

**SEJTFELSZÍNI RECEPTOROK ÉS JELÁTVITELI
RENDSZEREK SZEREPE A SEJTPROLIFERÁCIÓ
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

BÍRÓ TAMÁS



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET**

Debrecen
2010

1. BEVEZETÉS

1.1. A jelátvitel szerepe a proliferáció és a differenciálódás szabályozásában

Az emberi szervezetben található szervek és szövetek folyamatos (gyakran élethosszig tartó) fejlődése, növekedése, valamint a sérülést követő átépüléss-regenerációja a külső és belső környezethez való alkalmazkodás alapfeltétele. Ezen, az adott egyed mindenkori igényeit messzemenően figyelembe vevő mechanizmusok élettani működését az egyes sejtek osztódásának (sejtproliferáció); egyéni, az adott sejtre jellemző „specializált” fejlődésének (differenciálódás); valamint a sejtek élettartamának és túlélésének (programozott sejthalál, apoptózis) dinamikusan változó szabályozása teszi lehetővé.

A „finoman hangolt” proliferációs, differenciálódási és túlélési folyamatok működése során az egyes sejtek genetikai programja igen sokrétű kontroll alatt áll, melyben gyakorlatilag a szervezet valamennyi szabályozó rendszere résztvesz. A sejtek növekedésének regulációjában így, a teljesség igénye nélkül, kiemelkedő szereppel bírnak a közvetlen sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok; a humorális faktorok (pl. hormonok, citokinek, növekedési faktorok, vazoaktív ágensek, gyulladásos mediátorok) által létrehozott auto-, para- és endokrin intercelluláris kommunikációs hálózatok; a növekvő-differenciálódó sejteket ellátó neuronális végződések trofikus hatásai (pl. mitogén hatású neurohormonok és -peptidek felszabadítása révén), stb.

A fenti „neuro-immuno-endokrin” rendszerek elsődleges hírvivői komplex, többlépcsős szignalizációs mechanizmusok aktivitását megváltoztatva szabályozzák a célsejtek növekedését. Ezen jelátviteli folyamatok magukba foglalják, többek között, különféle sejtfelszíni (metabotróp, ionotróp) és/vagy intracelluláris

(citoplazmatikus, nukleáris) receptorok aktiválódását; másodlagos hírvivő molekulák (pl. kalcium, ciklikus nukleotidok, lipidek) képződését; protein kináz és foszfatáz rendszerek aktivitásának módosulását; bizonyos gének kifejeződésének és átíródásának megváltozását, stb. Mivel a különféle kommunikációs csatornákon keresztül befutó jelek szuperpozíciója, valamint az egymással számos szinten kapcsolódó jelátviteli útvonalak interferenciája határozza meg az adott sejt „sorsát” (proliferáció és/vagy differenciálódás és/vagy apoptózis), a folyamatsor megértéséhez elengedhetetlenül szükséges a sejtszinten zajló döntési mechanizmusokat befolyásoló szignalizációs útvonalak felderítése.

A jelátviteli rendszerek működésének patológias módosulása mélyreható változásokat eredményezhet a sejtek proliferációs és differenciálódási folyamataiban, mely olyan súlyos következményekkel járhat, mint pl. a daganatos transzformáció, autoimmun betegségek kifejlődése vagy gyulladásos állapotok kialakulása. Ismervén ezen kórképek incidenciájának és főként mortalitásának riasztóan emelkedő adatait nem meglepő, hogy a fenti összefüggések is a transzmembrán és intracelluláris jelátviteli folyamatok aktivitását szabályozó molekulák tanulmányozására irányították a figyelmet.

1.2. A vizsgált jelátviteli rendszerek

Kísérleteinkben három jelátviteli rendszer szerepét vizsgáltuk az *in vitro* és *in vivo* sejtproliferáció szabályozásában.

1.2.1. A tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) ioncsatorna

A TRPV1 egy jelentős Ca^{2+} -permeabilitással rendelkező nem-szelektív kationcsatorna, mely a „celluláris szenzorokként” működő TRP ioncsatornák

családjának egyik képviselője. A csatornát elsőként a csípőspaprikából izolált kapszaicin celluláris célmolekulájaként írták le („kapszaicin receptor”) a spinális hátsó gyöki és trigeminális szenzoros ganglionok kis méretű sejttesttel és C-típusú axonnal jellemezhető polimodális nociceptorain. Megállapították továbbá, hogy a szenzoros neuronokon kifejeződő receptor központi szerepet tölt be a fájdalomérzés és a neurogén gyulladás folyamataiban.

A TRPV1-et a kapszaicinen és a rokon vanilloid vegyületeken (pl. a resiniferatoxin) kívül többféle, a szervezetben képződő „endovanilloid” ágens is képes aktiválni és/vagy szenzitizálni. Ezek közül a TRPV1 legfontosabb endogén aktivátora a hőmérséklet emelkedése ($>43^{\circ}\text{C}$) és a pH csökkenése (acidózis, $\text{pH} < 5,5$). Ezen hatások mellett számos, leginkább gyulladásos mediátornak tekinthető anyag (pl. bradikinin, ATP, arachidonsav-származékok, leukotriének, a lipid-peroxidáció termékei, az endogén kannabinoidként leírt anandamid, stb.) is képes a TRPV1 szenzitizációjára. Ezek a mediátorok részben direkt módon, részben saját (főként metabotróp) receptoraikhoz kötődve intracelluláris jelátviteli útvonalak (kinázok, intracelluláris hírvivők) módosítása révén szabályozzák a TRPV1 működését.

Főként saját (az Értekezésben bemutatott kísérleteket megalapozó) kutatásainknak köszönhetően kiderült ugyanakkor az is, hogy a TRPV1 számos nem-neuronális sejtfeleségen is kifejeződik. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 funkcionális formában expresszálódik emlős hízó- és gliasejteken, és olyan folyamatok szabályozásában vesz részt, mint pl. a sejtek proliferációja, differenciálódása, vasoaktív mediátortermelése és citokinfelszabadítása. Ezt követően más munkacsoportok is kimutatták a TRPV1 molekuláris jelenlétét, többek között, pl. epidermális keratinocitákon, a gastrointesztinális és urogenitális traktus

számos sejtfeleségén, a bronchusok epitéliumán és többféle mononukleáris sejten is. Kísérleteink megkezdésekor ugyanakkor felderítésre várt a TRPV1-kapcsolt szignalizáció funkcionális, a sejtek növekedését reguláló szerepének, valamint a molekula szabályozásának leírása, főként humán nem-neuronális sejtpopulációkon.

1.2.2. Az endokannabinoid rendszer (ECS)

Az elmúlt két évtizedben a *Cannabis sativa* növényben megtalálható talán legfontosabb anyag, a növény pszichoaktív hatását kifejtő Δ^9 -tetra-hidro-kannabinol (Δ^9 -THC) vizsgálata során kiderült, hogy a Δ^9 -THC számos, az emberi szervezet által termelt endogén vegyület hatását „utánozza”. Ezen lipid természetű endokannabinoid vegyületek, mint pl. az anandamid vagy a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), az őket felismerő receptorok, valamint az endokannabinoidat szintetizáló és lebontó enzimhálózat együttesen képezi az ECS-t.

Az endokannabinoidokat először a központi idegrendszerben, mint retrográd neurotranszmittereket, illetve neuromodulátorokat jellemezték. Megállapították, hogy ezen vegyületek – főként az 1-típusú, G-protein kapcsolt kannabinoid receptor (CB1), valamint több jelátviteli mechanizmus (pl. cAMP, kináz rendszerek) aktiválásán keresztül – központi szereppel bírnak pl. a tanulás (long-term potentiation), a memória és a viselkedési folyamatok szabályozásában. Ezzel szemben az ugyancsak G-protein kapcsolt CB2-t főként az immunrendszer sejtjein írták le, ahol a receptor aktivációja mélyreható változásokat eredményezett a gyulladásos és immunológia folyamatokban. Bebizonyosodott továbbá, hogy a fenti metabotróp receptorokon kívül számos egyéb molekula (így egyes TRP csatornák, mint pl. a TRPV1) is képes a kannabinoidok celluláris hatásainak közvetítésére.

Érdekes módon az elmúlt néhány év kutatásainak köszönhetően kiderült az is, hogy az ECS elemei (receptorok, enzimek) szinte minden perifériás szervben (így pl. szív, máj, izom, zsírszövet, stb.) megtalálhatóak. Kísérleteink megkezdésekor ugyanakkor nem volt ismert az, hogy a kutatásaink középpontjában álló (humán) bőrben hogyan működik az ECS, valamint, hogy szerepet játszik-e a folyamatos proliferációs-differenciálódási programmal jellemezhető sejtek növekedésének szabályozásában.

1.2.3. A protein kináz C (PKC) izoenzimek

A sejten belüli jelátvitel egyik központi molekuláris rendszere a PKC izoenzimcsalád. Ezen szerin-treonin kinázok csoportjában a mai napig 11 különböző PKC izoenzimet különböztettek meg, melyeket aktivációs mechanizmusaik és szerkezeti sajátágaik alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk. A „klasszikus” csoportba (cPKC) a cPKC α , β I, β II és γ izoenzimek tartoznak, mely fehérjék aktiválódásukhoz diacil-glicerolt (DAG) és kalciumot igényelnek. A második csoportba a „novel” kalcium-független, de DAG-függő nPKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak. A harmadik csoportba az „atípusos” aPKC ζ és λ I izoenzimek sorolhatók, melyek aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem DAG-analóg forbol-észtert nem igényelnek. A negyedik csoportot egyetlen enzim a PKC μ (újabb nevén a PKD) alkotja, mely mind aktivációját, mind struktúráját tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.

Szervezetünknek nincs olyan sejt típusa, amely ne rendelkezne valamely PKC izoformával, illetve izoformákkal. Fontos tény ugyanakkor, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejt típusban; azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot hoznak létre.

Ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak (a teljesség igénye nélkül) pl. a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatsorában, meghatározott sejtípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisében, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek (csatorna-aktivitás, akciós potenciál kódolás, izomkontrakció) optimális kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusaiban (fagocitózis, immunglobulin termelés), stb.

Az utóbbi időben egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különbözhet egymástól. Felmerült emellett az is, hogy egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferáció, differenciálódás és regeneráció) kialakításában a különböző PKC izoformák nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétesnek adódhat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A TRPV1 vizsgálata során először célul tűztük ki a receptor azonosítását a humán bőr epiteliális és mezenchimális sejtfeleségein, valamint a bőr függelékein (szőrtüsző, faggyúmirigy). Ezt követően jellemezni kívántuk a TRPV1 funkcionális szerepét a különféle sejtek proliferációs, differenciálódási és apoptotikus folyamataiban, valamint a kapcsolódó immunológiai mechanizmusokban. Elemeztük

továbbá a TRPV1-aktiváció hatását a sejtek szekretoros működésére (lipidszintézis, citokin- és növekedési faktor termelés), valamint bizonyos, a sejtproliferáció és differenciálódás folyamataiban kulcsszerepet játszó gének expressziójára.

2.2. A TRPV1-mediált sejtválaszok szabályozásának elemzését is végrehajtottuk. Ennek során tanulmányozni kívántuk a sejtproliferáció és az apoptózis szabályozásában kulcsfontosságú $[Ca^{2+}]_i$ TRPV1-mediált változását, valamint a funkcionális ioncsatorna szubcelluláris lokalizációját. Emellett vizsgáltuk a sejtnövekedés egyik legfontosabb molekulacsaládjának, a neurotrofinoknak a TRPV1 működésére gyakorolt hatását, valamint új TRPV1-en ható agonistákat is azonosítottunk.

2.3. A TRPV1 vizsgálatához hasonlóan elemezni kívántuk az ECS szabályozó szerepét a humán bőrfüggelékek különféle sejtjeinek növekedésében, differenciálódási folyamataiban, túlélésében, valamint mediátortermelésében.

2.4. Többféle sejtes rendszert alkalmazva emellett tanulmányoztuk a PKC izoformák kifejeződésének változását a sejtek proliferációs és differenciáltsági állapotának függvényében. Vizsgáltuk továbbá a PKC rendszer farmakológiai befolyásolásának (PKC aktivátorok és gátlók) hatását a sejtfolyamatokra. Ezen túlmenően molekuláris biológiai módszerekkel megváltoztatott PKC mintázatú sejteket hoztunk létre, majd – a különféle sejtes modellrendszerekben észlelt megfigyeléseinket összehasonlítva – izoformaspecifikus válaszokat kívántunk azonosítani.

2.5. Végezetül számos, megváltozott proliferációs állapottal jellemezhető humán megbetegedésben (daganatok, autoimmun betegségek) elemeztük a PKC izoformamintázat, valamint a TRPV1 és a CB receptorok kifejeződésének esetleges módosulásait.

3. AZ ELVÉGZETT VIZSGÁLATOK, MÓDSZEREK

(A római számok a Értekezés alapjául szolgáló közlemények sorszámát jelölik;

A közlemények listája a 6. fejezetben található)

3.1. Az alkalmazott modellrendszerek

A proliferáció, a differenciálódás, a sejthalál, valamint ezek patológiás megváltozásainak (pl. tumorgenezis és progresszió) vizsgálatára számos sejtrendszer található az irodalomban, melyek jól jellemzik a fenti folyamatok jellegzetességeit. Kutatásaink során olyan, főként humán rendszereket fejlesztettünk és alkalmaztunk, melyek (i) sejtjeire az egész életen át tartó folyamatos proliferáció, differenciálódás és regeneráció jellemző; (ii) egymást jól kiegészítve lehetőséget teremtenek a proliferáció és differenciálódás mechanizmusait szabályozó rendszerek főbb aspektusainak széleskörű tanulmányozására; valamint (iii) mind fiziológiailag, mind farmakológiailag, mind klinikailag releváns módon modellezik az *in vivo* folyamatokat.

3.1.1. Sejtes *in vitro* rendszerek

Kutatásaink túlnyomó többségét primer sejtenyészetekken (vázizom, szőrtüsző-eredetű keratinocita, monocita-eredetű dendritikus sejtek) (II,V,XI,XII); primer szervkultúrán (izolált szőrtüsző) (II,IX); immortalizált és daganatos sejtvonalakon (SZ95 humán faggyúmirigy-eredetű sebocita, HaCaT humán epidermális keratinocita, Cal27 humán nyelv laphámkarcinóma, MonoMac-6 humán monoblasztos leukémia, C2C12 egér mioblaszt) (I,IV,X-XVII); valamint egészséges önkéntesekből és betegekből származó primer sejteken (T-limfocita, monocita) (XX) és szövetmintákon (bőr, szőrtüsző, daganatok) (I,II,IV,IX,X,XVII-XIX) hajtottuk végre. Emellett számos homológ és heterológ expressziós rendszert hoztunk létre, melynek

sejtjeiben az adott jelátviteli molekulákat vagy túltermeltettük (rekombináns overexpresszió); vagy a vizsgálni kívánt fehérje kifejeződését RNS interferencia (siRNS) technika alkalmazásával „lecsendesítettük” (IV,VI-VIII,X,XIII,XV,XVI).

3.1.2. *In vivo* állatkísérletek

Az *in vivo* proliferáció (tumorgenezis) tanulmányozása során a molekuláris biológiai technikákkal módosított sejteket Severe Combined Immunodeficiency (SCID) egerekbe injektáltuk, majd szövettani és immunhisztokémiai módszerekkel elemeztük a kifejlődött daganatok jellegzetességeit (XV). Vad típusú, valamint TRPV1-knockout (KO) egerekben emellett tanulmányoztuk az *in vivo* szőrnövekedés folyamatát (III).

3.2. A jelátviteli molekulák azonosítása

A vizsgált molekulák fehérje szintű kimutatására immunhisztokémia/citokémia (konfokális mikroszkópiával) (I-VI,IX-XV,XVII,XVIII), Western blot (I,II,IV-VII,X-XX) és áramlásos citometria (II,IV,V,X,XV,XVI,XX) technikákat alkalmaztunk, míg a sejtalkotókat mRNS szinten konvencionális RT-PCR és kvantitatív „real-time” Q-PCR technikák (I,II,IV,V,IX,X,XVII,XVIII) segítségével azonosítottuk. Az endokannabinoidok termelődését tömegspektroszkópiával (VII,X) mutattuk ki.

3.3. Funkcionális vizsgálatok

A sejtproliferációt növekedési görbék (II,IX,XI-XIII), immunhisztokémia/citokémia (Ki67) (II,XI,XV), valamint kolorimetriás (MTT, BrdU) és fluorimetriás (CyQuant) assay-k segítségével (II,IV,V,X,XIII-XVII); a differenciálódást különféle markerek fehérje és génszintű kimutatásával (II,IV,V,X-XV); az apoptózist

immunhisztokémia (TUNEL) (II,IX), áramlásos citometria (Annexin-V) (II,IV,X) és fluorimetriás (Annexin-V, DiIC₁(5) mitokondriális membránpotenciál-érzékeny jelölés) technikákkal (IV,X); a nekrotikus sejthalált áramlásos citometria (propidium-jodid) (II,IV,X) és fluorimetriás (SYTOX Green festődés, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz felszabadulás) (IV,X) módszerekkel; a kinázok aktiválódását radioaktív assay-k és Western blot metódusokkal (X,XIII,XV); míg a sejtek mediátortermelését ELISA (IV,X) és radioaktív vizsgálatokkal (XVI) határoztuk meg. A TRPV1 aktivációját követően az intracelluláris kalciumkoncentráció ([Ca²⁺]_i) változásait fluorimetriás mérésekkel (II,V-VIII,XIV) tanulmányoztuk.

4. EREDETI TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

(A római számok a Értekezés alapjául szolgáló közlemények sorszámát jelölik;
A közlemények listája a 6. fejezetben található)

Az alább bemutatandó eredeti tudományos eredményeket szolgáltató kísérletek túlnyomó többségét a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Élettani Intézetében, az általam vezetett Sejt- és Molekuláris Élettani Laboratóriumban végeztük. Tudományos munkánkat számos hazai, valamint külföldi klinikai (pl. DE OEC Bőrklinika és III. Belklinika; Dept. Dermatology, Univ. Lübeck, Németország) és elméleti (pl. DE OEC Biokémiai és Immunológiai Intézet; National Cancer Institute, NIH, USA) kollaborációs partner segítette, mely kapcsolatok a saját tudományos munkánkat jól kiegészítő kísérletes megközelítések együttes alkalmazását tették lehetővé. Projektjeink kivitelezésének anyagi feltételeit a Laboratórium munkatársai által elnyert nagyszámú hazai (pl. OTKA, ETT) és nemzetközi (pl. EU Keretprogramok) kutatási támogatás biztosította.

4.1. A nem-neuronális sejteken újonnan leírt TRPV1 funkcionális szerepe a sejtproliferáció szabályozásában

4.1.1. A TRPV1 vizsgálata során az irodalomban elsőként sikerrel azonosítottuk a receptor *in situ* kifejeződését a humán bőr számos neuroektodermális (epidermális keratinociták, verejtékmirigyek) és mezenchimális (Langerhans-sejtek, hízósejtek, simaizom) sejt típusán, valamint a bőrfüggelékek különféle sejt populációin (szőrtüsző keratinocitái, faggyúmirigyek sebocitái) (I,II).

4.1.2. Humán izolált szőrtüsző szervkultúra modellrendszerrel alkalmazva bebizonyítottuk továbbá, hogy a TRPV1 aktiválása az agonista kapszaicinnal specifikus (azaz TRPV1 antagonistákkal teljes mértékben felfüggeszthető) és dózisfüggő módon gátolta a hajszál hossznövekedését, csökkentette a szőrtüsző bulbáris keratinocitáinak proliferációját, fokozta ezen sejtek apoptózisát, valamint a korai katagén (regressziós) stádiumra jellemző morfológiai jegyek kialakulását váltotta ki. Humán szőrtüsző-eredetű tenyésztett külső gyökérhüvely (ORS) keratinocitákon, valamint humán immortalizált epidermális HaCaT keratinocitákon emellett kimutattuk, hogy a TRPV1 aktiválása, a $[Ca^{2+}]_i$ receptor-függő növekedésén keresztül, gátolta a sejtek proliferációját és apoptózist indukált. Megállapítottuk továbbá, hogy a kapszaicin mélyreható változásokat okozott a hajciklus szabályozásában résztvevő számos molekula (citokinek, növekedési faktorok) termelésében. Azaz, a TRPV1 aktiválása csökkentette a hajciklus pozitív regulátoraként ismert hepatic growth factor, insulin-like growth factor-I (IGF-I) és scattered factor kifejeződését, míg a szőrnövekedést gátló transforming growth factor- β_2 és interleukin- 1β (IL- 1β) expressziója emelkedett kapszaicin hatására (II).

4.1.3. A TRPV1 ioncsatorna sejt-, illetve szőrnövekedést szabályozó lehetséges szerepét TRPV1-KO egérmodellben is vizsgáltuk. Kvantitatív hisztomorfometria

módszert alkalmazva megállapítottuk, hogy a TRPV1-et nem expresszáló állatok szőrtüszőinek anagén-katagén transzformációja jelentős késést mutat a vad típusú állatokban mértékhez képest (III). Mivel ezen adataink jó összhangban voltak a humán szőrtüsző szervkultúrán mértékkel (lásd II), eredményeink a TRPV1 központi szerepét valószínűsítik a haj- és szőrnövekedés *in vivo* és *in vitro* növekedésének gátlásában.

4.1.4. A humán pilosebaceous egység másik tagján (faggyúmirigyek) is vizsgáltuk a TRPV1 működését, humán faggyúmirigy-eredetű immortalizált SZ95 szebocitákat alkalmazva. A humán faggyúmirigy *in situ* vizsgálatához hasonlóan (lásd I), az SZ95 szebocitákon is igazoltuk a TRPV1 (fehérje és génszintű) jelenlétét. Kimutattuk továbbá, hogy a TRPV1 agonista kapszaicin jelentősen és dóziszfüggő módon gátolta a szebociták bazális és arachidonsav indukálta lipidtermelését, mely hatás egyaránt kivédhetőnek bizonyult a TRPV1 specifikus gátlószer iodo-resiniferatoxin alkalmazásával, az ioncsatona siRNS-mediált „csendesítésével”, valamint az extracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_e$) csökkentésével. Génszintű (mRNS) vizsgálataink során emellett bebizonyosodott, hogy a szebocitákon kifejeződő TRPV1 aktivációja megváltoztatta a lipidanyagcsere szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok (pl. peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor [PPAR] izoformák) expresszióját és egyes citokinek (pl. IL-1 β) termelését (IV). Mindezen eredmények a TRPV1-kapcsolt szignalizáció gátló hatására utalnak a szebociták differenciálódásának (faggyútermelés) szabályozásában.

4.1.5. Humán monocita-eredetű dendritikus sejteken, az irodalomban elsőként, szintén kimutattuk a Ca^{2+} -csatornaként funkcionáló TRPV1 jelenlétét. Megállapítottuk továbbá, hogy a kapszaicin (a TRPV1 specifikus aktiválásán keresztül) gátolta a dendritikus sejt irányú differenciálódást, az éretlen dendritikus sejtekre jellemző

markerek (pl. DC-SIGN, CD11c, HLA-DR) kifejeződését, valamint a sejtek fagocitotikus aktivitását. A TRPV1 aktivációja emellett jelentősen gátolta a dendritikus sejtek pro-inflammatorikus citokinekkal kiváltott érését és aktivációját; lecsökkentette számos dendritikus sejt érési marker (pl. CD83, CCR7) és ko-aktivációs molekula (pl. CD40, CD80, CD86) kifejeződését, valamint egyes gyulladásos citokinek (pl. IL-6, IL-12) termelését; miközben fokozta az anti-inflammatorikus IL-10 szintjét (V). Mindezen adataink azt sugallják, hogy a dendritikus sejteken megtalálható TRPV1-kapcsolt szignalizációs útvonal gyulladásgátló hatással rendelkezik.

4.1.6. Vizsgáltuk továbbá a TRPV1 ioncsatorna molekuláris szabályozását is különféle, a rekombináns TRPV1-et kifejező heterológ expressziós rendszereket újonnan létrehozva. Ezen sejtes modellekben kimutattuk, hogy a TRPV1 vanilloid vegyületek (kapszaicin, resiniferatoxin) iránt mutatott érzékenysége, valamint ezen agonisták által beindított sejtválaszok (excitáció, $[Ca^{2+}]_i$ -növekmény, deszenzitizáció, sejthalál) jellegzetességei jelentős mértékben függnek az adott expressziós rendszer (tranzienst, stabil, indukálható) tulajdonságaitól, valamint az $[Ca^{2+}]_e$ -től. Kísérleteink során bebizonyosodott továbbá, hogy a funkcionális, kalciumpermeabilis csatornaként működő TRPV1 nemcsak a sejt felszíni, hanem intracelluláris kalciumraktárként szereplő kompartmentek (pl. endoplazmatikus retikulum) membránjába is beépülhet (VI).

4.1.7. A heterológ rendszerek emellett lehetőséget teremtettek új, a TRPV1 működését befolyásoló molekulák azonosítására is. Megállapítottuk, hogy a sejt-szöveti fejlődés, proliferáció és regeneráció szabályozásában központi szereppel bíró neurotrofinok – az általunk vizsgált nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, valamint a neurotrophin-3 és -4 – mindegyike képes a TRPV1

működésének fokozására, azaz a receptor szenzitizációjára (VII). Bebizonyosodott továbbá, hogy a orvosi gyakorlatban széleskörűen alkalmazott fájdalomcsillapító tramadol a TRPV1 agonistájaként is működik, hiszen a klinikai terápiás dózistartománnyal jól korreláló koncentrációkban megemelte a TRPV1-et kifejező sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jét, mely hatás a TRPV1 antagonistá kapszazepin adagolásával kivédhető volt (VIII).

4.2. Az ECS szerepe a humán bőrfüggelékek növekedésének és differenciálódásának szabályozásában

4.2.1. A pilosebaceous egység tagjain, hasonlóan a TRPV1 fent bemutatott jellemzéséhez, vizsgáltuk az ECS funkcionális szerepét is. Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy humán szőrtüszőben jelentős mértékben termelődnek endokannabinoidok (anandamid, 2-AG). Humán szőrtüsző szervkultúrát alkalmazva megállapítottuk továbbá, hogy az anandamid (valamint a növényi kannabinoid Δ^9 -THC) dóziszfüggő módon gátolta a hajszál elongációját és a szőrtüsző keratinocitáinak proliferációját, ugyanakkor apoptózist és katagén regressziót indukált a szőrtüszőben. Bebizonyosodott az is, hogy az anandamid fenti hatásait a szőrtüszőben főként az ORS keratinocitákon (a CB receptorok közül kizárólagosan) kifejeződő CB1 közvetítette. Végezetül kimutattuk, hogy – habár az anandamid számos sejten aktiválhatja a TRPV1-et – ezen hatásai függetlenek a TRPV1-aktiváció teljes mértékben megegyező (fentebb részletezett, lásd II) következményeitől. Mindezen adatok szinergista, a szőrnövekedést gátló TRPV1- és CB1-mediált szignalizációs folyamatok jelenlétére utalnak a humán szőrtüszőben (IX).

4.2.2. A humán faggyúmirigyet vizsgálva megállapítottuk, hogy a tenyésztett SZ95 sebociták ugyancsak jelentős mennyiségben termelnek endokannabinoidokat (anandamid, 2-AG). Kimutattuk azt is, hogy az endokannabinoidok a sejteken kifejeződő CB2 stimulálása, valamint egy komplex intracelluláris jelátviteli mechanizmus beindítása révén (pl. p42/44 Erk-1/2 mitogén-aktivált protein kinázok [MAPK] aktiválása, PPAR izoformák és célgénjeik átíródásának fokozása) jelentősen fokozták a sebociták zsírtermelését. siRNS technika alkalmazásával emellett bebizonyosodott, hogy a fenti mechanizmus „konstitutíven aktív”; azaz a faggyúmirigyben termelődő endokannabinoidok folyamatos jelenléte és autokrin-parakrin hatása szükséges a sebociták bazális (normál) zsírtermelésének fenntartásához (X).

4.3. A PKC izoenzimek specifikus, egymással gyakran ellentétes, valamint sejtípus-függő szerepe a proliferáció és differenciálódás szabályozásában

4.3.1. A PKC izoenzimek sejtproliferációban betöltött szerepének vizsgálata során először kimutattuk, hogy a primer humán tenyésztett vázizomsejtek jellegzetes PKC izoformamintázattal rendelkeznek; bennük a cPKC α és γ ; a nPKC δ , η és θ ; valamint az aPKC ζ jelenléte volt tetten érhető. Megállapítottuk továbbá, hogy a különféle izoenzimek szubcelluláris lokalizációjának mintázata, valamint expressziójának szintje az *in vitro* vázizomsejt proliferáció, fúzió és differenciálódás különböző stádiumaiban eltérően változott (XI).

4.3.2. Ugyanezen sejtes rendszert alkalmazva megállapítottuk továbbá, hogy az „univerzális” PKC aktivátor, DAG-analóg forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) dózisfüggő módon gátolta a vázizomsejtek növekedését és differenciálódását. Konfokális mikroszkópia alkalmazásával bebizonyosodott emellett, hogy a PMA

jelentősen módosította egyes PKC izoformák szubcelluláris lokalizációját: a nPKC η PMA adagolásakor a citoplazmából a magmembránba és a magba helyeződött át; a nPKC θ a citoplazmából a magba és feltehetően a nukleoluszba transzlokálódott; míg a cPKC γ a magból részlegesen a citoplazmába került át. Mivel a PKC izoformák transzlokációja aktiválódásuk jeleként értelmezhető, eredményeink a fenti izoformák szerepét valószínűsítik a PMA vázizomsejt-növekedést gátló celluláris hatásainak kifejlődésében (XII).

4.3.3. Különbféle vázizomsejteken vizsgáltuk továbbá a PKC izoformák lehetséges szerepét az egyik leghatásosabb szöveti növekedési faktor, az IGF-I mitogén hatásának kialakulásában. Primer humán tenyésztett vázizomsejteken megállapítottuk, hogy a nPKC δ izoforma kizárólagos szereppel bír az IGF-I vázizomsejt proliferációt és differenciálódást serkentő hatásának kifejlődésében (a MAPK és Akt/foszfatidil-inozitol 3-kináz rendszerek ugyanakkor nem vesznek részt a folyamatban). Egér rabdomióma eredetű immortalizált C2C12 sejvonalon ugyanakkor kimutattuk, hogy a nPKC δ -specifikus aktivitás központi szerepe mellett a MAPK útvonal is résztvesz az IGF-I hatásainak kialakításában. Bebizonyosodott az is, hogy C2C12 mioblasztokon a nPKC δ a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik, azaz megelőző aktivációja szükséges a MAPK rendszer aktivitásának fokozódásához. Mivel (i) a nPKC δ konstitutíven aktív formájának overexpressziója C2C12 mioblasztokban teljes mértékben „utánozta” az IGF-I hatását; valamint (ii) a nPKC δ kináz (domináns) negatív mutánsát kifejező sejtek nem reagáltak az IGF-I adagolására, eredményeink a nPKC δ központi szerepét bizonyítják az IGF-I hatásainak kialakulásában vázizomsejteken (XIII).

4.3.4. A vázizom vizsgálatával párhuzamosan elemeztük a folyamatos regenerációs aktivitást mutató humán bőr keratinocitáinak PKC rendszerét, humán

immortalizált HaCaT epidermális keratinocita modellt felhasználva. Hasonlóan a vázizomsejtekben tapasztaltakhoz megállapítottuk, hogy a HaCaT keratinociták is jellegzetes PKC izoformamintázattal rendelkeznek (cPKC α és β ; nPKC δ , ϵ és η ; aPKC ζ), mely jelentős mértékben változott a sejtek proliferációja és a nagy sejtdenzitás indukálta keratinocita differenciálódás során. Bebizonyosodott az is, hogy az általános PKC aktivátor PMA, eltérő módon hatva az egyes izoformákra, gátolta a HaCaT keratinociták proliferációját, valamint terminális differenciálódást indukált (XIV).

4.3.5. Ezt követően olyan HaCaT keratinocitákat állítottunk elő, melyek egyes PKC izoformák konstitutíven aktív formáját fejezték ki. Ezen sejtek *in vitro* vizsgálata során kimutattuk, hogy a cPKC α és a nPKC δ izoformák overexpressziója jelentősen lecsökkentette a sejtproliferációt, ugyanakkor pozitív hatást gyakorolt a differenciálódásra és a sejtek apoptózisára. Ezzel ellentétben, a cPKC β és a nPKC ϵ aktivitása fokozta a sejtek növekedését, ugyanakkor gátolta a differenciálódást és a programozott sejthalált. Az *in vivo* proliferáció (tumorgenezis) tanulmányozása során a rekombináns technikákkal módosított HaCaT keratinocitákat immunhiányos (SCID) egerekbe injektáltuk, majd szövettani és immunhisztokémiai módszerekkel elemeztük a kifejlődött daganatok jellegzetességeit. Jó összhangban a sejtenyészetekben kapott adatokkal megállapítottuk, hogy a cPKC β és a nPKC ϵ overexpressziója megnövelte, míg a cPKC α és a nPKC δ fokozott aktivitása lecsökkentette a HaCaT keratinociták *in vivo* növekedési potenciálját. Mindezen adataink az egyes PKC izoenzimek specifikus, ugyanakkor egymással ellentétes szerepére utalnak a humán epidermális keratinociták növekedésének, differenciálódásának és túlélésének szabályozásában (XV).

4.3.6. Végezetül monoblasztos leukémia modellben (MonoMac-6 sejtek) vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét. Megállapítottuk, hogy két legnagyobb mennyiségben expresszálandó izoforma, a cPKC β és a nPKC δ serkenti a sejtek proliferációját, valamint arachidonsav termelését. Bebizonyosodott továbbá, hogy a cPKC β és a nPKC δ „downstream” célmolekulák (kalcium-independens foszfolipáz A₂, DAG-lipáz) aktiválásán keresztül fejtik ki hatásaikat. Kimutattuk azt is, hogy a cPKC α kisebb mértékben fejeződik ki a sejtekben, valamint, hogy – a fenti két izoenzimmel ellentétes funkciót ellátva – gátolja a MonoMac-6 sejtek proliferációját és arachidonsav termelését (XVI).

4.4. A jelátviteli molekulák kifejeződése és funkciója jelentősen módosul egyes humán megbetegedésekben

4.4.1. Humán betegségek vizsgálata során először különféle daganatokban vizsgáltuk a fenti jelátviteli molekulák kifejeződését. A TRPV1 vizsgálata során megállapítottuk, hogy az ioncsatorna fehérje és génszintű kifejeződése (mely igen alacsonynak bizonyult az egészséges nyelv epitéliumában) drámaian fokozódott a humán nyelv prekancerózus elváltozásában (leukoplakia), valamint nyelv laphámkarcinómában. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy a megemelkedett TRPV1 expresszió mértéke nem korrelált a primer tumorok malignitásának (hisztopatológiai grádus) fokával (XVII).

4.4.2. A fentiekhez hasonlóan a humán prosztatata megbetegedéseiben is vizsgáltuk TRPV1, valamint a CB1 kifejeződését. Megállapítottuk, hogy mindkét molekula (fehérje és mRNS szintű) expressziója jelentősen fokozódott humán prosztatatakarcinómában (PCC). Kimutattuk ugyanakkor, hogy míg a megemelkedett TRPV1 szint jó korrelációt mutatott a PCC növekvő grádusával (azaz a malignitás

fokával), addig a CB1 esetében hasonló jelenséget nem tapasztaltunk. Bebizonyosodott az is, hogy a CB1 expressziója nagymértékben megnövekedett benignus prosztatata hiperpláziában, míg a TRPV1 szintje nem változott az egészséges kontrollhoz képest (XVIII). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a TRPV1 és CB1 molekulák meghatározó szereppel bírhatnak a humán prosztatata daganatos elváltozásainak kialakulásában.

4.4.3. A PKC izoformák kifejeződésében bekövetkező esetleges módosulásokat először tranzicionális sejtes húgyhólyagkarcinómában vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az egészséges uroepitéliumban általunk leírt PKC izoformamintázat (cPKC α és β ; nPKC δ és ϵ ; aPKC ζ) szignifikánsan változott a primer tumorok grádusának függvényében. Kimutattuk, hogy a cPKC β és a nPKC δ szintje (mely izoformák jelentős mértékben kifejeződtek a kontroll hólyagban) folyamatosan csökkent a grádus növekedésével párhuzamosan. Ezzel ellentétben a cPKC α , a nPKC ϵ és az aPKC ζ expressziója a daganatok grádusával párhuzamosan emelkedett, azaz a legmagasabb szintű kifejeződést a legrosszabb prognózisú tumorokban tapasztaltuk. Mindezen adatok azt sugallják, hogy a PKC rendszer egyes izoformái (feltehetően egymással ellentétes) szereppel bírnak a húgyhólyagkarcinóma patogenezisében (XIX).

4.4.4. A PKC izoformák szintjét különböző autoimmun betegségeken szenvedők perifériás vér mononukleáris sejtjeiben is tanulmányoztuk. Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy szisztémás lupus erythematosus (SLE) betegek csökkent proliferációs kapacitással jellemezhető T-limfocitáiban a cPKC β ; a nPKC δ , ϵ és η ; valamint az aPKC ζ expressziója, míg az SLE-s betegek monocitáiban a nPKC δ és ϵ , valamint az aPKC ζ szintje jelentős mértékben lecsökkent az egészséges önkéntesek sejtjeiben mértékhez képest. Bebizonyítottuk azt is, hogy mind a klinikai javulást

eredményező *in vivo*, mind az *in vitro* kortikoszteroid kezelés (különböző mértékben ugyan, de) a legtöbb PKC izoforma expresszióját az egészséges kontrollhoz közeli értékre emelte („normalizálta”). Leírtuk emellett, hogy ezen változások kizárólag az SLE-s betegek esetében mutathatóak ki, hiszen Sjögren-szindrómás és Kevert Kötőszöveti Betegségben (MCTD) szenvedők sejtjeiben a PKC izoformák kifejeződése nem változott a kontrollhoz viszonyítva (XX).

5. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTHATÓSÁGA

Kísérleteink számos, a klinikai, farmakológiai és biotechnológiai gyakorlatban közvetlenül hasznosítható új eredményt szolgáltatnak, melyekről több összefoglaló publikációban is beszámoltunk (az Értekezéshez csatolva: XXI, XXII). Ezek közül az alábbiakat emeljük ki:

5.1. TRPV1 agonisták és CB2 antagonisták (akár kombinált) alkalmazása, valamint az endokannabinoidok termelődését gátló ágensek (pl. a szintetizáló enzimek inhibitorainak) adagolása sikerrel kecsegtet a faggyúmirigy patológiásan fokozott zsírtermelésével jellemezhető kórképek (pl. acne vulgaris) terápiájában. Ezen logikát követve a TRPV1 antagonisták, CB2 agonisták, illetve az endokannabinoidok szintézisét fokozó anyagok (pl. a lebontó enzimek gátlószereinek) adagolása jó hatékonyságú lehet a száraz bőr (és a hozzá kapcsolódó másodlagos kórképek, mint pl. a viszketés) kozmetológiai és dermatológiai kezelésében. Mivel a faggyúmirigy könnyen „hozzáférhető” a bőrön

alkalmazott hatóanyagok számára, ezen vegyületek nagy valószínűséggel helyileg (pl. krém formájában) is adagolhatók lesznek.

5.2. A szőrtüszőben kifejeződő TRPV1 és CB1 aktiválása terápiás értékű lehet fokozott szőrnövekedéssel járó kórképekben (pl. hipertrichózis), míg TRPV1 és CB1 antagonisták a csökkent hajnövekedéssel és/vagy fokozott hajhullással jellemezhető betegségek (pl. az alopecia különböző formái, effluvium) kezelésében lehetnek alkalmazhatók.

5.3. Mivel a TRPV1 aktiválása jelentősen lecsökkentette a humán epidermális keratinociták növekedését, felmerül a TRPV1 agonistáinak alkalmazása a humán bőr hiperproliferatív megbetegedéseinek (pl. pikkelysömör) kezelésében is.

5.4. A daganatos megbetegedések nagy százalékát kitevő bőrgyógyászati tumorokban hatékony beavatkozás lehet továbbá a keratinociták fokozott proliferációját indukáló cPKC β és nPKC ϵ izoformák aktivitásának csökkentése szelektív inhibitorok alkalmazásával. Másik, az előzőeket akár kiegészítő terápiás alternatívaként olyan szerek alkalmazása is sikerrel kecsegtet, melyek a sejtproliferációt gátló (és a sejtek differenciálódását elősegítő) nPKC δ és cPKC α izoenzimek aktivitásának fokozásán keresztül fejtik ki hatásukat.

5.5. A fenti gondolatmenetet követve természetes és szintetikus TRPV1 és CB1 agonisták ugyancsak új támadáspontú daganatellenes szerekként szerepelhetnek a jövőben pl. a bőr, a prosztata és a nyelv benignus és malignus elváltozásaiban.

5.6. A humán dendritikus sejteken tapasztaltak fényében végezve felmerül a TRPV1 aktivitását fokozó szerek potenciális gyulladásgátló hatásának kiaknázása is.

6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

(Tematikus sorrendben, az Értekezésben bemutatottaknak megfelelően)

- I Bodó E., Kovács L., Telek A., Varga A., Paus R., Kovács L. and **Bíró T.** (2004): Vanilloid Receptor-1 is Widely Expressed on Various Epithelial and Mesenchymal Cell Types of Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 123(2):410-413; IF: 4,238
- II Bodó E., **Bíró T.**[#], Telek A., Czifra G., Griger Z., Tóth I.B., 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(4):985-998; IF: 5,796 ([#]megosztott elsőszereplőség)
- III **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.* 126:1909-1912; IF: 4,535
- IV Tóth I.B., Géczy T., Griger Z., Dózsa A., Seltsmann H., Kovács L., Nagy L., Zouboulis C.C., Paus R. és **Bíró T.** (2009): Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Signaling as a Regulator of Human Sebocyte Biology. *J. Invest. Dermatol.* 129(2):329-339 IF: 5,251
- V Tóth I.B., Benkő S., Szöllősi A.G., Kovács L., Rajnavölgyi É. és **Bíró T.** (2009): Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Signaling Inhibits Differentiation and Activation of Human Dendritic Cells. *FEBS Lett.* 583(10):1619-1624; IF: 3,264
- VI Lázár J., Szabó T., Kovács L., Blumberg P.M. és **Bíró T.** (2003): Distinct Features of Recombinant Vanilloid Receptor-1 Expressed in Various Expression Systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(10):2228-2240; IF: 4,995
- VII Lázár J., Szabó T., Marincsák R., Kovács L., Blumberg P.M. és **Bíró T.** (2004): Sensitization of Recombinant Vanilloid Receptor-1 by Various Neurotrophic Factors. *Life Sci.* 75(2):153-163; IF: 2,158
- VIII Marincsák R., Tóth I.B., Czifra G., Szabó T., Kovács L. és **Bíró T.** (2008): The Analgesic Drug Tramadol Acts as an Agonist of the Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1). *Anesth. Analg.* 106(6):1890-1896; IF: 2,590
- IX Telek A., **Bíró T.**[#], Bodó E., Tóth I.B., Borbíró I., Kovács L., Kunos G. és Paus R. (2007): Inhibition of Human Hair Follicle Growth by Endo- and Exocannabinoids. *FASEB J.* 21(13):3534-3541; IF: 6,791 ([#]megosztott elsőszereplőség)
- X Dobrosi N., Tóth I.B., Nagy G., Dózsa A., Géczy T., Nagy L., Zouboulis C.C., Paus R., Kovács L. és **Bíró T.** (2008): Endocannabinoids Enhance Lipid Synthesis and Apoptosis in Human Sebocytes via Cannabinoid Receptor-2-Mediated Signaling. *FASEB J.* 22(10):3685-3695; IF: 7,049
- XI 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(2):96-104; IF: 2,446

- XII** Boczán J., **Bíró T.**, Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F. és Kovács L. (2001): Phorbol Ester Treatment Inhibits Proliferation and Differentiation of Cultured Human Skeletal Muscle Satellite Cells by Differentially Acting on Protein Kinase C Isoforms. *Acta Neuropathol.* 102:55-62; IF: 2,165
- XIII** Czifra G., Tóth I.B., Marincsák R., Juhász I., Kovács I., Ács P., Kovács L., Blumberg P.M. és **Bíró T.** (2006): Insulin-like Growth Factor-I-Coupled Mitogenic Signaling in Primary Cultured Human Skeletal Muscle Cells and in C2C12 Myoblasts. A Central Role of Protein Kinase C δ . *Cell. Signal.* 18:1461-1472; IF: 4,887
- XIV** Papp H., Czifra G., Lázár J., Boczán J., Gönczi M., Csernoch L., Kovács L. és **Bíró T.** (2003): Protein Kinase C Isozymes Regulate Proliferation and High Cell Density-Mediated Differentiation of HaCaT Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 12:811-824; IF: 2,040
- XV** Papp H., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Aleksza M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M. és **Bíró T.** (2004): Opposite Roles of Protein Kinase C Isoforms in Proliferation, Differentiation, Apoptosis, and Tumorigenicity of Human HaCaT Keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(9):1095-1105; IF: 4,812
- XVI** Griger Z., Páyer E., Kovács I., Tóth I.B., Kovács L., Sipka S. és **Bíró T.** (2007) Protein Kinase C β and δ Isoenzymes Promote Arachidonic Acid Production and Proliferation of MonoMac-6 Cells. *J. Mol. Med.* 85:1031-1042; IF: 4,820
- XVII** Marincsák R., Tóth I.B., Czifra G., Márton I., Rédl P., Tar I., Tóth L., Kovács L. és **Bíró T.** (2009): Increased Expression of TRPV1 in Squamous Cell Carcinoma of the Human Tongue. *Oral Dis.* 15:328-335; IF: 2,087
- XVIII** Czifra G., Varga A., Nyeste K., Marincsák R., Tóth I.B., Kovács I., Kovács L. és **Bíró T.** (2009): Increased Expression of Cannabinoid Receptor-1 and Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1) in Human Prostate Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin.* 135(4):207-214; IF: 2,217
- XIX** Varga A., Czifra G., Tállai B., Németh T., Kovács I., Kovács L. és **Bíró T.** (2004): Tumor Grade-Dependent Alterations in the Protein Kinase C Isoform Pattern in Urinary Bladder Carcinomas. *Eur. Urol.* 46(4):462-465; IF: 2,651
- XX** **Bíró T.**, Griger Z., Kiss E., Papp H., Aleksza M., Kovács I., Zeher M., Bodolay E., Csépany T., Szűcs K., Gergely P., Kovács L., Szegedi G. és Sipka S. (2004): Abnormal Cell-Specific Expressions of Certain Protein Kinase C Isoenzymes in Peripheral Mononuclear Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Effect of Corticosteroid Application. *Scand. J. Immunol.* 60(4):421-428; IF: 1,912
- XXI** Paus R., Schmelz M., **Bíró T.** és Steinhoff M. (2006): Frontiers in Pruritus Research: Scratching the Brain for More Effective Itch Therapy. *J. Clin. Invest.* 116(5):1174-1186; IF: 15,754
- XXII** **Bíró T.**, Tóth I.B., Haskó G., Paus R. és Pacher P. (2009): The Endocannabinoid System of the Skin in Health and Disease: Novel Perspectives and Therapeutic Opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* 30(8):411-420; IF: 9,34

7. SCIENTOMETRIA

7.1. Általános adatok

7.1.1. *In extenso* közlemények (teljes pályafutás)

- a. A közlemények száma: 69
 - i. Ebből első és utolsószerzős: 34
- b. A közlemények összesített impakt faktora: 289,085
- c. A közleményekre kapott független citációk száma: 927
- d. Hirsch-index: 21

7.1.2. *In extenso* közlemények (Ph.D. fokozat megszerzése óta)

- a. A közlemények száma: 60
 - i. Ebből első és utolsószerzős: 29
- b. A közlemények összesített impakt faktora: 243,449
- c. A közleményekre kapott független citációk száma: 571
- d. Hirsch-index: 16

7.2. Az Értekezés alapjául szolgáló közleményekre vonatkozó adatok

- a. Közlemények száma: 22
 - i. Ebből első és utolsószerzős: 20
- b. A közlemények összesített impakt faktora: 101,798