

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A bőr barrierfunkciójában szerepet játszó tényezők vizsgálata humán keratinocitákon

Dr. Páyer Edit

Témavezetők:

Prof. Dr. Szegedi Andrea és Prof. Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés.....	5
Irodalmi áttekintés.....	6
<i>A bőr és a keratinociták</i>	6
<i>A bőr, mint barrier</i>	7
<i>A PKC rendszer</i>	12
<i>A PKC szerepe keratinocitákban</i>	16
<i>Az adhéziós molekulák</i>	17
<i>Adhéziós molekulákat érintő bőrgyógyászati kórképek: a pemphigus vulgaris és foliaceus</i>	19
<i>Barrier diszfunkció atópiás dermatitisben</i>	22
<i>Poliolok a bőrgyógyászatban</i>	24
Célkitűzések	25
Anyagok és módszerek.....	26
<i>Felhasznált anyagok</i>	26
<i>HaCaT keratinociták és tenyésztése</i>	26
<i>NHEK-k izolálása és tenyésztése</i>	27
<i>PKC-overexpresszor HaCaT sejtek létrehozása</i>	28
<i>RNS interferencia (RNSi)</i>	28
<i>Western blot</i>	28
<i>Immuncitokémia</i>	30
<i>Kvantitatív “real-time” PCR (Q-PCR)</i>	31
<i>Az életképesség és proliferáció vizsgálata MTT esszével</i>	32
<i>Az apoptózis vizsgálata</i>	33
<i>A nekrosis vizsgálata</i>	34
<i>A sejtek intracelluláris kalcium koncentrációjának ($[Ca^{2+}]_i$) meghatározása Ca^{2+}-imaging technikával</i>	35
<i>Statisztikai analízis</i>	36
Eredmények.....	37

I. A PKC izoenzimek hatása az adhézións molekulák kifejeződésére humán epidermális HaCaT keratinocitákon.....	37
Az adhézións molekulák kifejeződése HaCaT keratinociták sejtdenzitás-indukálta differenciáltsági állapotának függvényében.....	37
Az adhézións molekulák kifejeződése különféle PKC izoformákat stabilan túltermelő HaCaT keratinocitákban.....	38
Az adhézións molekulák kifejeződése HaCaT keratinocitákban RNS-interferencia segítségével szelektíven csökkentett PKC expresszió esetén	40
A szelektív PKC δ inhibitor rottlerin hatása az adhézións molekulák kifejeződésére HaCaT keratinocitákban.....	42
II. A glicerol és xilitol hatása a barrier kialakulásában szerepet játszó mechanizmusokra és jelátviteli folyamatokra normal humán epidermális keratinocitákon (NHEK).....	44
A poliolok nem befolyásolják az NHEK-k proliferációját és életképességét.....	44
A xilitol és glicerol hatása a keratinocitákban expresszálódoó differenciálódási és barrier markerek kifejeződésére	44
A poliolok nem befolyásolják az NHEK-k intracelluláris Ca ²⁺ koncentrációját.....	48
A poliolok hatása különböző jelátviteli folyamatokra.....	48
A poliolok hatása a gyulladásos mediátorok termelődésére és kifejeződésére	50
Megbeszélés	61
A PKC rendszer adhézións molekulák szabályozásában betöltött szerepe	62
Poliolok hatása keratinocita életfolyamatokat szabályozó jelátviteli útvonalakra	66
Összefoglalás.....	69
Summary	71
Irodalomjegyzék.....	73
Tárgyszavak	83
Keywords	84
Köszönetnyilvánítás	85
Függelék	87

Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP binding cassette - ATP-kötő kazetta	MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
AD	<i>atópiás dermatitis</i>	mRNS	<i>messenger</i> ribonukleinsav
AMP	antimikrobiális peptid	NHEK	normál humán epidermális keratinocita
AQP3	aquaporin-3	NMF	natural moisturizing factor - természetes hidratáló faktor
ATP	adenozin trifoszfát	PBS:	foszfát puffer oldat
DAG	diacil-glicerol	P-cad	P-kadherin
DAPI	4',-6-diamidino-2-fenilindol	PIP2	Foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
DMSO	dimetil-szulfoxid	PKC	Protein kináz C
dsc	dezmokollin	PMA	Forbol-12-miristát-13-acetát
dsg	dezmoglein	poly-IC	poliinozinil:policitidil sav
FLG	filaggrin	Q-PCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
Gly	Glicerol	RNSi	RNS interferencia
HLA	humán leukocita antigén	SC	<i>Stratum corneum</i>
IgG	immunoglobulin G	SSS	<i>Staphylococcal scaled skin</i> - <i>Staphylococcus</i> okozta bőrleválás
IL	interleukin	Str	<i>stratum</i>
INV	involukrin	TEWL	transepidermal water loss - transzpidemális vízvesztés
IP3	inozitol-triszfoszfát	TG	transzglutamináz
K10/17	keratin 10/17		
LPS	lipopoliszacharid		
LTA	lipoteicoil sav		
MAPK	mitogén aktivált protein kináz		
MMP1, 9	metalloproteináz 1, 9		

TGF transforming growth factor -
transzformáló növekedési faktor

Th2 T-helper 2

TJ *tight junction* - szoros
kapcsolóapparat

TNF tumor nekrosis faktor

Xyl Xilitol

Bevezetés

A bőrt érintő betegségek nemcsak esztétikai problémát, hanem számos kellemetlen tünetet (fájdalom, viszketés) is okoznak; emellett kezelésük is további szövődményeket vonhat maga után (infekciók, osteoporosis, veseelégtelenség stb.). Mindezek miatt egyre inkább arra törekszünk, hogy a betegségek patogenezisét megismerjük, valamint hatékonyabb célzott terápiát alkalmazzunk, mely kevesebb mellékhatással jár és jobb életminőséget biztosít a betegek számára.

Munkánk központi eleme a *pemphigus vulgaris* és az *atópiás dermatitis* patogenezisében is fontos szereppel bíró barrier funkció és regeneráció jelátviteli folyamatainak kutatása volt. Ennek során elsőként a mechanikai integritás fenntartásában jelentős, a keratinociták közötti kapcsoló egységeket felépítő adhézios molekulák, a dezoglein (dsg) -1, dsg-3 és P-kadherin (P-cad) kifejeződését befolyásoló folyamatokat vizsgáltuk, kiemelt figyelmet fordítva ezen sejtek proliferációs és differenciálódási folyamatait szabályozó protein kináz C (PKC) izoenzimsaládra (Papp et al. 2003). Mivel az epidermisz felépítése során a keratinociták különböző differenciálódási fázisba kerülnek, mely során eltérő adhézios molekulák fejeződnek ki, felmerült a kérdés, hogy a PKC enzimsaládnak van-e hatása ezekre a fehérjékre is.

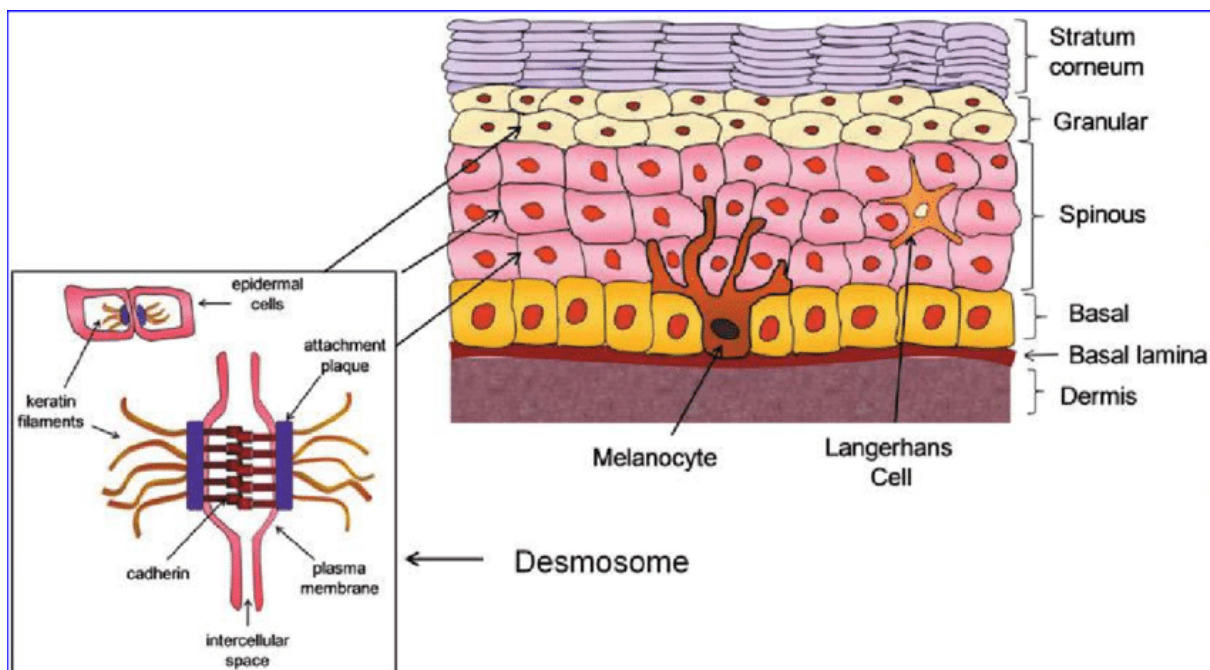
A bőrgyógyászati externákban az irritáció csökkentése és a barrier funkció helyreállítása céljából sikeresen alkalmazzuk a glicerolt és a hasonló szerkezetű xilitolt (Korponyai et al. 2017). Kísérleteinkben második részében így arra fókuszáltunk, hogy ezen két poliol megváltoztatja-e a keratinocitákban a differenciálódási és gyulladásos markerek kifejeződését, illetve befolyásolja-e a kapcsolódó jelátviteli folyamatokat.

Irodalmi áttekintés

A bőr és a keratinociták

Bőrünk jelenti a határt az emberi test és a külső környezet között. Védi testünket a külső kémiai és fizikai hatásokkal szemben, metabolikus, immunológiai folyamatokban vesz részt, hőszabályozó szerepe van, illetve az elsővonalbeli védelmet biztosítja a mikróbákkal szemben (Hongbo, 2004).

A keratinociták a test védelmének biztosítását egy fiziko-kémiai barrier kialakításával valósítják meg. Ahhoz, hogy ezt a fiziko-kémiai barriert fenntartsák, a sejtek folyamatosan proliferálnak, majd differenciálódnak és kialakul az epidermisz négy rétege (a tenyér és talp bőrében még egy réteg, a *Stratum lucidum* is megtalálható). A *Stratum basale*-ban (alapi réteg) a folyamatosan osztódó hengeres őssejtek helyezkednek el, melyek elsődleges támadáspontjai több, a szabályozásban szerepet játszó anyagnak. Felfelé haladva a sejtekben beindul a programozott sejthalál (apoptózis) folyamata, illetve a barrier kialakításához szükséges citoszkeletális fehérjék termelődése, mely folyamatot kornifikációnak nevezzük. A következő réteg a *Stratum spinosum* (tüskés réteg), majd ezt követi a *Stratum granulosum* (szemcsés réteg). Az ezt alkotó sejtekben kétféle granulum jön létre; az egyik a keratohialin testecske, a másik a lamelláris test. A keratohialin granulum a *Stratum corneum* (SC) intracelluláris komponenseit, a filaggrint, a lorikrint és a keratin filamentumokat tartalmazza, míg a lamelláris test az extracelluláris anyagokat, úgymint lipideket, korneodezmozint és kallikreint. A szemcsés réteg után a sejtek ellapulttá válnak és elveszítik magjukat, sejtmembránjuk helyett az ún. „cornified envelope” veszi őket körül, mely a lamelláris testekből kiszabaduló anyagokból áll. Ezeket a sejteket korneocitáknak nevezzük, az általuk létrehozott réteget pedig *Stratum corneum*-nak (Fuchs 1990), **1. ábra**.



1. ábra Az epidermisz felépítése

Az epidermisz 4 rétegből épül fel, mely a bazális membrántól a felszín felé haladva a *Str. basale*, *spinosum*, *granulosum*, *corneum*. A sejtek közötti kapcsoló apparátusok a dezmoszómák, melyek az intercelluláris térben kadherineken keresztül kapcsolódnak, míg a sejten belül keratin filamentumok horgonyozzák ki a citoszkeleton fehérjéihez. (Visscher and Narendran 2014)

A bőr, mint barrier

A bőr barrier funkciójának fenntartásában kémiai, fizikai, mechanikai, illetve immunológiai tényezőknek van szerepe. A barrier fenntartásának egyik legfontosabb eleme az elszarusodott réteg; felépítését a falhoz szokták hasonlítani, melyben az elszarusodott keratinociták, a korneociták a téglákat, a zsírban gazdag intercelluláris mátrix pedig a habarcst szimbolizálja (El Maghraby et al. 2008, Pailler-Mattei et al. 2009). A korneociták belsejét filaggrinhoz kötött citokeratin tölti ki, míg kívülről egy merev, úgynevezett fehérje-lipid boríték (cornified envelope) veszi körül (Bouwstra et al. 2003, Rudikoff 1998, Stawczyk-Macieja et al. 2015). Ez a boríték kapcsolódik az extracelluláris mátrixhoz, határt képezve a hidrofil és lipofil felszínek között (Bouwstra and Ponc 2006). Az elszarusodott réteg tehát 15-20 elhalt, ellapult sejtsorból áll, ahol a sejteket korneodezmoszómák kötik össze és oldhatatlan lipidek veszik

körül. A réteg alján elhelyezkedő sejtek még szorosan kapcsolódnak egymáshoz, míg a felső részben már lazán helyezkednek el, majd leválnak. Ez szintén kontrollált folyamat, mely a korneodezmoszómák degradációja révén valósul meg és fő triggere az intracelluláris kalciumkoncentráció növekedés, mely proteázokat és fehérje módosító enzimeket aktivál (Madison 2003).

A barrier állapotát befolyásoló fizikai faktorok közé tartozik a faggyútermelés mértéke, az epidermisz hidráltsága, melyet alapvetően a transepidermális vízvesztés (transepidermal water loss – TEWL) befolyásol, valamint a bőr pH értéke (Hongbo, 2004). A felszínt beborító lipréteg két forrásból származik. Az egyik a zsírköpeny nagy részét kitevő faggyú (sebum), melyet a faggyúmirigyek termelnek, míg a másik az epidermális lipidek. A zsírréteg vastagsága 0,5-5 μm attól függően, hogy az adott régióban milyen a faggyúmirigyek denzitása (Pailler-Mattei et al. 2009, Youn et al. 2005). Az intercelluláris mátrix lipidjei a *Str. granulosum* Odland/lamelláris testecskéiben található prekursorokból jönnek létre. A kalciumkoncentráció növekedésével a lamelláris testek elindulnak a sejt apikális felszíne felé, ahol exocitosisal kiürítik tartalmukat. A poláris lipidek enzimatisz folyamatok révén apolárisá, a glikoszíngolipidek hidrolízis során ceramidokká, míg a foszfolipidek szabad zsírsavvá alakulnak át. Az epidermális lipidek 45-50%-ban színgolipidekből vagy ceramidokból, 20-25%-ban koleszterinből, 10-15%-ban szabad zsírsavakból és nagyon kis részben apoláris lipidekből állnak (Plasencia et al. 2007, Verdier-Sevrain and Bonte 2007). Ezzel szemben a faggyú apoláris lipidek keveréke; trigliceridekből (~15%), szabad zsírsavakból (~33%), viasz észterekből (~26%), szkvalénből (~12%), koleszterin észterekből (~3%) és koleszterinből (~1,5%) áll (Giacomoni et al. 2009, Zouboulis 2004). A domináns zsírsavak C16-C18 szénláncú esszenciális zsírsavak, melyből a legtöbb az olajsav, míg a telített zsírsavak közül a pálmásav (Nordstrom et al. 1986, Plasencia et al. 2007). A faggyú antimikrobiális hatása révén véd a patogén mikroorganizmusok elszaporodása ellen (Youn et al. 2002), valamint a túlzott

nedvesség és a környezet hőmérséklet változásaival szemben (Zouboulis CC. 2004); emellett segít fenntartani az epidermisz vízmegkötő képességét (Tagami 2008b, Youn et al. 2002).

Az egészséges bőrfelszín pH értéke 4,0-6,0 között változik. A savas környezet fenntartását a szabad zsírsavak termelése (főként a tejsav), aminosavak, hidrogén és ammónium vegyületek biztosítják (Darlenski et al. 2009). A savköpeny kialakításában jelentős szerepe van azon lipolitikus enzimeknek, melyek a szaruréteg intracelluláris lipid metabolizmusában vesznek részt. A savas kémhatást az alsóbb rétegekben a nátrium/hidrogén pumpa tartja fent, mely a sejtekből eltávolítja a H^+ iont, így helyére Na^+ ion kerül. A savas pH tartja egyensúlyban a normál és a potenciálisan patogén flóra kórokozóit. Szaprofita mikroorganizmusok a triglicerideket szabad zsírsavvá alakítják át, ezáltal segítik a savas környezet fenntartását. A pH kóros emelkedése kedvez a baktériumok és gombák szaporodásának és kolonizálásának; emellett katepszinek aktiválódnak, fokozódik a filaggrin lebomlása, ezáltal csökken a természetes hidratáló faktor (natural moisturizing factor-NMF) kialakulása (Lambers et al. 2006), valamint a transepidermális vízvesztés is fokozódik (Darlenski et al. 2009).

Az epidermális barrier integritása védi meg az epidermiszt a fokozott vízvesztéstől, illetve fenntartja a megfelelő hidráltságot (O'Goshi and Serup 2005). Ennek az egységnek az egyik tényezője az NMF, mely felelős a megfelelő hidráltság fenntartásáért. Az NMF többségében szabad zsírsavakból és metabolitjaiból, mint az urokainsavból és a filaggrin lebontásából származó pirrolidon dekarboxilsavból áll. A bőrön keresztüli vízvesztés a verejtékmirigyek kiválasztásának és a transepidermális passzív diffúzióknak az eredménye; ez utóbbi a TEWL értékkel jellemezhető (Holm et al. 2006). A TEWL értéke jelzi az epidermális réteg integritását és nagyon érzékeny mutatója az epidermális barrier károsodásnak (Huang and Chang 2008, Tagami 2008a). Állandó külső körülmények között a TEWL 4-10 g/h/m² körül változik, attól függően, hogy a bőr melyik részén mérjük. Amennyiben azonban a barrier funkció károsodik, a TEWL akár harmincszorosára is megnőhet (Hongbo 2004). Mindezek

mellett a TEWL-t számos egyéb faktor befolyásolhatja, mint például a bőr hőmérséklete, a bőr ereinek vérátáramlása, az epidermisz regenerációs üteme, a szaruréteg lipidtartalma és vastagsága, a verejtékmirigyek száma és aktivitása, vagy a külső hőmérséklet és páratartalom (Marrakchi and Maibach 2007). A normális mértékű TEWL fenntartásában fontos szerepe van a *Str. granulosum* és *corneum* között lévő junkcióknak is, melyek befolyásolják a víz és egyéb anyagok áramlását a magasabb és alacsonyabb koncentrációjú részek között. Fontos továbbá, hogy a TEWL szabályozza a hámlást is; minél intenzívebb a vízvesztés, annál fokozottabb a hámlás, melynek az excesszív hámlással járó kórképekben, illetve *erythrodermában* van jelentősége (Verdier-Sevrain and Bonte 2007).

A mechanikai védelemet különböző sejtkapcsoló apparátusok hozzák létre. A szoros kapcsoló apparátusok (tight junction, TJ), a szomszédos sejteket összekötve, meghatározzák a paracelluláris anyagáramlást és elkülönítik a sejtmembrán apikális és bazolaterális részét. Azt figyelték meg, hogy a *Str. corneum* károsodása esetén a TJ fehérjék az alsóbb sejtrétegekben, a *Str. granulosumban* és *spinosumban* fokozottan jelennek meg, mely feltételezi szerepüket a barrier létrehozásában (Brandner et al. 2006). Az adherens junkciók és dezmoszómák szintén fontos alkotórészei a barriernek. Több olyan betegségben, ahol a sejtek közötti kapcsolatokat mediáló fehérjék károsodnak (példaképpen a *pemphigus vulgaris*, ahol a desz 3; illetve az akut ekcéma, ahol az E-kadherin) fokozódik a TEWL, de ezek állatmodelljeiben is fokozott TEWL-t igazoltak (Elias et al. 2001, Trautmann et al. 2001).

A bőr az első vonalbeli védelmet jelenti a szervezet számára a kórokozókkal szemben is, melyet saját immunrendszerének segítségével valósít meg. Ennek egyik eleme a veleszületett és adaptív immunitáshoz tartozó effektor sejtek, úgymint a neutrofilek, makrofágok, dendritikus sejtek, limfociták, melyeket “bőr asszociált lymphoid szövetnek” (SALT) is neveznek. A másik lényeges képviselői az immunbarrier fenntartásában nélkülözhetetlen keratinociták (Yazdi et al. 2016). Mindemellett bőrünket mikroorganizmusok kolonizálják,

melyek segítenek az egyensúlyt fenntartani a patogén kórokozókkal szemben, emellett folyamatosan stimulálják az immunrendszert mind az immunogén, mind a tolerogén immunválasz fenntartására (Fredricks 2001). A bőr valamennyi, immunitásban részt vevő sejtje rendelkezik mintázat felismerő receptorokkal (PRR-pattern recognition receptor), mely az ún. patogén-asszociált (PAMP-pathogen-associated molecular pattern) vagy veszély-asszociált molekuláris mintázatot (DAMP-danger-associated molecular pattern) ismeri fel, ezáltal nagyon korai immunválaszt tudnak létrehozni (Akira et al. 2006).

Az epidermális keratinociták “nem-professzionális” effektor sejteknek tekinthetők, ugyanis antimikrobiális peptideket (AMP), proinflammatorikus citokineket és kemokineket termelnek, valamint kóros körülmények között antigén prezentáló sejtekként is viselkedhetnek. Az AMP-k evolúciósan konzervált peptidek, melyek a kórokozók membránjához kötődve lyukat hoznak létre. Ide tartoznak a β -defenzinek (HBD-1, -2, -3), katelicidinek (LL-37), pszoriazin (S100A7) és RNáz 7 (Braff et al. 2005, Schroder and Harder 2006). A HBD-k cisztein gazdag kis molekulású peptidek. A HBD-1 folyamatosan jelen van, főleg Gram negatív kórokozók ellen jelent védelmet. A HBD-2 csak gyulladás esetén termelődik; citokineket aktivál (tumor nekrosis faktor- α [TNF- α], interleukin-1 [IL-1]), illetve elsősorban Gram negatív baktériumok, kismértékben Gram pozitívak ellen hatásos. Ezzel szemben a HBD-3, mely szintén gyulladásos környezetben termelődik, a Gram pozitívakkal szemben jelent védelmet. A HBD-k és a keratinociták további fontos feladata a dendritikus sejtek és memória T-sejtek aktiválása (Harder et al. 2001). Az LL-37 prekursor molekulája a hCAP-18, melyet számos bőrben előforduló sejt képes termelni, majd neutrofil granulociták proteázai alakítják át egy 37 aminosavból álló peptiddé. A baktériumok, gombák és vírusok ellen egyaránt képes védelmet biztosítani, emellett a hízósejtek és a neutrofilek kemotaxisát is elősegíti (Nizet et al. 2001). A pszoriazin hatékonyságát *Escherichia coli* ellen igazolták, illetve kemotaktikus hatását is kimutatták CD4⁺ sejteken és neutrofileken (Glaser et al. 2005, Jinquan et al. 1996).

Az RNáz 7 ribonukleáz aktivitása révén széles antimikrobiális spektrummal rendelkezik (Harder and Schroder 2002).

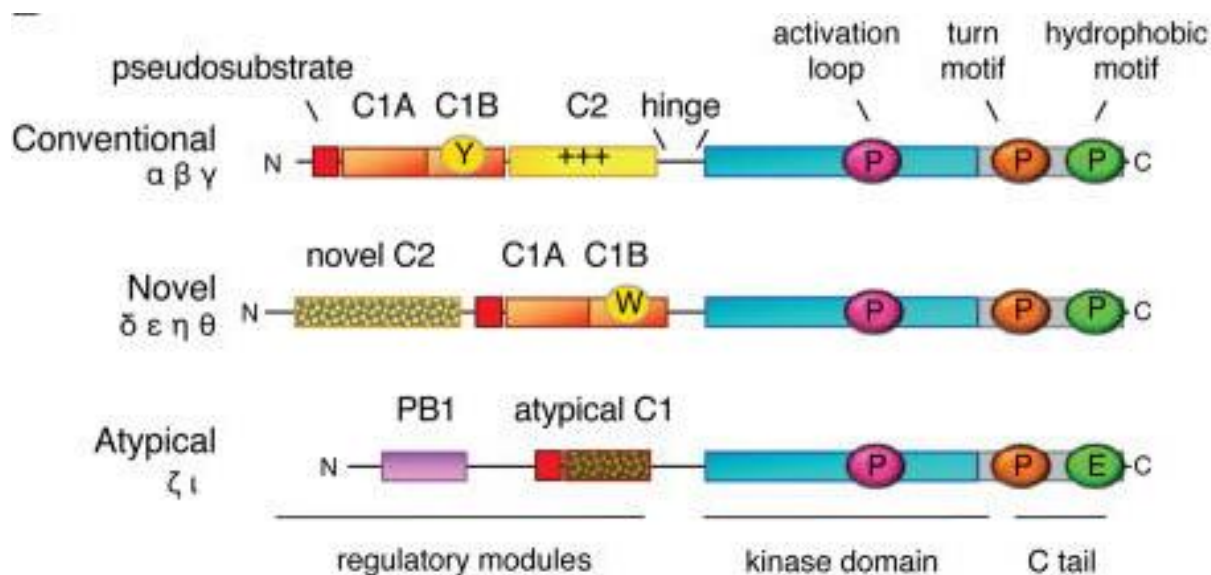
A keratinociták által termelt citokinek közül kiemelhető a TNF- α , IL-1 és IL-6, melyek mitogén és lipid szintézist fokozó hatással rendelkeznek, és szerepük van a neutrofilek bőrbe való migrációjának beindításában. Akut barrierkárosodás esetén expressziójuk fokozódik, azonban ha a károsodás krónikussá válik, gyulladást és fokozott epidermális proliferációt okoznak (Wang et al. 2004). A keratinociták emellett folyamatos transzformáló növekedési factor- β (transforming growth factor- β , TGF- β) termeléssel elősegítik a Langerhans-sejtek aktivációját és beáramlását, melyek együttesen az immun “surveillance” fontos elemei (Sharp et al. 2005).

A PKC rendszer

A protein kináz C (PKC), melyet Yasutomi Nishizuka fedezett fel 1988-ban (Nishizuka 1988), a szerin/treonin kinázok egyik jelentős képviselője, mely a test valamennyi sejtjének, így a keratinociták életfolyamataiban is központi szerepet játszik. Szerkezeti és aktivációs mechanizmusaik alapján korábban 4 nagyobb csoportot különítettünk el, melyet 12 különböző izoforma alkotott (Nishizuka 1988, Nishizuka 1992). A konvencionális vagy klasszikus csoportba (cPKC) tartozik: a PKC α , β_1 , β_2 és γ , melyek kalcium- és diacylglicerol- (DAG), illetve annak exogén megfelelőjeként működő forbol-észter-dependensek. A novel csoportot (nPKC) alkotja a PKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek, kalcium nélkül, forbol-észterekkel (illetve DAG-lal) is aktiválhatók. A harmadik, atípusos csoportba (aPKC) sorolható a PKC ζ és $\lambda/1$. Ezen izoformák aktiválódásához sem kalcium, sem forbol-észter nem szükséges. Külön csoportot hoztak létre a PKC μ számára, mely szerkezete és aktivációja szempontjából is rendhagyó volt; újabb közlemények szerint ezt a formát már a protein kináz D családba sorolják (Johannes et al. 1994). Így jelenleg 3 nagy csoport különíthető el, illetve 11 izoforma.

A PKC-k szerkezetére jellemző, hogy tartalmaznak egy N terminális regulatórikus domént (kb. 35 kDa), illetve egy C terminális kináz domént (kb. 45 kDa). A klasszikus és novel izoformák N-terminális doménje tartalmazza a pszeudoszubsztrát kötő helyet, valamint a DAG (C1) és kalcium (C2) kötőhelyet, míg a C-terminálison az ATP és a szubsztrát kötőhely található meg, ezért nevezzük kináz vagy katalitikus doménnek.

A pszeudoszubsztrát kötőhelynek az enzim saját gátlásában van szerepe, lefedi a szubsztrát kötő helyet. A C1 doménből egy vagy kettő is lehet. A novel izoformákban erős affinitást mutat a DAG-hoz, mely miatt az aktivációhoz elegendő önmagában a DAG, míg a klasszikus izoformákban ez az affinitás alacsony, így ezek az izoenzimek a DAG mellett az intracelluláris kalcium szint emelkedését is igénylik aktivációjukhoz. (Giorgione et al. 2006) Az atípusos PKC-k csak egy DAG-inszenzitív C1 domént tartalmaznak (Pu et al. 2006), mely közvetlenül a pszeudoszubsztrát régió után helyezkedik el és az enzim aktiváció gátlásában van szerepe (Graybill et al. 2012). A klasszikus izoenzimekben a C2 domén érzékeli a kalciumot, melynek bekötődésével az enzim a plazma membránhoz kapcsolódik. A kalciummal megkötött rész kapcsolódik az anionos foszfolipidekhez, míg a bázikus része a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfáthoz (PIP2) (Morales et al. 2016). A novel formák C2 doménje sem a kalciumhoz, sem a PIP2-hoz nem tud kötődni. Az atípusos enzimek tartalmaznak egy PB1 domént, mely fehérjékhez (p62, Par6) kötődik, és hasonlóan működik, mint a C1 domén DAG kapcsolat a novel és klasszikus típusokban (Graybill et al. 2012, Tobias and Newton 2016). A kináz domén tartalmazza az aktivációs helyet. A C terminális farok teszi lehetővé a kapcsolódást különböző regulatórikus fehérjék számára. Két erősen konzervált foszforilációs helyet tartalmaz, az egyik a "turn"-motívum, másik a hidrofób szakasz, melyek az enzim stabilitásában játszanak szerepet (Edwards and Newton 1997), illetve a PKC-t érése során a membránhoz horgonyozzák (Yang and Igumenova 2013, Newton 2018) **(2. ábra)**

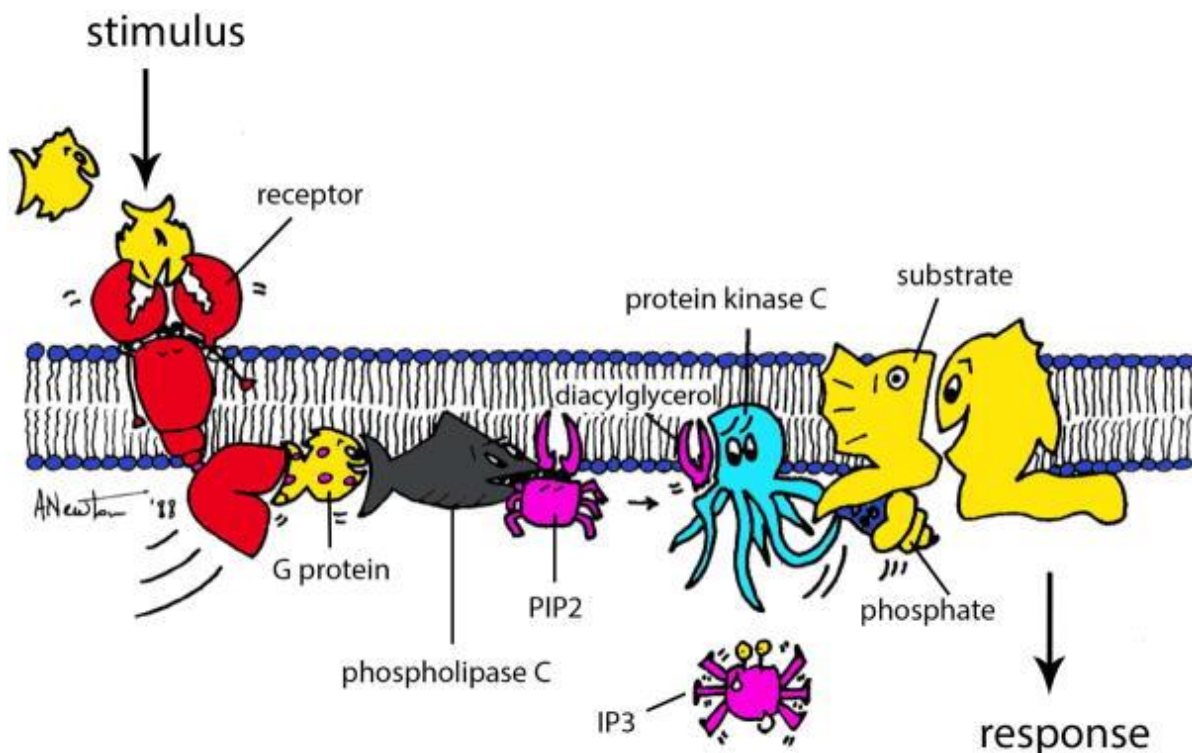


2. ábra A PKC izoenzimek szerkezeti jellemzői

Valamennyi PKC izoenzim esetén a regulatórikus domén tartalmaz egy pszeudoszubsztrát régiót (piros négyzet) és egy C1 domént (narancssárga négyzet). Ezek különböző affinitással rendelkeznek a DAG iránt (az ábrán Y/W [Y-gyenge, W-erős] jelöléssel látható a C1B doménben). A klasszikus izoenzimekben a kalciumot kötő C2 domén (sárga négyzet), a PIP₂-hoz való kötődésben játszik szerepet. Az atípusos izoformákban lévő PB1 domén (lila négyzet) az enzim aktivációjáért felelős. A kináz doménben (kék) lévő aktivációs hurok (rózsaszín kör) és C terminális farokban (szürke) lévő "turn"-motívum (narancssárga kör) és hidrofób régió (zöld kör) az enzim foszforilációs helyei (Newton 2018).

A gátolt, stabil állapotú PKC a citoszolban található. A klasszikus izoformáknál a PIP₂ hasítása során felszabaduló DAG és kalcium hatására két lépésben aktiválódik az enzim. Először a kalcium bekötődik a C2 doménhez, mely ezáltal a plazma membrán anionos foszfolipidjeivel létesít kapcsolatot. Ez konformáció változást okoz és a C2 domén eltávolodik a kináz doméntól, így szabaddá válik a bázikus PIP₂ kötő domén is, mely kihorgonyozza az enzimet a membránhoz. Második lépésben a DAG bekötődik a C1B doménhez, mely újabb konformáció változást eredményez, mely pedig elmozdítja a pszeudoszubsztrátot a szubsztrát-kötő helytől (Orr et al. 1992, Newton and Johnson 1998, Jaken 1996, Nishizuka 1988, Nishizuka 1992, Parekh et al. 2000). Az aktiváció során lejátszódó membránba történő transzlokáció a PKC izoenzimek specifikus jellegzetessége. A novel izoformákat a DAG

önmagában aktiválja. Mivel nem rendelkeznek plazmamembrán szenzorral valamennyi membrán struktúrához képesek kötődni; úgymint a plazma membránhoz, mitokondriumhoz, Golgihoz és a PKC δ esetében a magmembránhoz (Gallegos et al. 2006). Az atípusos izoformák sem kalciummal, sem DAG-lal nem aktiválhatók. Ezek az enzimek PB1 doménjük segítségével különböző célfehérjékhez, mint a p62 és Par6 kötődnek, ezáltal a pszeudoszubsztát eltávolodik a szubsztát-kötő helytől, így lehetővé válik a célmolekula bekötése (Drummond and Prehoda 2016, Steinberg 2004) (3. ábra).



3. ábra PKC aktiváció folyamata

A foszfatididil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂, lila rák) foszfolipáz C (szürke cápa) általi hasítása révén inozitol-triszfoszfát (IP₃, ráktest), és diacilglicerol (DAG, rák olló) keletkezik. Az IP₃ hatására az intracelluláris kalcium koncentráció növekszik, mely lehetővé teszi a PKC (kék polip) allosztérikus változását. Ezeknek a másodlagos hírvivőknek a kötődése stabilizálja a PKC aktív formáját, mely így a plazmamembránhoz kötődve képes foszforilálni a szubsztátját (sárga csikó halak) (Newton 2018).

A PKC izoenzimek megoszlása az adott speciesre, szövetre, valamint sejtre jellemző (Baier et al. 1993, Goodnight et al. 1994, Nishizuka 1988, Nishizuka 1992, Ohno et al. 1991).

Ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek befolyásolni. Azonban nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különbözik(het) egymástól (Nishizuka 1992), Decker, 2003). Bebizonyosodott emellett az is, hogy egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferáció és differenciálódás) kialakításában akár egymással ellentétes hatásuk is lehet (Papp et al. 2003).

A PKC szerepe keratinocitákban

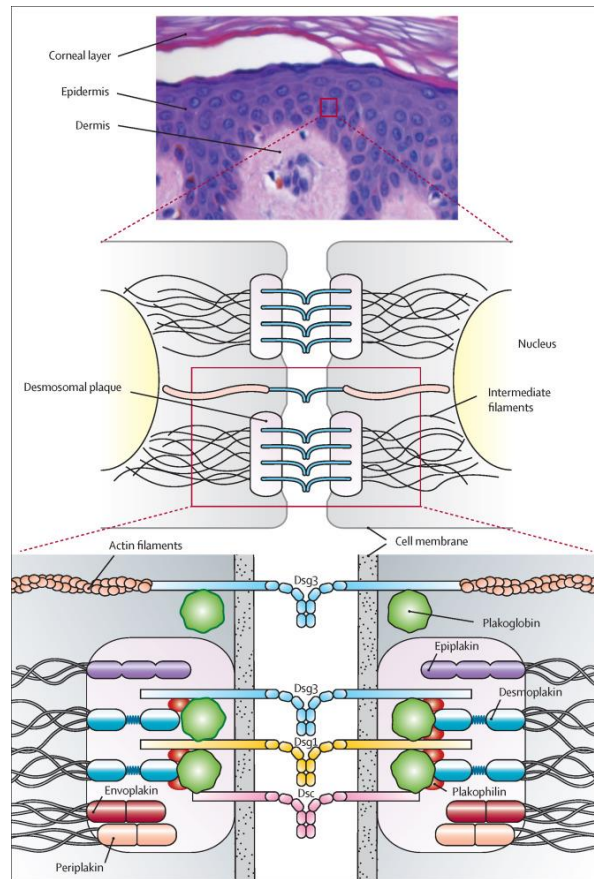
Ismert, hogy a normál humán epidermális keratinocitákban (NHEK) megtalálható a PKC α , β , γ , δ , ϵ , η , valamint ζ és μ (Fischer et al. 1993, Fisher et al. 1993, Rennecke et al. 1996). A munkacsoport, amelyhez én is csatlakoztam PhD munkám során, korábban HaCaT keratinocitákon térképezte fel az egyes PKC izoenzimek előfordulását, illetve a differenciálódásban és proliferációban betöltött szerepét. Igazolódott, hogy a HaCaT sejtekben hét izoenzim található: a cPKC α és β ; a nPKC δ , ϵ , η és θ , valamint az aPKC ζ . Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a NHEK és HaCaT között csak minimális különbség van a PKC rendszer vonatkozásában (NHEK-ben θ nem volt kimutatható). További kísérletekben bebizonyosodott, hogy az izoformák közül a proliferáló sejtekben az ϵ , míg a differenciálódókban a δ kifejeződése volt szignifikánsan emelkedett. Kimutatták azt is, hogy a keratinociták a különböző differenciáltsági stádiumoknak megfelelően fejeznek ki különböző markereket. Így a proliferáló sejtekben a keratin 17 (K17), a differenciálódás kezdetén a keratin 10 (K10) expressziója a legmagasabb, a differenciált sejtekben az involukrin (INV) és filaggrin (FLG), a terminális differenciáció fázisát pedig a transzglutamináz-1 (TG-1) jelzi (Ryle et al. 1989). PKC aktivátorok és inhibitorok alkalmazásával sikerült igazolni a PKC izoformák specifikus befolyásoló hatását a proliferációra és differenciálódásra. Az általános PKC aktivátor forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) hatására a sejtek a terminális differenciálódás jeleit

mutatták; ezzel szemben az általános PKC inhibitor (GF109203X) hatására a K17 lényegesen nem változott, míg a többi, a differenciációs fázisban kifejeződő markerek, az INV, FLG, K10 és TG-1 csökkentek (Papp et al. 2003). Ezen eredmények megerősítése céljából rekombináns transzfekció segítségével az egyes PKC izoenzimeket stabilan overexpresszáló HaCaT sejteket is létrehoztak. Kimutatták, hogy a cPKC α -t és az nPKC δ -t kifejező sejtekben a proliferáció lecsökkent, míg az nPKC ϵ -t vagy a cPKC β -t fokozottan expresszáló sejtek növekedési üteme felgyorsult. A differenciáltsági állapot is ennek megfelelően változott, ugyanis a hiperproliferatív cPKC β -t vagy nPKC ϵ -t overexpresszáló sejtekben lecsökkent a késői differenciáltsági markerek szintje, míg az cPKC α -t és δ -t expresszáló hipoproliferatív keratinocitákban az INV, a FLG és a keratinocita-specifikus TG-1 fejeződik ki fokozottabban (Papp et al. 2004).

Kevésbé kutatott területhez tartozik a PKC rendszer adhézións molekulákra kifejtett hatása. A szelektív PKC inhibitor H7, illetve tirozin- és szerin/treonin-kináz gátló staurosporin képes volt a kalcium-függő dezmoszómák kialakulását gátolni, ami valószínűsíti, hogy a PKC szerepet játszhat a dezmoszómák kialakulásában. Más kísérletekben a PMA, mint általános PKC aktivátor az adherens junkciókon keresztül sejt-sejt kapcsolat kialakulását okozta (Kitajima et al. 1999). Továbbra sem volt ugyanakkor ismert a PKC rendszer adhézións molekulák kifejeződésének szabályozásában betöltött szerepe.

Az adhézións molekulák

A szövetek az epitélsejtek felszínén elhelyezkedő kapcsoló struktúrák, az adhézións molekulák segítségével tartják fenn szerkezeti stabilitásukat. Ezek lehetnek adherens junkciók és dezmoszómák, melyek a kadherin szupercsaládba tartozó adhézións molekulákból épülnek fel (4. ábra).



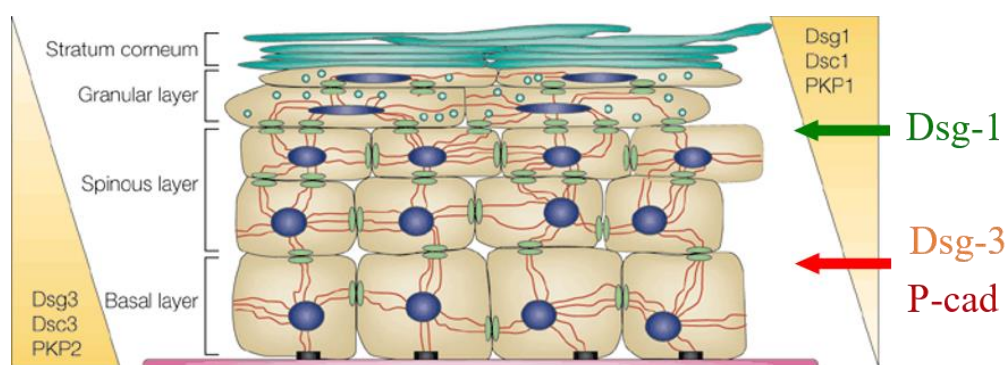
4. ábra *Epidermális dezmoszómák szerkezete.*

A dezmoszómák a szomszédos keratinocitákat összekötő struktúrák, melyeket alkotó adhézíós molekulák (dsg-1, dsg-3, dsc), legtöbbször homológ formában kapcsolódnak egymáshoz. (Schmidt et al. 2019)

A kadherineek homofil kalcium dependens molekulák, melyek egy nagy extracelluláris, egy transzmembrán és egy kisebb intracelluláris doménnel rendelkeznek. Az adherens junkciókban található a klasszikus kadherineek, az E- és P-kadherin (E-cad, P-cad), melyek a katenineken keresztül aktinhoz kötődnek. A dezmoszómákat a dezmoszómális kadherineek alkotják – ezek a dezogleineek (dsg) és a dezokollinok (dsc) –, melyek intermedier filamentumok segítségével a keratinrendszerrel tartanak fenn kapcsolatot (Koch and Franke 1994). Ezen kapcsoló molekuláknak három-három izoformáját különböztetjük meg: a dsg-1, 2 és 3-at, valamint dsc-1, 2 és 3-at. Míg a dsg-2 és dsc-2 minden dezmoszómát tartalmazó szövetben megtalálható, addig a dsg-1 és 3, valamint a dsc-1 és 3 csak a többrétegű epitélben

fordul elő (Garrod et al. 2002). A dezmogleineket öt extracelluláris, egy transzmembrán és egy citoplazmatikus domén alkotja. Utóbbival kötődnek a dezmozoplakinhoz és dezmofilinhez, illetve a két első extracelluláris domén N terminális régiójával egymáshoz kötődnek (Futei et al. 2000) (4. ábra)

PhD munkám során a dsg-1, dsg-3 és P-cad molekulákat tanulmányoztuk, melyek előfordulása különböző a bőrben és a nyálkahártyákon. A dsg-1 elsősorban a többrétegű laphám szuprabazális rétegeiben fordul elő. Ezzel szemben a dsg-3 az epidermiszben a *Stratum basale* és *spinosum* alsó sejtsoraiban, a nyálkahártyában valamennyi sejtrétegben megtalálható (Arnemann et al. 1993). A P-kadherin szintén csak a bazális sejtek felszínén expresszálódik (Furukawa et al. 1994) (5. ábra).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

5. ábra A vizsgált dsg-1, dsg-3 és P-cad kifejeződése a humán bőr epidermiszében

A bazális sejtsorokban a dsg-3 és P-cad, ezzel szemben a felsőkben a dsg-1 fokozott expresszióját figyelték meg (Green and Gaudry 2000).

Adhéziós molekulákat érintő bőrgyógyászati kórképek: a pemphigus vulgaris és foliaceus

Ismert, hogy a különböző hólyagképződéssel járó bőrbetegségek kialakulásában az adhéziós molekulákkal szemben létrejövő “immunológiai támadás” játszik szerepet. Autoimmun bullózus kórképekben és Darier betegségben igazolták a P-cad upregulációját (Kovacs et al. 2004). A dsg-1 és 3 patogenetikai szerepe jól feltérképezett pemphigus

*vulgaris*ban és *foliaceus*ban. Kimutatták, hogy a *Staphylococcal scaled skin* (SSS) szindróma kialakulásában szerepet játszó *Staphylococcus aureus* exfoliatív toxinja a dsf-1 3-as és 4-es doménjéhez kötődve hozza létre a bőr leválását (Amagai 2008). Ezen betegségek közül a *pemphigus* 2 fő típusát mutatjuk be részletesen.

A *pemphigus* egy potenciálisan halálos kimenetelű hólyagos betegség, mely mind a bőrt, mind a nyálkahártyákat érintheti. A sejtfelszíni antigénhez kötődő antitestek következtében a keratinociták közötti intercelluláris kapcsolat megszakad, akantolízis jön létre (Stanley, 2003). A betegség leggyakrabban 45-65 év között jelentkezik. Incidenciája jelentős különbségeket mutat az egyes országokban, leggyakoribb az USA-ban és Izraelben. Ennek a változékonyságnak az oka a genetikai háttér és kiváltó tényezők különbözősége lehet (Schmidt et al. 2019). Úgy tűnik, hogy a *pemphigusos* betegek legnagyobb része hordozza a HLA DRB1*04:02 vagy DQB1*05:03 allélt (Vodo et al. 2018). Emellett eddig 4 nem-HLA gént is kimutattak. Ezek a dsf-3-at kódoló DSG3; a TAP2 gén, mely az antigén prezentációban szerepet játszó ATP-kötő kazetta (ABC) transzportert kódol; az IL-6 gén és a gyulladásban és apoptózisban fontos transzkripciós faktort kódoló ST18 gén (Sarig et al. 2012, Vodo et al. 2018). Környezeti tényezők közül gyógyszereknek (penicillamin, captopril), növényvédő szereknek, nehézfémeknek, UV sugárzásnak, égésnek, műtétnek és stresszes életmódnak lehet szerepe (Daneshpazhooh et al. 2016, Morell-Dubois et al. 2008, Wolf et al. 1991). A nikotin fogyasztás védelmet jelent, melyet magyarázhat az a tény, hogy a kolinerg antagonisták *in vitro* csökkentik az akantolízis mértékét *pemphigus*ban (Lai et al. 2018, Nguyen et al. 2004).

A két fő target antigén *pemphigus*ban a dsf-1 és dsf-3, melyek a kalcium dependens kadherin családba tartozó transzmembrán adhéziós fehérjék (Waschke and Spindler 2014). *Pemphigus foliaceus*ban dsf-1 ellen termelődnek autoantitestek, melyek a *Str. granulosum* szintjében kialakuló hólyagokat okoznak kizárólag a bőrön. Ezzel ellentétben a *pemphigus vulgaris*ban a szuprabazális rétegben kialakuló hólyagok típusosan először a nyálkahártyán

jelennek meg, majd ezt követően a bőrön. A nyálkahártya érintettséggel járó formában dsG-1, míg a mukokután formában mindkét izoforma elleni autoantitestek jelen vannak (Amagai 1999), melyek immunglobulin G (IgG) típusúak (Mahoney et al. 1999).

A *pemphigus foliaceus* 160 kDa-os antigénjét, a dsG-1-et Eyre és Stanley azonosította (Eyre and Stanley 1987) a dezoglein család első tagjaként, majd a *pemphigus vulgaris* antigén egy 130 kDa-os glikoproteinjét, a dsG-3-at Amagai és mtsai mutatták ki (Amagai et al. 1991).

A két *pemphigus* típus klinikai megjelenésében fellelhető különbség hátterében egyrészt a két izoforma eltérő megjelenése áll az epidermiszben és az epitéliumban. Egy másik tényező, hogy a két dsG képes kompenzálni egymás hiányát abban a rétegben, ahol mindkettő expresszálódik; ezt nevezik “dezoglein kompenzáció” teóriának. A nyálkahártyában a dsG-1 főként a felszíni rétegekben expresszálódik és csak kismértékben a bazális rétegben, a dsG-3 azonban minden rétegben kifejeződik. A bőrben a dsG-1 a felszíni, a dsG-3 a szuprabazális rétegekben található elsősorban. Ennek eredményeként az anti-dsG-1 IgG termeléssel járó *pemphigus foliaceus*ban a felső epidermális rétegben jön létre a hólyag, ahol a dsG-3 expresszió nem kompenzálja a dsG-1 antitestek okozta funkcionális hiányát, míg a nyálkahártyán nem okoz tüneteket a dsG-3 teljes jelenléte miatt. Ehhez hasonlóan a *pemphigus vulgaris*ban az akantolízis az anti-dsG-3 IgG hatására a nyálkahártya alsó rétegében jön létre, ahol a dsG-1 expresszió minimális (Stanley and Amagai 2006).

A kórképek kezelését immunszuppresszív és immunmoduláns szerek alkalmazása jelenti. Korábban első vonalban szteroidokat (prednisolone, dexamethason) alkalmaztak, de tekintettel súlyos mellékhatásaikra előtérbe kerültek a szteroid spórolást lehetővé tevő kezelések. Ma, amennyiben elérhető, az anti-CD20 rituximabot alkalmazzák, emellett nagy dózisú immunoglobulin, mikofenolát mofetil és azathioprine, illetve ezen szerek kombinációja lehet elsősorban hatékony (Schmidt et al. 2019, Melchionda and Harman 2019).

A hólyagos bőrbetegségek mortalitása elsősorban a kísérő infekciókkal függ össze és jelentősen javult az alkalmazott szteroid összdózisok csökkenésével. A betegség lefolyását befolyásoló rizikó tényezők közé tartozik a magas szérumszint anti-dsg-3 szint, a fiatal életkor, valamint a nyálkahártya érintettsége (Saha et al. 2014).

Barrier diszfunkció atópiás dermatitisben

Az *atópiás dermatitis* (AD) a leggyakoribb gyulladásos bőrbetegség a fejlett országokban, melyre különböző predilekciós helyeken (pl. flexor felszíneken) kialakuló száraz, viszkető területek jellemzőek. A betegség gyakoribb gyermekkorban és fiatal felnőttkorban; kialakulásában genetikai, környezeti és immunológiai tényezők egyaránt szerepet játszanak. Az utóbbi évtizedekben egyre inkább ismertté vált a betegség patogenezise, melyben az epidermális barrier károsodásának és immunológiai folyamatoknak van központi szerepe. A betegség kialakulásában szerepet játszó immunológiai folyamatok kiterjedése révén az alapvetően bőrre lokalizálódó betegség szisztémássá válhat és egyéb allergiás kórképek (allergiás rhinitis, asthma, ételallergia) is kialakulhatnak; ezt a folyamatot ún. “atópiás menetelés”-nek nevezték el (Spergel and Paller 2003). Bár az *atópiás dermatitis* kialakulásában a barrierkárosodásnak és az immunológiai folyamatoknak együttesen van szerepe, tekintettel az értekezés témájára, ebben a fejezetben a barrier diszfunkciót tárgyaljuk részletesebben.

A barrier károsodás egyik fő eleme a filaggrin metabolizmus megváltozása, melyet FLG gén knock out és mutált egerekben észlelt spontán dermatitis, bőrbarrier károsodás és dehidratáció támaszt alá (Saunders et al. 2016). A *Str. granulosum* lamelláris testecskéiben a filaggrin polimerizált (profilaggrin) formában van jelen, melyből enzimatis hasítás révén monomerek képződnek a *Str. corneumban*. A monomerek keratin filamentumokhoz kapcsolódva struktúrális fehérjeként vesznek részt a keratinociták felépítésében. A felsőbb rétegekben azonban citrullinációval, peptidyl-arginin-deimináz segítségével elszakadnak a

keratinoktól és aminosavakká (glutamin, arginin, hisztidin) degradálódnak, melyekből a savas pH fenntartásához szükséges urokainsav és a természetes hidratáló faktorokhoz tartozó (NMF), így a hidratáció megőrzésében fontos, pirrolidin karboxilsav jön létre (Leyvraz et al. 2005, Rawlings and Harding 2004). A pH emelkedésével szerin proteázok és kallikrein aktiválódnak, ami a korneodezmoszómák és az intercelluláris lipidek érésében szerepet játszó enzimek fokozott degradációjához vezet, így csökken a ceramid szintézis (Briot et al. 2009). A szerin proteázok megfelelő működéséhez elengedhetetlen a proteáz inhibitorok élettani funkciója is, tehát az ezeket kódoló génekben bekövetkezett mutációk (**1. táblázat**) szintén szerepet játszanak az AD kialakulásában (O'Regan et al. 2009)

Gén	Fehérje
FLG (R501X, 2282del4)	Filaggrin
KLK7	Kallikrein
SPINK5	LEKTI (Lympho-epithelial
	Kazal-type-related inhibitor)

1. táblázat Az atópiás dermatitisben leggyakrabban szerepet játszó gének és az általuk kódolt fehérjék.

Az így kialakult változások Th2 típusú gyulladásos folyamatokat aktiválnak és fokozódik az allergének bőrön keresztüli átjutása (Kawasaki et al. 2012), mely IL-1 α és β , valamint IL-4 szintézist eredményez. Az IL-4 hatására csökken a ceramid, filaggrin, lorikrin és dsgr-3 szintézis (Elias and Schmuth 2009). A pH értékének növekedése hatással van a bőrt kolonizáló baktériumokra is, melyek szintén fontos szerepet játszanak az AD patogenezisében. Az emelkedett pH érték és az immunrendszer Th2 irányú eltolódása kedvez a *Staphylococcus aureus* elszaporodásának (Rippke et al. 2004), mely a keratinociták sejthalálához vezető folyamatokat generál (Brauweiler et al. 2014).

A barrierkárosodás mellett természetesen az immun folyamatoknak is jelentős szerepe van a patogenezisben. Számos citokineket kódoló génben bekövetkező mutáció ismert. Mindezek alapján az AD kezelésében az immunszuppresszív és barrier helyreállító gyógyszereket együttesen szükséges alkalmazni.

Poliolok a bőrgyógyászatban

A glicerolról (1,2,3-trihidroxi-propán), mely endogén módon a bőrben is termelődik, ismert, hogy hidratálja és nyugtatja a bőrt. Emellett javítja a bőr barrier funkcióját azáltal, hogy csökkenti a dezmoszómák degradációját (Rawlings et al. 1995), stabilizálja a kollagént és elősegíti a sebgyógyulást (Andersen et al. 2007, Fluhr et al. 2008). A xilitol (1,2,3,4,5-pentahidroxi-pentán) a glicerolhoz hasonló poliol, melyet elsősorban cukor helyettesítőként ismerünk; kis mennyiségben szervezetünkben is termelődik a szénhidrát metabolizmus során (Ur-Rehman et al. 2015). Ismert erről a vegyületről is hidratáló és irritációt csökkentő hatása (Korponyai et al. 2011, Szel et al. 2015); kimutatták továbbá, hogy gátolja a *Staphylococcus aureus* biofilm kialakulását AD-ben (Katsuyama et al. 2005) és elősegíti a kollagén felépülését a bőrben (Knuuttila et al. 2000, Mattila et al. 2005). A fizikai hasonlóság ellenére ismert, hogy nem teljesen azonos hatás várható ettől a két vegyülettől. A glicerol aquaporin 3 (AQP3) csatornákon keresztül penetrálódik az epidermisz alsóbb rétegeibe (Hara et al. 2002). A csökkent hidratáltságú *Str. corneum*mal és károsodott bőrbarrierrel rendelkező AQP-3 hiányos egerekben a glicerol kezelés javította a hidratáltságot, míg a xilitol nem mutatott ilyen hatást (Hara and Verkman 2003).

Célkitűzések

PhD munkám során fő célom a bőr barrier funkcióját befolyásoló tényezők vizsgálata volt. Ennek során két területen folytattam kutatásokat.

1. Kísérleteink egyik felében a PKC izoenzimek adhéziós molekulák (dsg-1, dsg-3, P-cad) kifejeződésére gyakorolt hatását elemeztük humán epidermális HaCaT keratinocitákon.

Munkánk során:

- a. vizsgáltuk expressziójukat a tenyésztési idő, azaz a proliferációs és differenciáltsági állapot függvényében;
- b. adott PKC izoenzimeket stabilan overexpresszáló HaCaT sejtekben;
- c. Végezetül szelektív PKC δ inhibitor, valamint RNS interferencia (RNSi) technika alkalmazásával adott PKC izoformára nézve “géncsendesített” HaCaT keratinocitákon.

2. Kutatásaink második részében a barrier helyreállításában szerepet játszó anyagok (glicerol, xilitol) hatását vizsgáltuk a barrier kialakulásában szerepet játszó mechanizmusokra és jelátviteli folyamatokra. Ennek során:

- a. Különböző koncentrációk és kezelési idők alkalmazásával vizsgáltuk a poliolok hatását a keratinociták proliferációjára, a keratinociták differenciálódási markereinek kifejeződésére, valamint a sejtek intracelluláris kalciumszintjeire;
- b. A keratinocita differenciálódási folyamatokban szerepet játszó jelátviteli folyamatokra fókuszálva, tanulmányoztuk a PKC, illetve a MAPK útvonalra gyakorolt hatásukat, melyekről ismert a keratinociták differenciálódásának szabályozásában betöltött szerepük.
- c. Végezetül, különféle gyulladásos modelleket alkalmazva tanulmányoztuk esetleges gyulladáscsökkentő hatásukat.

Anyagok és módszerek

Felhasznált anyagok

Kísérleteink során használt Xilitol, Glicerol, LTA (“lipoteicoil-sav”, *S. aureus*ból), LPS (*Lipopolysaccharid*, *E. coliból*), poly-IC (“polyinosinic:polycytidyl-sav”) és rottlerin a Sigma-Aldrichtól (St. Louis, MO, USA) származik. Az oldószerek esetleges aspecifikus hatásainak kizárására a gyártó uatsításának megfelelő oldószerezal ezerszeres töménységű törzsoldatokat készítettünk. A -20°C-on tárolt törzsoldatokból közvetlenül a kezelés előtt készítettük el a szükséges koncentrációkat a sejtek tápoldatában (Ca²⁺-imaging esetén Hank oldatban). Vizsgálataink során „kezeletlen kontrollként” minden esetben az anyagok oldószerezével azonos hígításban kezelt sejteket használtunk.

HaCaT keratinociták és tenyésztése

A humán dermatológiai kutatások során széleskörűen használt HaCaT humán keratinocita sejtvonalat egy melanomában szenvedő férfi beteg nem infiltrált bőrterületéből izolálták (Boukamp et al. 1988, Boukamp et al. 1997). A sejtek spontán immortalizálódását alacsony extracelluláris kalcium koncentráció ([Ca²⁺]_e) és magasabb hőmérséklet alkalmazásával érték el. Jellemző a sejtekre, hogy ugyan nem jött létre bennük daganatos transzformáció, ugyanakkor *in vitro* proliferációs kapacitásuk, valamint *in vivo* tumorgenetikus potenciáljuk megnövekedett, differenciálódási képességük azonban csökkent (Breitkreutz et al. 1991, Fusenig and Boukamp 1998).

Az immortalizációval járó változások mellett, a HaCaT sejtekre továbbra is jellemzőek maradtak a normal human epidermális keratinociták (NHEK) működési sajátosságai, így a legtöbb funkcionális vonatkozásban a NHEK-k egyik legjobb modelljének tekinthetők (Fusenig and Boukamp 1998, Schoop et al. 1999).

A humán immortalizált HaCaT keratinocitákat 25 és 75 cm²-es szövettenyésztő edényben, 10% embrionális borjú szérummal (Sigma-Aldrich), 2 mM-os L-glutaminnal, 50 U/ml penicillinnel, 50 µg streptomycinnel, 1,25 µg/ml Fungizonnal (mindegyik TEVA-Biogaltól, Debrecen, Magyarország) kiegészített Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) tápoldatban tenyésztettük 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett. A PKC overexpresszor (illetve az „üres” vektorral transzfektált) keratinocitákat hasonló körülmények között, ugyanakkor (a folyamatos szelekció fenntartásának érdekében) 500 µg/ml geneticin antibiotikumot (Invitrogen, Paisley, Egyesült Királyság) tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük.

NHEK-k izolálása és tenyésztése

A humán bőrmintákat sebészeti beavatkozáson áteső, bőrgyógyászati szempontból egészséges donoroktól nyertük, akik bőrmintáik kutatási célú felhasználásához a megfelelő tájékoztatást követően írásos beleegyezésüket adták. A mintavétel és a felhasználás a Helsinki Deklarációnak megfelelően, az Debreceni Egyetem Kutatásetikai Bizottságának engedélyét követően (protokollszám: DE OEC RKEB/IKEB 3724-2012; ügyiratszám: IX-R-052/01396-2/2012) történt.

A NHEK-k izolálása során a dermo-epiteliális elválasztást 2,4 IU/ml diszpáz oldattal (Roche Diagnostics, Berlin, Németország) végeztük (egy éjszakán át 4°C-on), majd az epidermiszt rövid ideig (20 perc, 37°C) 0,05%-os tripszinnel (Sigma-Aldrich) emésztettük. Az így nyert NHEK sejteket 1 µM inzulinnal, 1 µM kortizollal (mindkettő a Sigma-Aldrichtól), 100 µg/ml streptomycinnel, 100 U/ml penicillinnel, 50ng/ml amphotericin B-vel, 0,4% borjú agyalapi mirigy kivonattal (mindegyik az Invitrogentől) és 0,06 mM CaCl₂-dal (Sigma-Aldrich) kiegészített szérummentes Epilife médiumban (Invitrogen) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett.

PKC-overexpresszor HaCaT sejtek létrehozása

A különböző PKC izoenzimeket stabilan overexpresszáló HaCaT keratinocitákat korábbi leírásnak megfelelően hoztuk létre. (Papp et al. 2004). A kísérletek transzfektált poolokból történtek, de minden izoformára vonatkozóan az eredményeket három különálló klónnal erősítettük meg. A rekombináns overexpresszió hatékonyságát Western blottal és kináz esszéivel ellenőriztük.

RNS interferencia (RNSi)

A sejteket 6-well-es szövettenyésztő plate-en szélesztettük szérumot tartalmazó, antibiotikum mentes DMEM tápoldatban. Ezt követően 40-50%-os konfluencia szinten Lipofectamin 2000 anionos detergens (Invitrogen) segítségével transzfektáltuk őket cPKC α , β , nPKC δ és ϵ elleni, scrambled (kontrollként) vagy fluoreszcein kötött kontroll kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal (mindegyik a Santa Cruz Biotech-től, Santa Cruz, CA, Egyesült Államok), melyeket előzőleg a transzfekciós reagenst tartalmazó transzfekciós médiummal (mindkettő a Santa Cruztól) kevertünk össze és szobahőmérsékleten 25 percig inkubáltunk. Az RNSi mediált géncsendesítés hatékonyságát Western blot és quantitative “real-time” PCR (Q-PCR) technikákkal négy napig naponta ellenőriztük.

Western blot

Western blot technikát alkalmaztunk az adhéziós molekulák kimutatására, a PKC izoformák RNS interferenciával történt lecsendítésének fehérje szintű ellenőrzésére, illetve a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal aktiválódásának igazolására. A sejteket jéghideg foszfát-pufferben (PBS) mostuk le, lízis pufferrel learattuk (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzenszulfonil-fluorid, 20 μ M leupeptin, pH 7,4, mindegyik a

Sigmától), majd jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Ezt követően a fehérjetartalmat módosított BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg. A lizátumokhoz nátrium-dodecil-szulfát mintapuffert (SDS-PAGE, 10 [V/V]% glicerin, 2 [V/V]% SDS, 62 mM Tris, 20 mM ditiotritol, 0,002 [V/V]% brómfenolkék és 5 [V/V]% β -merkaptoetanol; mind Sigma) adtunk, majd a fehérjék denaturálását 10 perces 100°C-on történő főzéssel végeztük. Az így elkészített mintákat SDS-PAGE gélelektroforézisnek vetettük alá (vályúként 20-30 μ g fehérjét vittünk fel 8%-os gélre), majd nitrocellulóz membránra (BioRad, Bécs, Ausztria és Whatman, Maidstone, Egyesült Királyság) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben blokkoltuk, majd az adott fehérje elleni primer monoklonális antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Az alkalmazott primer antitesteket a **2. táblázatban** soroltuk fel. Ezt követően a membránokat 30 percig PBST (1 [V/V] % Tween-20 (Sigma) tartalmú PBS oldat) oldatban mostuk. Másodlagos antitestként torma peroxidáz konjugált kecskében termeltetett nyúl és egér ellenes IgG antitestet (1:1000 hígításban, BioRad) használtunk, mellyel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat. Az immunreakciók eredményét ECL Western blot meghatározó kit (Amersham, Little Chalfont, Egyesült Királyság), illetve SuperSignal® West Pico Chemiluminescens Substrate kit (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével tettük láthatóvá. Az immunoblottok denzitometriás analízisét Intelligent Dark Box (Fuji, Tokyo, Japán) és Image Pro Plus 4.5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) segítségével végeztük (Griger et al. 2007, Papp et al. 2003). Ezt követően a több független kísérletből származó normalizált denzitometriás értékeket meghatároztuk és átlag $\pm$ SEM-ként fejeztük ki. Az egyenletes mintafelvitel igazolására membrán strippinget követően háztartási fehérjék elleni antitesttel végeztük el a folyamatot. Ennek során a membránokat 2% SDS-t és 0,1M β -merkaptoetanol tartalmazó 200 ml 50mM Tris-HCl pufferrel (pH 7,5) (mindegyik a Sigma-Aldrich-tól) kezeltük 65°C-on 1 órán át, majd háztartási fehérjék (β -aktin, citokróm C) ellenes monoklonális

antitestet alkalmaztunk. Az adhézións molekulák és az RNS interferencia ellenőrzésénél β -aktint (Sigma) és citokróm C-t (Santa Cruz), a MAPK útvonal aktiválásának igazolásánál β -aktint (Santa Cruz) alkalmaztunk. Ezután a korábbi módszer szerint vizualizáltuk az eredményt. A specificitás igazolására, amennyiben rendelkezésre állt, specifikus neutralizáló peptidet alkalmaztunk, egyéb esetekben elsődleges antitest nélkül végeztük a kísérleteket, melyek során immunfestés nem jött létre.

Cél fehérje	Faj	Hígítás	Gyártó
PKC α	nyúl	1:1000	Sigma-Aldrich
PKC β	nyúl	1:1000	Sigma-Aldrich
PKC δ	nyúl	1:200	Santa Cruz
PKC ϵ	nyúl	1:1000	Sigma-Aldrich
Dsg-1	egér	1:25	Progen (Heidelberg, Németország)
Dsg-3	nyúl	1:250	Serotec (Düsseldorf, Németország)
P-cad	egér	1:250	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, Egyesült államok)
Erk1/2	egér	1:500	Sigma-Aldrich
phospho-Erk1/2	egér	1:500	Sigma-Aldrich
Cytochrom C	egér	1:50	Santa Cruz
β -aktin	egér	1:1000	Sigma-Aldrich
β -aktin	egér	1:2000	Santa Cruz

2. táblázat *Western blot során alkalmazott elsődleges monoklonális antitestek*

Immuncitokémia

A NHEK-kon végzett immuncitokémiai vizsgálatok során a sejteket 24-well plate-re helyezett steril fedőlemezen szélesztettük és tenyésztettük, majd acetonnal fixáltuk. A membrán permeabilizálása 0,1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) oldattal történt. PBS oldattal történő

mosást követően az aspecifikus kötőhelyeket 5% borjú szérumból (BSA, Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk (30 percig, szobahőmérsékleten). Ezt követően a sejteket nyúlban termeltetett PKC α (1:200 hígításban, Sigma-Aldrich) és PKC δ (1:200 hígításban, Santa Cruz) ellenes elsődleges antitesttel egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. PBS-sel történő mosást követően fluoreszcein-izotiocianát (Maksoud et al.) konjugált másodlagos antitesttel (1:200 hígításban, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Egyesült Államok) kezeltük a sejteket 60 percig szobahőmérsékleten. PBS-sel történő mosás után a sejtmagokat DAPI festés (Vector Laboratories) segítségével tettük láthatóvá. A negatív kontrollok esetében az elsődleges antitestet kihagytuk a kísérlet során vagy blokkoló peptidet alkalmaztunk.

A PKC izoformák transzlokációjának kimutatására, mely utal azok aktivációjára, a fent leírt jelölés előtt a sejteket előzőleg különböző ideig 0,27% glicerollal vagy 0,45% xilitollal kezeltük. A fluoreszcens festést Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal (Oberkochen, Németország) tettük láthatóvá.

Kvantitatív “real-time” PCR (Q-PCR)

A PKC izoformák RNS interferenciával történt lecsendesítésének ellenőrzésére, a keratinocita differenciációs markerek és gyulladásos útvonalak aktiválódásának mRNS szintjének kimutatására Q-PCR technikát alkalmaztunk, melyet ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster city, CA, Egyesült Államok) géppel végeztük 5' nukleáz assay-t használva. A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk, majd 2-3 μ g teljes RNS cDNS-sé történő reverz transzkripcióját végeztük el 15 U AMV reverz transzkriptáz (Promega, Madison, WI, USA) és 0,025 μ g/ μ l random primer (Promega) felhasználásával. Az így nyert cDNS-ek PCR amplifikációját TaqMan Gene Expression Assay-k (Applied Biosystem) segítségével végeztük a TaqMan Universal PCR Master Mix Protokollt

követve. Belső kontrollként a β -aktint, illetve a ciklofilin A-t (Usai-Satta et al.) határoztuk meg. AtaqMan primerek és próbák azonosítóját a **3. táblázat** tartalmazza.

Cél gén	Azonosító
PKC α	Hs00176973_m1
PKC β	Hs00176998_m1
PKC δ	Hs00178914_m1
PKC ϵ	Hs00178455_m1
IL-1 α	Hs00174092_m1
IL-1 β	Hs00174097_m1
IL-6	Hs00985639_m1
IL-8	Hs00174103_m1
IL-18	Hs01038788_m1
MMP 1	Hs00899658_m1
MMP 9	Hs00234579_m1
TNF α	Hs00174128_m1
HLA-DR	Hs00219575_m1
FLG	Hs00856927_g1
LOR	Hs01894962_s1
IVL	Hs00846307_s1
OCL	Hs00170162_m1
β -aktin	Hs99999903_m1
PPIA	Hs99999904_m1

3. táblázat Q-PCR során alkalmazott primerek és próbák azonosítóikkal

Az életképesség és proliferáció vizsgálata MTT esszével

Az MTT-esszé alapja, hogy a sárga színű 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromidból (MTT, Sigma-Aldrich) a tetrazólium gyűrű mitokondriális dehidrogenázok általi hasítása révén lila színű formazán kristály keletkezik. A sejteket 96 lyukú

lemezekre szélesztettük 10.000 sejt/lyuk denzitásban, majd xilitol és glicerol különböző koncentrációival, különböző ideig kezeltük őket. Ezt követően a tenyésztő oldat eltávolítása után minden lyukba 100 µl, 0,5 mg/ml végkoncentrációjú PBS-ben oldott MTT oldatot pipettáztunk, majd 37°C-on 2 órán át inkubáltuk a sejteket. Az MTT oldat eltávolítását követően minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” (81 [V/V]% 2-propanol, 9 [V/V]% 1 M HCl, 10 [V/V]% Triton X-100; mindegyik Sigma-Aldrichtól) adtunk a formazán kristályok feloldására, majd tizenöt percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket közepesen intenzív rázatás mellett. A formazán kristályok koncentrációját kolorimetriás úton határoztuk meg 565 nm-en FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, az adatokat a kontroll százalékában, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg.

Az apoptózis vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legkorábbi markere. Kísérleteink során a mitokondriális membránpotenciál vizsgálatát a MitoProbe™ DilC₁(5) Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, Egyesült Államok) segítségével végeztük el (Dobrosi et al. 2008, Green and Reed 1998, Susin et al. 1998, Toth et al. 2011, Toth et al. 2009). A kísérlet során alkalmazott festék (1,1',3,3,3',3'-hexametil-indodikarbocianin-jodid; a továbbiakban „DilC₁ (5)”), a mitokondriális membránpotenciál függvényében halmozódik fel a sejtek mitokondriumaiban, ezért a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk. A NHEK-kat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekre (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany), majd xilitol és glicerol MTT assay-nél alkalmazott koncentrációival kezeltük őket ugyanazon ideig. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 1:200 arányban hígított DilC₁(5) munkareagenssel (50 µl/lyuk) 30 percig 37°C-on inkubáltuk. PBS-sel történő mosást követően

a fluoreszcencia intenzitást 630 nm-es hullámhosszon gerjesztve, 670 nm-en detektálva mértük FlexStation 3 Fluorescence Image MicroPlate Reader készülék (FLIPR; Molecular Devices, San Francisco, CA, Egyesült Államok) segítségével. Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcenciát a kezeletlen kontroll százalékában, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg.

A nekrozis vizsgálata

A különféle anyagok sejtnekrózist okozó hatását fluoreszcens SYTOX Green (Life Technologies) jelöléssel végeztük. A festék csak a nagymértékben sérült plazma-, illetve magmembránon keresztül képes átjutni és a sejtmagban a duplaszálú DNS-hez kötődni. Az ép plazmamembránnal rendelkező, azaz élő sejtekbe nem képes bejutni. A festék zöld fluoreszcencia intenzitásából a tenyészetben lévő citotoxikus folyamatokra következtethetünk. A sejteket 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekre (Greiner Bio One) szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd a poliolokkal kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után 1 μM végkoncentrációjú SYTOX Green (Life Technologies) reagenssel (50 μl /lyuk) 30 percig, 37°C-on inkubáltuk a sejteket. PBS-sel történő mosást követően FlexStation 3 készülék (Molecular Devices) segítségével 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett. Minden kezelést négy ismétléssel végeztünk, a relatív fluoreszcencia intenzitást a kezeletlen kontroll százalékában, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg.

Az SYTOX Green, illetve a $\text{DiI}_1(5)$ festékeket egyszerre adtuk a munkaooldathoz, így a folyamatokat egyszerre tudtuk vizsgálni ugyanabban a mintában (Geczy et al. 2012).

A sejtek intracelluláris kalcium koncentrációjának ($[Ca^{2+}]_i$) meghatározása Ca^{2+} -imaging technikával

A NHEK-kban létrejövő, poliolo okozta esetleges $[Ca^{2+}]_i$ változást fluorimetriás Ca^{2+} -imaging technikával vizsgáltuk. A kísérletek során Fluo-4 AM jelölést használtunk. A Fluo-4 egy Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festék, ami a hozzákapcsolt „AM” (acetoxi-metilészter) csoportnak köszönhetően képes bejutni a sejtekbe, ahol nem-specifikus észterázok lehasítják az „AM” részt, csapdába ejtve ezzel a Fluo-4-et a sejt belsejében. A Fluo-4-nek szabad kalcium ion jelenlétében jelentősen megnő a fluoreszcencia intenzitása, amit a mérés során detektálhatunk. A vizsgálat során a sejteket 10.000 sejt/lyuk sűrűségben 96-lyukú „black well/clear bottom” lemezekre (Greiner Bio One) szélesztettük. A mérés napján háromszori Hank oldatos (1% BSA, 2,5 mM Probenecid, 136,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,81 mM $MgSO_4$, 1,26 mM $CaCl_2$, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM $NaHCO_3$, pH 7,2, mindegyik Sigma-Aldrichtól) mosást követően a sejteket tápoldatban oldott 2 μ M Fluo-4 AM (Invitrogen) festékkel 40 percig 37°C-on inkubáltuk. Ismételt mosás után 1% borjú szérum albumin (BSA) és a nem-specifikus transzporterek gátlására 2,5 mM Probenecid (mindkettő Sigma-Aldrichtól) tartalmú Hank oldatban tartottuk a sejteket 30 percig, 37°C-on. A Fluo-4 AM-rel feltöltött sejtek $[Ca^{2+}]_i$ változását FLIPR (Molecular Devices) készülékkel mértük 494 nm gerjesztési és 516 nm emissziós hullámhosszokon. A kinetikai mérések közben a műszerbe épített pipettorfej segítségével automatikusan adagoltuk a sejtekhez a kezelőanyagokat. Pozitív kontrollként 180 μ M ATP tartalmú oldatot, negatív kontrollként kalcium mentes Hank oldatot alkalmaztunk.

Statisztikai analízis

Az adatokat az IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc., Armonk, NY, USA), illetve Origin Pro Plus 6.0 szoftver (Microcal) segítségével, kétoldali, kétmintás *t*-próbával vizsgáltuk, és a $P < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények

I. A PKC izoenzimek hatása az adhéziós molekulák kifejeződésére humán epidermális HaCaT keratinocitákon

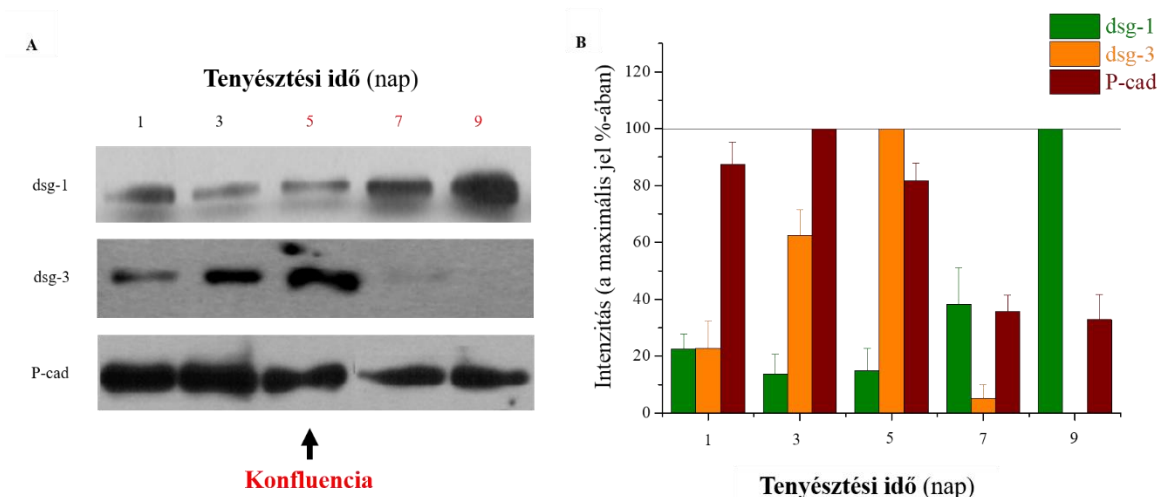
Az adhéziós molekulák kifejeződése HaCaT keratinociták sejtdenzitás-indukálta differenciáltsági állapotának függvényében

Laboratóriumunkban korábban kimutattuk (Papp et al. 2003), hogy ha a HaCaT keratinociták eléri a konfluencia állapotát (vagyis benövik a tenyésztőedényt), a nagy sejtdenzitás következtében beindul differenciálódási programjuk. Ezért először azt vizsgáltuk, hogy az adhéziós molekulák kifejeződése változik-e a konfluencia függvényében. Kísérleteink során a sejteket 9 napon keresztül tenyésztettük; a sejteket 1., 3., 5., 7. és 9. napon összegyűjtöttük, majd az adhéziós molekulákra nézve Western blotot végeztünk, illetve denzitometriával kvantitatívan is meghatároztuk a kapott eredményeket. A sejtek a 100%-os konfluenciát az 5. tenyésztési napon érték el (6. ábra).

Megállapítottuk, hogy a különböző adhéziós molekulák kifejeződése eltérő módon változott. A *dsg-1* a szubkonfluens (vagyis még a proliferáció fázisában lévő) sejteken kevésbé volt megtalálható, mint a nagy sejtdenzitást elért, azaz differenciálódó keratinocitákon. Ezzel ellentétes módon a *dsg-3* expressziója a proliferáció fázisában volt magas (1-5. napok között), míg a posztkonfluens kultúrákban gyakorlatilag nem volt detektálható. A *P-cad* kifejeződése is ehhez hasonlóan alakult; a molekula szintje a proliferáló sejtekben emelkedett volt, míg a differenciálódókban alacsony (6. ábra).

Mindezen eredmények összhangban vannak azzal a kifejeződési mintázattal, amely a *dsg-1*, *-3* és *P-cad* molekulák vonatkozásában *in vivo* az epidermisz rétegeiben megfigyelhető. Azaz, ahogyan korábban már említettük, a *dsg-3* és *P-cad* a nagyobb proliferációs aktivitással jellemezhető *Str. basale* és az alsó spinosus rétegekben, míg a *dsg-1* inkább a differenciáltabb

*Str. granulosum*ban fejeződik ki (Arnemann et al. 1993, Furukawa et al. 1994). Ez alapján megállapítható, hogy a HaCaT keratinociták jól használhatóak az adhéziós molekulák kifejeződésének *in vitro* vizsgálatára.



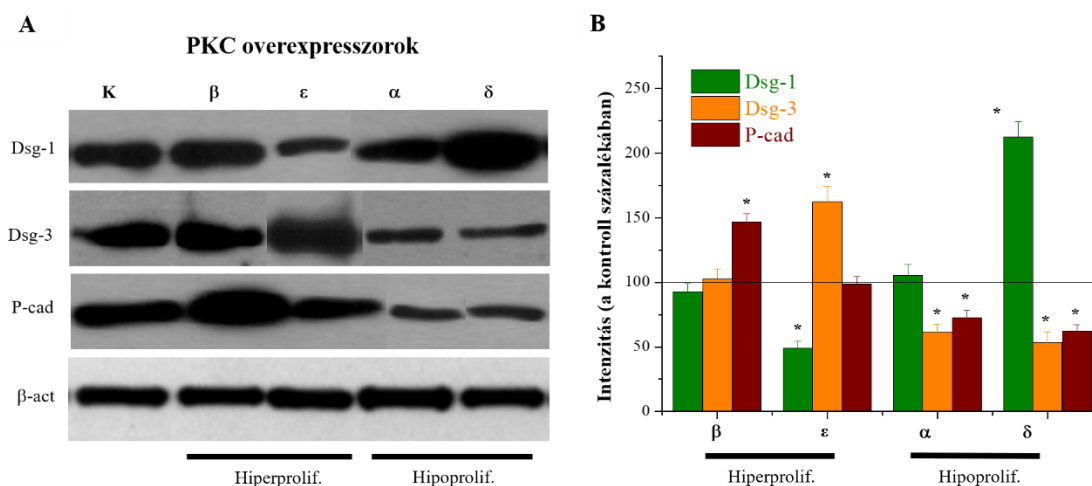
6. ábra Az adhéziós molekulák expressziójának változása a tenyésztési napok függvényében

(A) Az 1., 3., 5., 7. és 9. tenyésztési napon összegyűjtött HaCaT sejteken, adhéziós molekulák (dsg-1, dsg-3, P-cad) elleni specifikus antitestek felhasználásával végzett Western blot eredménye. 4-5 egymástól független kísérletet végeztünk el, melyek azonos eredményt mutattak. **(B)** A Western blot során kapott immunjelek denzitometriás analízise során nyert értékek, melyet a β -aktinra normalizáltunk, majd az eredményeket százalékban adtuk meg. Az adott kísérletben legerősebb jel intenzitását vettük 100 %-nak.

Az adhéziós molekulák kifejeződése különféle PKC izoformákat stabilan túltermelő HaCaT keratinocitákban

Laboratóriumunkban korábban már kimutattuk, hogy a PKC izoenzimek rekombináns overexpressziója szignifikáns mértékben befolyásolja a HaCaT keratinociták *in vitro* és *in vivo* proliferációját és differenciálódását. A cPKC α és nPKC δ túltermelése csökkentette a sejtproliferációt, míg a differenciálódási markerek (involukrin, filaggrin, transzglutamináz-1) kifejeződését fokozta. Ezzel ellentétben, a cPKC β és nPKC ϵ esetében fokozott proliferációt és a differenciálódás csökkenését észlelték (Papp et al. 2004).

Jelen kísérleteinkben a három adhéziós molekula kifejeződését elemeztük a PKC overexpresszor HaCaT keratinocitákon. Ehhez azonos (kb. 80-85 %-os) konfluenciánál összegyűjtött, hasonló proliferációs és differenciálódási stádiumban lévő sejteken Western blot analízist végeztünk (7. ábra).



7. ábra Az adhéziós molekulák expressziója a különféle PKC izoformákat túltermelő HaCaT keratinocitákban izoforma specifikus módon változik

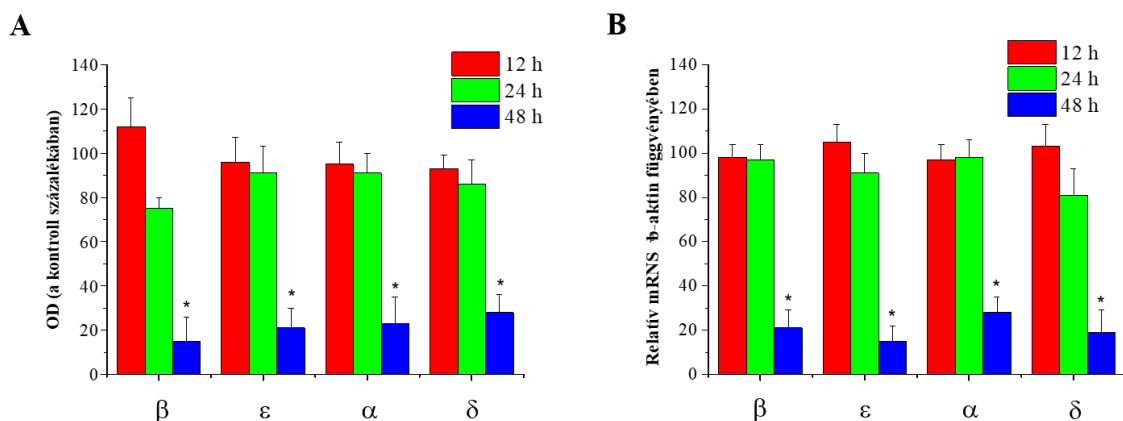
(A) Az egyes PKC izoenzymeiket stabilan overexpresszáló vagy a kontroll (K) esetén üres vektort tartalmazó sejteket összegyűjtöttük, majd specifikus antitestek felhasználásával Western blotot készítettünk az adhéziós molekulák kimutatására. (B) A Western blot során kapott immunjelek denzitometriás analízise során kapott értékeket β-aktinra normalizáltuk, majd az értékeket százalékban adtuk meg, ahol a kontroll („üres” vektorral transzfektált) sejtek vizsgálatakor kapott jel intenzitását vettük 100 %-nak. Az ábrán 5-6 független kísérlet átlag±SEM értékeit tüntettük fel. A * szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelöl a kontrollhoz viszonyítva.

Azt találtuk, hogy a dsg-1 kifejeződése a differenciálódást indukáló PKCδ overexpressziójakor szignifikánsan növekedett, míg a hiperproliferatív PKCε overexpressziója jelentősen csökkentette ezen adhéziós molekula expresszióját (a hipoproliiferatív PKCα és a hiperproliferatív PKCβ nem változtatta meg a dsg-1 kifejeződését). Az epidermisz alsóbb (proliferáló) rétegeiben *in vivo* elhelyezkedő dsg-3 (a vártnak megfelelően) a differenciálódást fokozó PKCα-t és δ-t overexpresszáló keratinocitákban szignifikánsan alacsony, míg a

proliferációt serkentő PKC ϵ -t túltermelő sejtekben szignifikánsan magas expressziós szintet mutatott (a PKC β esetében nem volt különbség a kontrollhoz képest). A dsg-3-hoz hasonló *in vivo* eloszlást mutató P-cad szignifikánsan fokozottan fejeződött ki a hiperproliferatív PKC β -t túltermelő sejtekben, míg a hipoproliferatív PKC α és δ overexpressziója szignifikánsan csökkentette expresszióját (az ugyancsak hiperproliferatív PKC ϵ izoenzim túltermeltetése nem befolyásolta a P-cad kifejeződését).

Az adhézións molekulák kifejeződése HaCaT keratinocitákban RNS-interferencia segítségével szelektíven csökkentett PKC expresszió esetén

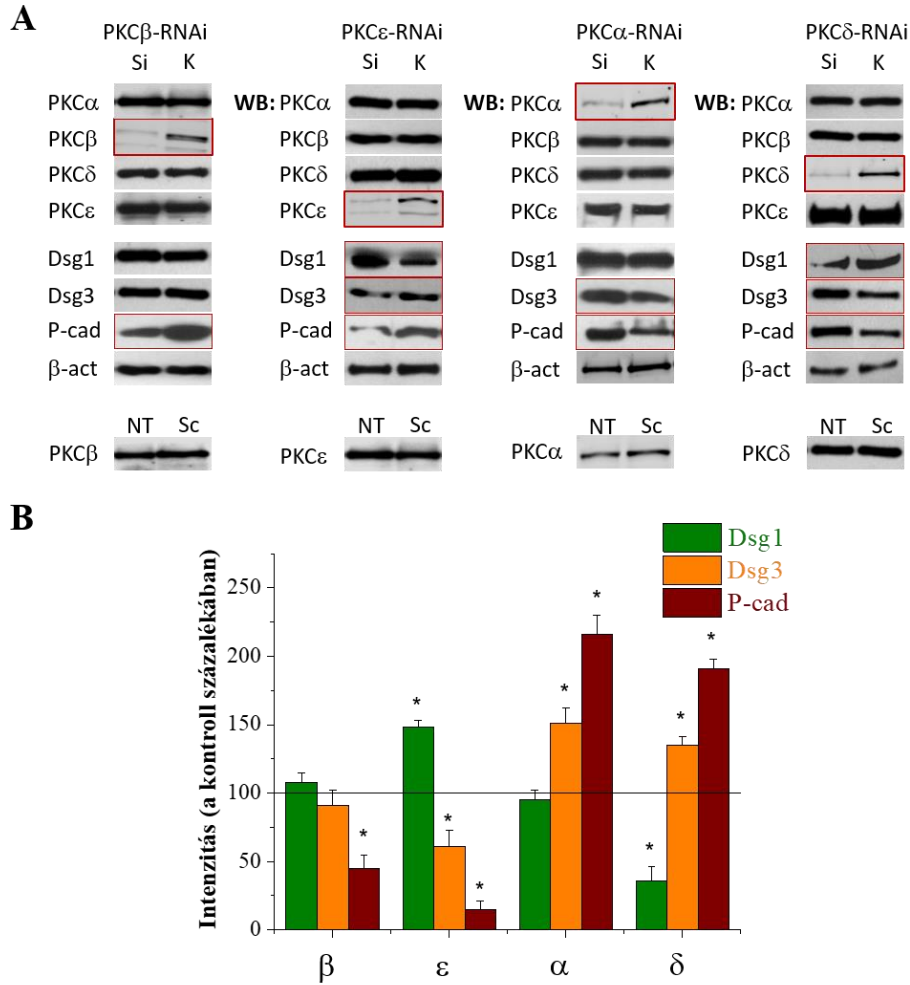
Kísérleteink következő lépéseként RNSi technika (Griger et al. 2007) alkalmazásával vizsgáltuk egyes PKC izoformák szelektív down-regulációját követően az adhézións molekulák kifejeződésében bekövetkező változásokat. Az RNSi beavatkozás hatékonyságának ellenőrzése céljából Q-PCR-t, Western blotot, illetve annak denzitometriás analízisét végeztük el (**8. ábra**). Megállapítottuk, hogy RNSi transzfekciót követően 48 órával szignifikáns mértékben csökkent valamennyi „célzott” PKC izoforma szintje (scrambled RNS-t tartalmazó minták kb. 20%-ára). Tekintettel arra, hogy nem tapasztaltunk mérhető változást sem a többi („nem támadott”) PKC izoforma, sem a vizsgált β -aktin kifejeződésében; valamint a scrambled RNS-ek sem befolyásolták az endogén izoenzimek kifejeződését, a beavatkozás szelektívnek bizonyult. További vizsgálataink során ezért 48 óráig kezelt mintákat használtunk.



8. ábra RNSi transzekció hatékonyságának időfüggése fehérje és mRNA szinten

(A) Transzekciót követően 12, 24 és 48 óra múlva adott PKC izoformák irányában végzett Western blot immunjeleinek denzitometriás analízise során nyert optikai denzitás β -aktinra normalizált értékei, melyet a kontroll (scrambled) százalékában adtuk meg. **(B)** Ezzel párhuzamosan Q-PCR technika segítségével kimutatott PKC izoformák mRNA β -aktinra normalizálva, a scrambled kontroll százalékában megadva. A * szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelöl a kontrollhoz viszonyítva.

A PKC overexpresszió esetében kapott eredményekhez képest ugyanazon PKC izoformák szelektív down-regulációja ellentétes módon változtatta meg az adhézións molekulák kifejeződését (**9. ábra**). A *dsg-1* kifejeződése szignifikáns módon fokozódott a hiperproliferatív PKC β , míg szignifikánsan csökkent a differenciálódást fokozó PKC δ downregulációja esetén (a PKC α és a β szintjének csökkentése nem okozott érdemi változást). A *dsg-3* vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a differenciálódást indukáló PKC α és δ szintjének molekuláris csökkentése szignifikáns mértékben fokozta, míg a proliferációért felelős PKC ϵ down-regulációja szignifikánsan csökkentette a szintjét (az ugyancsak hiperproliferatív hatású PKC β szintjének módosítása nem befolyásolta a *dsg-3* expresszióját). A legdrámaibb változást a P-cad vizsgálatakor tapasztaltuk. Megállapítottuk, hogy a keratinociták differenciálódását fokozó PKC α és δ kifejeződésének csökkentése szignifikáns mértékben megnövelte, míg a hiperproliferatív PKC β és ϵ down-regulációja szignifikáns mértékben lecsökkentette a P-cad expresszióját.



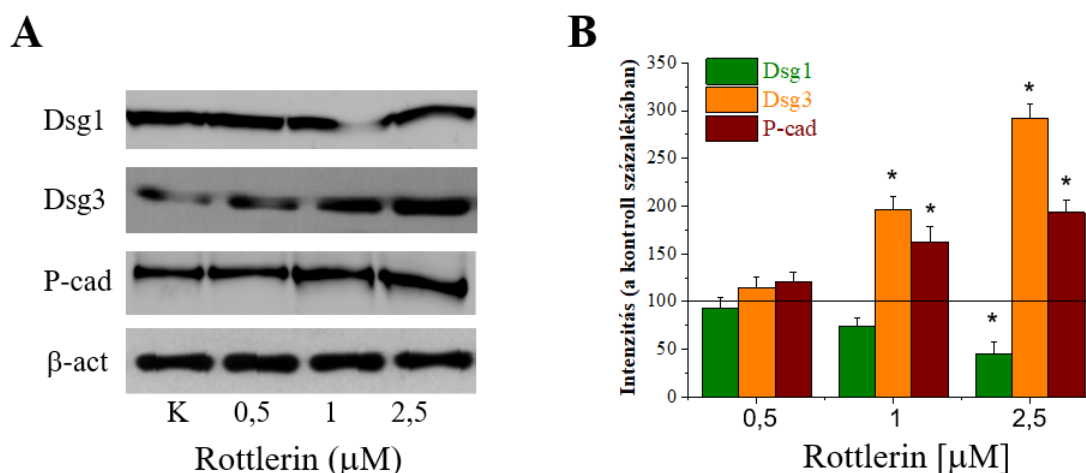
9. ábra Az adhézións molekulák kifejeződése RNSi technikával szelektíven down-regulált PKC izoenzimek esetén HaCaT keratinocitákban

(A) RNSi (si) technikával “géncsendesített” sejteken (transzfekciót követő 48 óra múlva) végzett Western blot a PKC izoformák, a különféle adhézións molekulák, valamint a β -aktin, mint endogén kontroll kifejeződésének kimutatására, mely 5-6 hasonló eredményt adó kísérlet egyikét mutatja, piros keretben a változásokat kiemelve. **(B)** A Western blot során kapott immunjelek denzitometriás analízisének eredménye β -aktinra normalizálva a kontroll (scrambled RNSi próbát tartalmazó) százaléklékában megadva (kontroll=100%). Az ábrán 6 független kísérlet átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettük fel. A * szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket.

A szelektív PKC δ inhibitor rottlerin hatása az adhézións molekulák kifejeződésére HaCaT keratinocitákban

A fenti eredményeket más módszerekkel is megerősítendő farmakológiai módszerekkel folytattuk vizsgálatainkat. Mivel kereskedelmi forgalomban csak a PKC δ -nak van specifikus

gátlószere (a többi izoforma specifikusnak vélt gátlószéréről ugyanis kiderült, hogy egyéb enzimeket is gátolnak, (Alessi 1997), így farmakológiai kísérleteinkben a rottlerint alkalmaztuk (Gschwendt et al. 1994), mely 5 μ M koncentráció alatt képes a PKC δ szelektív gátlására.



10. ábra A PKC δ gátlószér rottlerin hatása az adhéziós molekulák expressziójára

(A) 0,5, 1 és 2,5 μ M koncentrációjú rottlerinrel (2 napig, naponta) történt kezelést követően, az adhéziós molekulák elleni specifikus antitestek felhasználásával Western blotot készítettünk. A kísérleteket 4-5 ismétléssel végeztük el, melyek hasonló eredményt adtak. **(B)** A kapott immunjelek denzitometriás analizisével nyert értékeket β -aktinra normalizáltuk, majd a kontroll (kezeletlen) százalékában adtuk meg (kontroll=100%). Az ábrán 4-5 független kísérlet átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettük fel. A * szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelöl a kontrollhoz viszonyítva.

A kontroll HaCaT sejteket 2 napon keresztül naponta 0,5, 1 és 2,5 μ M koncentrációjú rottlerint tartalmazó oldattal kezeltük, majd western blot technikával vizsgáltuk az adhéziós molekulák szintjét (**10. ábra**). Megállapítottuk, hogy a rottlerin dózisfüggő módon szignifikáns mértékben lecsökkentette a dsg-1, míg fokozta a dsg-3 és P-cad expresszióját (a kezeletlen kontrollhoz képest). Ezen eredményeink megerősítették a PKC δ overexpresszor, illetve a PKC δ -specifikus RNSi transzfektált keratinociták vizsgálatokor kapott eredményeket.

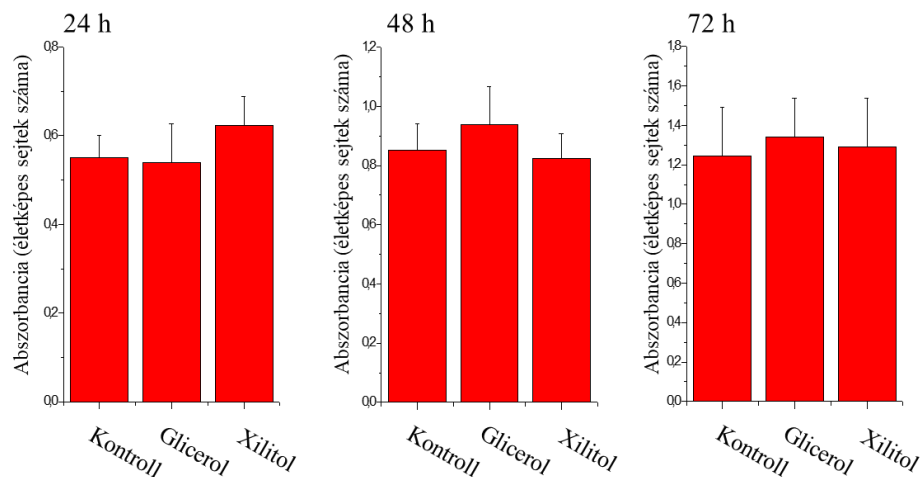
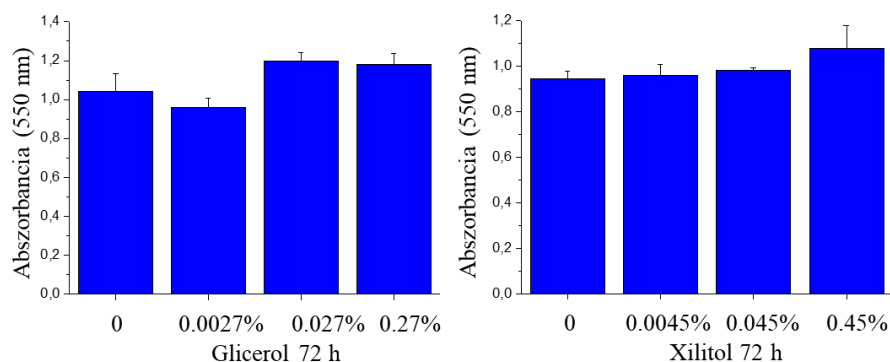
II. A glicerol és xilitol hatása a barrier kialakulásában szerepet játszó mechanizmusokra és jelátviteli folyamatokra normal humán epidermális keratinocitákon (NHEK)

A poliolok nem befolyásolják az NHEK-k proliferációját és életképességét

Kísérleteinkben elsőként azt vizsgáltuk, hogy hatással vannak-e a poliolok (glicerol, xilitol) a tenyésztett NHEK-k növekedésére és túlélésére. A 60-70 %-os konfluencián növekvő NHEK-kat (prekonfluens, vagyis proliferáló) 0,0027-0,27%-os glicerollal, illetve 0,0045-0,45%-os xilitollal (azonos ozmolaritás mellett) kezeltünk 24, 48 és 72 órán keresztül, majd az életképes sejtek arányát kolorimetriás MTT assay-vel határoztuk meg (**11. ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy egyik poliol sem okozott mérhető koncentráció vagy időfüggő csökkenést a sejtek életképességében. Mivel további DilC₁(5) és Sytox Green festéssel is ki tudtuk zárni az anyagok apoptózist vagy nekrozist okozó hatását (nincs bemutatva), ezt követő kísérleteinkben a legmagasabb koncentrációkat (0,27% glicerol, 0,45% xilitol) alkalmaztuk.

A xilitol és glicerol hatása a keratinocitákban expresszáladó differenciálódási és barrier markerek kifejeződésére

Ezt követően különböző differenciáltsági állapotú (konfluenciájú) sejtenyészetekben vizsgáltuk a poliolok hatását azon molekulák (filaggrin, involucrin, lorikrin, okkludin) expressziójára, melyek központi szerepet játszanak az epidermális keratinociták differenciációjában, így az epidermális barrier kialakításában (Papp et al. 2004, Papp et al. 2003).

A**B**

11. ábra A poliolok nem befolyásolják a NHEK-k proliferációját

Prekonfluens (vagyis proliferáló) NHEK sejtkultúrát 0,0027, 0,027, 0,27%-os glicerollal és 0,0045, 0,045, 0,45%-os xilitollal kezeltünk 24, 48 és 72 órán keresztül, majd MTT esszé segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességét és növekedési ütemét. Az adatokat átlag $\pm$ SEM értékben tüntettük fel. Három kísérletsorozat azonos eredményeket mutatott. Kimutattuk, hogy a vizsgált anyagok sem idő- (a legnagyobb koncentrációt alkalmazva) **(A)**, sem dóziszfüggő **(B)** módon nem befolyásolják az epidermális keratinociták életképességét és proliferációját.

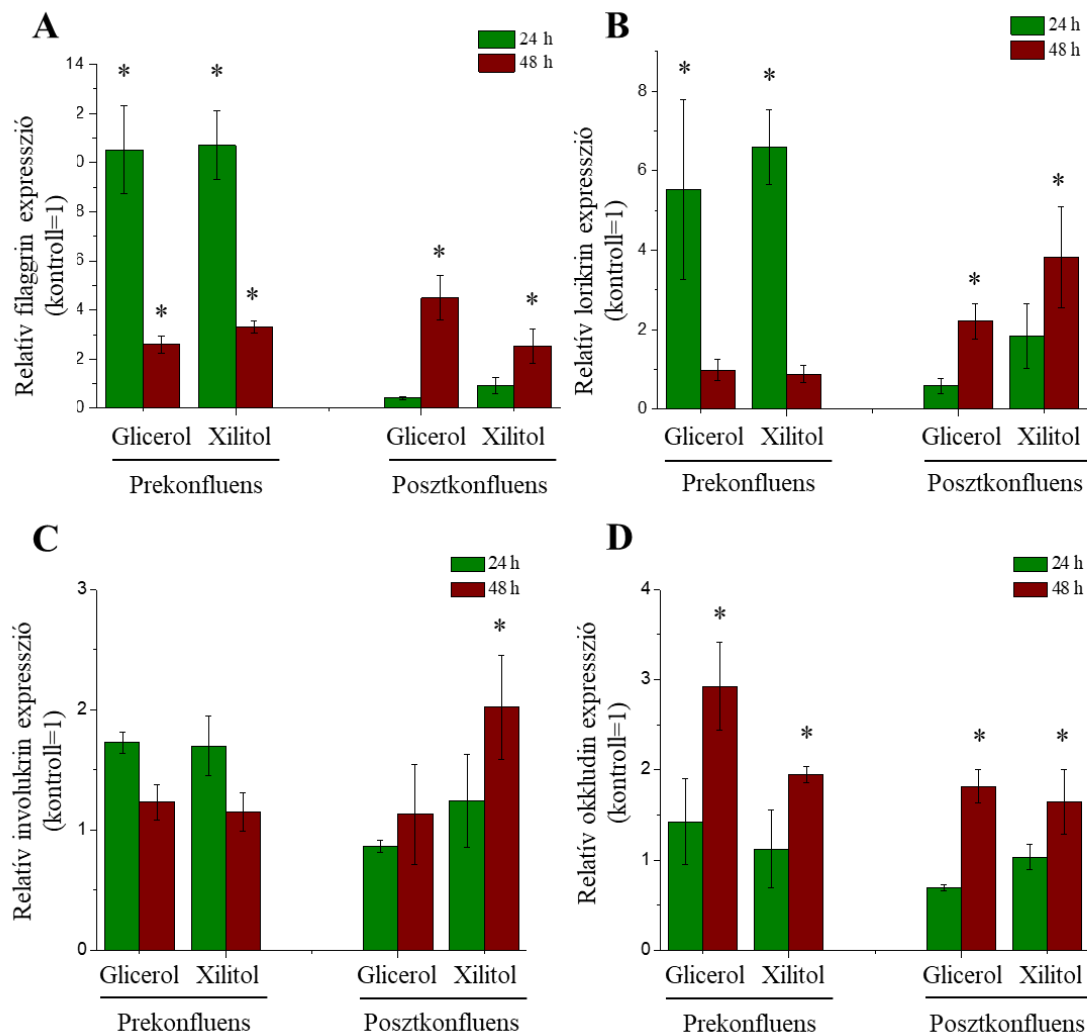
Mivel ismert, hogy a NHEK-k differenciálódási programja a konfluencia elérését követően automatikusan beindul (nagy sejtdenzitás indukálta differenciálódás) (Czifra et al. 2012, Olah et al. 2012), ezért először prekonfluens NHEK sejtkultúrán Q-PCR technikával vizsgáltuk a poliolok hatását (**12. ábra**). A keratinocita differenciálódási markereket vizsgálva

megállapítottuk, hogy mind a glicerol, mind a xilitol jelentős és szignifikáns mértékben megnövelte a filaggrin mRNS szintű expresszióját 24 és 48 órás kezelést követően egyaránt, valamint szignifikáns mértékben fokozta a lorikrin szintjét 24 óra elteltével (az involukrin esetében csak tendenciózus növekményt mértünk a 24 órás mintákban).

A posztkonfluens, vagyis már differenciálódó sejt kultúrákban vizsgálva a két poliol hatását, azt tapasztaltuk, hogy 48 óra eltelte után a glicerol szignifikáns mértékben fokozta a filaggrin és lorikrin kifejeződését (de nem volt hatással az involukrin szintjére). Ehhez hasonló hatást mutatott a másik poliol, de a filaggrin és lorikrin kifejeződésének szignifikáns növelése mellett a xilitol az involukrin expresszióját is szignifikáns mértékben fokozta 48 órás kezelést követően (**12. ábra**).

A fenti markerek mellett vizsgáltuk a tight junction-ök felépítésében szerepet játszó okkludin kifejeződését is, mely az epidermális barrier kialakulásának és fenntartásának egyik kulcsmolekulája (Fuchs 1990). Megállapítottuk, hogy mindkét poliol szignifikáns mértékben fokozta az okkludin kifejeződését 48 órás kezelést követően a pre- és posztkonfluens sejt kultúrákban egyaránt (**12. ábra**).

Mindezen adatok azt sugallják, hogy a poliolok – az epidermális keratinociták differenciálódásának fokozása révén – pozitív hatással rendelkeznek a barrier felépítésére és/vagy helyreállítására vonatkozóan.

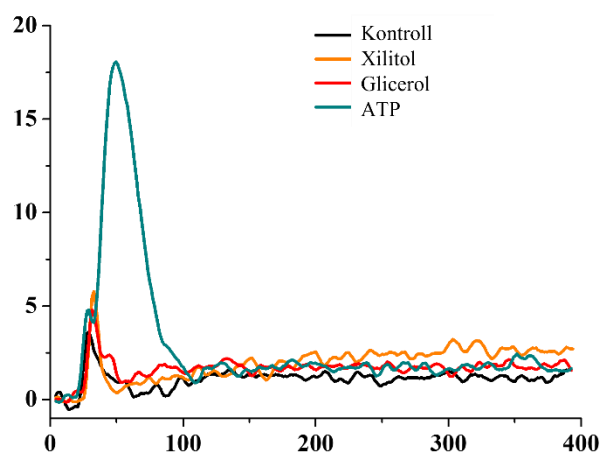


12. ábra. A glicerol és xilitol különböző módon befolyásolja a keratinocita differenciálódási és barrier markerek kifejeződését.

Prekonfluens (vagyis proliferáló) és posztkonfluens (vagyis differenciálódó) NHEK-kat 0,27%-os glicerol oldattal and 0,45%-os xilitol oldattal kezeltünk 24, illetve 48 órán át. Ezt követően Q-PCR technika segítségével vizsgáltuk a filaggrin **(A)**, lorikrin **(B)**, involucrin **(C)** és okkludin **(D)** mRNS expresszióját. Az adatokat $\Delta\Delta CT$ módszerrel kalkulálva, PPIA-ra és kezeletlen kontrollra normalizálva adtuk meg, ahol a kontroll értéke 1. Az eredmények három különböző meghatározás átlag $\pm$ SD értékét mutatják. Két teljesen különböző kísérlet azonos eredményeket mutatott. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ (*-gal jelölve) értékeket tekintettük.

A polioloak nem befolyásolják az NHEK-k intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját

Tekintettel arra, hogy a keratinociták proliferációs és differenciálódási folyamatainak szabályozásában igen jelentős szerepe van a kalciumnak, kísérleteink következő részében Ca^{2+} -imaging technika alkalmazásával vizsgáltuk, hogy a polioloaknak van-e hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra (**13. ábra**). Megállapítottuk, hogy egyik poliol sem befolyásolja a Ca^{2+} koncentrációt, vagyis hatásukat valamilyen más jelátviteli útvonalon fejtik ki.

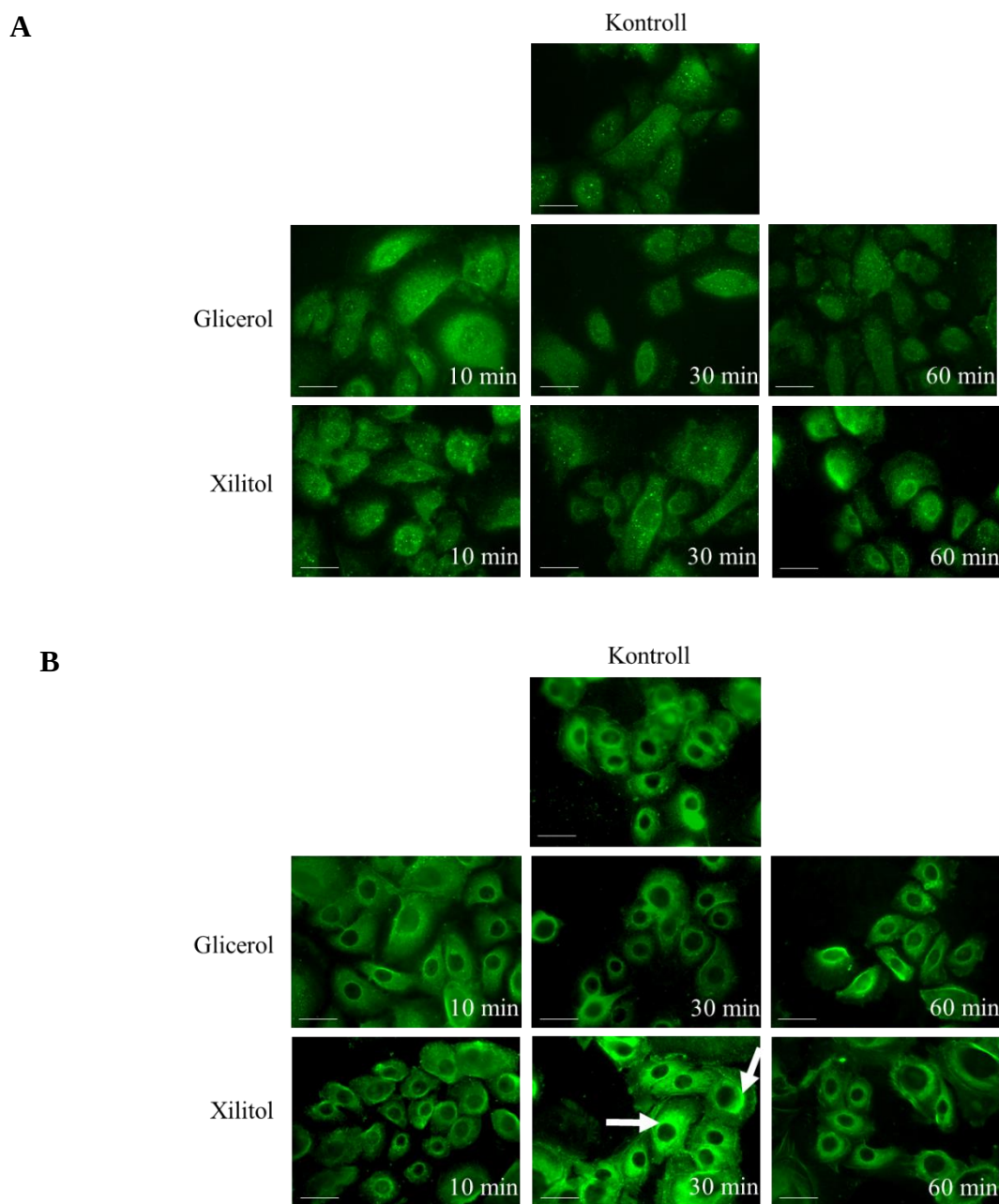


13. ábra. A polioloak nem növelik a keratinociták intracelluláris kalciumkoncentrációját. Fluorimetriás Ca^{2+} imaging technika alkalmazásával, Fluo-4 AM festéket használva a glicerol (0,27%) és xilitol (0,45%) hatására nem alakul ki intracelluláris kalciumkoncentráció változása keratinocitákban. Pozitív kontrollként ATP-t (180 μM) használtunk, a fluoreszcenciát (melyet relatív fluoreszcencia egységben adtunk meg) az alapvonalra normáltuk. Két elvégzett kísérlet azonos eredményt adott.

A polioloak hatása különböző jelátviteli folyamatokra

Amint korábban részleteztük, a PKC izoenzimek központi szerepet játszanak a keratinociták életfolyamatainak szabályozásában. Laboratóriumunk korábban kimutatta, hogy a PKC α és δ izoformák aktivitásának megnövelése fokozza a humán keratinociták differenciálódását (Gschwendt et al. 1994); ezért megvizsgáltuk azt is, hogy a polioloak hasonló hatásában részt vesznek-e ezen izoformák. Mivel (ahogy fent részleteztük) a PKC enzimek aktiválódásuk során megváltoztatják szubcelluláris lokalizációjukat (azaz pl. a citoplazmából a

magmembránba transzlokálódnak), ezért konfokális mikroszkóp alkalmazásával tanulmányoztuk a poliolo hatását a PKC α és δ sejten belüli elhelyezkedésére.

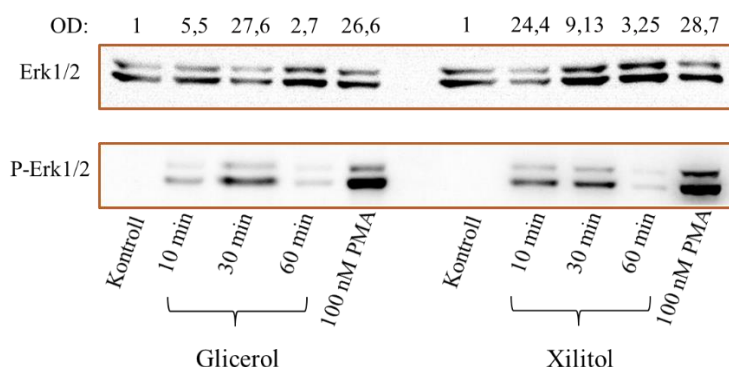


14. ábra A xilitol a PKC δ szeletív transzlokációját váltja ki NHEK-on

NHEK-kat glicerollal (0,27%) és xilitollal (0,45%) 10, 30 és 60 percen keresztül kezeltünk, majd a PKC α -t (**A**) és a PKC δ -t (**B**) fluoreszcens festékekkel megjelölve konfokális mikroszkóp segítségével (“z-stack” módban, második kép a fedőlemez szintjétől) határoztuk meg az izoenzim szubcelluláris lokalizációját. A PKC α esetében nem észleltünk változást a kezelések hatására, míg a PKC δ esetében xilitol hatására transzlokáció volt kimutatható (nyilakkal jelezve). Lépték: 10 μ m. Két különböző kísérlet azonos eredményt mutatott.

Megállapítottuk, hogy a poliolok nem változtatták meg a PKC α szubcelluláris lokalizációját (**14/A. ábra**). Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy a xilitol (a glicerollal ellentétben) a PKC δ transzlokációját okozta (**14/B. ábra**), mely az enzim aktivációjára utal.

A MAPK rendszer, hasonlóan a PKC rendszerhez, számos keratinocita funkció központi szabályozó eleme (Eckert et al. 2002). Ezért azt is vizsgáltuk, hogy befolyásolják-e a poliolok a MAPK jelátviteli útvonal aktivitását. Western blot technika alkalmazásával azt találtuk, hogy mindkét általunk vizsgált poliol a MAPK kaskád aktivációját váltotta ki, amit az Erk1/2 (p42/44) MAPK tranziens foszforilációja jelzett (**15. ábra**).



15. ábra Mindkét poliol aktiválja a MAPK-Erk jelátviteli útvonalat NHEK-on
NHEK-kat glicerollal (0,27%) és xilitollal (0,45%) 10, 30 és 60 percen keresztül kezeltünk, majd Western blot technika alkalmazásával vizsgáltuk az Erk1/2a – foszfo-Erk1/2 átalakulást, melyek a 42 kDa/44 kDa-nak megfelelő sávban voltak kimutathatók. Pozitív kontrollként PMA-t használtuk. Két kísérlet hasonló eredményt mutatott.

Ezen kísérletes eredményeink azt sugallják, hogy a glicerol és a xilitol feltehetően különböző hatásmechanizmussal befolyásolják az epidermális keratinociták differenciálódását.

A poliolok hatása a gyulladásos mediátorok termelődésére és kifejeződésére

A barrier és bőr integritás szempontjából szintén fontos tényező a gyulladásban szerepet játszó fehérjék aktivációja, termelődése. Ezért különböző gyulladás modellekben vizsgáltuk, hogy a xilitol és glicerol hogyan változtatja meg mRNS szinten az inflammatorikus citokinek

(IL-ek, TNF α , matrix metalloproteázok, MMP) expresszióját a keratinocitákban. A NHEK-kat a toll-like receptor (TLR) útvonal aktivátoraival kezeltük (O'Neill et al. 2013); az LTA a TLR-2 útvonalat aktiváló Gram pozitív bakteriális endotoxin; a poly-IC a TLR-3 irányában ható, vírusfertőzésnek megfelelő aktivációt indukál; míg a TLR-4 aktivációhoz LPS-t használtunk, ami egy Gram negatív bakteriális endotoxin. Vizsgáltuk ezen anyagok hatását különböző gyulladásos mediátorok (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-8, TNF- α , MMP1 és MMP9) mRNS szintű expressziójára. Elemeztük továbbá, hogy változik-e HLA-DR expresszió, melyről leírták, hogy szerepet játszik a keratinociták immun aktivációjában, a gyulladásban és TLR jelátvitelben (Farthing et al. 1992, Travers et al. 1999) **(4/A-I. táblázat)**. A HLA-DR expresszió vizsgálatokor enyhe donorfüggést tapasztaltunk; látható volt ugyanakkor egy tendencia, hogy a poliolok képesek voltak meggátolni a TLR-indukált HLA-DR expresszió-fokozódást azon esetekben, amikor az útvonal aktiválható volt. A xilitol esetében ez a hatás szignifikánsnak bizonyult. **(4/A. táblázat)**. Bár némi donor dependencia az IL-1 α és IL-1 β által közvetített TLR upreguláció esetében is megfigyelhető volt, összességében mind a xilitol, mind a glicerol szignifikánsan csökkentette ezen IL-k kifejeződését **(4/B-C. táblázat)**. Az IL-6 és IL-18 esetében a poliolok kevésbé bizonyultak hatékonynak, illetve az IL-8 TLR-mediált kifejeződését is csak kismértékben csökkentették **(4/D-F. táblázat)**. A xilitol azonban meglehetősen effektívnek bizonyult a poly-IC indukálta TNF- α upreguláció kivédésében **(4/G. táblázat)**. MMP1 és MMP9 esetében azt tapasztaltuk, hogy TLR aktivációra adott válasz kevésbé volt kifejezett, de mindkét poliol (főként a xilitol) hatására szignifikáns módon csökkent a TLR-indukált MMP9 expresszió **(4/H-I. táblázat)**.

4/A	HLA-DRA								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
Kontroll	1	1	1	U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	1.00
LPS	NI	NI	NI	U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	NI
LPS+Gly				U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	
LPS+Xyl				U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	
LTA	NI	1.76	NI	U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	NI
LTA+Gly		1.04#		U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	
LTA+Xyl		1.05#		U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	
pIC	NI	8.38	2.86	U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	NI
pIC+Gly		3.76#	1.05#	U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	
pIC+Xyl		1.59*	2.00#	U/I	U/I	U/I	U/I	U/I	

4/A. táblázat Poliolok hatása a HLA-DRA kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5$ x up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/B	IL-1 α								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LPS	2.71	NI	NI	NI	1.63	NI	NI	NI	NI
LPS+Gly	2.38				1.66				
LPS+Xyl	1.15*				1.62				
LTA	3.19	NI	2.10	NI	1.68	1.99	NI	1.64	NI
LTA+Gly	3.17		2.13		1.66	1.64*		1.94*	
LTA+Xyl	1.66*		1.47*		1.57	1.76*		1.57	
pIC	1.86	3.37	1.92	NI	1.88	NI	2.01	1.98	1.93
pIC+Gly	1.32*	3.59	1.33*		1.26*		2.05	2.19*	1.58*
pIC+Xyl	1.27*	2.40#	1.45*		1.53#		1.97	2.24	2.79*

4/B. táblázat Poliolok hatása az IL-1 α kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5x$ up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/C	IL-1 β								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LPS	6.91	NI	NI	NI	1.75	NI	NI	NI	NI
LPS+Gly	7.62#				1.84				
LPS+Xyl	2.41*				1.78				
LTA	8.88	1.59	3.17	NI	1.93	NI	2.36	1.55	1.58
LTA+Gly	10.74#	1.86#	3.32		1.83		2.14	1.56	1.49
LTA+Xyl	3.74*	2.14#	3.62		1.75*		1.81*	1.37*	1.52
pIC	4.21	13.44	4.57	NI	2.78	NI	1.86	2.32	2.59
pIC+Gly	2.90*	16.49#	4.37		1.11*		1.50*	2.17	1.75*
pIC+Xyl	0.78*	9.06*	3.83*		2.33*		2.70*	1.83*	3.72*

4/C. táblázat Poliolok hatása az IL-1 β kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5$ x up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/D	IL-6								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	1.00	N/D	1	1	1	1	1	1	1
LPS		N/D		2.72	1.67				2.42
LPS+Gly	NI	N/D	NI	2.11#	2.10*	NI	NI	NI	1.88#
LPS+Xyl		N/D		2.25#	1.14*				1.36#
LTA	1.86	N/D							
LTA+Gly	0.90#	N/D	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
LTA+Xyl	1.69	N/D							
pIC	2.00	N/D	11.88	18.19	115.45		7.51	44.43	14.55
pIC+Gly	1.18#	N/D	70.92*	10.17#	177.28*	NI	13.13#	48.56#	5.82*
pIC+Xyl	2.17	N/D	12.75	13.70#	62.09*		6.31#	41.87#	13.26#

4/D. táblázat Poliolok hatása az IL-6 kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5x$ up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/E	IL-8								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	1	N/D	1	1	1	1	1	1	1
LPS	NI	N/D	1.82	4.71	1.84	NI	4.25	NI	NI
LPS+Gly		N/D	0.87*	5.55#	2.74*		2.54*		
LPS+Xyl		N/D	6.22#	6.63#	2.47*		3.54*		
LTA	NI	N/D	7.37	1.80	NI	NI	3.59	2.15	NI
LTA+Gly		N/D	38.32*	1.96			3.04*	2.99#	
LTA+Xyl		N/D	54.10*	1.44			4.09*	2.31*	
pIC	NI	N/D	241.40	4.51	8.96	1.77	22.09	33.03	12.64
pIC+Gly		N/D	790.02*	4.02	12.18*	1.94	41.58*	41.71*	13.46#
pIC+Xyl		N/D	531.63*	8.91*	12.65*	2.14#	31.57*	49.23*	16.00*

4/E. táblázat Poliolok hatása az IL-8 kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5x$ up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/F	IL-18								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LPS	11.81	NI	1.52	NI	NI	NI	NI	NI	3.91
LPS+Gly	9.50#		1.72						2.70#
LPS+Xyl	4.22*		2.44#						1.79#
LTA	5.32	NI	1.55	NI	NI	NI	2.54	NI	1.54
LTA+Gly	12.19*		1.63				2.42		1.58
LTA+Xyl	3.82#		2.39#				1.96*		2.18#
pIC	3.08	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
pIC+Gly	3.74								
pIC+Xyl	1.30#								

4/F. táblázat Poliolok hatása az IL-18 kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5x$ up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/G	TNF- α								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
Ctrl	N/D	1	1	N/D	N/D	1	1	1	1
LPS	N/D	NI	NI	N/D	N/D	NI	3.12	1.67	NI
LPS+Gly	N/D			N/D	N/D		1.77*	1.22*	
LPS+Xyl	N/D			N/D	N/D		2.20#	1.64	
LTA	N/D	NI	NI	N/D	N/D	NI	1.58	1.65	NI
LTA+Gly	N/D			N/D	N/D		1.28*	1.79	
LTA+Xyl	N/D			N/D	N/D		1.74	1.99*	
pIC	N/D	24.65	14.49	N/D	N/D	1.87	10.87	33.39	12.26
pIC+Gly	N/D	21.88#	11.44#	N/D	N/D	1.71	10.48	35.28	6.36*
pIC+Xyl	N/D	8.86*	6.37*	N/D	N/D	0.78*	11.92#	25.37*	16.46*

4/G. táblázat Poliolok hatása a TNF- α kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5x$ up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/H	MMP1								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	N/D	1	1	N/D	N/D	1	1	1	1
LPS	N/D	NI	NI	N/D	N/D	NI	NI	NI	NI
LPS+Gly	N/D			N/D	N/D				
LPS+Xyl	N/D			N/D	N/D				
LTA	N/D	1.73	5.72	N/D	N/D	NI	1.79	NI	1.52
LTA+Gly	N/D	1.67	4.97#	N/D	N/D		1.08*		1.05*
LTA+Xyl	N/D	4.18*	7.72#	N/D	N/D		1.83		1.52
pIC	N/D	3.13	1.59	N/D	N/D	NI	NI	NI	NI
pIC+Gly	N/D	2.85	1.22#	N/D	N/D				
pIC+Xyl	N/D	3.75#	2.26#	N/D	N/D				

4/H. táblázat Poliolok hatása az MMP1 kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5$ x up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

4/I	MMP9								
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 4	Donor 5	Donor 6	Donor 7	Donor 8	Donor 9
ctrl	N/D	1	1	N/D	N/D	1	1	1	1
LPS	N/D	NI	NI	N/D	N/D	NI	NI	NI	NI
LPS+Gly	N/D			N/D	N/D				
LPS+Xyl	N/D			N/D	N/D				
LTA	N/D	NI	NI	N/D	N/D	NI	1.93	NI	NI
LTA+Gly	N/D			N/D	N/D		0.64*		
LTA+Xyl	N/D			N/D	N/D		1.16*		
pIC	N/D	102.69	23.16	N/D	N/D	NI	NI	NI	1.57
pIC+Gly	N/D	149.50*	13.47*	N/D	N/D				0.96*
pIC+Xyl	N/D	29.45*	9.22*	N/D	N/D				2.33*

4/I. táblázat Poliolok hatása az MMP9 kifejeződésére

9 donortól származó keratinocita tenyészetet különböző TLR aktivátorokkal (LTA, mint TLR2; poly-IC-pIC, mint TLR3; LPS, mint TLR4 aktivátor) kezeltünk, majd 0,27%-os glicerol és 0,45%-os xilitol oldatot adtunk a sejtekhez. Ezt követően Q-PCR segítségével megmértük a HLA-DRA mRNS expresszióját, a $\Delta\Delta CT$ módszert használva. A táblázatban feltüntetett adatokat a PPIA, mint belső kontrollra normalizálva, a saját kontrollt (csak LTA, pIC vagy LPS kezelt) 1-nek véve tüntettük fel. Minden kísérletet háromszor végeztünk el. **Szín kód:** zöld betű, zöld háttér és *: szignifikáns expresszió csökkenés ($P < 0,05$), fekete betű, sárga háttér és #: down-regulációra utaló tendencia (nem szignifikáns), piros betű, fehér háttér és #: up-regulációra utaló tendencia, piros betű, piros háttér és *: szignifikáns ($P < 0,05$) up-reguláció, N/D: nem mérhető, U/I: nem azonosítható, nem indukálható (NI): $\leq 1,5x$ up-reguláció észlelhető az aktivátorral kezelt csoportban a kezeletlenhez képest.

Megbeszélés

Bőrünk a legnagyobb szervünk, melynek legfontosabb feladata, hogy megvédje szervezetünket a fizikai, kémiai hatásoktól és kórokozóktól. Ahhoz, hogy ez megvalósuljon, számos jól összehangolt mechanizmus alakult ki, melynek pillérei maguk a keratinociták, az immunsejtek, illetve a bőrt kolonizáló mikroorganizmusok. A keratinociták mind az epidermiszt felépítő szerkezetükkel, mind immunológiai tulajdonságaikkal részt vesznek a védekező folyamatokban. Az epidermisz jellegzetes négy rétegében a sejtek a bazális membrán felett elhelyezkedő osztódó sejtektől felfelé haladva számos differenciációs folyamat révén jutnak el az elszarusodó, legfelső rétegig. A differenciálódási folyamat során megváltozik a sejtek struktúrája, a sejt-sejt kapcsolatok, illetve számos, a mechanikai és kémiai behatások ellen védő, az epidermiszen keresztüli vízvesztést gátló, a pH fenntartásában szerepet játszó anyag termelődik ("cornified envelop"). Mindemellett közvetlen immunológiai funkciókkal is rendelkeznek, hiszen felszínükön expresszálnak számos az immunrendszert aktiváló fehérjét (PRR-k), illetve antimikrobiális peptideket (pl. β -defenzin, pszoriazin, RNáz 7), kemokineket, citokineket (pl. IL-1, 6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$) termelnek.

A bőr barrier fenntartása céljából az epidermiszben különböző kompenzációs és regenerációs folyamatok játszódnak le. Attól függően, hogy a barrier melyik komponensében jön létre károsodás, különböző folyamatok indulnak be, úgymint keratinocita proliferáció, zsír és fehérje termelés. Tartósan fennálló károsodás azonban felboríthatja az egyensúlyt és a folyamatok kontrollálatlanná válnak, létrehozva ezzel a különböző barrierkárosodással járó betegségek jellegzetes tüneteit, mint a keratinocita hiperproliferáció, bőrszárazság, hámlás, viszketés vagy eritéma. Ezek a betegségek az esztétikai problémák mellett súlyos, akár életet veszélyeztető állapotokat hozhatnak létre, ezért is fontos patogenezisük minél részletesebb megismerése, hiszen célzott, oki kezelésre csak így van mód. Fontos továbbá, hogy amennyiben

lehetséges, megelőzzük vagy minél korábbi stádiumban, még az enyhébb eltérések idejében megakadályozzuk, illetve visszafordítsuk a folyamatokat.

Jelen munkában ismertetett kísérleteink során feltérképeztük a fizikai barrier kialakításában fontos adhézios molekulák kifejeződését befolyásoló jelátviteli folyamatok közül a PKC izoenzimsalád hatását, illetve a barrier helyreállításban ismerten szerepet játszó xilitol és glicerol jótékony fizikai-kémiai hatása (vízmegkötő képesség) mellett feltételezhető jelátvitelt befolyásoló szerepét.

A PKC rendszer adhézios molekulák szabályozásában betöltött szerepe

Az epidermisz sejtjei közötti kapcsoló apparátusok feladata az epidermisz struktúrális integritásának fenntartása, másrészt fizikai akadályt is képeznek a külső ágensek ellen. Kísérleteink során ezen apparátusok közé tartozó dezmoszómákat alkotó fehérjéket vizsgáltuk, a dezoglein-1-et (dsg-1), dezoglein-3-at (dsg-3) és a P-kadherint (P-cad). Ismert a dsg-1 és 3-ról, hogy differenciációtól függően különböző epidermális sejtrétegben helyezkednek el. A dsg-1 a felsőbb, differenciáltabb rétegekben, míg a dsg-3 az alsóbb, differenciálatlanabb rétegekben expresszálódik nagyobb mértékben (Arnemann et al. 1993, Garrod et al. 1996, Garrod 1993, Garrod et al. 2002, Legan et al. 1994) (**2. ábra**). Ezen molekulák az autoimmun hólyagos bőrbetegségek közé tartozó *pemphigus vulgaris* és *foliaceus* patogenezisében játszanak szerepet, ugyanis az ellenük termelődő antitestek hozzájárulnak a típusos hólyagok kialakulásához (Amagai 1996, Amagai et al. 2006, Amagai et al. 1996). Egy másik fontos kapcsoló apparátus az adherens junction, melyek kadherinekből épülnek fel (Yap et al. 1997). Vizsgálataink középpontjában ezek közül is a P-cad állt, mely a bazális és szuprabazális rétegben fordul elő gyakrabban (Mahoney et al. 2006, Mege et al. 2006). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy ezen adhézios molekulákat számos, a differenciációra is hatással bíró folyamat befolyásolhatja (Denning et al. 2000, Denning et al. 1998a, Hennings et al. 1980, Lewis et al. 1994). A mi

érdeklődésünk középpontjában ezek közül a jelátviteli rendszerek közül a PKC rendszer állt, melyről ismert a differenciálódást és proliferációt szabályozó hatása, illetve, hogy az egyes izoformák egymással ellentétes hatással rendelkeznek (Papp et al. 2003).

Az adhéziós molekulák és PKC rendszer kapcsolatát vizsgáló kísérleteink során első célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk az adhéziós molekulák *in vivo* körülmények között észlelhető jellegzetes, differenciáció függő eloszlása sejtenyészetben is megfigyelhető-e, vagyis a differenciáltabb sejtek a dsg-1-et, míg a proliferálók dsg-3-at és P-cad-t fejeznek-e ki nagyobb mértékben. Ismert a keratinociták azon tulajdonsága, hogy tenyésztésük során, amikor elérik a konfluencia állapotát a magas sejtdenzitás okozta gátlás révén proliferációjuk csökken és sejtfolyamataik a differenciálódás irányába változnak (Pillai et al. 1990, Hohl et al. 1991, Poumay and Pittelkow 1995). Így azonos sejtdenzitással széleszett HaCaT keratinocita tenyészeteket különböző tenyésztési napokon (1., 3., 5., 7., 9. nap) “learattunk” és Western blot segítségével vizsgáltuk az adhéziós molekulák fehérje szintű kifejeződését. Azt tapasztaltuk, hogy a prekonfluens (1., 3., 5. nap) mintákban a dsg-3 és P-cad expresszió szignifikánsan magasabb volt a dsg-1-hez képest, míg ezzel ellentétesen, a konfluencia elérését követően (7., 9. nap) a differenciáció fázisában lévő sejtekben a dsg-1 fejeződött ki jelentős mértékben, míg a másik két adhéziós molekula kevésbé (6. ábra). Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy *in vivo* az epidermiszben lévő körülmények jól korellálnak *in vitro* a különböző tenyésztési napokon vizsgált sejtkultúrákkal az adhéziós molekulák kifejeződésének tekintetében.

Munkahipotézisünk szerint, ha van a PKC rendszernek szabályozó szerepe a sejtkapcsoló fehérjékre, akkor azok fokozott vagy éppen csökkent expressziója/működésének gátlása megváltoztatja az adhéziós molekulák kifejeződését is. Ezért következő kísérletsorozatunkban a PKC izoenzimek adhéziós molekulákra gyakorolt szabályozó hatását kívántuk tanulmányozni overexpresszálo és RNS interferenciával lecsendesített PKC

izoformákat tartalmazó HaCaT sejtek, illetve a PKC δ specifikus gátlószereként ismert rottlerin alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a differenciálódást elősegítő nPKC δ (Denning et al. 1998b, Papp et al. 2004, Papp et al. 2003) a differenciálódási markernek tekinthető *dsg-1* expresszióját fokozta, míg a proliferáló sejteken inkább megtalálható *dsg-3* és P-cad szintézisét csökkentette az overexpresszálo sejteken, míg eredményeink mind a specifikus gátlószer és a géncsendesített sejt kultúrák esetén ezzel ellentétesek voltak. Ezzel szemben cPKC α nem volt hatással a *dsg-1* kifejeződésére, mely alapján feltételezhető, hogy bár mindkét izoforma a differenciálódásban játszik szerepet, különböző módon befolyásolják az adhéziós molekulák kifejeződését. A keratinocita proliferációt szabályozó nPKC ϵ és cPKC β (Papp et al. 2004) hatásáról elmondhatjuk, hogy az előbbi a *dsg-1* expresszióját csökkentette, a *dsg-3* és P-cad-ét növelte, míg az utóbbi izoenzim csak a P-cad kifejeződésére volt hatással, azaz fokozta azt. Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy érdekes módon a *dsg-1* expressziójának szabályozásában kalcium független PKC izoenzimek (nPKC δ és ϵ) vesznek részt. Emellett ismert, hogy a kalcium fokozza a *dsg-1* kifejeződését (Denning et al. 1998a) és a keratinocita differenciálódást, mely valószínűleg nem közvetlenül a kalcium dependens PKC-k aktivációján keresztül valósul meg. A *dsg-3* szabályozásában úgy tűnik szintén a kalcium independens nPKC-k vesznek részt, de emellett a cPKC α -nak is van hatása, melyet támogat Osada és mtsainak eredménye, mely szerint *pemphigus vulgaris*-ban szenvedő betegekből izolált *dsg-3* elleni autoantitest a cPKC α és nPKC δ aktivációját okozta (Osada et al. 1997). A P-cad-t mind a klasszikus és novel PKC párok (cPKC α /nPKC δ és cPKC β /nPKC ϵ) befolyásolhatják, egymással ellentétes módon (7-9. és 10. ábra).

Az irodalomban több adat található arról, hogy a PKC rendszernek szerepe van a dezmoszómák kialakulásában, azonban eddig nem volt ismert, hogy az egyes PKC izoenzimek külön-külön hogyan befolyásolják azt. Kimura és mtsai kimutatták, hogy az (izoforma függő) PKC aktiváció/gátlás megváltoztatja a kalcium-independens, hiper-adhezív dezmoszómák

kialakulását, mely ezáltal mechanikai hatásra ellenállóbb epidermiszt tesz lehetővé (Kimura et al. 2007). Irodalmi adatok alapján a *pemphigus vulgaris*-IgG (PV-IgG) hatására több PKC izoforma (PKC α és δ) is aktiválódik (Osada et al. 1997). Emellett Sanchez-Carpintero és mtsai a PKC gátló biszindolilmaleimid alkalmazásával meg tudták akadályozni a *pemphigus vulgaris* IgG okozta hólyagképződést újszülött egerekben. (Sanchez-Carpintero et al. 2004). Leírták, hogy a PKC gátlása stabilizálja a dezmoszómában a dsg-3-at, illetve gátlószerek (Gö-6976: cPKC inhibitor, Safingol: cPKC α inhibitor) hatására a PV-IgG dsg-3-at elimináló hatása kivédhető volt (Spindler et al. 2011). Emellett az is ismert, hogy a dezmoplakin foszforilációjában a PKC α -nak szerepe van (Kroger et al. 2013), hiszen az izoforma gátlása stabilizálja a dezmoszómát, valamint gátolja annak szétbomlását. Saját eredményeink alapján a PKC izoenzimek attól függően, hogy melyik izoformáról beszélünk vannak hatással a dsg-3 kifejeződésére; az irodalomban ugyanakkor nem lelhető fel olyan közlemény, mely izoforma függően vizsgálta volna hatásukat. Más jelátviteli útvonalak patofiziológiai szerepe is ismert *pemphigus vulgaris*-ban, úgymint a p38MAPK, GTPáz családba tartozó Rho, a c-myc és a foszfolipáz C szignalizáció (Sharma et al. 2007, Spindler and Waschke 2018), ugyanakkor ezek pontos szerepe még tisztázásra vár. Egu és mtsai a dsg-1 kifejeződését és a hólyagképződést vizsgálták PKC és Erk útvonal szabályozó hatásának tekintetében PV-IgG jelenlétében. A PKC nem szelektív gátlószert (Bim-X) alkalmazva nem észleltek változást sem a hólyagképződés megakadályozásában, sem a dsg-1 depléciójának csökkentésében, míg az Erk gátlásával sikerült ezeket az eltéréseket csökkenteni (Egu et al. 2019). A PKC útvonal aktiválásának sikertelensége hátterében felmerül, hogy a nem szelektív PKC inhibitor egymással ellentétes hatású PKC izoenzimet gátolt, melynek eredményeként “nettó hatástalanságot” tapasztalhattak. Izoforma specifikus hatást csak a PKC α esetében vizsgáltak, míg a többi izoenzimiről nincs adat, mely a szabályozó folyamatok felderítése céljából elengedhetetlen lenne. Eredményeink

jó alapot adhatnak további olyan kutatásoknak, melyek az *in vivo* talált összefüggések alapján a klinikumban használható terápiás lehetőségek kifejlesztésére irányulnak.

Poliolok hatása keratinocita életfolyamatokat szabályozó jelátviteli útvonalakra

A poliolok olyan cukoralkohol molekulák, melyek több hirdoxilcsoportot tartalmaznak. A glicerol (glicerin) számos gyógyászatban használt készítményben megtalálható. Ismert antimikrobiális hatása, melyet sebek kezelésénél használnak ki hidrogél tartalmú kötésekként formájában (Stout and McKessor 2012). Vízmegkötő tulajdonsága miatt hidratálóként kozmetikumokban, bőrgyógyászati externákban használt, édes íze miatt szirupok alkotóeleme, hiperozmotikus tulajdonsága révén végbélkúp formájában laxatívumként alkalmazható. Nem ennyire elterjedt még az alkalmazása a másik, érdeklődésünk középpontjában lévő poliólnak, a xilitolnak. Legtöbbünknek a xilitol hallatán cukorhelyettesítőként történő alkalmazása jut eszébe. Emellett azonban terjed bőrgyógyászati alkalmazása is elsősorban hidratáló krémek alkotóelemeként (pl. Aquaxyl, Xylinep). Számos kutatás történt a glicerol és xilitol keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Kimutatták, hogy fiziko-kémiai hatásuk révén a barrier diszfunkció helyreállításában játszanak szerepet (Fluhr et al. 2008). Egér modellben igazolták, hogy a nátrium-lauril-szulfát irritáns, gyulladáskeltő hatását ki tudták védeni, melyet a TEWL csökkenése, IL-1 β és TNF- α mRNS szintű csökkenése, fehérvérsejtek infiltrációjának csökkenése, valamint az epidermisz vastagságának megtartása igazolt (Szel et al. 2015). Más munkacsoportok AQP3 knock down egereken vizsgálták a glicerol hatását az epidermális barrierre. Az aquaporin 3 víz/glicerol transzporterként ismert az epidermiszben. Hara és mtsai az találták, hogy ezekben az egerekben a topikális, illetve orálisan alkalmazott glicerol javította a SC hidráltságát, a TEWL csökkent. (Hara and Verkman 2003). Ugyanezen hatás nem volt kimutatható egyéb poliolok (xilitol, eritritol, propanediol) alkalmazása esetén. Mások ugyanilyen egér modellben a bél áteresztő képességének fokozódását, intesztinális

epiteliális sejteken a claudin-1 és okkludin expressziójának csökkenését találták, mely alapján feltételezték a glicerol barrier szabályozó szerepét (Zhang et al. 2011). Humán kutatások is történtek a két poliol együttes alkalmazására. Két hét topikális alkalmazás után megvizsgálva a bőr különböző hidráltsági és morfológiai paramétereit (*Str. corneum* vastagság, TEWL, érdesség, epidermisz vastagság, dermális papilla echogenitás), illetve a filaggrin jelenlétét az epidermiszben megállapították, hogy a fenti paraméterek a két anyag együttes topikális alkalmazása esetén jelentős javulást mutattak (Korponyai et al. 2017). Ismert, hogy az irritatív kontakt dermatitis és száraz bőr szindrómákban patogenetikai szereppel bíró ozmotikus stressz hatására a keratinociták gyulladásos mediátorokat termelnek (Terunuma et al. 2001). Igazolódott, hogy mind a xilitol, mind glicerol ezt a gyulladásos választ képes csökkenteni (Szel et al. 2019). Kimutatták továbbá, hogy xilitol és farnezol tartalmú krém együttes alkalmazása *atópiás dermatitis*ben szendvedő betegekben csökkentette az AD-ben patogenetikai szereppel bíró *S. aureus* kolonizációt, emellett csökkentette a TEWL mértékét, illetve fokozta a SC hidráltságát mutató konduktanciát (Katsuyama et al. 2005).

Kevésbé ismert azonban, hogy ezek a hatások milyen jelátviteli folyamatokon keresztül valósulnak meg. Kísérleteink során elsőként igazoltuk, hogy a két poliol nem befolyásolja a keratinocita életfolyamatokat az általunk alkalmazott dózisokban (0,27% glicerol, 0,45% xilitol) (**11. ábra**). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a NHEK-on bizonyos differenciálódási markerek (filaggrin, lorikrin, okkludin) mRNS szintű kifejeződése fokozódik proliferáló és differenciálódó kultúrákban egyaránt (**12. ábra**). Ismert, hogy a kalcium differenciációt szabályozó szereppel bír, azonban a glicerol és xilitol ezt a hatást nem az intracelluláris kalcium koncentráció fokozásával érte el (**13. ábra**). Annak kiderítése érdekében, hogy a differenciálódási markerek expressziójának fokozódása hogyan jöhetett létre, egyéb jelátviteli útvonalakat vizsgáltunk meg, mint a MAPK/Erk és PKC útvonalakat, melyekről szintén kimutatták proliferáció-differenciálódást szabályozó szerepét (Gazel et al. 2008, Harmon et al.

2013). Azt tapasztaltuk, hogy hatásukra aktiválódik a MAPK/Erk útvonal (**15. ábra**), illetve a xilitol PKC δ aktivációt eredményez (**14/B. ábra**). Ezen eredményünk összefüggést mutat azzal, hogy a kalcium-dependens PKC α -ra nem volt hatása az általunk vizsgált anyagoknak (**14/A. ábra**). Adataink emellett azt is sugallják, hogy a keratinocita differenciációban igazoltan szerepet játszó PKC δ szignalizáción keresztül alakulhat ki a hatás (Lee et al. 1997). Igazoltuk továbbá, hogy a xilitol és glicerol különböző anti-inflammatorikus hatással is rendelkezik. Mindkét anyag képes volt az immunaktivációban jelentős HLA-DR (Farthing et al. 1992, Travers et al. 1999) up-regulációjának kivédésére a TLR2 és 3 útvonalak stimulációja során. Kimutattuk, hogy míg a glicerol főként a TLR3 útvonalat befolyásolja, addig a xitolnak mindhárom (TLR2, 3, 4) gyulladás modellben volt hatása a citokinek kifejeződésére (**4. táblázat**). Azt azonban szükséges megjegyeznünk, hogy a hatás jelentős donorfüggést mutatott, illetve, hogy az általunk tapasztalt a mRNS szintű változásokat további, fehérje szintű vizsgálatokkal kell kiegészíteni, illetve validálni.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a két anyag együttes lokális alkalmazása a hidratálás mellett, a keratinocita differenciálódásra és a gyulladás csökkentésére is hatással van, melyet további humán klinikai vizsgálatok erősíthetnek meg a későbbiekben.

Összefoglalás

Bőrünk integritása nélkülözhetetlen a környezetünkben lévő ágensek elleni védekezésben. Az integritás fenntartásának egyik fontos tényezőjét jelentik a sejtkapcsoló apparátusok, melyeket alkotó fehérjék *in vivo* különböző eloszlást mutatnak az epidermisz rétegeiben, vagyis a differenciáltsági állapottól függően. Az adhézións molekulák közül a *pemphigus vulgaris* és *foliaceus* patogenezisében szerepet játszó dsg-1, 3 és P-cad expresszióját befolyásoló tényezőket vizsgáltuk. Annak fényében, hogy a PKC izoenzim család szabályozó funkciót lát el a sejtek proliferációjában és differenciálódásában és ezen szabályozó funkció jól vizsgálható a humán epidermális HaCaT keratinocita sejtvonalban, logikusnak tűnt az egyes PKC izoenzimek hatásának vizsgálata az adhézións molekulák kifejeződésére, melyet overexpresszió, RNS interferencia és gátlószer, a rottlerin alkalmazásával végeztük.

	cPKC α	nPKC δ	cPKC β	nPKC ϵ
dsg-1	-	↑	-	↓
dsg-3	↓	↓	-	↑
P-cad	↓	↓	↑	-

5. táblázat Összefoglaló táblázat a PKC izoenzimek adhézións molekulákra gyakorolt hatásáról

Piros háttér: proliferációhoz kapcsolódó fehérjék. Zöld háttér: differenciálódáshoz kapcsolódó fehérjék

Kísérletes eredményeink arra utalnak, hogy a két Ca-independens ‘novel’ nPKC izoforma a differenciáltabb sejteken megtalálható dsg1-et egymással ellentétes módon szabályozza, azaz a differenciálódást segítő nPKC δ fokozta, míg a proliferációért felelős ϵ csökkentette a dsg-1 expresszióját. A differenciálatlanabb sejteken kifejeződő dsg-3 expresszióját ezzel szemben az nPKC δ csökkentette, míg az nPKC ϵ fokozta; a differenciálódást indukáló a Ca-dependens ‘konvenciális’ PKC α az nPKC δ -hoz hasonlóan viselkedett ebből a szempontból. A proliferáló keratinocitákon jelenlévő P-cad esetében valamennyi általunk

vizsgált PKC izoforma szabályozó szerepe érvényesült, egymással ellenétes módon (cPKC α /nPKC δ gátolta, míg cPKC β /nPKC ϵ fokozta az expressziót). Kísérleteink során kimutattuk tehát, hogy a PKC izoenzimek részt vesznek a dezmoszómákat és adherens jukciókat felépítő adhéziós molekulák kifejeződésének szabályozásában (**5. táblázat**).

Az integritás fenntartásának egy másik jelentős eleme a hidrálttság biztosítása, melyet két lokálisan is alkalmazható poliol, a glicerol és xilitol segíthet. Irodalmi adatok már korábban felvetették, hogy a hidrálttság biztosítása mellett ezen poliolok jelátviteli folyamatokat is befolyásolhatnak; így kísérleteink másik részében ezt vizsgáltuk. A poliolokat nem toxikus dózisban (xilitol: 0,0045%-0,45%; glicerol: 0,0027%-0,27%) alkalmazva vizsgáltuk a differenciálódási markerek kifejeződésére gyakorolt hatásukat. Azt találtuk, hogy a filaggrin, lorikrin, involukrin és okkludin expresszióját mindkét anyag fokozta.

	Filaggrin	Lorikrin	Involukrin	Okkludin	PKC δ	MAPK	Gyulladás
Glicerol	+	+	-	+	-	+	+
Xilitol	+	+	+	+	+	+	+

6. táblázat Összefoglaló táblázat a poliolok keratinociták biológiai folyamataiban szerepet játszó differenciálódási markerekre, jelátviteli útvonalakra és a gyulladásra gyakorolt hatásáról

Ezen hatás mindkét poliol esetében a MAPK útvonalon, míg a xilitol esetében a nPKC δ addicionális aktivációján keresztül valósult meg. Gyulladás modellekben az is kimutatható volt, hogy mind a glicerol, mind a xilitol különféle citokinek expresszióját befolyásolva gyulladáscsökkentő hatást is kifejtett. Mindezen eredményeink azt sugallják, hogy a glicerol és a xilitol hidratáló hatásuk mellett i) befolyásolják a barrier helyreállítás szempontjából fontos fehérjék termelését és ii) a gyulladás csökkentését is elő tudják segíteni különböző jelátviteli útvonalak aktiválása révén. Mindezek mellett elméleti megfontolások alapján az is feltételezhető, hogy együttes alkalmazásuk még hatékonyabban javítja a bőr barrier funkcióját (**6. táblázat**).

Summary

The integrity of our skin is indispensable in the protection against harmful agents in our environment. One important factor in maintaining integrity is cell adhesion apparatus, whose structure proteins show different distributions *in vivo* in the layers of the epidermis, i.e., depending on the state of differentiation. Adhesion molecules (dsg-1, 3 and P-cad), which are involved in the pathogenesis of *pemphigus vulgaris* and *foliaceus*, were investigated. In the light of the fact that the PKC isoenzyme family performs a regulatory function in cell proliferation and differentiation and that this regulatory function is well studied in the human epidermal HaCaT keratinocyte cell line, it seemed logical to investigate the effect of each PKC isoenzyme on the expression of adhesion molecules with the used overexpression, RNA interference technics and the antagonist, rottlerin. Our results suggest that the two Ca-independent ‘novel’ nPKC isoforms regulate dsg-1, found on more differentiated cells, in the opposite ways, i.e., nPKC δ , which promotes differentiation, increased, while ϵ , which is responsible for proliferation, decreased dsg-1 expression. In contrast, the expression of dsg-3, expressed on undifferentiated cells, was reduced by nPKC δ , while was increased by nPKC ϵ ; the differentiation-inducing Ca-dependent ‘conventional’ PKC α behaved similarly to nPKC δ . In the case of P-cad, present on proliferating keratinocytes, all PKC isoforms examined by us seemed to have regulatory role, in an opposite way (cPKC α /nPKC δ inhibited, while cPKC β /nPKC ϵ increased expression). Thus, we have shown that PKC isoenzymes are involved in the regulation of the expression of adhesion molecules that make up desmosomes and adherent junctions.

Another important element in maintaining integrity is the provision of hydration, which can be aided by two topical polyols, glycerol and xylitol. Previous publications have suggested that in

addition to providing hydration, these polyols can also affect signal transduction pathways. Thus, in the other part of our experiments we examined this. We investigated the effect of polyols on the expression of differentiation markers using non-toxic doses (xylitol: 0.0045% - 0.45%; glycerol: 0.0027% - 0.27%). We found that the expression of filaggrin, loricrine, involucrin, and occludin was enhanced by both substances. This effect was mediated by the MAPK pathway for both polyols and by the additional activation of nPKC δ for xylitol. In inflammation models, it was also shown that both glycerol and xylitol had an anti-inflammatory effect by influencing the expression of various cytokines. All these results suggest that in addition to their moisturizing effect, glycerol and xylitol i) influence the production of proteins, which are important for barrier restoration and ii) can also help reduce inflammation by activating different signaling pathways. In addition, based on theoretical considerations, it can also be assumed that their combined application even more effectively improves the skin barrier function.

Irodalomjegyzék

- AKIRA S, UEMATSU S AND TAKEUCHI O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- ALESSI DR. 1997. The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 402: 121-123.
- AMAGAI M. 1996. Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11: 319-352; discussion 353.
- AMAGAI M. 1999. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 20: 92-102.
- AMAGAI M. 2008. Pemphigus vulgaris and its active disease mouse model. *Curr Dir Autoimmun* 10: 167-181.
- AMAGAI M ET AL. 2006. Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"? *Exp Dermatol* 15: 815-831.
- AMAGAI M, KLAUS-KOVTUN V AND STANLEY JR. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67: 869-877.
- AMAGAI M, KOCH PJ, NISHIKAWA T AND STANLEY JR. 1996. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 106: 351-355.
- ANDERSEN F, HEDEGAARD K, PETERSEN TK, BINDSLEV-JENSEN C, FULLERTON A AND ANDERSEN KE. 2007. Comparison of the effect of glycerol and triamcinolone acetonide on cumulative skin irritation in a randomized trial. *J Am Acad Dermatol* 56: 228-235.
- ARNEMANN J, SULLIVAN KH, MAGEE AI, KING IA AND BUXTON RS. 1993. Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci* 104 (Pt 3): 741-750.
- BAIER G, TELFORD D, GIAMPA L, COGGESHALL KM, BAIER-BITTERLICH G, ISAKOV N AND ALTMAN A. 1993. Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 268: 4997-5004.
- BOUKAMP P, PETRUSSEVSKA RT, BREITKREUTZ D, HORNUNG J, MARKHAM A AND FUSENIG NE. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.
- BOUKAMP P, POPP S, ALTMAYER S, HULSEN A, FASCHING C, CREMER T AND FUSENIG NE. 1997. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* 19: 201-214.
- BOUWSTRA JA, DE GRAAFF A, GOORIS GS, NIJSSE J, WIECHERS JW AND VAN AELST AC. 2003. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol* 120: 750-758.
- BOUWSTRA JA AND PONEC M. 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* 1758: 2080-2095.
- BRAFF MH, DI NARDO A AND GALLO RL. 2005. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 124: 394-400.
- BRANDNER JM, KIEF S, WLADYKOWSKI E, HOUDEK P AND MOLL I. 2006. Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol* 19: 71-77.

- BRAUWEILER AM, GOLEVA E AND LEUNG DYM. 2014. Th2 cytokines increase Staphylococcus aureus alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *J Invest Dermatol* 134: 2114-2121.
- BREITKREUTZ D, BOUKAMP P, RYLE CM, STARK HJ, ROOP DR AND FUSENIG NE. 1991. Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. *Cancer Res* 51: 4402-4409.
- BRIOT A, DERAISON C, LACROIX M, BONNART C, ROBIN A, BESSON C, DUBUS P AND HOVNANIAN A. 2009. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med* 206: 1135-1147.
- CZIFRA G, SZOLLOSI AG, TOTTH BI, DEMAUDE J, BOUEZ C, BRETON L AND BIRO T. 2012. Endocannabinoids regulate growth and survival of human eccrine sweat gland-derived epithelial cells. *J Invest Dermatol* 132: 1967-1976.
- DANESHPAZHOOH M, FATEHNEJAD M, RAHBAR Z, BALIGHI K, GHANDI N, GHIASI M, ABEDINI R, LAJEVARDI V AND CHAMS-DAVATCHI C. 2016. Trauma-induced pemphigus: a case series of 36 patients. *J Dtsch Dermatol Ges* 14: 166-171.
- DARLENSKI R, SASSNING S, TSANKOV N AND FLUHR JW. 2009. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm* 72: 295-303.
- DENNING MF, DLUGOSZ AA, CHENG C, DEMPSEY PJ, COFFEY RJ, JR., THREADGILL DW, MAGNUSON T AND YUSPA SH. 2000. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes. *Exp Dermatol* 9: 192-199.
- DENNING MF, GUY SG, ELLERBROEK SM, NORVELL SM, KOWALCZYK AP AND GREEN KJ. 1998a. The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase C. *Exp Cell Res* 239: 50-59.
- DENNING MF, WANG Y, NICKOLOFF BJ AND WRONE-SMITH T. 1998b. Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 273: 29995-30002.
- DOBROSI N, TOTTH BI, NAGY G, DOZSA A, GECZY T, NAGY L, ZOUBOULIS CC, PAUS R, KOVACS L AND BIRO T. 2008. Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J* 22: 3685-3695.
- DRUMMOND ML AND PREHODA KE. 2016. Molecular Control of Atypical Protein Kinase C: Tipping the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *J Mol Biol* 428: 1455-1464.
- ECKERT RL, EFIMOVA T, DASHTI SR, BALASUBRAMANIAN S, DEUCHER A, CRISH JF, STURNIOLO M AND BONE F. 2002. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 7: 36-40.
- EDWARDS AS AND NEWTON AC. 1997. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem* 272: 18382-18390.
- EGU DT, KUGELMANN D AND WASCHKE J. 2019. Role of PKC and ERK Signaling in Epidermal Blistering and Desmosome Regulation in Pemphigus. *Front Immunol* 10: 2883.
- EL MAGHRABY GM, BARRY BW AND WILLIAMS AC. 2008. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci* 34: 203-222.

- ELIAS PM, MATSUYOSHI N, WU H, LIN C, WANG ZH, BROWN BE AND STANLEY JR. 2001. Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. *J Cell Biol* 153: 243-249.
- ELIAS PM AND SCHMUTH M. 2009. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9: 437-446.
- EYRE RW AND STANLEY JR. 1987. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *J Exp Med* 165: 1719-1724.
- FARTHING PM, MATEAR P AND CRUCHLEY AT. 1992. Langerhans cell distribution and keratinocyte expression of HLADR in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 21: 451-455.
- FISCHER SM, LEE ML, MALDVE RE, MORRIS RJ, TRONO D, BUROW DL, BUTLER AP, PAVONE A AND WARREN B. 1993. Association of protein kinase C activation with induction of ornithine decarboxylase in murine but not human keratinocyte cultures. *Mol Carcinog* 7: 228-237.
- FISHER GJ ET AL. 1993. Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-beta II in psoriasis. *J Invest Dermatol* 101: 553-559.
- FLUHR JW, DARLENSKI R AND SURBER C. 2008. Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. *Br J Dermatol* 159: 23-34.
- FREDRICKS DN. 2001. Microbial ecology of human skin in health and disease. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6: 167-169.
- FUCHS E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111: 2807-2814.
- FURUKAWA F, TAKIGAWA M, MATSUYOSHI N, SHIRAHAMA S, WAKITA H, FUJITA M, HORIGUCHI Y AND IMAMURA S. 1994. Cadherins in cutaneous biology. *J Dermatol* 21: 802-813.
- FUSENIG NE AND BOUKAMP P. 1998. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 23: 144-158.
- FUTEI Y, AMAGAI M, SEKIGUCHI M, NISHIFUJI K, FUJII Y AND NISHIKAWA T. 2000. Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 115: 829-834.
- GALLEGOS LL, KUNKEL MT AND NEWTON AC. 2006. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 281: 30947-30956.
- GARROD D, CHIDGEY M AND NORTH A. 1996. Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr Opin Cell Biol* 8: 670-678.
- GARROD DR. 1993. Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol* 5: 30-40.
- GARROD DR, MERRITT AJ AND NIE Z. 2002. Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). *Mol Membr Biol* 19: 81-94.
- GAZEL A, ROSDY M, TORNIER C, DE FRAISSINETTE ADE B AND BLUMENBERG M. 2008. Transcriptional profiling defines the effects of nickel in human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 217: 686-692.
- GECZY T, OLAH A, TOTTH BI, CZIFRA G, SZOLLOSI AG, SZABO T, ZOUBOULIS CC, PAUS R AND BIRO T. 2012. Protein kinase C isoforms have differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol* 132: 1988-1997.
- GIACOMONI PU, MAMMONE T AND TERI M. 2009. Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci* 55: 144-149.

- GIORGIONE JR, LIN JH, MCCAMMON JA AND NEWTON AC. 2006. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase C δ compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *J Biol Chem* 281: 1660-1669.
- GLASER R, HARDER J, LANGE H, BARTELS J, CHRISTOPHERS E AND SCHRODER JM. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6: 57-64.
- GOODNIGHT J, MISCHAK H AND MUSHINSKI JF. 1994. Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res* 64: 159-209.
- GRAYBILL C, WEE B, ATWOOD SX AND PREHODA KE. 2012. Partitioning-defective protein 6 (Par-6) activates atypical protein kinase C (α PKC) by pseudosubstrate displacement. *J Biol Chem* 287: 21003-21011.
- GREEN DR AND REED JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- GREEN KJ AND GAUDRY CA. 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 208-216.
- GRIGER Z, PAYER E, KOVACS I, TOTTH BI, KOVACS L, SIPKA S AND BIRO T. 2007. Protein kinase C- β and - δ isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells. *J Mol Med (Berl)* 85: 1031-1042.
- GSCHWENDT M, MULLER HJ, KIELBASSA K, ZANG R, KITTSTEIN W, RINCKE G AND MARKS F. 1994. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 93-98.
- HARA M, MA T AND VERKMAN AS. 2002. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem* 277: 46616-46621.
- HARA M AND VERKMAN AS. 2003. Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7360-7365.
- HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E AND SCHRODER JM. 2001. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276: 5707-5713.
- HARDER J AND SCHRODER JM. 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277: 46779-46784.
- HARMON RM, SIMPSON CL, JOHNSON JL, KOETSIER JL, DUBASH AD, NAJOR NA, SARIG O, SPRECHER E AND GREEN KJ. 2013. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *J Clin Invest* 123: 1556-1570.
- HENNINGS H, MICHAEL D, CHENG C, STEINERT P, HOLBROOK K AND YUSPA SH. 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254.
- HOHL D, LICHTI U, BREITKREUTZ D, STEINERT PM AND ROOP DR. 1991. Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 96: 414-418.
- HOLM EA, WULF HC, THOMASSEN L AND JEMEC GB. 2006. Instrumental assessment of atopic eczema: validation of transepidermal water loss, stratum corneum hydration, erythema, scaling, and edema. *J Am Acad Dermatol* 55: 772-780.
- HUANG HC AND CHANG TM. 2008. Ceramide 1 and ceramide 3 act synergistically on skin hydration and the transepidermal water loss of sodium lauryl sulfate-irritated skin. *Int J Dermatol* 47: 812-819.
- JAKEN S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 8: 168-173.

- JINQUAN T, VORUM H, LARSEN CG, MADSEN P, RASMUSSEN HH, GESSER B, ETZERODT M, HONORE B, CELIS JE AND THESTRUP-PEDERSEN K. 1996. Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J Invest Dermatol* 107: 5-10.
- JOHANNES FJ, PRESTLE J, EIS S, OBERHAGEMANN P AND PFIZENMAIER K. 1994. PKC α is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 269: 6140-6148.
- KATSUYAMA M, KOBAYASHI Y, ICHIKAWA H, MIZUNO A, MIYACHI Y, MATSUNAGA K AND KAWASHIMA M. 2005. A novel method to control the balance of skin microflora Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. *J Dermatol Sci* 38: 207-213.
- KAWASAKI H, NAGAO K, KUBO A, HATA T, SHIMIZU A, MIZUNO H, YAMADA T AND AMAGAI M. 2012. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1538-1546 e1536.
- KIMURA TE, MERRITT AJ AND GARROD DR. 2007. Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. *J Invest Dermatol* 127: 775-781.
- KITAJIMA Y, AOYAMA Y AND SEISHIMA M. 1999. Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell attachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4: 137-144.
- KNUUTTILA ML, KUOKSA TH, SVANBERG MJ, MATTILA PT, KARJALAINEN KM AND KOLEHMAINEN E. 2000. Effects of dietary xylitol on collagen content and glycosylation in healthy and diabetic rats. *Life Sci* 67: 283-290.
- KOCH PJ AND FRANKE WW. 1994. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 6: 682-687.
- KORPONYAI C, KOVACS RK, EROS G, DIKSTEIN S AND KEMENY L. 2011. Antiirritant properties of polyols and amino acids. *Dermatitis* 22: 141-146.
- KORPONYAI C, SZEL E, BEHANY Z, VARGA E, MOHOS G, DURA A, DIKSTEIN S, KEMENY L AND EROS G. 2017. Effects of Locally Applied Glycerol and Xylitol on the Hydration, Barrier Function and Morphological Parameters of the Skin. *Acta Derm Venereol* 97: 182-187.
- KOVACS A, SCHMIDT E, BEGANY A, HUNYADI J AND SZEGEDI A. 2004. Immunohistochemical examination of P-cadherin in bullous and acantholytic skin diseases. *Acta Derm Venereol* 84: 116-119.
- KROGER C, LOSCHKE F, SCHWARZ N, WINDOFFER R, LEUBE RE AND MAGIN TM. 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol* 201: 681-692.
- LAI O, RECKE A, ZILLIKENS D AND KASPERKIEWICZ M. 2018. Influence of cigarette smoking on pemphigus - a systematic review and pooled analysis of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 32: 1256-1262.
- LAMBERS H, PIESSENS S, BLOEM A, PRONK H AND FINKEL P. 2006. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 28: 359-370.
- LEE YS, DLUGOSZ AA, MCKAY R, DEAN NM AND YUSPA SH. 1997. Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C α in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol Carcinog* 18: 44-53.
- LEGAN PK, YUE KK, CHIDGEY MA, HOLTON JL, WILKINSON RW AND GARROD DR. 1994. The bovine desmocollin family: a new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biol* 126: 507-518.

- LEWIS JE, JENSEN PJ AND WHEELOCK MJ. 1994. Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol* 102: 870-877.
- LEYVRAZ C, CHARLES RP, RUBERA I, GUITARD M, ROTMAN S, BREIDEN B, SANDHOFF K AND HUMMLER E. 2005. The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8. *J Cell Biol* 170: 487-496.
- MADISON KC. 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121: 231-241.
- MAHONEY MG, HU Y, BRENNAN D, BAZZI H, CHRISTIANO AM AND WAHL JK, 3RD. 2006. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp Dermatol* 15: 101-109.
- MAHONEY MG, WANG Z, ROTHENBERGER K, KOCH PJ, AMAGAI M AND STANLEY JR. 1999. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 103: 461-468.
- MAKSOD R, DU PREEZ S, EATON-FITCH N, THAPALIYA K, BARNDEN L, CABANAS H, STAINES D AND MARSHALL-GRADISNIK S. 2020. A systematic review of neurological impairments in myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome using neuroimaging techniques. *PLoS One* 15: e0232475.
- MARRAKCHI S AND MAIBACH HI. 2007. Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact Dermatitis* 57: 28-34.
- MATTILA PT, PELKONEN P AND KNUUTTILA ML. 2005. Effects of a long-term dietary xylitol supplementation on collagen content and fluorescence of the skin in aged rats. *Gerontology* 51: 166-169.
- MEGE RM, GAVARD J AND LAMBERT M. 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 18: 541-548.
- MELCHIONDA V AND HARMAN KE. 2019. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: an overview of the clinical presentation, investigations and management. *Clin Exp Dermatol* 44: 740-746.
- MORALES KA, YANG Y, COLE TR AND IGUMENOVA TI. 2016. Dynamic Response of the C2 Domain of Protein Kinase Calpha to Ca(2+) Binding. *Biophys J* 111: 1655-1667.
- MORELL-DUBOIS S, CARPENTIER O, COTTENCIN O, QUEYREL V, HACHULLA E, HATRON PY AND DELAPORTE E. 2008. Stressful life events and pemphigus. *Dermatology* 216: 104-108.
- NEWTON AC. 2018. Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53: 208-230.
- NEWTON AC AND JOHNSON JE. 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta* 1376: 155-172.
- NGUYEN VT, ARREDONDO J, CHERNYAVSKY AI, PITTELKOW MR, KITAJIMA Y AND GRANDO SA. 2004. Pemphigus vulgaris acantholysis ameliorated by cholinergic agonists. *Arch Dermatol* 140: 327-334.
- NISHIZUKA Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665.
- NISHIZUKA Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- NIZET V, OHTAKE T, LAUTH X, TROWBRIDGE J, RUDISILL J, DORSCHNER RA, PESTONJAMASP V, PIRAINO J, HUTTNER K AND GALLO RL. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414: 454-457.

- NORDSTROM KM, LABOWS JN, MCGINLEY KJ AND LEYDEN JJ. 1986. Characterization of wax esters, triglycerides, and free fatty acids of follicular casts. *J Invest Dermatol* 86: 700-705.
- O'GOSHI K AND SERUP J. 2005. Inter-instrumental variation of skin capacitance measured with the Corneometer. *Skin Res Technol* 11: 107-109.
- O'NEILL LA, GOLENBOCK D AND BOWIE AG. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13: 453-460.
- O'REGAN GM, SANDILANDS A, MCLEAN WH AND IRVINE AD. 2009. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 124: R2-6.
- OHNO S ET AL. 1991. Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv Enzyme Regul* 31: 287-303.
- OLAH A, SZOLLOSI AG AND BIRO T. 2012. The channel physiology of the skin. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 163: 65-131.
- ORR JW, KERANEN LM AND NEWTON AC. 1992. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol Chem* 267: 15263-15266.
- OSADA K, SEISHIMA M AND KITAJIMA Y. 1997. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108: 482-487.
- PAILLER-MATTEI C, NICOLI S, PIROT F, VARGIOLU R AND ZAHOUANI H. 2009. A new approach to describe the skin surface physical properties in vivo. *Colloids Surf B Biointerfaces* 68: 200-206.
- PAPP H ET AL. 2004. Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* 61: 1095-1105.
- PAPP H, CZIFRA G, LAZAR J, GONCZI M, CSERNOCH L, KOVACS L AND BIRO T. 2003. Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 12: 811-824.
- PAREKH DB, ZIEGLER W AND PARKER PJ. 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19: 496-503.
- PILLAI S, BIKLE DD, MANCIANTI ML, CLINE P AND HINCENBERGS M. 1990. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* 143: 294-302.
- PLASENCIA I, NORLEN L AND BAGATOLLI LA. 2007. Direct visualization of lipid domains in human skin stratum corneum's lipid membranes: effect of pH and temperature. *Biophys J* 93: 3142-3155.
- POUMAY Y AND PITTELKOW MR. 1995. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 104: 271-276.
- PU Y, PEACH ML, GARFIELD SH, WINCOVITCH S, MARQUEZ VE AND BLUMBERG PM. 2006. Effects on ligand interaction and membrane translocation of the positively charged arginine residues situated along the C1 domain binding cleft in the atypical protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 281: 33773-33788.
- RAWLINGS A, HARDING C, WATKINSON A, BANKS J, ACKERMAN C AND SABIN R. 1995. The effect of glycerol and humidity on desmosome degradation in stratum corneum. *Arch Dermatol Res* 287: 457-464.
- RAWLINGS AV AND HARDING CR. 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17 Suppl 1: 43-48.

- RENNECKE J, JOHANNES FJ, RICHTER KH, KITTSSTEIN W, MARKS F AND GSCHWENDT M. 1996. Immunological demonstration of protein kinase C μ in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphosphol-13-acetate treatment of cells. *Eur J Biochem* 242: 428-432.
- RIPPKE F, SCHREINER V, DOERING T AND MAIBACH HI. 2004. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *Am J Clin Dermatol* 5: 217-223.
- RUDIHOFF D. 1998. The effect of dryness on the skin. *Clin Dermatol* 16: 99-107.
- RYLE CM, BREITKREUTZ D, STARK HJ, LEIGH IM, STEINERT PM, ROOP D AND FUSENIG NE. 1989. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40: 42-54.
- SAHA M, BHOGAL B, BLACK MM, COOPER D, VAUGHAN RW AND GROVES RW. 2014. Prognostic factors in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 170: 116-122.
- SANCHEZ-CARPINTERO I, ESPANA A, PELACHO B, LOPEZ MORATALLA N, RUBENSTEIN DS, DIAZ LA AND LOPEZ-ZABALZA MJ. 2004. In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades. *Br J Dermatol* 151: 565-570.
- SARIG O ET AL. 2012. Population-specific association between a polymorphic variant in ST18, encoding a pro-apoptotic molecule, and pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 132: 1798-1805.
- SAUNDERS SP ET AL. 2016. Spontaneous atopic dermatitis is mediated by innate immunity, with the secondary lung inflammation of the atopic march requiring adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 137: 482-491.
- SCHMIDT E, KASPERKIEWICZ M AND JOLY P. 2019. Pemphigus. *Lancet* 394: 882-894.
- SCHOOP VM, MIRANCEA N AND FUSENIG NE. 1999. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112: 343-353.
- SCHRODER JM AND HARDER J. 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 469-486.
- SHARMA P, MAO X AND PAYNE AS. 2007. Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J Dermatol Sci* 48: 1-14.
- SHARP LL, JAMESON JM, CAUVI G AND HAVRAN WL. 2005. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol* 6: 73-79.
- SPERGEL JM AND PALLER AS. 2003. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 112: S118-127.
- SPINDLER V, ENDLICH A, HARTLIEB E, VIELMUTH F, SCHMIDT E AND WASCHKE J. 2011. The extent of desmoglein 3 depletion in pemphigus vulgaris is dependent on Ca^{2+} -induced differentiation: a role in suprabasal epidermal skin splitting? *Am J Pathol* 179: 1905-1916.
- SPINDLER V AND WASCHKE J. 2018. Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Front Immunol* 9: 136.
- STANLEY JR AND AMAGAI M. 2006. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 355: 1800-1810.
- STAWCZYK-MACIEJA M, SZCZERKOWSKA-DOBOSZ A, REBALA K AND PURZYCKA-BOHDAN D. 2015. Genetic background of skin barrier dysfunction in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Postepy Dermatol Alergol* 32: 123-126.

- STEINBERG SF. 2004. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* 384: 449-459.
- STOUT EI AND MCKESSOR A. 2012. Glycerin-Based Hydrogel for Infection Control. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1: 48-51.
- SUSIN SA, ZAMZAMI N AND KROEMER G. 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366: 151-165.
- SZEL E ET AL. 2019. Protective effects of glycerol and xylitol in keratinocytes exposed to hyperosmotic stress. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 12: 323-331.
- SZEL E ET AL. 2015. Anti-irritant and anti-inflammatory effects of glycerol and xylitol in sodium lauryl sulphate-induced acute irritation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29: 2333-2341.
- TAGAMI H. 2008a. Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Arch Dermatol Res* 300 Suppl 1: S1-6.
- TAGAMI H. 2008b. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int J Cosmet Sci* 30: 413-434.
- TERUNUMA A, AIBA S AND TAGAMI H. 2001. Cytokine mRNA profiles in cultured human skin component cells exposed to various chemicals: a simulation model of epicutaneous stimuli induced by skin barrier perturbation in comparison with that due to exposure to haptens or irritant. *J Dermatol Sci* 26: 85-93.
- TOBIAS IS AND NEWTON AC. 2016. Protein Scaffolds Control Localized Protein Kinase C ζ Activity. *J Biol Chem* 291: 13809-13822.
- TOTH BI, DOBROSI N, DAJNOKI A, CZIFRA G, OLAH A, SZOLLOSI AG, JUHASZ I, SUGAWARA K, PAUS R AND BIRO T. 2011. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol* 131: 1095-1104.
- TOTH BI, GECZY T, GRIGER Z, DOZSA A, SELTMANN H, KOVACS L, NAGY L, ZOUBOULIS CC, PAUS R AND BIRO T. 2009. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol* 129: 329-339.
- TRAUTMANN A, ALTZNAUER F, AKDIS M, SIMON HU, DISCH R, BROCKER EB, BLASER K AND AKDIS CA. 2001. The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol* 117: 927-934.
- TRAVERS JB, HAMID QA, NORRIS DA, KUHN C, GIORNO RC, SCHLIEVERT PM, FARMER ER AND LEUNG DY. 1999. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. *J Clin Invest* 104: 1181-1189.
- UR-REHMAN S, MUSHTAQ Z, ZAHOR T, JAMIL A AND MURTAZA MA. 2015. Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55: 1514-1528.
- USAI-SATTA P, BASSOTTI G, BELLINI M, OPPIA F, LAI M AND CABRAS F. 2020. Irritable Bowel Syndrome and Gluten-Related Disorders. *Nutrients* 12.
- VERDIER-SEVRAIN S AND BONTE F. 2007. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 6: 75-82.
- VISSCHER M AND NARENDHRAN V. 2014. The Ontogeny of Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3: 291-303.
- VODO D, SARIG O AND SPRECHER E. 2018. The Genetics of Pemphigus Vulgaris. *Front Med (Lausanne)* 5: 226.

- WANG XP, SCHUNCK M, KALLEN KJ, NEUMANN C, TRAUTWEIN C, ROSE-JOHN S AND PROKSCH E. 2004. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 123: 124-131.
- WASCHKE J AND SPINDLER V. 2014. Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Med Res Rev* 34: 1127-1145.
- WOLF R, TAMIR A AND BRENNER S. 1991. Drug-induced versus drug-triggered pemphigus. *Dermatologica* 182: 207-210.
- YANG Y AND IGUMENOVA TI. 2013. The C-terminal V5 domain of Protein Kinase Calpha is intrinsically disordered, with propensity to associate with a membrane mimetic. *PLoS One* 8: e65699.
- YAP AS, BRIEHER WM AND GUMBINER BM. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 119-146.
- YAZDI AS, ROCKEN M AND GHORESCHI K. 2016. Cutaneous immunology: basics and new concepts. *Semin Immunopathol* 38: 3-10.
- YOUN SW, KIM SJ, HWANG IA AND PARK KC. 2002. Evaluation of facial skin type by sebum secretion: discrepancies between subjective descriptions and sebum secretion. *Skin Res Technol* 8: 168-172.
- YOUN SW, NA JI, CHOI SY, HUH CH AND PARK KC. 2005. Regional and seasonal variations in facial sebum secretions: a proposal for the definition of combination skin type. *Skin Res Technol* 11: 189-195.
- ZHANG W, XU Y, CHEN Z, XU Z AND XU H. 2011. Knockdown of aquaporin 3 is involved in intestinal barrier integrity impairment. *FEBS Lett* 585: 3113-3119.
- ZOUBOULIS CC. 2004. Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol* 22: 360-366.

Tárgyszavak

bőr barrier, adhéziós molekulák, pemphigus, *atópiás dermatitis*, keratinocita differenciálódás, protein kináz C, xilitol, glicerol, gyulladás

Keywords

skin barrier, adhesion molecules, pemphigus, atopic dermatitis, keratinocyte differentiation, protein kinase C, xylitol, glycerol, inflammation

Köszönetnyilvánítás

A következőkben szeretnék köszönetet nyilvánítani mindazoknak, akik bármilyen módon segítettek a PhD munkámhoz szükséges kísérletek elvégzését.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kovács László** professzor úrnak és **Dr. Csernoch László** Intézetvezető Úrnak, amiért lehetővé tették számomra, hogy az Élettani Intézetben végezhessem TDK, majd PhD munkámat.

Ugyancsak szeretném megköszönni témavezetőimnek, **Dr. Bíró Tamás** professzor úrnak és **Dr. Szegedi Andrea** professzor nőnek munkám során nyújtott útmutatásait, szakmai és baráti tanácsait. Az általuk képviselt szakmai munkásság és emberi érték követendő például szolgálhatott számomra.

Ugyancsak hálával tartozom az Élettani Intézet valamennyi munkatársának, aki segítette munkámat. Külön köszönet illeti **Dr. Czifra Gabriellát, Dr. Griger Zoltánt, Dr. Tóth István Balázst, Dr. Varga Attiláné Ibcsikét**, akik megszeretették velem a kutatói munkát és türelemmel tanítottak, amikor az Élettani Intézetben kezdtem dolgozni. Hálás köszönet illeti **Dr. Oláh Attilát** és **Dr. Szöllősi Attilát**, akik a közlemények és a disszertáció elkészítéséhez nyújtottak felbecsülhetetlen segítséget.

Köszönöm továbbá cikkeim **társszerzőinek** a munkát, amivel lehetővé tették azok elkészítését.

Mivel az utam már jónéhány éve a klinikum felé irányult, itt szeretném megköszönni a **Hematológiai Tanszék munkatársainak**, hogy szakmai fejlődésemet segítették, külön kiemelve **Dr. Illés Árpád** professzor urat, aki kitartó ösztökélésével elősegítette a disszertáció elkészülését.

Végezetül szeretném megköszönni **Szüleimnek és Testvéremnek**, hogy megteremtették a lehetőséget számomra, hogy ezt a pályát választhassam, és mindvégig

támogattak, Férjemnek, **Dr. Pap Pálnak**, hogy “hűséges segítőtársam” minden körülmények között és gyermekeimnek **Pap Pál Benedeknek** és **Pap Abigélnek**, hogy beragyogják a mindennapjainkat.

Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/422/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Páyer Edit

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Páyer, E.**, Szabó-Papp, J., Ambrus, L., Szöllősi, A. G., Andrási, M., Dikstein, S., Kemény, L., Juhász, I., Szegedi, A., Bíró, T., Oláh, A.: Beyond the physico-chemical barrier: glycerol and xylitol markedly yet differentially alter gene expression profiles and modify signalling pathways in human epidermal keratinocytes.
Exp. Dermatol. 27 (3), 280-284, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.13493>
IF: 2.868
2. Szegedi, A., **Páyer, E.**, Czifra, G., Tóth, I. B., Schmidt, E., Kovács, L., Blumberg, P. M., Bíró, T.: Protein kinase C isoenzymes differentially regulate the differentiation-dependent expression of adhesion molecules in human epidermal keratinocytes.
Exp. Dermatol. 18 (2), 122-129, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00771.x>
IF: 3.239

További közlemények

3. Szántó, M., Oláh, A., Szöllősi, A. G., Tóth, K. F., **Páyer, E.**, Czakó, N., Pór, Á., Kovács, I., Zouboulis, C. C., Kemény, L. V., Bíró, T., Tóth, I. B.: Activation of TRPV3 inhibits lipogenesis and stimulates production of inflammatory mediators in human sebocytes: a putative contributor to dry skin dermatoses.
J. Invest. Dermatol. 139 (1), 250-253, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.015>
IF: 7.143
4. Illés, Á., **Páyer, E.**, Simon, Z., Miltényi, Z.: A sokszínű Castleman-betegség.
Hematol. Transzfuziol. 48, 81-85, 2015.





5. **Páyer, E.**, Miltényi, Z., Simon, Z., Magyari, F., Barna, S., Méhes, G., Illés, Á.: Diagnostic and Therapeutic Difficulties in Diffuse Large B-cell Lymphoma Arising From HHV8 Positive Castleman Disease.
J. Hematol. 1 (2-3), 65-69, 2012.
6. Simon, Z., Jóna, Á., Miltényi, Z., **Páyer, E.**, Lieber, A., Szilasi, M., Illés, Á.: Diagnosztikai nehézséget okozó pulmonalis infiltrátum.
Orv. Hetil. 153 (27), 1077-1081, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29404>
7. Váróczy, L., **Páyer, E.**, Kádár, Z., Gergely, L., Miltényi, Z., Magyari, F., Szodoray, P., Illés, Á.: Malignant lymphomas and autoimmunity - a single center experience from Hungary.
Clin. Rheumatol. 31 (2), 219-224, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-011-1807-1>
IF: 2.037
8. **Páyer, E.**, Miltényi, Z., Simon, Z., Szabados, L., Dull, K., Méhes, G., Illés, Á.: Uncommon late relapse of angioimmunoblastic T-Cell lymphoma after 16-year remission period.
Pathol. Oncol. Res. 18 (3), 737-741, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9475-7>
IF: 1.555
9. Magyari, F., **Páyer, E.**, Barna, S., Simon, Z., Miltényi, Z., Udvardy, M., Váróczy, L., Illés, Á.: Az első tapasztalatok rituximab-bendamustin kezeléssel Hodgkin-lymphoma autológ perifériás őssejt-transzplantációt követő progressziójában.
Magyar Belorv. Arch. 2011 (64), 167-169, 2011.
10. Miltényi, Z., Simon, Z., **Páyer, E.**, Váróczy, L., Gergely, L., Jóna, Á., Illés, Á.: Changing patterns in the clinical pathological features of hodgkin lymphoma: a report from Debrecen, Hungary.
ISRN Hematology. 2011, 810708, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5402/2011/810708>
11. Váróczy, L., Gergely, L., **Páyer, E.**, Miltényi, Z., Simon, Z., Illés, Á.: Myeloid growth factor therapy in malignant lymphomas: a 5-year retrospective study from Hungary.
Support. Care Cancer. 19 (10), 1619-1623, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-010-0992-9>
IF: 2.597
12. Miltényi, Z., Simon, Z., **Páyer, E.**, Váróczy, L., Gergely, L., Illés, Á.: Refrakter és relabált Hodgkin-lymphomás betegek kezelésével szerzett tapasztalataink.
Orv. Hetil. 151 (5), 172-178, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28799>
13. Miltényi, Z., Simon, Z., **Páyer, E.**, Váróczy, L., Gergely, L., Jóna, Á., Illés, Á.: Változnak-e a Hodgkin-lymphoma klinikopatológiai jellemzői?
Orv. Hetil. 151 (49), 2011-2018, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28990>





14. Griger, Z., **Páyer, E.**, Kovács, I., Tóth, I. B., Kovács, L., Sipka, S., Bíró, T.: Protein kinase C-beta and -delta isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells.

J. Mol. Med. 85 (9), 1031-1042, 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-007-0209-y>

IF: 4.82

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,259

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,107**

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

Debrecen, 2021.08.30.

