamint vad típusú egér bőr SOC-n a kapszaicin hatása teljes mértékben felfüggeszthető volt a TRPV1-specifikus antagonistá I-RTX alkalmazásával; (2) a fenti folyamatok vonatkozásában a kapszaicin hatástalanak bizonyult TRPV1-KO egerek hátbőréből indított SOC-n. Megállapítható tehát, hogy a TRPV1 – teljes mértékben megegyezve a humán szőrtüsző szervkultúrán és epidermális keratinocytá tenyészeteken tapasztaltakkal – a humán és egér bőrben a folliculáris és epidermális növekedés gátló molekulájaként funkcionál.

#### C) A humán transzplantált szőrtüsző – SCID állatmodell

A TRPV1 szerepét az *in vivo* haj/szőrnövekedés szabályozásában egy másik állatmodellben is vizsgálni kívántuk. Ennek során immunhiányos Severe Combined Immunodeficiency (SCID) egerek hátbőrébe először teljes vastagságú humán bőrdarabot implantáltunk. Ezt követően a humán fejbőrből izolált anagén (azaz a növekedési fázisban lévő) szőrtüszőket ültettünk a már szervült humán bőrbe. Megállapítottuk, hogy a szőrtüsző több héten keresztül is megtartotta morfológiai integritását. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy – a humán hajtranszplantáció során tapasztaltakhoz hasonlóan – a szőrtüszők regressziós (katagén, dystrophias telogén) átalakulást szenvedtek, melynek hossza igen széles határok között (6 hét – 3 hónap) változott. Mivel izolált szőrtüszőkön, valamint bőr szervkultúrán kapott fent

bemutatott eredményeink a TRPV1-aktivációt a katagén átalakulás egyik legerősebb stimulusaként jellemezték – mely így csak az anagén fázisban lévő szőrtüszőkön realizálódhat –, ezért a kísérletek jelenlegi stádiumában még nem állt módunkban exogén és endogén vanilloid vegyületek hatásait elemezni. Jelenleg folyó kísérleteinkben olyan tenyésztési-transzplantációs körülmények optimalizálása zajlik, melyek felgyorsíthatják a transzplantált szőrtüszők első anagén fázisának, azaz növekedésének megjelenését.

#### D) A TRPV1 aktiválása gátolja az *in vivo* tumorigenesis

Állatkísérleteink utolsó részében a TRPV1 szerepét tanulmányoztuk az *in vivo* tumorigenesis folyamatának szabályozásában. A kísérleteinkben sikerrel indukáltuk daganatok kifejlődését TRPV1-et endogén módon kifejező humán HaCaT epidermális keratinocita, valamint humán SZ95 sebocita sejtvonalak SCID egerekbe történő intradermális injektálásával. Kimutattuk, hogy mindkét sejtvonal szövettanilag jóindulatú, a környezettől jól demarkálódó daganatok kifejlődését eredményezte. Bebizonyosodott az is, hogy a daganatok közelében (azok kifejlődése után) intradermálisan elhelyezett automatikus pumpán keresztül adagolt kapszaicin jelentősen lecsökkentette a tumorok méretét. Mindezen adatok ismételten a TRPV1-kapcsolt szignalizáció növekedést gátló hatására utalnak.

### **III. Kísérletek humán mintákon**

#### A) A TRPV1 kifejeződése fokozódik humán daganatokban

Kísérleteink során vizsgáltuk továbbá a TRPV1 kifejeződését különféle (jó- és rosszindulatú) humán daganatokban. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 mRNS és fehérje szintű kifejeződése jelentősen fokozódott a humán bőrből származó basaliomában és squamosus carcinomában. A patohisztológiai diagnózissal való összehasonlítás során ugyanakkor kiderült, hogy ezen expresszió-növekmény nem mutatott korrelációt sem a tumor gradusával, sem a klinikopatológiai stádiummal. Érdekes módon annak ellenére, hogy az epidermális és follicularis melanocyták nem expresszálták a TRPV1-et, ugyancsak jelentős TRPV1 kifejeződés-fokozódást tapasztaltunk jóindulatú naevus pigmentosusban (a TRPV1 malignus melanomában való kifejeződéséről egyelőre ellentmondásos adatokkal rendelkezünk).

Habár közvetlenül nem tartozott a pályázatban vállalt munkaterv kísérletei közé, munkánk során lehetőségünk nyílt eredményeink összevetésére más szövettípusokból származó daganatokkal is. Kimutattuk, hogy a nyelv epitheliális laphámcarcinomájában, valamint prostatacarcinomában ugyancsak jelentősen fokozódott a TRPV1 expressziója. Megállapítottuk ugyanakkor azt is, hogy míg a nyelvdaganatokban szintén nem volt összefüggés a TRPV1 szint és a patohisztológiai diagnózis között, addig prostatacarcinomában a TRPV1 expressziója jó korrelációt mutatott a daganat emelkedő gradusával (azaz a malignitás fokával). Végezetül, előzetes eredményeink szerint a TRPV1 aktiválása a legtöbb vizsgált carcinoma sejtvonalban jelentősen lecsökkentette a sejtek életképességét. Mindezen eredmények felvetik a sejtek növekedését gátló TRPV1 potenciális terápiás célpontként való alkalmazhatóságának lehetőségét.

#### **IV. Konklúzió**

Az egymást kiválóan kiegészítő modellrendszerekben végzett kísérleteink új celluláris folyamatokat azonosítottak a TRPV1 sejt-specifikus, a bőr különféle sejtjeinek *in vitro* és *in vivo* növekedését és túlélését szabályozó szerepére vonatkozóan. Vizsgálataink emellett feltárták a TRPV1 és a bőrben azonosított endokannabinoid rendszer kapcsolatait is. Tudományos eredményeink gyakorlati jelentőséggel is bírnak, hiszen rámutatnak a receptor, valamint a kapcsolódó intracelluláris jelátviteli folyamatok potenciális terápiás célpontként való alkalmazhatóságára az emberi bőr (főként fokozott növekedéssel jellemezhető) betegségeinek kezelésében.

#### **V. Publikációs aktivitás**

A fenti eredményeket nagyszámú (17), impakt faktorra rendelkező, külföldi folyóiratban megjelent *in extenso* közleményben (lásd kapcsolódó Közleményjegyzék), 1 könyvfejezetben, valamint 8 idézhető absztraktban publikáltuk.