

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Retzlerné Medgyesi Barbara

**A permeabilitási barrier vizsgálata egészséges és gyulladt
bőrben**

DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI

DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A permeabilitási barrier vizsgálata egészséges és gyulladt
bőrben**

Retzlerné Medgyesi Barbara

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI

DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A bőr felépítése.....	8
2.2. A topográfiaileg eltérő bőrterületek jellemzése.....	10
2.3. Az immunológiai barrier jellegzetességei a topográfiaileg eltérő bőrterületeken	11
2.4. A permeabilitási barrier	13
2.4.1. A SC szerkezete	13
2.4.1.1. A cornified envelope	14
2.4.1.2. Dezmoszóma szerkezete és a korneociták hámlása	17
2.4.2. A tight junction.....	18
2.4.3. Antimikrobiális peptidok szerepe a bőrben	19
2.5. Barrier károsodáson alapuló betegségek	21
2.5.1. Atópiás dermatitis (AD)	21
2.6. Rosacea.....	23
2.6.1. A rosaceát kiváltó és fokozó faktorok	23
2.6.2. A veleszületett és az adaptív immunrendszer működése rosaceában.....	24
2.6.3. A rosaceában megjelenő vaszkuláris, neuroimmun és neurovaszkuláris eltérések	25
3. CÉLKITŰZÉS	26
3.1. Az egészséges bőr permeabilitási barrier vizsgálata	26
3.2. A permeabilitási barrier vizsgálata rosaceában	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
4.1. Bőrbíopsziás minták gyűjtése és feldolgozása	28
4.2. RNS izolálás, Reverz Transzkripció.....	30
4.3. Kvantitatív Valós-idejű Polimeráz Láncreakció (QRT- PCR).....	31
4.4. Az RNS szekvenálás (RNAseq)	33
4.5. Útvonal analízis/pathway analízis	34
4.6. Immunhisztokémia (IHC), immunfluoreszcens (IF) és rutin festések	34
4.7. Metszetek digitalizálása Whole-slide imaging-gel.....	36
4.8. Transzepidermális vízvesztés mérése	36
4.9. Konfokális mikroszkópia.....	36
4.10. Statisztikai analízis	37
5. EREDMÉNYEK	38
5.1. Az egészséges bőr permeabilitási barrier vizsgálatai	38
5.1.1. A TEWL mérése a különböző bőrrégióban.....	38
5.1.2. A CE intracelluláris struktúrmolekulák expressziójának vizsgálata a különböző bőrrégiókban	38
5.1.3. A KLK proteázok és az ABCA12 lipid transzporter expressziójának a vizsgálata a különböző bőrrégiókban.....	39

5.1.4.	A korneodezmoszóma és TJ komponensek vizsgálata a különböző bőrrégiókban	39
5.1.5.	A sejtkapcsoló struktúrák organizációjának vizsgálata a különböző bőrrégiókban	42
5.2.	A rosaceás bőr barrier vizsgálata	45
5.2.1.	Heatmap, Principal Component Analysis (PCA)	45
5.2.2.	Pathway analízis 1	47
5.2.3.	Pathway analízis 2	48
5.2.4.	Az QRT-PCR és IHC vizsgálataink megerősítették a ROS bőrben detektált szignifikáns eltéréseket a legfőbb permeabilitási barrier komponensekkel kapcsolatban	50
5.2.5.	CE képzésében résztvevő molekulák vizsgálata	51
5.2.6.	Intercelluláris lipid lamellák képződésében résztvevő főbb molekulák vizsgálata	51
5.2.7.	Dezmoszóma organizációjában szerepet játszó molekulák vizsgálata	52
5.2.8.	Korneociták hámlásában résztvevő főbb molekulák vizsgálata	52
5.2.9.	TJ molekulák vizsgálata	52
5.2.10.	Barrier alarmin molekulák vizsgálata	52
5.2.11.	AMP-k vizsgálata	53
5.2.12.	A ROS bőrre jellemző barrier változások hasonlóak az AD bőr barrierkárosodásához	58
5.2.12.1.	Irodalmi keresés	58
5.2.12.2.	Fehérje szintű vizsgálatok (IF festés) megerősítették az AD és a ROS jellemző barrier károsodásainak hasonló jellegét.....	58
6.	MEGBESZÉLÉS	62
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	72
8.	SUMMARY	73
9.	IRODALOMJEGYZÉK	74
10.	KULCSSZAVAK	84
11.	KEY WORDS	85
12.	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	86
13.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	87
14.	FÜGGELÉK – SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	89

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

ABCA12	ATP- binding cassette sub-family A member 12	EDC	Epidermális Differenciációs Komplex
AD	Atópiás dermatitis	ETR	Erytheamto- teleangioectaticus
AGR	Apocrine gland rich, apokrin mirigyben gazdag	FA FC	Field area Fold Change, x-szeres változás
AMP	Antimikrobiális peptid		
ANOVA	One-way analysis of variancia	FLG GP	Filaggrin Gland poor, Faggyúmirigyben szegény
BP	Biological process		
CAMP	Cathelicidin		
CCL	Chemokine ligan, Kemokin Ligand	GO HRP	Gene ontology Horseradish peroxidase
cDNS	Komplementer DNS	HS	Hidradenitis suppurativa
CE	Cornified envelope	Ig	Immunoglobulin
CDH1	Cadherin-1	IF	Immunfluoreszcens
CDSN	Corneodesmosin	IHC	Immunhisztokémia
CLDN	Claudin	IL	Interleukin
DAB	3, 3'-Diaminobenzidine	ISP	Immune System Process
DAPI	4', 6-diamino-2- fenilindol	IVL JAM	Involucrin Junctional adhéziós molekula
DC	Dendritikus sejt		
DCD	Dermcidin	KC	Keratinocita
dDC	Dermális dendritikus sejt	KEEG	Kyoto Encyclopedia of genes and genomes
DEFB4	Defensin beta 4B		
DEG	Differentially expressed genes, eltérően expresszált gének	KLK KRT LC	Kallikrein Keratin Langerhans sejt
DNA/DNS	Deoxyribonucleic acid, dezoxiribonukleinsav	LCE LCN	Late Cornified Envelope Lipocalin
DSC	Dezmocollin	LEKTI	Lympho-epithelial type inhibitor
DSG	Dezmoglein		

LOR	Loricrin		Ribonukleinsav
LT	Lamelláris test	ROI	Region of interest
MA	Mask area, Maszkolt terület	ROS	Rosacea
MF	Molecular function	S100A	S100 calcium-binding protein-A
mRNS	Messenger RNS	SB	Stratum basale
NKT	Natural Killer T cell, Természetes ölü sejt	SC	Stratum corneum
NMF	Natural Moisturizing Factor, Természetes hidratáló faktor	SCCE	Stratum corneum chymotryptic (kimotriptikus) enzim
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein	SD	Standard deviáció
OCLN	Occludin	SDS	Szodium-dodecil-szulfát
OR	Ocularis rosacea	SG	Stratum granulosum
PCA	Principal Component Analysis, Főkomponens Analízis	SGR	Sebaceous gland rich, Faggyúmirigyben gazdag
pDC	Plazmacitoid dendritikus sejt	SIS	Skin Immune System, Bőr immunrendszer
PKP1	Plakophilin-1	SLP	Secretory Leukocyte
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	SLP	Peptidase inhibitor
PPR	Papulopustular rosacea	SLS	Sodium-lauril-szulfát
QRT-PCR	Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction, Kvantitatív Valós-idejű polimeráz lánreakció	SPINK5	Kazal-típusú szerint proteáz-inhibitor
PhR	Phymatosus	SPRR	Small prolin rich protein
PS	Psoriasis	SRA	Sequence Read Archive
RNáz	Ribonukleáz	SS	Stratum spinosum
RNA/RNS	Ribonucleic acid,	TEWL	Transepidermal Water Loss, Transzepidermális vízvesztés
		TG	Transzglutamináz
		Th	Helper T sejt
		TJ	Tight junction
		TNF	tumor nekrozis faktor
		TSLP	Thymic Stromal

ZO

Lymphopoietin

Zonulae occludens

1. BEVEZETÉS

Az egészséges bőr anatómiai és szövettani felépítése bizonyos mértékben eltér a faggyú mirigyben gazdag (SGR, Sebaceous Gland Rich, zsíros), az apokrin mirigyben gazdag (AGR, Apocrine Gland Rich, nedves) és a mirigyekben szegény (GP, Gland Poor, száraz) bőrrégiókban, köszönhetően a stratum corneum eltérő vastagságának, illetve a faggyú, eccrin és apokrin mirigyek és a szőrtüszők változó számának. Ennek következménye egy diverz kémiai milió megjelenése a bőr felszínén. Az utóbbi évek kutatásai feltárták, hogy a kémiai milió változatosságával párhuzamosan a mikrobiom is különbözik az eltérő bőrterületeken. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai azt is kimutatták, hogy a bőr mikrobiomjához és kémiai miliójához hasonlóan a bőr immunológiai működésében (immunbarrier) is regionális eltérések detektálhatók. Szignifikáns különbséget igazoltunk az SGR, AGR és a GP bőrben található immunsejtek (DC-k, T sejtek) számában és aktivitásában, valamint rávilágítottunk arra, hogy az SGR és AGR régiókat egy nem gyulladásozó IL-17/IL-10 citokin környezet jellemzi, melyhez az IL-17-hez kapcsolódó kemokinek és antimikrobiális peptidok (AMP-k) emelkedett szintje is társul. Azt azonban eddig senki nem vizsgálta, hogy az immunológiai barrierhez hasonlóan a permeabilitási barrier is különbözik-e a három egészséges bőrrégióban. Disszertációm első részében ezen kérdés megválaszolására végzett kutatásainkat összegzem.

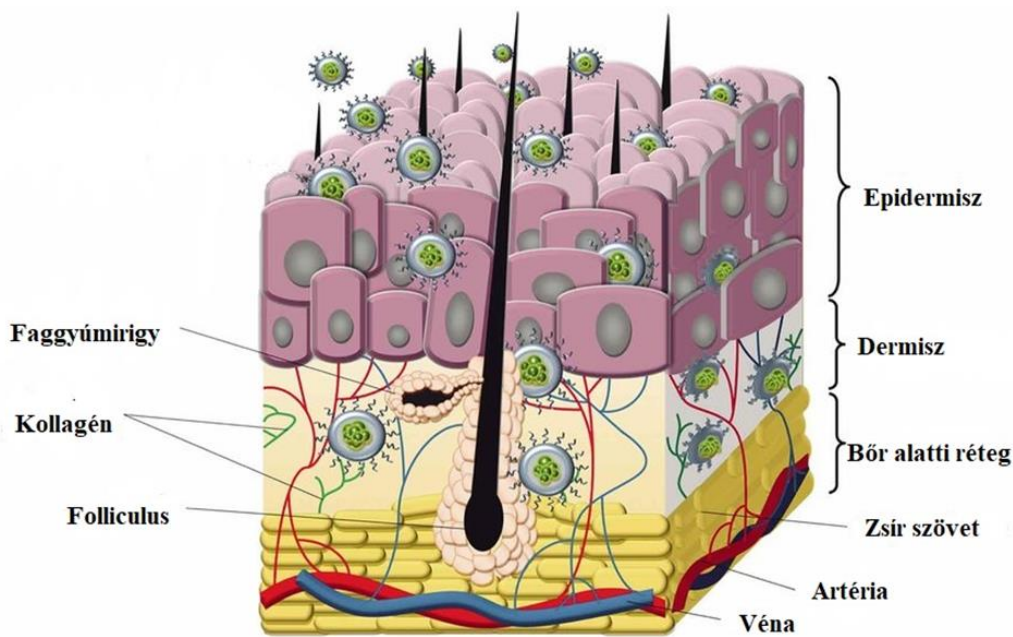
A permeabilitási barrier sérülése számos bőrbetegség fontos jellemzőjeként, sőt iniciáló okaként is ismert. A rosacea egy, a faggyúmirigyben gazdag bőrterületekre, azon belül az arca lokalizálódó immun-mediált bőrbetegség, ahol az emelkedett pH és transzepidermális vízvesztés (TEWL), valamint csökkent hidratáltság és fokozottan száraz bőr permeabilitási barrier károsodásra utal. Kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a permeabilitási barrier eltéréseit molekuláris szinten rosaceában, disszertációm második felében erről számolok be.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A bőr felépítése

A bőr 1,8 m²-es felületével az emberi test egyik legnagyobb méretű szerve. Számos funkciója mellett az egyik legfontosabb feladata az emberi szervezet elsődleges védelmi vonalának kialakítása. A humán bőr anatómiai szempontból három fő rétegre tagolható (**1. ábra**). A külső környezethez legközelebb elhelyezkedő rétege az epidermisz (hám), ami több rétegből áll. Ennek legalsó rétege a *stratum basale* (SB), mely egyetlen sejtsorát differenciálatlan bazális keratinociták (KC) alkotják. A felette elhelyezkedő réteg a *stratum spinosum* (SS), ahol a KC-k már bizonyos szinten differenciált állapotban vannak jelen. A SS-t a *stratum granulosum* (SG) réteg követi, ahol a keratohialin granulomok megjelenése jellemző, melyek hisztidin és cisztein gazdag fehérjéket tartalmaznak, melyek a keratin (KRT) filamentumokat kötik össze. Egyes bőrrégiókban egy újabb réteg, a *stratum lucidum* is kimutatható. Az epidermisz legkülső rétege a *stratum corneum* (SC), melyet már teljes mértékben differenciált KC-k alkotnak. Az epidermisz, melynek több mint 90%-át a KC-k alkotják (1, 2), saját vérellátással nem rendelkezik, így az alatta található rétegben elhelyezkedő erek biztosítják a táplálását (3). A KC-kon kívül egyéb sejtípusok is megtalálhatóak az epidermiszben, mint például az idegi eredetű Merkel sejtek, vagy a melanocita pigmenttermelő sejtek, melyek melanin expressziójuk révén az ultraibolya (UV) sugárzástól védik a bőr felszínét. Az epidermisz szuprabazális rétegében speciális immunsejtek is jelen vannak (Langerhans sejtek, CD8⁺ T sejtek), melyek a bőr-immunrendszer elemei közé tartoznak (4, 5).

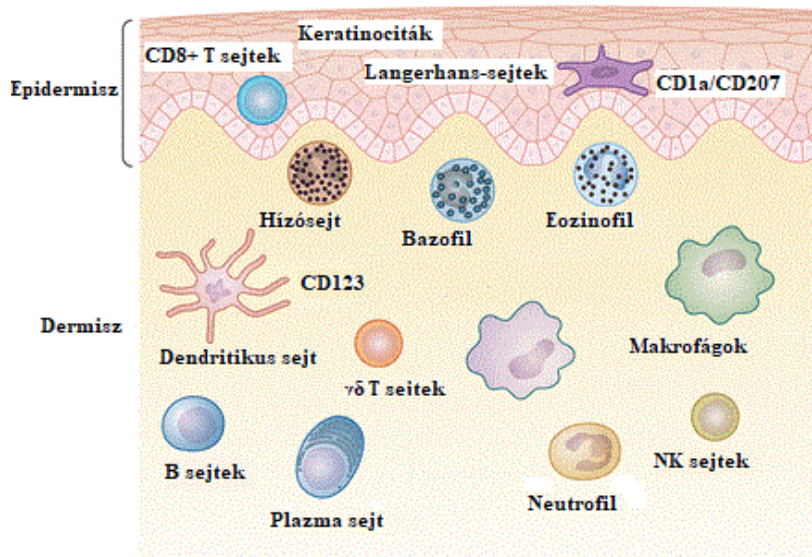
Az epidermisz alatt helyezkedik el a dermisz (írha), melynek legnagyobb tömegét kötőszöveti rostok, extracelluláris mátrix molekulák, és az ezeket termelő fibroblasztok teszik ki. Ebben a rétegben már pilosebaceous egységek, verejtékmirigyek, artériás, vénás és nyirokerek is találhatóak. A dermisz a felhámhoz képest több professzionális immunsejtet tartalmaz, melyek legfőbb képviselői a dendritikus sejtek (DC), mint a dermális DC-k (dDC) és a plazmacitoid DC-k (pDC), a CD4⁺ T-helper (Th) sejtek, a $\gamma\delta$ -T sejtek, a természetes ölő sejtek (NK sejtek), a makrofágok és a hízósejtek (1) (**2. ábra**). A dermisz alatt található harmadik réteg pedig a hipodermisz (bőralja), melyet zsír és kötőszövet épít fel (1, 3) (**1. ábra**).



1. ábra A bőr rétegeinek (epidermisz, dermisz és hipodermisz) sematikus ábrázolása

(Forrás: Bahamonde-Norambuena D. M-PA, Mario Cantin, Munoz M., Katherine Zepeda, Cristian Vilos. Polymeric Nanoparticles in Dermocosmetic. Int J Morphol. 2015;33(4):1563-8.)

A bőrnek számos fontos funkciója ismert, mellyel hozzájárul az emberi szervezet védelméhez, megfelelő működésének, homeosztázisának fenntartásához. Ezen funkciók ellátásában fontos szerepet játszanak a bőr immun- és permeabilitási barrierjének elemei. A bőr permeabilitási barrierjének (fiziko-kémiai barrier) legfőbb két fő eleme a SC réteg önmaga és a SG rétegben lévő tight junction (TJ) hálózat, melyek biztosítják a külső környezeti hatásokkal szembeni védelmet (pl.: mechanikai sérülések, UV-sugárzás stb.), valamint megakadályozzák a különböző patogének bőrbe való bejutását (1, 2, 6, 7). Emellett szerepet játszanak még a bőrön keresztüli vízvesztés kontrollálásában, a bőr megfelelő hidratáltságának kialakításában. A permeabilitási barrierrel ellentétben, melyet egy vékony réteg képvisel, a bőr immunbarriert, vagyis a bőr immunvédelmét (immunológiai barrier) a KC-k és a korábban felsorolt epidermális és dermális klasszikus immunsejtek által létrehozott bőr immunrendszer (Skin Immune System, SIS) biztosítja, mely szerepet játszik a toxinok, fertőző ágensek, daganatok elleni védekezésben. A saját mikrobiótával szemben viszont toleranciát mutat, ezzel segítve a bőr homeosztázisának fenntartását (6-9) (**2. ábra**).



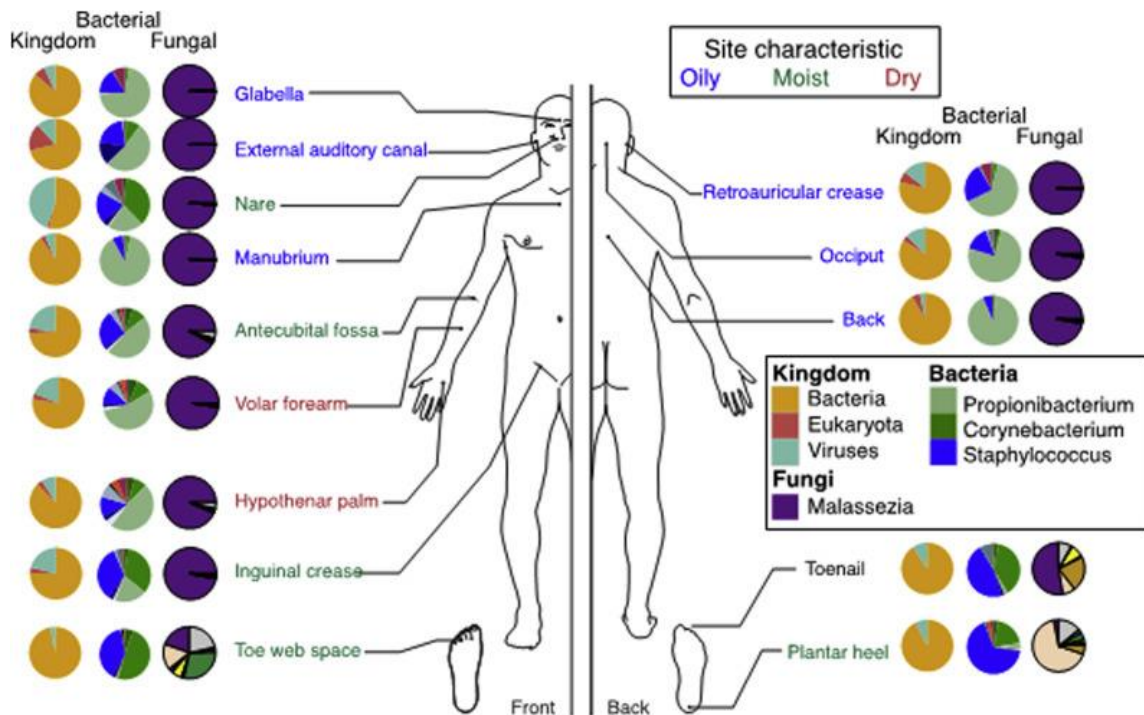
2. ábra Az immunsejtek eloszlásának sematikus ábrázolása a bőr epidermiszében és dermiszében

(Forrás: Quaresma JAS. Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. Clinical microbiology reviews. 2019;32(4))

2.2. A topográfiaailag eltérő bőrterületek jellemzése

Sokáig úgy gondolták, hogy az egészséges bőr egységes felépítésű és működésű, de az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően több ezzel ellentétes adat látott napvilágot. A test különböző területein lévő bőr anatómiai és szövettani felépítése (pl. a SC eltérő vastagsága, faggyú-, eccrin- és apokrin mirigyek mennyisége) eltérő. A szövettani különbségek mellett diverz kémiai miliót is detektáltak a különböző bőrrégiókban a mirigyváladék eltérő mennyiségével, összetételével és pH-jával összefüggésben (10). További megfigyelések alapján az is elmondható, hogy a különböző bőrrégiókat a kémiai környezethez alkalmazkodva más-más homeosztatisz mikróorganizmusok kolonizálják, tehát a bőr mikrobiomjának összetételében is eltérések figyelhetőek meg (3. ábra). A faggyúmirigyben gazdag bőrrégiókban (háton, arcon, fejbőrön) például nagyobb arányban van jelen Corynebaktérium a faggyúmirigyben szegény bőrterületekhez képest (pl. az alkaron) (11). Ezen anatómiai/kémiai/mikrobiom különbségek alapján megkülönböztethetünk faggyúmirigyben gazdag (SGR), apokrin mirigyben gazdag (AGR), és mirigyekben szegény (GP) bőrterületeket.

Számos vizsgálat megerősítette, hogy a bőr mikrobiom fontos szerepet játszik a SIS kialakulásában, aktivitásában, működésének fenntartásában (10).



3. ábra A mikrobiom (baktériumok és gombák) topográfiai eloszlása egészséges bőrön

(Forrás: Kong HH, Segre JA. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Investigating the Skin Microbiome. The Journal of investigative dermatology. 2017;137(5):e119-e22.)

2.3. Az immunológiai barrier jellegzetességei a topográfiailag eltérő bőrterületeken

Mivel a mikrobiom jelentős hatást gyakorol a SIS működésére, az immunológiai barrier pedig szoros összefüggést mutat a permeabilitási barrierrel, így kutatócsoportunkban felvetődött az az eddig nem vizsgált kérdés, hogy vajon a különböző bőrrégiók immun- és permeabilitási barrierjében is detektálhatóak-e regionális különbségek. Ennek megválaszolására irányuló korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a bőr mikrobiomjához és kémiai miliójéhez hasonlóan a SIS aktivitásában és expressziós mintázatában is különbségek detektálhatók a régiók között (12, 13). Először az SGR és GP összehasonlítást végeztük el. Eredményeink szerint az SGR bőr epidermális KC-ában megfigyelhető egy magasabb, de még mindig homeosztatis, nem gyulladásos Thymic Stromal Lymphopietin (TSLP, egy epiteliális sejtől származó citokin, mely az adaptív és a természetes immunválasz irányításában vesz részt) expresszió, melyet a faggyúmirigy fő komponense, a linolsav szabályoz. Továbbá ezen régióban nagyobb számban detektáltunk nem-gyulladásos CD11c⁺ DC-eket és CD4⁺ T sejteket jellegzetes IL-17/IL-10 citokin expressziós mintázattal. További vizsgálataink során az is bebizonyosodott, hogy a veleszületett immunrendszer bizonyos elemei (AMP-k, kemokinek) az SGR bőr epitheliumában szignifikánsan magasabban expresszálódtak a GP-hez képest. Az AMP-k közül S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2, CAMP és LCN2 molekulákat vizsgáltuk. Az összes

vizsgált AMP-t sikerült mindkét bőrrégióban detektálnunk gén szinten, és az összes vizsgált AMP expressziója (CAMP kivételével) szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrterületen. Két AMP-t immunhisztokémiai módszerrel is vizsgáltunk (LCN2, S100A8), mindkettőjük expressziója szignifikánsan magasabb volt a zsíros bőrben a száraz régiókhöz hasonlítva. A vizsgált kemokinek közül (CCL2, CCL3, CCL19, CCL20, CCL23, CCL24) mindegyik emelkedett expressziót mutatott a zsíros bőrben gén szinten, míg az IHC módszerrel is vizsgált CCL2 expressziója fehérje szinten is szignifikánsan magasabbnak mutatkozott. Emellett a bőr permeabilitási barrierjében (KRT17, KRT79) is eltéréseket figyeltünk meg. A jellegzetes különbségekkel párhuzamosan ugyanakkor a proinflammatorikus citokinek mindkét egészséges bőrrégióban alacsony szinten expresszálódtak [IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-33, a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α)]. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az SGR bőrrégiót egy egyedi, nem-gyulladásos Th17/IL-17 által irányított immun milió és sajátos permeabilitási barrier jellemzi, és ez a jellegzetes expressziós mintázat eltér a GP bőrterületeken detektálható mintázattól (12, 13).

Egy másik tanulmányunkban az AGR és a GP egészséges bőrrégiókat hasonlítottuk össze gén és fehérje szinten. Vizsgálataink során az AGR bőrterületeken is nem gyulladásos IL-17/IL-10 citokin környezetet detektáltunk, szignifikánsan magasabb T sejt és DC jelenléttel (aktiváció jele nélkül), IL-17-hez kapcsolódó kemokinekkel, AMP-kkel és barrier elemekkel (14), de nem teljesen azonos formában, mint SGR esetén. Az SGR-hez hasonlóan az AGR bőrterületeken is megfigyelhető volt a TSLP epidermális jelenléte a homeosztatisz immun milió részeként, de az IL-17 kapcsolt kemokin és AMP szintek nem mutattak az SGR-el teljesen azonos eltéréseket (14). A vizsgált AMP-k (TSLP, S100A7, S100A8, S100A9, DEFB4B, LCN2) közül a legtöbb upregulálódott gén szinten az AGR régióban. Három molekulát fehérje szinten is megvizsgáltunk (S100A8, TSLP, LCN2), és mindhárom AMP emelkedett expressziót mutatott nedves bőrben, és közülük a TSLP és az LCN2 expressziója szignifikánsan is magasabb volt.

Az eddigi kutatások eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az emberi bőr a mikrobiom és a kémiai milió tekintetében felosztható legalább három eltérő régióra (száraz/nedves/zsíros), és ezzel összefüggésben az immun barrier jellemzői, a SIS működési aktivitása is különbözik ezeken a bőrterületeken. Véleményünk szerint ezen eltérések hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a topográfiailag különböző bőrrégiókon eltérő régió specifikus bőrbetegségek alakulhatnak ki. Ilyen például a hidradenitis suppurativa (HS), amely a nedves AGR bőrterületen fordul elő (hónalj, ágyék rész), az acne és a rosacea, mely betegségek a zsíros bőrrégióban (SGR) jelennek meg (arc), vagy az atópiás dermatitis (AD), mely

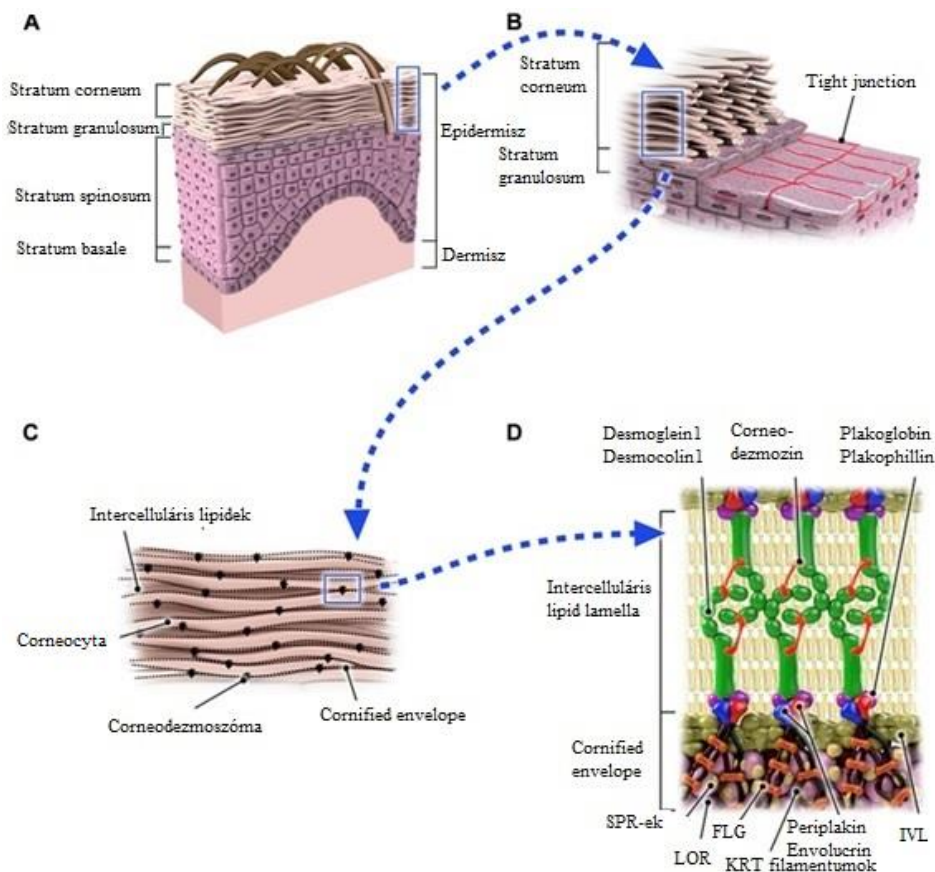
többnyire száraz bőrterületekre (GP) lokalizálódik. Ezen feltételezésünk számos további vizsgálatot igényel a jövőben.

2.4. A permeabilitási barrier

A bőr számos feladata közül az egyik legfontosabb a permeabilitási barrier kialakítása és fenntartása, ezáltal biztosítva az elsődleges védelmi vonalat az emberi szervezet számára a különböző fizikai, biológiai és kémiai stresszel szemben. A permeabilitási barrier funkcióért elsősorban a SC rétege és a SG-ban elhelyezkedő TJ hálózat a felelős (2, 7, 15, 16) (**4. ábra**).

2.4.1. A SC szerkezete

A SC egy rugalmas réteg, melynek vastagsága körülbelül 20 μm (17). Felépítését a fal szerkezetéhez lehet hasonlítani, ahol téglák, habarcs és vasoszlopok vannak jelen, melyek megszilárdítják, és egyben tartják a szerkezetet. A SC-ban a téglákat az elhalt, elszarusodott KC-k, más néven a korneociták reprezentálják, a habarcs funkciót a korneociták közötti lipidek (ceramidok, koleszterol, zsírsav-észterek) és különböző enzimek biztosítják. A sejteket korneodezmoszóma típusú kapcsoló elemek tartják össze, melyek az acélrudak szerepét töltik be a fal megerősítésében. A SC szerkezet kialakulásához a KC-k egy igen összetett és szigorúan szabályozott differenciálódási folyamaton mennek keresztül ez epidermiszben történő vándorlásuk alatt, melyet kornifikációnak nevezünk. A folyamat az epidermális őssejtekből indul ki, melyek átmeneti sejtekké majd végül korneocitákká alakulnak át. A SC egyik fontos feladata a folyamatos hámlás biztosítása, ezzel tartva fenn az epidermisz állandó vastagságát (18).



4. ábra A bőr barrier elemei

FLG: filaggrin; LOR: loricrin, KRT: keratin, IVL: involucrin

(Forrás: Egawa G, Kabashima K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. The Journal of allergy and clinical immunology. 2016;138(2):350-8.e1.)

2.4.1.1. A cornified envelope

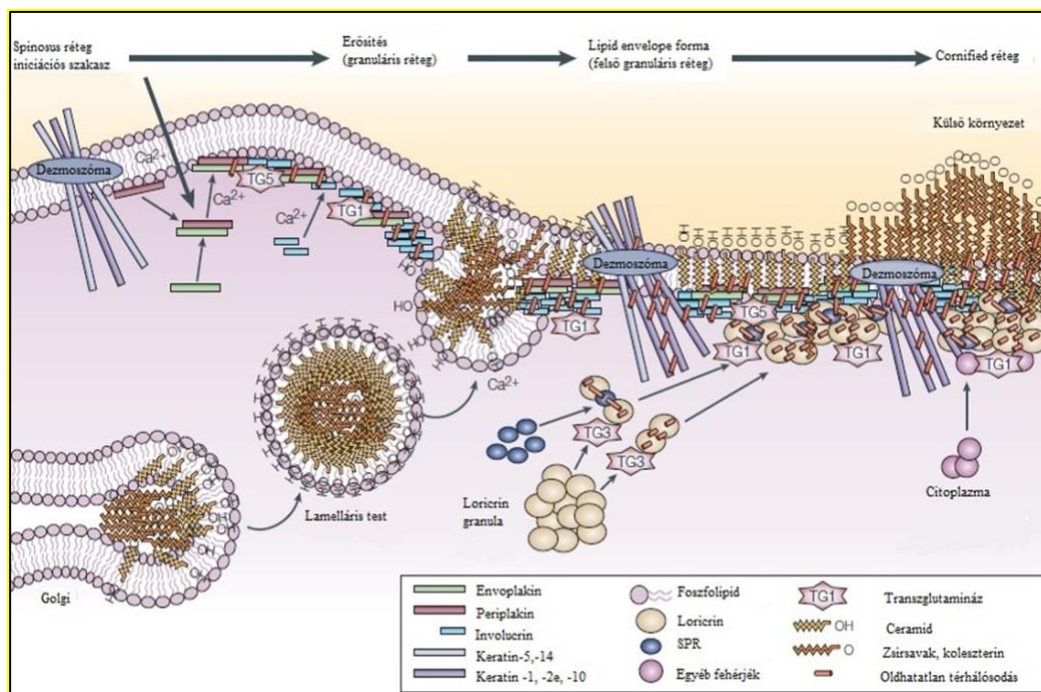
A SC-ban jelenlévő differenciált, sejtmag nélküli KC-k (korneociták) egy oldhatatlan, erős szerkezetet alakítanak ki, melyet cornified envelope-nak (CE) nevezünk, és amely a bőr barrier funkciójának kialakításában és fenntartásában játszik szerepet. A CE lipid és fehérje polimerekből épül fel, melyek között a keresztkötéseket a transzglutamináz (TG) nevű enzimek biztosítják. Ez a komplex szerkezetű, 15 nm vastagságú, erősen térhálós, oldhatatlan fehérje hálózat (envoplakin, periplakin, involucrin, loricrin) a sejtfalhoz hasonlóan ellenálló burokként veszi körül a KC sejtmembránját. Az extracelluláris felülethez egyrétegű ω -hidroxí-ceramidok kapcsolódnak, ezzel erősítve meg a CE merev szerkezetét (15, 19-22).

A CE kialakításában kiemelkedő szerepet játszó fehérjék az involucrin (IVL) és a loricrin (LOR). Az IVL más CE fehérjékhez hasonlóan ismétlődő peptid egységekből áll, és különféle struktúrájú fehérjékkel képes térhálót képezni. A CE kialakulásának első lépésekor, korai komponensként az IVL egy olyan alapvázat képes létrehozni, melyhez több, eltérő szerkezetű fehérje is hozzá tud kapcsolódni. A CE struktúrában az IVL a sejtmembrán mellett helyezkedik el (23). A CE másik fontos fehérjéje a LOR, mely a granuláris rétegben termelődik. Három különálló domén alkotja (glicerin, szerin, cisztein), melyek glutaminban gazdag rövid régiókat tartalmaznak, az N és C terminálisokon pedig glutaminban és lizinben gazdag szekvenciák találhatók (24).

A CE fehérjék közé tartoznak még a late cornified envelope (LCE) és a small prolin rich (SPR) proteinek, illetve az S100A család kalcium-kötő fehérjéi, és a hét ismert S100-fuzionált típusú fehérje (SFTP) is: profilaggrin, hornerin, filaggrin-2, repetin, cornulin, trichohyalin és trichohyalin-like 1 (25, 26). Az SPR proteinek kis (6-18 kDa) prolinban gazdag fehérjék: ezek az SPR1 (2 fehérje), SPR2 (10 fehérje) és az SPR3 (1 fehérje) fehérjék. Az SPR fehérjék glutaminban és lizinben gazdag fej- és farokdomént, valamint egy központi domént is tartalmaznak, amely nyolc (SPR1 és SPR3) vagy kilenc (SPR2) aminosavat tartalmazó ismétlődő peptidegységből áll (24, 27, 28).

A CE-ban előforduló fontos komponens a filaggrin, melynek előalakja a profilaggrin, mely egy nagyméretű (~500 kDa), komplex fehérje. Kezdetben erősen foszforilált állapotban van jelen a keratohyalin granulomokban felhalmozódva, majd a kornifikáció során defoszforilálódik és proteolitikus hasítás következtében filaggrin (FLG) molekulákra hasítódik (29, 30). Az említett proteineket (pl. IVL, LOR, FLG) kódoló gének az epidermális differenciációs komplexben (EDC: Epidermal Differentiation Complex), az 1q21-es régióban helyezkednek el (31). Az EDC-ben található gének a KC-k terminális differenciálódásában és kornifikációjában játszanak szerepet. Az emberekben ez a komplex 1,9 Mbp szakaszon helyezkedik el az 1q21 kromoszómán belül (32, 33). A CE kialakulása több folyamaton keresztül megy végbe. A komplex kialakulásának első szakaszában a SS-ban a KC-k a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} szintre válaszként envoplakint, periplakint és IVL-t kezdenek el termelni (19). Ezt követően az envoplakin és a periplakin heterodimert képez, és az IVL-al együtt a plazmamembrán alatt halmozódnak fel (34). A fehérjék között kialakuló keresztkötések biztosítják a multiprotein egységek együttmaradását, mely kötések a már említett transzglutamináz enzimek (TG1 és a TG5) hozzák létre (35-38). Az IVL, envoplakin és periplakin beépülnek az envelope-ba, majd az SPR proteinek, a LOR és a KRT filamentumok is kapcsolódnak (39).

Fontos, megjegyezni, hogy az IVL fehérje a CE vázaként funkcionál, és ez a scaffold fehérje biztosítja a kötőhelyeket a plakin dimerek és a KRT filamentumok számára, valamint teszi lehetővé a dezmoszómális fehérjékkel való kombinálódásukat (19). A plakin fehérjék keresztkötése az IVL vázhoz, illetve a dezmoszómák és keratinszálak kapcsolódása a CE-hez nagy stabilitást biztosít a korneociták számára (34). A LOR és az SPR fehérjék keresztkötését a TG3 enzim látja el. A két fehérje a sejt perifériájába transzlokálódik, ahol TG1 és a TG5 enzimek biztosítják az IVL vázhoz való kapcsolódásukat (27). Ennek a folyamatnak a többszöri ismétlődése alakítja ki ezt a merev, erős CE szerkezetet, mely szerkezet fehérjéinek 80%-át a LOR teszi ki. Végül az extracelluláris ceramid lipidek kötődését az IVL vázhoz a TG1 enzim biztosítja (23, 34) (5. ábra).



5. ábra A CE kialakulásának lépései

Az első fázis az iniciációs szakasz, mely a spinosus rétegben zajlik, itt történik a CE struktúrális fehérjék szintézise, valamint a specifikus lipidek szintetizálása és szekréciója az intercelluláris térbe. A TG1 és a TG5 keresztköti az envoplakint és a periplakint, ezáltal rögzíti őket a dezmoszómához. A második a megerősítési szakasz, mely a granuláris rétegben zajlik, ahol az egyes lipidek kovalensen kötődnek a CE fehérjékhez, valamint a LOR keresztkötése is megtörténik a kis prolinban gazdag proteinekhez (SPR), melyet a TG3 és a TG1 enzimek végeznek. A lipid envelope kialakulása szintén a granuláris rétegben zajlik, ahol a lamelláris test (LT) lipidjeit (amelyek a Golgi-ból származnak) a keresztkötött proteinekkel (envoplakin, periplakin, involucrin) a TG5 és TG1 köti össze. A megerősítés fázisa és a lipid envelope képződésének lépései egy időben történnek. A CE rétegben lezajló utolsó fázis a LOR és más fehérjék további keresztkötését foglalja magában (TG1 által), valamint az ω -OH-ceramidok, zsírsavak és koleszterin szekréciója is itt történik.

(Forrás: Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nature reviews Molecular cell biology. 2005;6(4):328-40.)

2.4.1.2. Dezmoszóma szerkezete és a korneociták hámlása

A dezmoszóma a KC-k felszínén találhatóak és a szomszédos sejtek közötti kapcsolódást biztosítják. Három fehérje család tagjaiból épülnek fel: a dezmoszómális cadherinekből, valamint az armadillo és plakín nevezetű fehérjékből (34). A SC-ban található KC-k, a korneociták összekötését egy módosított dezmoszóma sejtkepcsoló struktúra, a korneodezmoszóma biztosítja (2, 40). A korneodezmoszóma két fő alkotóeleme a desmoglein-1 (DSG1) és a desmocollin-1 (DSC1), mely glikoproteinek a cadherin Ca^{2+} független sejtadhéziós molekulák családjába tartoznak (27). A DSG1 és a DSC1 képes kölcsönhatásba lépni a plakoglobin és plakophilin nevezetű armadillo fehérjékkel, melyek az envoplakinhoz és periplakinhoz is kötődnek (34, 41, 42). A DSG2 és a DSC2 a bazális, a DSG3 és a DSC3 a bazális és spinosus rétegekben, míg a DSG1 és DSC1 pedig az epidermisz legfelső rétegeiben találhatóak meg (41). A korneodezmoszóma további fontos alkotóeleme egy foszforilált, glikozilált protein, a corneodesmosin (CDSN), ami az epidermisz felső spinosus és granulált rétegeiben expresszálódik (27). A dezmoszóma sejtkepcsoló struktúra fontos morfológiai változásokon megy keresztül a KC-k érése során a cornified réteg eléréséig (43, 44). A bőr hámlásának lényege a korneociták kohéziójának megszűnése, ahol a korneodezmoszóma degradációja a legkülső korneociták egyidejű leválását eredményezi. A folyamatban a kepcsoló struktúra extracelluláris részének proteolitikus hasítása kulcsfontosságú. A korneodezmoszóma lebomlását a SC kimotriptikus enzim (SCCE, kimotripszin-szerű enzim) (45, 46) és a tripszinszerű proteázok végzik (40, 43). A SCCE fontos szerepet játszik az in vivo hámlás folyamatában, a szövetben való elhelyezkedése (az interfollikuláris epidermisz szuprabazális KC-iban fejeződik ki), illetve a katalitikus aktivitása és inhibitor profilja miatt (47, 48). Egyes tanulmányok kimutatták a SCCE jelenlétét a SC extracelluláris terében is, ahová a kornifikáció során került (49). Bár maga a hámlás folyamatának az alapja a korneodezmoszóma proteolitikus degradálódása, emellett még számos más szabályozási mechanizmus is részt vesz a folyamatban. Ide tartozik pl.: az enzim-prekursoroknak és a SC-ban lévő proteáz inhibitoroknak az aktiválása (50), a SC lipid összetételének változásai az intercelluláris térben (51), a víztartalom (52), a SC pH-jának változása (53) illetve a különféle glikozidázok hatásai (54). A korneociták hámlásának szabályozását elsősorban a kallikreinnel (KLK) kapcsolatos szerin-peptidázok (KLK5, KLK7 és KLK14) proteolitikus kaszkádja végzi, melyek a SC-ban katalitikusan aktív formában vannak jelen (55, 56).

A KLK-ek aktivitása a SC-ban a megemelkedett pH-val növekszik, emellett aktivitásukat proteáz inhibitorok szabályozzák, beleértve a Kazal-type 5 szerin proteáz-inhibitor (SPINK5) által kódolt Lympho-epithelial Kazal-type inhibitorokat (LEKTI) (57). A KLK-ek és a LEKTI a lamelláris testekben (LT, Odland testek) tárolódnak kezdetben, majd az intercelluláris térbe a SG-SC határán szekretálódnak (34). Amikor a hámlás folyamata nem megfelelően megy végbe, az itt található különálló sejtek felhalmozódhatnak a bőr felületén (a SC egyidejű megvastagodásával vagy nélküle). A zavar súlyossága a mérsékelttől akár egy súlyosabb állapotig is terjedhet. Amikor a bőrben gyengébb hámlási folyamat megy végbe, annak következményeként a bőrfelületen egy egyenetlen és száraz bőr kombináció jelenik meg, fokozódva pedig vastagabb, erőteljesebb pikkelyesedés jelenhet meg a bőrön, ami például a psoriázisra vagy az ichtiózusra utalhat (47).

2.4.2. *A tight junction*

A TJ megismeréséhez a SG szerepéről szükséges néhány szót ejteni, hisz a SC sejtjein kívül a SG-ban elhelyezkedő sejtek is részt vesznek a fiziko-kémia barrier kialakításában a barriert alkotó összetevők termelésével (58). A SG csupán 2-3 sejsorból áll, mégis két kiemelkedően fontos szerepe van: az egyik, hogy megtermelje azokat az összetevőket, amik a SC erős struktúrájához szükségesek, a másik pedig a TJ réteg kialakítása.

A SG-ban található epidermális sejtek olyan LT-eket tartalmaznak, melyekben különböző, később az extracelluláris térbe jutó komponensek vannak jelen (pl.: lipidek, fehérjék, enzimek). Ezen LT-ek az epidermális sejtek differenciálódása során képesek a tartalmukat a granulosum és a cornified réteg területén az extracelluláris térbe üríteni (20, 34). A SG szerepe fontos az intercelluláris lipidek termelése szempontjából is, hiszen ceramidok, szabad zsírsavak és koleszterin heterogén keverékei termelődnek ebben a rétegben (59).

A SG-ra jellemző keratohialin granulomok fontos komponenseket biztosítanak az előző részben leírt SC rétegnek. A SG nevét is, ezen két membrán által körülhatárolt keratohialin granulomokról kapta, melyek a SC intracelluláris struktúr komponenseit tartalmazzák, mint például a FLG-t, a LOR-t és a KRT filamentumokat (34).

A SG kiemelkedően fontos szerepe a TJ-k képzése. A TJ olyan struktúra, mely nélkülözhetetlen a barrier integritás szempontjából (34). Központi szerepet játszik a sejt adhézióban (epitéliában és az endotéliában), ahol a szomszédos sejtek szabályozott módon kapcsolódnak egymáshoz (60). A TJ funkciója közé tartozik a szöveti barrier kialakítása és fenntartása mellett a különböző molekulák szállításának biztosítása a szervezet különböző területeire (61). A bőrben a TJ-k szorosan zárják a szomszédos KC sejteket, de lehetővé teszik

a víz és bizonyos oldott anyagok szelektív áthaladását **(4. ábra)** (62-64).

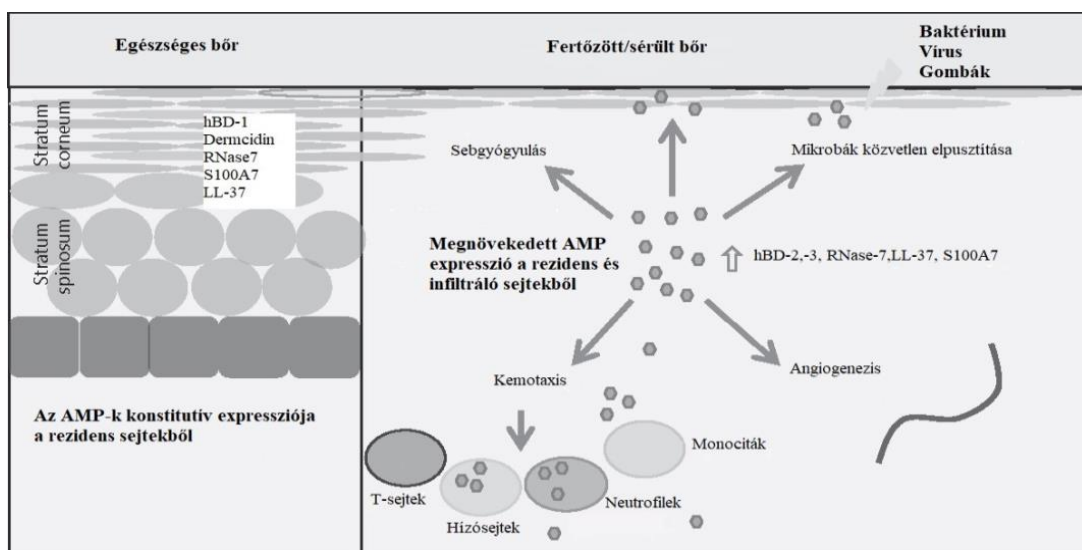
Ezt az intercelluláris junkciót különböző transzmembrán fehérjék alkotják, mint a claudin 1-24 (CLDN), occludin (OCLN), tricellulin, junctionális adhéziós molekula (JAM), citoszolikus schaffold fehérjék (zonulae occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), cingulin, és symplekin (62, 65, 66).

Elsőként az OCLN transzmembrán fehérjét detektálták a TJ-ben, melyhez több funkciót is társítottak (67-69). Az OCLN egy politopikus membránfehérje, amely négy transzmembrán domént, illetve N- és C-terminálisokat is tartalmaz (60, 70-73). A TJ-ben előforduló másik fő transzmembrán fehérje a CLDN, mely négy transzmembrán doménből áll össze (60). A TJ létfontosságú szerepét a bőr homeosztázisában CLDN-1 hiányos egerekkel bizonyították be. A kísérlet során a CLDN1-gyel nem rendelkező rágcsálók a születésük után 24 órán belül súlyos kiszáradás következtében elpusztultak. Viszont ezeknél az egereknél nem figyelték meg a SC komponensek termelődésének rendellenességét (74). A CLDN-ok nemcsak a barrier képződéséért, hanem a para-celluláris út szelektív permeabilitásáért is felelősek (75). A TJ citoplazmatikus schaffold vázát különböző adapter fehérjék biztosítják (ZO-1/2/3, PATJ, Pals1, PAR-3 és PAR-6). Számos protein-protein kölcsönhatást megfigyeltek ezen fehérjék között, ami egy bonyolult fehérjehálózatot eredményezett. Ezeknek a fehérjéknek a nagy része képes kölcsönhatásba lépni a transzmembrán komponensekkel, valamint az f-aktinnal, így ennek a jelentősége az, hogy egy molekuláris hidat képesek képezni az adhéziós fehérjék és a citoskeleton között (60, 76). A SC mellett a TJ-k csak második védelmi vonalként működnek a különböző kórokozókkal szemben. Viszont a TJ elsődleges barrierként is működhet a SC-mentes bőrfüggelékben (pl.: szőrtüszőkben vagy a verejtékmirigyekben) (34).

2.4.3. Antimikrobiális peptidek szerepe a bőrben

Az AMP-k a veleszületett immunválasz mediátorai, melyeket a bőr számos sejt típusa képes termelni (KC-k, hízósejtek, faggyúsejtek, makrofágok, adipociták) (77). 12-50 aminosavból épülnek fel, szerkezetük szerint 4 féle peptidet különböztetünk meg: α -hélix, β -lemez, „extended” és a hurkos fehérje szerkezetűt. Általában a sérült epithélium felszínén termelődnek, mivel fő feladatuk, hogy a gazdaszervezet mikrobiális inváziójának ellenálljanak azáltal, hogy képesek közvetlenül elpusztítani a kórokozókat. Ugyanakkor számos egyéb funkciójuk is felismerésre került, immunsejteket képesek toborozni a károsodott felszínre, citokin/kemokin termelést modulálnak, és egy részük alarmin funkcióval is bír (például LL-37, hBD2, hBD3) **(6. ábra)** (78, 79). Az antimikrobiális aktivitásuk mellett az angiogenezisben és a sebgyógyulásban is fontos szerepet töltenek be (1, 78, 80, 81).

Számos immun-mediált bőrgyógyászati kórképben megfigyelték már az AMP-k patológiásan megemelkedett termelődését, például rosaceában, psoriasisban, AD-ben vagy acne-ban. A bőrben lévő AMP-k legfőbb forrásai a KC-k. A KC-k képesek cathelicidint (CAMP, LL-37), béta-defenzineket (humán β -defensin 1-4), dermcidint (DCD), ribonukleázokat (RNÁZ 5,7), psoriasint (S100A7), SLPI-t (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor), elafint, kemokin ligand 20-at (CCL20), lizozimot és adrenomedulint termelni. Az LL37-nek fontos szerepe van a megfelelő epidermális permeabilitás barrier funkció kialakításában, a citokin és kemokin termelés szabályozásában, emellett stimulálja a sebgyógyulást, angiogenezist, neovaszkularizációt, reepithelizációt, valamint kemotaktikus (monociták, hízósejtek, T sejtek és neutrofil granulociták) hatással is rendelkezik (82, 83). A béta-defenzinek képesek fokozni a monociták, T-limfociták, DC-k és a hízósejtek kemotaxisát a sérülés helyén, ezáltal erősítik a veleszületett és adaptív immunrendszer működését (1, 8, 84, 85). A konstitutívan termelődő AMP-k, mint a psoriasin (S100A7) (86), calprotektin, S100 fehérjék (S100A8/S100A9), valamint az RNáz 7 (87, 88) a bőrnek a SC rétegében is jelen vannak. Ezen kívül például a bőr verejékmirigyeiből szekretálódik a dermcidin vagy a lactoferin, melyek képesek felhalmozódni az emberi bőrben (85, 87, 89, 90).



6. ábra Az AMP-k expressziója és funkciója

Az egészséges bőrben a rezidens sejtek által konstitutívan termelt AMP-k elsődleges védelmi vonalat biztosítanak a kórokozókkal szemben. Ha a bőr barrieret valamilyen fertőzés vagy sérülés éri, abban az esetben az infiltrálódó sejtek magas szintű AMP expressziót biztosítanak, és ezzel párhuzamosan a rezidens KC-k is több AMP-t termelnek. Az AMP-k ezt követően elpusztítják a mikrobákat, gyulladásozó sejteket toboroznak, illetve stimulálják a kemokinek termelődését, az angiogenezist és a sebgyógyulást (human béta defensin: hBD-1,-2,-3.)

(Forrás: Clausen ML, Agner T. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. Current problems in dermatology. 2016; 49:38-46.)

Munkacsoportunk korábbi kutatásai során kimutatta, hogy a topográfiailag eltérő bőrterületeken az anatómiai felépítésben, a kémiai milióban, illetve a mikrobióta összetételben tapasztalható eltérésekkel párhuzamosan a bőr antimikrobiális barrierje (AMP termelése) sem tekinthető már egységesnek: az SGR és AGR bőrterületeken mRNS szinten 2-40-szeres, fehérje szinten 4-9-szeres AMP expressziót detektáltunk a GP bőrfelületekhez képest (13, 14)

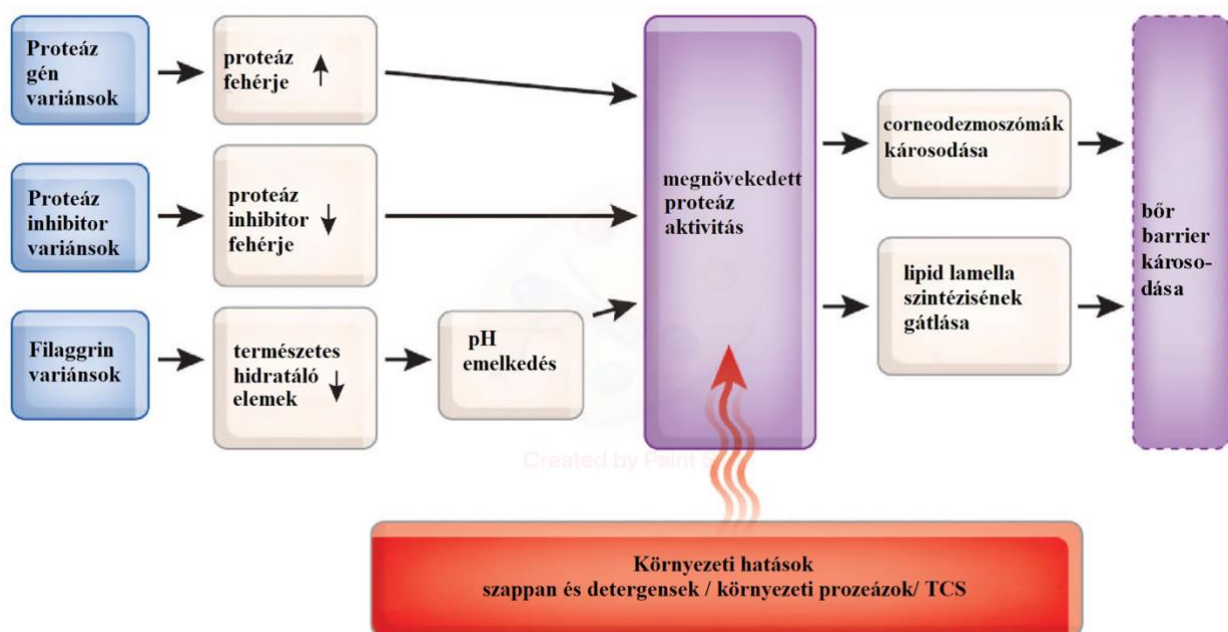
2.5. Barrier károsodáson alapuló betegségek

2.5.1. Atópiás dermatitis (AD)

A bőr permeabilitási barrierjének károsodása patológiás következménnyel járhat. A külső környezettel szembeni védelem csökkenhet, a külvilágból érkező toxinok, allergének, mikrobák könnyebben bejuthatnak a bőrbe, és gyulladásos folyamatokat indíthatnak el (34). Úgyszintén jelentkezhethet a károsodott barrieren keresztül fokozott vízvesztés, és a bőr hidratáltságának csökkenése, mely ugyancsak gyulladást tud elindítani a bőrben. Az AD az egyik ilyen jól ismert, bőr barrier működési defektussal járó krónikus gyulladás. A fejlett országokban a gyermekek körében 15-20%-os gyakoriságú a betegség, a felnőtt lakosság körében 1-10 % közötti prevalencia adatokat közölnek (91). A fejlett országokhoz képest a fejlődő országokban a betegek száma jóval alacsonyabb, de ez a szám folyamatosan emelkedik (92). Az AD kialakulásában genetikai és környezeti faktorok együttesen játszanak szerepet (multifaktoriális kórkép) (**7. ábra**), és ezen faktorok kombinációja határozza meg az AD súlyosságát és kialakulásának valószínűségét (58, 93, 94). Ez a krónikus bőrbetegség főként a száraz, faggyú- és apokrin mirigyben szegény bőrregiókon manifesztálódik (95). Az AD-re jellemző a fokozott Th2 (és kisebb mértékben a Th22/Th17) típusú gyulladás, a gyakori allergiás szenzitizáció környezeti allergénekkal szemben, az érzékeny, száraz bőr megjelenése, a megnövekedett transzepidermális vízvesztés (TEWL) és a bőr csökkent vízmegkötő képessége (7, 17, 96, 97). A legfrissebb kutatások azt bizonyítják, hogy a betegség lényeges eleme az epidermális barrier defektusa (94, 98). AD-ben megfigyelhető a SC károsodása, amely egy vagy több diszfunkció következménye. Ilyen defektus lehet a SC lipidek csökkent szintje, vagy a proteinek genetikai és/vagy szerzett hibái, mint például a FLG mutációja (7, 93, 99-103). Az AD-ban a barrier károsodás és az immunológiai gyulladás kapcsolatára 2 hipotézis létezik. Az „outside-in” elmélet szerint elsőként a barrier károsodása történik meg, és ennek a következményeként aktiválódik a természetes és szerzett immunitás (KC alarmin termelés, IL-25 és IL-33 és TSLP termelés, DC aktiválódás, Th2 aktiválódás). Az „inside-out” teória szerint a barrier károsodása az immunaktiváció hatására alakul ki, vagyis először Th2 típusú gyulladás jelenik meg a bőrben, a képződő IL-4, IL-13 és IL-31

citokinek pedig barrier károsodáshoz vezetnek (83). Az AD több esetben társul más allergiás megbetegedésekkel is, mint például étel allergiával, asztmával vagy allergiás rhinitisszel, melyek megjelenése egymást követi, ezeket együttesen atópiás menetelésnek nevezik (104, 105).

Az AD patogenezisében tehát a permeabilitási barrier károsodása, a KC aktiváció és a Th2 típusú gyulladás egymást kiváltó, erősítő tényezők, melyek egy ördögi kört alkotnak. Terápiásan is egyszerre szükséges a gyulladást kezelni gyulladáscsökkentő készítményekkel és a barrier károsodást reparálni megfelelő barrier helyreállító kezelésekkel. Az AD hatékony kezelése fontos a későbbi allergiás betegségek kialakulásának megelőzése szempontjából is (34).



7. ábra A gének három csoportja, melyek a strukturális, proteáz és proteáz inhibitor fehérjéket kódolják, hozzájárulnak a bőr barrier defektusához AD-ban

A proteáz (például KLK7) és a proteáz inhibitor (CSTA és SPINK5) génekben megjelenő változások közvetlenül a SC fokozott proteáz aktivitásához vezetnek, ami a corneodeszmoszóma lebomlását eredményezi. A FLG-t kódoló FLG gén hiány/mutáció a természetes hidratáló faktor (NMF) szintjének csökkenéséhez vezet az SC-n belül. Amint az NMF-szint csökken, a SC pH-ja emelkedik, ami fokozott proteáz és csökkentett proteáz inhibitor aktivitást, majd csökkent lipid lamella szintézist eredményez. A környezeti irritánsok (szappan és más tisztítószer, háziporlatka és a Staphylococcus aureus elleni exogén proteázok, lokális kortikoszteroidok) tartós használata szintén súlyosbítja a barrier proteolitikus lebontását, ami további, fokozott barrier károsodást eredményez.

(Forrás: Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. The Journal of investigative dermatology. 2009;129(8):1892-908.)

2.6. Rosacea

A rosacea egy gyakori, krónikus immun-mediált gyulladáshoz vezető bőrbetegség, melynek kialakulásának okai még nem teljesen ismertek (106-108). Legfőképpen a SGR bőrrégiókon jelenik meg, leginkább az arcra, az orra és az állra lokalizálódva. A betegség általában a 30-50 év közötti, világos bőrű felnőtteknél jelentkezik, illetve a megfigyelések alapján nőknél nagyobb (2-3x) gyakorisággal fordul elő, mint férfiaknál (109, 110). A gyulladás az európai népesség 2-10%-át érinti. A betegség jellegzetes klinikai tünetei közé tartozik a kipirulás, a tranziens vagy perzisztens erythema, papulák és pustulák megjelenése, illetve a teleangiectasia. Ezen kívül égő, szúró fájdalom, plakkok kialakulása, illetve ödéma és pyhema megjelenése is jellemzi a betegséget (111). A rosaceában négy fő klinikai altípust különböztetünk meg: erythemato-teleangiectaticus (ETR), papulopustulosus (PPR), a phymatosus (PhR) és az ocularis (OR) rosaceát (111, 112). A rosacea patofiziológiája még nem ismert teljeskörűen. Habár a rosacea faggyúmirigyekben gazdag SGR bőrrégióra lokalizálódó bőrbetegség, több bőrgyógyászati közlemény is felhívja a figyelmet arra, hogy a betegek arcbőre súlyosan száraz és érzékeny. A bőrszárazságon kívül funkcionális vizsgálatok azt is kimutatták, hogy rosaceában az arc bőrének permeabilitási barrier funkciója jelentősen károsodott. Ezen vizsgálatok során a betegek lézionális bőrében jelentősen megemelkedett pH-t és transepidermális vízvesztést (transepidermal water loss TEWL) mértek, a bőr hidratáltsági szintje viszont csökkent (113, 114). A barrier károsodását molekuláris szinten még nem vizsgálták rosaceás betegek bőrében. Rosaceában a barrier károsodás bizonyos jelei mellett a patogenezisben kiemelt szerepet játszik még a veleszületett (KC, DC, makrofágok, neutrofil granulociták) és szerzett immunválasz (T sejtek) sejtjeinek fokozott aktivitása, illetve érrendszeri és idegrendszeri diszfunkciók (115, 116). A felsorolt tényezők közötti összefüggések, a betegség kialakulásának elsődleges lépései azonban nem teljesen ismertek.

2.6.1. A rosaceát kiváltó és fokozó faktorok

Számos esetben megfigyelték, hogy bizonyos környezeti tényezők/ingerek a veleszületett immunrendszer sejtjeit aktiválják rosaceás bőrben. A betegséget kiváltó és a tüneteket súlyosbító külső triggerok közé soroljuk a hőmérséklet ingadozásait (erős hideg vagy meleg környezet), az erős fizikai vagy lelki stresszt, napfényt, fűszeres ételeket, forró italokat, a dohányzást, az alkoholfogyasztást, illetve a Demodex folliculorum atka megnövekedett mennyiségét. Egyes gyógyszerek szedése is kiváltó faktor lehet rosaceában, mint a niacin, anticoncipiensek és sympathomimetikum tartalmú készítmények, de akár egy kozmetikum vagy a terhesség, illetve benzoyl-peroxid vagy tretionin lokális kezelések is beindíthatják,

vagy ronthatják a betegség tüneteit (117, 118). Ezek a külső ingerek képesek aktiválni a bőr veleszületett immunsejtjeit, elsősorban a KC-kat, majd a szerzett immunválasz sejtjeinek aktiválódása következik be (lásd később). Rosaceában a neuroimmun kommunikáció és a bőr vaszkulátúra kóros diszfunkciója is jellemző, melyet kiválthatnak közvetlenül a külső ingerek vagy már az aktivált veleszületett immunválaszi folyamatokon keresztül is kialakulhat (119, 120). A kiváltó ingerekkel kapcsolatos vizsgálatok közül legtöbb tanulmány a kommenzális szaprofita atkáról, a *Demodex folliculorum*-ról készült, ami a faggyúmirigy és a haj folliculusokkal rendelkező területeken fordul elő. Leggyakrabban a homlok, az orcák, az orr és az áll területén kolonizál (121). A *Demodex* előfordulása életkortól függ: a csecsemők bőrén még nem, míg az idősök bőrén közel 100%-ban jelen van. Maga a kolonizáció gyerek és fiatal felnőtt korban kezdődik, és általában a felnőtt emberek 20-80%-ában fordul elő. Több vizsgálat is azt találta, hogy a rosaceás bőrben a *Demodex* sűrűsége magasabb (5-10 atka/cm²), mint az egészséges bőrön (0,7 atka/cm²) (122, 123). Egyes kutatók felvetették annak lehetőségét, hogy az epitheliális sejtek károsodásával, az epitheliális barrieren keresztül az atka a dermiszbe bejutva stimulálja a Toll-like receptorokat (124). Ugyanakkor ezt sokan megkérdőjelezik, hiszen a bizonyított kolonizáció nem ad arra teljes magyarázatot, hogy ez az ártalmatlan mikrobióta atka hogyan indítja el a gyulladást, és miért csak egyes embereknél váltja ki azt. Van olyan feltételezés is, miszerint a *Bacillus oleronius* az igazi patogén rosaceában, és a *Demodex* csak vektorként van jelen a gyulladásban, mivel ez a baktérium a *Demodex*-ben található meg (125). A felsorolt, rosaceát indukáló mindennapos külső ingerekre, környezeti tényezőkre az emberek többsége toleranciával válaszol. Felmerül tehát a kérdés, miért váltanak ki ezek az ártalmatlan ingerek gyulladást rosaceás betegeknél és miért csak az arcbőrükön jön létre ez a gyulladás. Ezzel kapcsolatban még számos kérdés megválaszolatlan.

2.6.2. *A veleszületett és az adaptív immunrendszer működése rosaceában*

A KC-k számos sejt felszíni és citoplazmatikus receptort tartalmaznak, melyek különböző külső ingereket képesek érzékelni (kémiai, fizikai, biológiai ingerek). A KC-k a felszínükön Toll-Like (TLR) 1,2,4,5,6 receptorokat, a citoplazmában TLR3,9-et képesek expresszálni, és indukáltan a TLR7 receptort is. Ezen receptorokon keresztül képesek a KC-k az úgynevezett PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) molekulák felismerésére, melyek a különböző patogénekből származó mikrobiális termékek együttese (126). A KC-k citoplazmájában lévő NLR (NOD-like Receptor) receptorokkal pedig képesek a DAMP (Danger Associated Molecular Pattern) molekulákat felismerni, melyek a különböző toxinok,

irritánsok és haptének származékai (127). Amikor ezek a molekulák a megfelelő receptoraikhoz kötődnek, a KC-k különböző szignálútvonalai aktiválódnak. Ez egyrészt az AMP-k termelésével a kórokozók elpusztítását segíti elő, illetve a citokin és kemokin termelés elindításával a veleszületett és az adaptív immunrendszer aktivitásához járul hozzá (126, 128). Rosaceában a KC-k kóros érzékelő működését figyelhetjük meg. A vizsgálatok kimutatták a TLR2 receptor fontos, központi szerepét a rosacea kialakulásában, mivel magas expresszióját figyelték meg a rosaceás betegek epidermális KC-iban (129). A vizsgált betegek bőrében ugyancsak kimutatták, hogy az AMP-k közül a cathelicidin és aktív alakja (LL37) minden rosacea altípusban megemelkedett, mRNS és fehérje szinten is (119). A magas AMP szint a TLR2 receptor aktiválódásának az egyik következménye, ezzel bizonyítva ezen receptor fontosságát a betegségben (129, 130). A legelfogadottabb hipotézis, hogy először a TLR2 receptor aktiválódása történik meg valamilyen trigger hatására a KC felszínén, ezt követően további útvonalak bekapcsolásával a KC-k TNF és IL-1 pro-inflammatorikus citokineket, illetve LL37-et kezdenek el termelni, kemokin termelés beindítása mellett. Következő lépésként a Th17 sejtek IL-17 és IL-22 citokineket kezdenek el termelni, melyek tovább aktiválják a KC-kat, amik ezt követően CCL20, CCL5, CXCL1 és CXCL8 kemokineket szekretálnak (131, 132). Végül a Th17, Th1 sejtek és a neutrofilek fokozott beáramlása a bőrbe kialakítja a rosaceára jellemző gyulladást.

2.6.3. A rosaceában megjelenő vaszkuláris, neuroimmun és neurovaszkuláris eltérések

A rosaceás betegekre jellemző (ETR, PPR, Phr csoportban) a kifejezett érpermeabilitás és vazodilatáció, illetve a fokozottan előforduló IL-17 jelenlét, ami egy angiogenezist is indukáló citokin, így vaszkularizációs elváltozásokat képes indukálni (133-135). A betegségben kezdetben átmeneti jellegű, majd állandósuló vazodilatáció jelentkezik, ennek során teleangiectasiák alakulnak ki az arc bőrében (136). Rosaceában a KC-k receptorain kívül a bőr idegvégződéseiben található receptorok is kóros módon érzékelik a külvilág triggereit. Ennek vizsgálata során bizonyos kutatások megerősítették, hogy a TRPV1⁺ (tranzien receptor potencial vanilloid 1⁺) idegvégzések száma, melyek különböző külső ingereket érzékelnek (stressz, meleg -fűszeres ételek, fizikai aktivitás) megemelkedik rosaceás bőrben (137). Ezen receptorok külső faktorok fokozott érzékelésével vazodilatációt, neurogén gyulladást okozhatnak neuropeptidek felszabadítása útján (137-142).

3. CÉLKITŰZÉS

3.1. Az egészséges bőr permeabilitási barrier vizsgálata

Korábbi kutatások rávilágítottak arra, hogy a topográfiailag eltérő egészséges bőrterületeken a mikrobióta összetétel, a kémiai milió és az immunrendszer aktivitása eltérő. Saját kutatásaink szerint a bőr antimikrobiális barrierje sem tekinthető egységesnek, jelentős különbségeket detektáltunk a mirigyekben gazdag (SGR, AGR) és mirigyekben szegény (GP) régiók AMP expressziója között. Mivel a bőr antimikrobiális és permeabilitási barrierje szoros kapcsolatban áll egymással, célul tűztük ki, a permeabilitási barrier két fő elemének, a SC-nak és a TJ rétegnek gén és fehérje expressziós vizsgálatát, illetve organizációjuk tanulmányozását a különböző egészséges (SGR, GP és AGR) bőrrégiókban.

Kutatásunk során az alábbi vizsgálatok elvégzését tűztük ki célul a három egészséges bőrrégióban:

1. A transzepidermális vízvesztés (TEWL) vizsgálata a permeabilitási barrier működésének tanulmányozása céljából (funkcionális vizsgálatok)
2. A SC molekulák gén [RNA Seq, Kvantitatív Valós-idejű Polimeráz Láncreakció (QRT-PCR)] és fehérje [immunhisztokémia (IHC)] szintű vizsgálata:
 - a, CE intracelluláris struktúrmolekulák
 - b, korneocita deszkvamációban és az intercelluláris lipid lamellák kialakításában szerepet játszó molekulák
 - c, korneodezmoszómák szerveződésében szerepet játszó komponensek
3. TJ molekulák gén (QRT-PCR) és fehérje (IHC) szintű vizsgálata
4. A fent említett molekulák organizációjának vizsgálata (konfokális mikroszkópia)

3.2. A permeabilitási barrier vizsgálata rosaceában

Mivel a rosacea, ami a faggyúmirigyben gazdag arc bőr krónikus betegsége, súlyos bőr szárazsággal, emelkedett pH-val és transepidermális vízvesztéssel, valamint csökkent hidratáltsággal jellemezhető, ami barrier károsodásra utal, célul tűztük ki a permeabilitási barrier molekuláris szintű vizsgálatát rosaceában, SGR bőrhöz hasonlítva:

1. Célul tűztük ki a génextpressziós mintázatok különbségeinek feltárását teljes transzkriptom analízissel
2. A SC és a TJ barrier molekulák gén (QRT-PCR) és fehérje (IHC) szintű vizsgálatait:
 - a) CE képzésében résztvevő molekulák
 - b) Intercelluláris lipid lamellák képződésében szerepet játszó molekulák
 - c) Korneodezmoszóma komponensek és a korneociták leválásáért és keresztkötések kialakításáért felelős enzimek
 - d) TJ komponensek
 - e) Az immunológiai barrier kialakításában résztvevő AMP-k
3. További célunk volt a rosacea és az AD permeabilitási barrier jellegzeteségeinek összehasonlítása IF módszerrel

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Bőrbiopsziás minták gyűjtése és feldolgoása

A vizsgálatainkhoz immun-mediált bőrbetegségben szenvedő betegektől és egészséges személyektől punch biopsziákat ($0.5-1\text{cm}^2$) gyűjtöttünk. Az első vizsgálatunkhoz plasztikai műtéten átesett egészséges személyek különböző bőrterületeiről szereztük be a biopsziás mintákat: 8 faggyúmirigyben gazdag (SGR), 8 faggyúmirigyben szegény (GP) és 8 apokrin mirigyben gazdag (AGR) bőrrégióból származott. A másik vizsgálatunkhoz 8 papulopustularis rosaceában (PPR) szenvedő beteg léziós arcbőréből és 8 egészséges személy SGR bőrterületéről nyertük ki a mintákat (**1. táblázat**). Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) és a Debreceni Egyetem Regionális Etikai Bizottsága engedélyezte a kutatást. A műtétek előtt a donorok a Helsinkai Nyilatkozat irányelveinek megfelelően írásbeli beleegyezésüket adták a bőrminták kutatási célból való felhasználására. Minden egyes begyűjtött bőrbiopsziás mintát két részre vágtuk. Az egyik felét formalinos fixálást követően paraffinba ágyasztuk immunhisztokémiai (IHC) és immunfluoreszcens (IF) vizsgálatokhoz, míg a minta másik részét QRT-PCR vizsgálatra használtuk fel, melyet -70°C -on tároltunk RNA *later* oldatban (Qiagen, Hilden, Németország) az RNS izolálás megkezdéséig. A beágyazott mintákon haematoxylin-eozin festést végeztünk, majd ezt követően fénymikroszkópos vizsgálattal (10x-es nagyítás) a szövettani mintákat 3 csoportba soroltuk be a faggyúmirigyek és apokrin mirigyek száma alapján. A mintát GP-ként definiáltuk, ha az egységnyi területre eső faggyúmirigyek száma $n \leq 1$ és SGR-ként, ha $n \geq 3$ volt, illetve a metszetet akkor tekintettük AGR-nek, ha az apokrin mirigyek száma $n \geq 2$.

1. táblázat: Az RNS szekvenálási, QRT-PCR, immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra felhasznált teljes vastagságú bőrbioptziák összefoglaló táblázata

1.vizsgálat

Donorok	Életkor	Nem	Lokalizáció
GP (n=8)			
SGP 1	43	nő	Felkar
SGP 2	66	nő	Boka
SGP 3	50	nő	Felkar
SGP 4	52	nő	Lábszár
SGP 5	25	férfi	Felkar
SGP 6	50	férfi	Lábszár
SGP 7	65	férfi	Felkar
SGP 8	67	férfi	Lábszár
Átlag életkor±SD	52,2±14,1		
SGR (n=8)			
SGR 1	42	férfi	Orr
SGR 2	61	férfi	Homlok
SGR 3	62	nő	Áll
SGR 4	66	férfi	Orr
SGR 5	38	férfi	Arc
SGR 6	69	nő	Homlok
SGR 7	68	férfi	Orr
SGR 8	67	férfi	Arc
Átlag életkor±SD	59,1±12,2		
AGR (n=8)			
AGR 1	70	férfi	Hónalj
AGR 2	43	férfi	Hónalj
AGR 3	48	nő	Hónalj
AGR 4	65	nő	Hónalj
AGR 5	60	nő	Hónalj
AGR 6	38	nő	Hónalj
AGR 7	45	nő	Hónalj
AGR 8	51	nő	Hónalj
Átlag életkor±SD	51,2±12		

2. vizsgálat

Donorok	Életkor	Nem	Lokalizáció
SGR (n=8)			
SGR 1	77	nő	Hajas fejbőr
SGR 2	62	férfi	Állkapocs
SGR 3	57	nő	Orr
SGR 4	61	nő	Orr
SGR 5	42	nő	Lapocka
SGR 6	38	nő	Áll
SGR 7	47	férfi	Arc (középső rész)
SGR 8	66	férfi	Arc (középső rész)
Átlag életkor±SD	56,25±13,11		
Rosacea (n=8)			
ROS 1	36	nő	Homlok
ROS 2	53	nő	Orr
ROS 3	60	nő	Áll
ROS 4	79	férfi	Orr
ROS 5	71	férfi	Orr
ROS 6	69	nő	Homlok
ROS 7	57	nő	Homlok
ROS 8	50	nő	Áll
Átlag életkor±SD	59,38±13,59		

Az egészséges kontrollok és a papulopustulózis rosacea betegek vizsgált bőrmintáinak jellemzői. Rövidítések: SD, standard eltérés; ROS, rosacea; SGR, faggyúmirigyben gazdag; GP, faggyúmirigyben szegény; AGR, apokrin mirigyben gazdag

4.2. RNS izolálás, Reverz Transzkripció

Az RNA *later*-ben tárolt mintákat a subcutis (bőr alatti zsírszövet) eltávolítását követően Tri Reagens oldatban (Sigma-Aldrich, Dorset, Egyesült Királyság) homogenizáltuk Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Németország) szövet lizáló készülékben, előzőleg autoklávozott acél golyók alkalmazásával (Qiagen). A homogenizálást követően a bőrmintákból trizolos protokoll szerint RNS-t izoláltunk. Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Bioscience, Budapest, Magyarország) ellenőriztük. Az RNS minőségét Agilent 2100 bioanalizátorral (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató

Laboratóriumának munkatársai ellenőrizték. A QRT-PCR-hez 1 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé (komplementer DNS), melyet egy DNáz I enzim (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kezelés előtt meg az esetleges genomiális DNS szennyezések megelőzése érdekében. A cDNS szintézist High Capacity cDNA Archive Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával a gyártó által ajánlott protokoll szerint végeztük.

4.3. Kvantitatív Valós-idejű Polimeráz Lánreakció (QRT- PCR)

A QRT-PCR vizsgálatokat a gyártó által tervezett FAM-MGB assay-vel (Thermo Fischer, Budapest, Hungary), illetve a TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával, triplikátumban végeztük. A mérésekhez ABI PRISM® 7000 szekvenáló készüléket használtuk. A célgének relatív mRNS szintjét a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel határoztuk meg, minden esetben a PPIA mRNS expresszióra normalizálva. A vizsgálatoknál alkalmazott primerek listáját a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat: A QRT-PCR kísérletek során használt assay-k

Target molekula	Assay ID	Target molekula	Assay ID	Target molekula	Assay ID	Target molekula	Assay ID
ABCA12	Hs00292421_m1	FLG	Hs00856927_g1	KRT79	Hs00418343_m1	S100A7	Hs00161488_m1
CDH1	Hs01023895_m1	KLK5	Hs00909973_m1	LCE1D	Hs04224967_gH	S100A8	Hs00374264_g1
CDSN	Hs00169911_m1	KLK7	Hs00909973_m1	LCE1F	Hs00820275_sH	S100A9	Hs00610058_m1
CLDN1	Hs00221623_m1	KLK14	Hs00983577_m1	LCN2	Hs01008571_m1	SPRR1A	Hs00954595_s1
CLDN16	Hs00198134_m1	KRT1	Hs00196158_m1	LL37	Hs00189038_m1	SPRR2A	HS03046643_s1
CLDN23	Hs01013638_s1	KRT6A	Hs01699178_g1	LOR	Hs01894962_s1	TGM1	Hs00165929_m1
DEFB4B	Hs00175474_m1	KRT10	Hs00166289_m1	OCLN	Hs00170162_m1	TGM3	Hs00162752_m1
DSC1	Hs00245189_m1	KRT16	Hs00373910_g1	PKP1	Hs00240873_m1	TGM5	Hs00909973_m1
DSG1	Hs00355084_m1	KRT17	Hs00356958_m1	PPIA	Hs99999904_m1	TSLP	Hs00263639_m1

Rövidítések: ABCA12, ATP-binding cassette sub-family A member 12; CDH1, cadherin-1; CDSN, corneodesmosin; CLDN, claudin; DEFB4B, defensin beta 4B; DSC1, desmocollin-1; DSG1, desmoglein-1; FLG, filaggrin; KLK, kallikrein; KRT, keratin; LCE, late cornified envelope; LCN2, lipocalin-2; LL37, cathelicidin; LOR, lorcrin; OCLN, occludin; PKP1, plakophilin-1; PPIA, peptidylprolyl Isomerase A; S100A, s100 calcium-binding protein-A; SPRR, small prolin rich protein ; TGM, transglutamináz; TSLP, Thymic Stromal Lymphopoietin

4.4. Az RNS szekvenálás (RNAseq)

Az RNS szekvenáláshoz először cDNS könyvtárat hoztunk létre 1µg teljes RNS felhasználásával, TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) segítségével a gyártó által előírt protokoll alapján. A poli-A végű RNS-eket oligodT-konjugált mágneses gyöngyökkel tisztítottuk meg, majd fragmentálásuk 94°C-on 8 percen keresztül zajlott. Az egyszálú cDNS átírásához random primereket és SuperScript II reverz transzkriptáz enzimet (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A következő lépésként a második szál cDNS szintetizálása következett. A duplaszálú cDNS végek kijavítása és a 3' végek adenilálása után az Illumina index adapterek mintához történő ligálása történt meg. Majd PCR-rel amplifikáltuk az adapterrel ligált cDNS fragmenseket. A cDNS fragmentumok méret eloszlását és molaritását Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip-en (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ellenőriztük le.

Az RNS-szekvencia könyvtárakat a szekvenálás előtt 10nM-os koncentrációra állítottuk be és az 5 könyvtárat pool-oztuk. A szekvenálás egy Illumina HiScan SQ készüléken (Illumina, San Diego, CA, USA) zajlott egyirányú 50bp-os szekvencia futtatással, ahol mintánként 16-18 millió leolvasást kaptunk. A minőségellenőrzéshez és a de-multiplexeléshez a CASAVA szoftvert alkalmaztuk. Ezután a szekvenált adatok illesztése Human Genom v19-re TopHat és Cufflinks algoritmusok alkalmazásával történt meg, így bam fájlokat hoztunk létre. A további statisztikai elemzésekhez a StrandNGS szoftvert használtuk, a bam fájlok importálása és normalizálása pedig a DESeq szoftver segítségével valósult meg. A statisztikailag szignifikáns génexpressziós minták azonosításához nem-paraméteres Wilcoxon Mann-Whitney tesztet használtuk. A könyvtárkészítést, a szekvenálást és az azt követő adatok elemzését a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában Dr. Póliska Szilárd végezte el. Az RNS szekvencia adatok egy részét (SGR1-SGR6 minták) korábban közzétettük és a Sequence Read Archive (SRA) adatbázisban, a (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) PRJNA421246 hivatkozási szám alatt megtalálható. Míg az SGR7, SGR8 és ROS1-ROS8 minták az SRA adatbázisban a PRJNA592080 hivatkozási szám alatt érhetőek el.

4.5. Útvonal analízis/pathway analízis

A DEG (eltérően expresszált gének) funkciójának azonosítása során többféle bioinformatikai elemzést is elvégeztünk, a Cytoscape CluGo alkalmazásával, több adatbázis felhasználásával: Gene Ontology (GO), Biological Process (BP), GO Immune System Process (ISP), GO Molecular Function (MF), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG), Reactome Pathway és Reactome Reactions. Először, a DEG-ek általános biológiai funkciójának azonosítása során „pathway enrichment” analízist végeztünk minden eltérően expresszált génre, ha az (fold change) $FC \geq 1,5$ volt. A statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) „feldúsult” útvonalak azonosításának érdekében a következő kritériumokat alkalmaztuk: az útvonalaknak legalább 50 gént kellett tartalmaznia az általunk bevitt génlistánkon szereplő gének közül. Ezután elvégeztünk egy második, szigorúbb kritériumú útvonal analízist, hogy részletesebben betekintést nyerjünk a barrierrel kapcsolatos szignifikáns DEG-ek funkcióival kapcsolatban. Az up- és downregulált DEG-eket két különböző klaszteranalízisnek vetettük alá a ClueGO pathway enrichment analízis során.

Az alapján, hogy a DEG-ek nagy része upregulált (kb. 61%), az analízis kritériumai eltérőek voltak az up- és downregulált gének esetében. Az upregulált gének klaszterének legalább 30 gént kellett tartalmaznia a bevitt génlistából valamint az egyes útvonalakra jellemző géneknek legalább a 20%-át, míg a downregulált gének klaszterének esetében legalább 18 gént kell tartalmaznia a bemenő génlistánkból és az egyes útvonalakra jellemző gének legalább 12%-át. A fenti megközelítés lehetővé tette számunkra az egyes útvonalakhoz tartozó up- és downregulált DEG-ek megkülönböztetését és megjelenítését is.

4.6. Immunhisztokémia (IHC), immunfluoreszcens (IF) és rutin festések

Az IHC vizsgálatokhoz a beteg és egészséges donoroktól származó bőrmintákból paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk. A vizsgálat során a metszeteket először deparaffináltuk, következő lépésként rehidratáltuk, majd hővel indukált antigén feltárást végeztünk. A metszeteken egy 15 perces 3%-os H_2O_2 -dal történő előkezelést is alkalmaztunk az endogén peroxidázok gátlásának érdekében. A festések során elsődleges anti-humán antitesteket használtunk, melyet a **3. táblázat** foglal össze.

3. táblázat Az IHC vizsgálatok során alkalmazott elsődleges antitestek

Antitest neve	Klonalitás	Izotípus	Gyártó	Katalógus szám
CDSN	Poliklonális	nyúl, IgG	Sigma-Aldrich	HPA054184
CLDN1	Poliklonális	nyúl, IgG	Abcam	ab15098
DSG1	Poliklonális	nyúl, IgG	Novus Biologicals	NBP184567
FLG	Monoklonális	egér, IgG	Abcam	ab218862
KRT1	Monoklonális	nyúl, IgG	Abcam	ab185628
KRT6	Monoklonális	egér, IgG	Abcam	ab18586
Lipocalin/NGAL	Poliklonális	nyúl, IgG	Invitrogen	PA5-32476
LOR	Monoklonális	nyúl, IgG	Novus Biologicals	NBP1-33610
S100A8	Poliklonális	nyúl, IgG	Invitrogen	PA532476
TGM5	Poliklonális	nyúl, IgG	Abcam	ab133786

Rövidítések: CDSN, corneodesmosin; CLDN, claudin; DSG1, desmoglein-1; FLG, filaggrin; KRT, keratin; LOR, loricrin; S100A, s100 calcium-binding protein-A; TGM, transglutamináz

Ezt követően Horseradish peroxidase (HRP)-konjugált (Biogenex, Ferment, CA) másodlagos anti-egér/anti-nyúl antitesteket alkalmaztunk. A mintákat az antitesttel történő inkubálás előtt és után is 3x5 percig mostuk, majd a festődés detektálására ImmPACT™ NovaRED™ Kit-et (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) vagy 3,3'-Diaminobenzidine-t (DAB) (Dako) használtuk. A metszeteken metil-zölddel történő háttérfestést is alkalmaztunk. A folyamat utolsó lépéseként a megfestett metszeteket a dehidratálást követően fedőlemezzel fedtük le. Az aktuálisan vizsgált fehérjék előhívása párhuzamosan zajlott az összes metszeten annak érdekében, hogy a vizsgált protein expressziók egymással összehasonlíthatóak legyenek a kiértékelés során. Pozitív, Ig és izotípus kontrollakat is alkalmaztunk a fehérjék [egér IgG2a Kappa (Covalab) és a nyúl immunoglobulin frakció (Sigma-Aldrich)] festésének normalizálásához.

Az IF festések, hasonlóan az IHC festésekhez, deparaffinált metszeteken történtek, és a kísérlet menete a másodlagos antitest alkalmazásáig hasonlóan történt. A primer antitestekkel (LOR, DSG1, KRT6 és S100A8) való inkubálás után Alexa Fluor™ 555 goat anti-mouse IgG (H + L) és/vagy Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (H + L) másodlagos

antitesteket alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific).

A haematoxylin-eozin festéseket intézetünk szövettani laboratóriumában dolgozó asszisztensek végezték el az egészséges bőrterületekről származó mintákon, a faggyúmirigyek számának meghatározása céljából.

4.7. Metszetek digitalizálása Whole-slide imaging-gel

A metszetek digitalizálása egy Zeiss sima-apokromatikus objektívű és Hitachi 3CCD progresszív scan color kamerával felszerelt Panoramic SCAN digitális metszet szkennelvel történt. Az immunfestések kiértékelését pedig a Panoramic Viewer 1.15.2 szoftver (3D Histech) HistoQuant applikációjának a segítségével végeztük. A kiértékelés során elsőként kiválasztottuk a vizsgálni kívánt területeket [Regions of interest (ROI)] (n=20/slide), majd a szoftver segítségével lemértük az összterületet [Field area (FA)(mm²)] és a maszkolt területet [Mask area (MA)(mm²)]. A MA reprezentálja a pozitív területeket, míg a FA a ROI-k összterületét adja meg. Minden ROI esetében kiszámoltuk az MA/FA értékeket.

4.8. Transzepidermális vízvesztés mérése

A méréseket 22–25 °C hőmérsékletű, 40–60% -os páratartalmú standardizált laboratóriumi körülmények között végeztük el, egészséges egyéneken (n=30), legalább 15 perces akklimatizáció után. A TEWL (g/hm²) méréséhez a Tewameter TM300 (Courage és Khazaka, Köln, Németország) műszert használtuk. A méréseket három különböző bőrrégióban végeztük el: alkaron (GP régió), homlokon (SGR régió) és a hónaljban (AGR régió). Egy-egy régióban 3 mérést végeztünk, mely minden esetben 30 másodpercig tartott.

4.9. Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópiához minden mintacsoportból négy, paraffinba ágyazott 40 µm-es metszetet használtunk fel. A minták deparaffinálása után hővel indukált antigén feltárást végeztünk. A festéshez elsődleges (anti-humán CLDN1: rabbit poliklonális IgG, ab15098, Abcam; anti-humán DSG1: egér monoklonális IgG,129204, Novus; anti-humán CDSN, nyúl poliklonális IgG, HPA054184, Sigma-Aldrich) és másodlagos (Alexa FluorTM 488 és 555 kecske anti-egér IgG [H+L], Thermo Fisher Scientific) antitestekkel inkubáltuk a mintáinkat, előbbivel 48 órán át 4 °C-on, míg utóbbival 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Végül a mintákat tárgylemezre helyeztük, és VECTASHIELD[®] HardSetTM Antifade DAPI mounting médiummal fedtük le (Vector Laboratories). Az immunfestett minták képalkotását egy 60-szoros olajimmerziós lencsével (NA: 1,42) rendelkező konfokális eszközzel, az Olympus FV3000 készülékkel végeztük el. Az előre meghatározott beállítások

(lézer teljesítmény, konfokális rekesz és erősítés, detektor paraméterek) minden mintánál azonosak voltak. Több 1 μm vastag optikai metszet jött létre, 0,5 μm -re elkülönülve a Z tengely mentén.

A képek feldolgozását az Adobe Photoshop CS5 szoftver segítségével készítettük el. A zöld és piros csatornák vonalprofiljait a FIJI képelemző csomag segítségével mértük le és ábrázoltuk. Mivel a ROI-k különböző hosszúságúak voltak, csak az első 50 mikrométert hasonlítottuk össze a SG-től kiindulva. A DSG1 és a CLDN immunfestés rendszerességét úgy analizáltuk, hogy megmértük a szomszédos immunfestett pontok közötti távolságot a sejtmembrán keresztmetszete mentén (zárt vonal a DAPI-festett mag körül a SG régióban). Egy adott bőrtípusban 100 pont közötti távolságot mértünk.

4.10. Statisztikai analízis

Az adatok eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Mivel az adataink normális eloszlást mutattak, így a két mintacsoportot kétmintás t-teszt használatával hasonlítottuk össze. A csoportok közötti különbségeket átlag \pm 95% -os konfidencia intervallum (átlag \pm 95% CI) ábrázolásával mutattuk be. A statisztikailag szignifikáns különbségek határát a $p < 0,05$ értéknél állapítottuk meg (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). A statisztikai analíziseket a 6-os verziójú GraphPad Prism szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) és az SPSS 25 (SPSS csomag Windows, Chicago, IL, USA) alkalmazásával végeztük el.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az egészséges bőr permeabilitási barrier vizsgálatai

Korábbi kutatásaink során kimutattuk, hogy a bőr antimikrobiális barrierje nem tekinthető egységesnek, jelentős különbségeket detektáltunk a mirigyekben gazdag (SGR, AGR) és mirigyekben szegény GP régiók AMP expressziója között (13, 14). Mivel a bőr antimikrobiális és permeabilitási barrierje szoros kapcsolatban áll egymással (82, 143-145), ezért célul tűztük ki a permeabilitási barrier két fő elemének, a SC és a TJ réteg molekuláinak vizsgálatát gén és fehérje expresszió és fehérje organizáció szinten, valamint funkcionális méréseket terveztünk a permeabilitási barrier működésének pontos elemzése céljából. A SC komponensek közül a CE kialakításában, a korneocita deszkvamációban, az intercelluláris lipid lamellák kialakításában, és a korneodezmoszómák szerveződésében szerepet játszó legfontosabb molekulákat vizsgáltuk a TJ molekulák mellett.

5.1.1. A TEWL mérése a különböző bőrrégióban

Elsőként a permeabilitási barrier funkcionális vizsgálatát végeztük el 30 egészséges személy bevonásával. A TEWL mérése a három ismert bőrrégióban (SGR, AGR, GP) történt. A vizsgálataink során kimutattuk, hogy az SGR és az AGR régiók transzepidermális vízvesztése szignifikánsan magasabb volt, mint a GP területé, tehát eltérő permeabilitási barrier funkció jellemzi a különböző bőrrégiókat. Vizsgálatunk során a legnagyobb különbséget az AGR és a GP területek között mértünk, ahol 6,89-szeres növekedés volt megfigyelhető, még az SGR és a GP régiók összehasonlítása során 1,57-szeres különbséget detektáltunk (**8.a ábra**).

5.1.2. A CE intracelluláris struktúrmolekulák expressziójának vizsgálata a különböző bőrrégiókban

Mivel funkcionális vizsgálataink során szignifikáns eltérést detektáltunk a 3 bőrrégió permeabilitási barrierje között, ezért molekuláris szinten is tanulmányoztuk a permeabilitási barrier legfontosabb molekuláit.

Elsőként a barrier funkcióban szerepet játszó SC komponensek közül a CE kialakításában részt vevő molekulák gén szintű vizsgálatát végeztük el QRT-PCR módszerrel, majd fehérje szintű vizsgálatainkhoz kvantitatív IHC módszert alkalmaztunk. A CE kialakításában részt vevő molekulák (KRT1, KRT10, LCE1D, LCE1F, SPRR1A, SPRR2A, TGM1 és TGM5)

vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns különbségeket a három bőrrégió között, sem gén, sem fehérje expresszió tekintetében (**8.b ábra** és **9. ábra**).

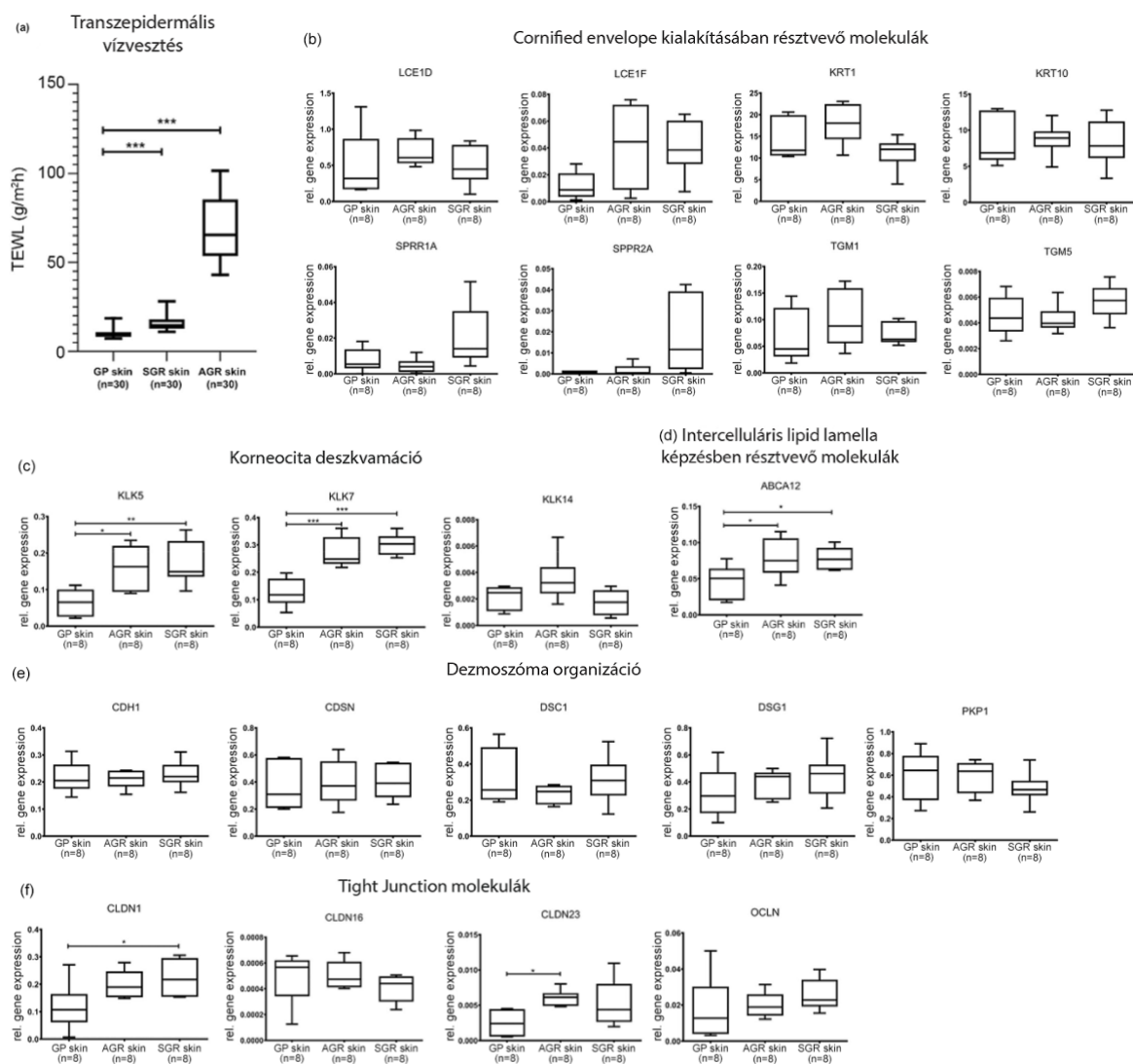
5.1.3. A KLK proteázok és az ABCA12 lipid transzporter expressziójának a vizsgálata a különböző bőrrégiókban

A korneocita deszkvamációjában, azaz a hámlásban (19, 146-148) szerepet játszó KLK5 és KLK7 enzimek expresszióját is vizsgáltuk QRT-PCR módszerrel. Eredményeink alapján elmondható, hogy a KLK5 és KLK7 molekulák mRNS szinten szignifikánsan upregulálódtak az SGR és AGR bőrrégiókban a GP területekhez viszonyítva (**8.c ábra**). A fehérje szintű vizsgálattal a két enzim hasonló expressziót mutatott a három bőrrégió interfollikuláris és follikuláris epidermiszének összehasonlítása során. Ugyanakkor a KLK5 és a KLK7 erősen festődött az AGR és az SGR régiók apokrin és faggyúmirigyeiben, ami lényeges különbségre utal a mirigyekben gazdag (AGR, SGR) és a GP bőrrégiók között fehérje szinten (**9. ábra**). Az enzimeken kívül az intercelluláris lipid lamellák kialakításában résztvevő ABCA12-t vizsgáltuk. Ez a transzporter molekula szignifikánsan magasabb génexpressziós szintet mutatott SGR és AGR bőrrégiókban, a GP területekhez képest (**8.d ábra**), míg a fehérje szintű vizsgálat során az ABCA12 az AGR epidermiszben mutatott kismértékű, de szignifikáns emelkedést a GP bőrhöz képest.

5.1.4. A korneodezmoszóma és TJ komponensek vizsgálata a különböző bőrrégiókban

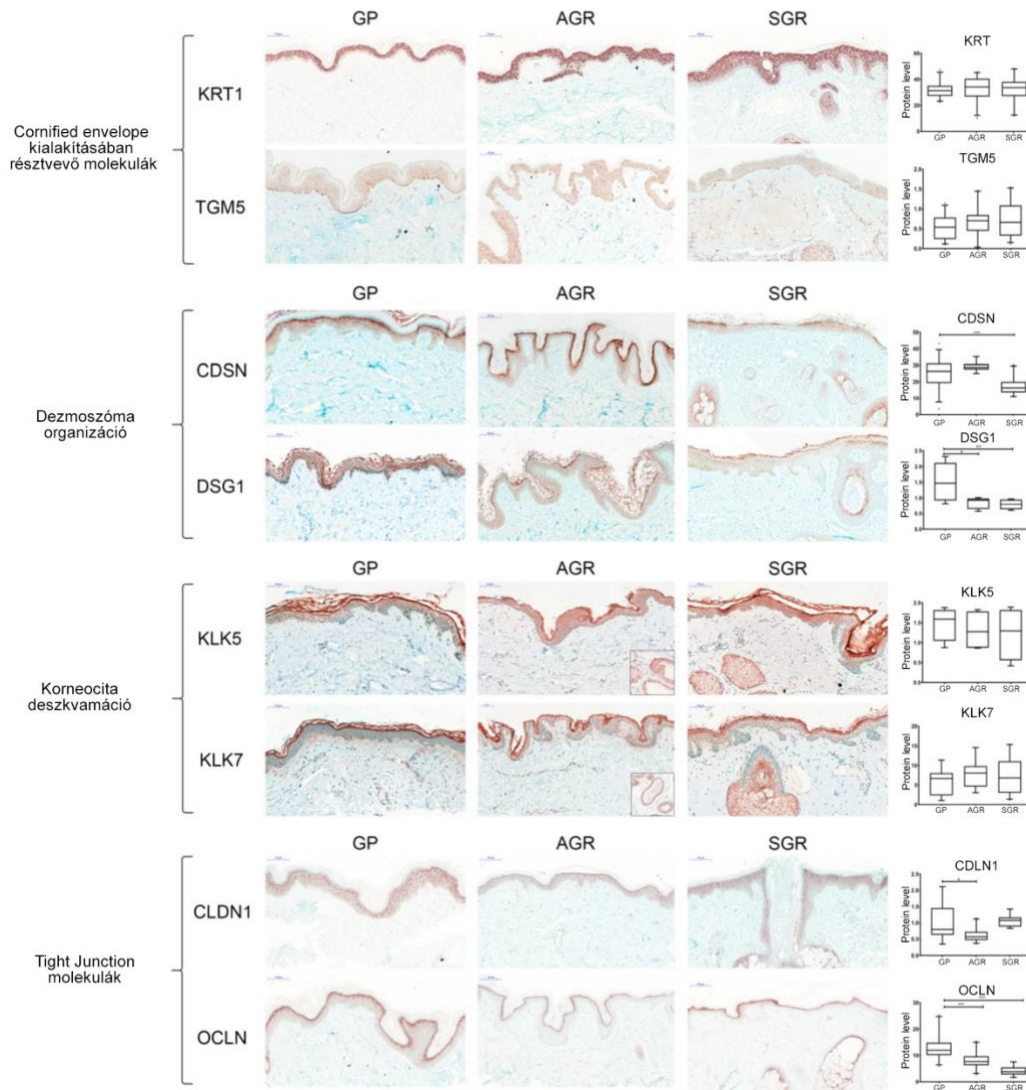
A korneodezmoszóma komponensek közé tartozó CDH1, CDSN, DSC1, DSG1 és PKP1 mRNS expressziójának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget a három egészséges bőrrégió között (**8.e ábra**). Ezzel ellentétben a fehérje szintű vizsgálataink során a DSG1 és CDSN molekulák expressziója eltért a vizsgált bőrmintákban. A DSG1 fehérje szinten szignifikánsan kisebb mennyiségben volt kimutatható mind az SGR, mind az AGR bőrrégiókban, valamint a CDSN fehérje expressziója is jelentősen csökkent SGR-ben a GP bőrrégióhoz képest (**9. ábra**).

A TJ komponensek gén szintű vizsgálata során kimutattuk, hogy a CLDN1 expressziója szignifikánsan emelkedett az AGR bőrterületeken a GP régiókhöz képest, míg a CLDN23 molekula az SGR területen mutatott emelkedést a GP bőrrégióhoz viszonyítva. A CLDN16, a CDH1 és az OCLN esetében viszont hasonló mRNS szintet figyeltünk meg mindhárom régióban (**8.e ábra**). Fehérje szintű vizsgálataink szerint a CLDN1 molekula expressziója az AGR területen szignifikánsan lecsökkent a GP régióhoz képest, illetve az OCLN szintje mind az SGR, mind az AGR területeken alacsonyabb volt, mint a GP bőrben (**9. ábra**).



8. ábra Eltérő barrier funkció és génexpressziós profil jellemzi az egészséges GP, AGR és SGR bőrrégiókat

a) TEWL mérése egészséges GP, AGR és SGR bőrterületeken. A vizsgálatot a Tewameter TM300 készülékkel (Courage és Khazaka, Köln, Németország) végeztük el, egészséges egyéneken (hajlító alkaron, hónalj és homlokon (n = 30)). A gén expressziós vizsgálatok során a **(b)** CE képzésért, **(c)** korneociták hámlásáért **(d)** intercelluláris lipid lamellák kialakulásáért, **(e)** dezmozóma szerveződésért felelős és **(f)** a TJ-hoz tartozó molekulákat vizsgáltuk meg egészséges GP, AGR és SGR bőrrégiókban QRT-PCR módszerrel. A grafikonok a mért mRNS transzkripció-szintek átlagát mutatják a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumal, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Sidac post hoc tesztel kiegészített ANOVA tesztel meghatározva). Rövidítések: ABCA12, ABC transzporter 12B; AGR, apokrin mirigyekben gazdag; CDH, cadherin; CDSN, corneodesmosin; CLDN, claudin; DSC, desmocollin; DSG, desmoglein; GP mirigyben szegény; KLK, kallikrein; KRT, keratin; LCE, late cornified envelope; OCLN, okkludin; PKP, plakophilin; SGR, faggyúmirigyekben gazdag; SPRR, kis prolinban gazdag fehérje; TEWL, transzepidermális vízvesztés; TGM, transzglutamináz.



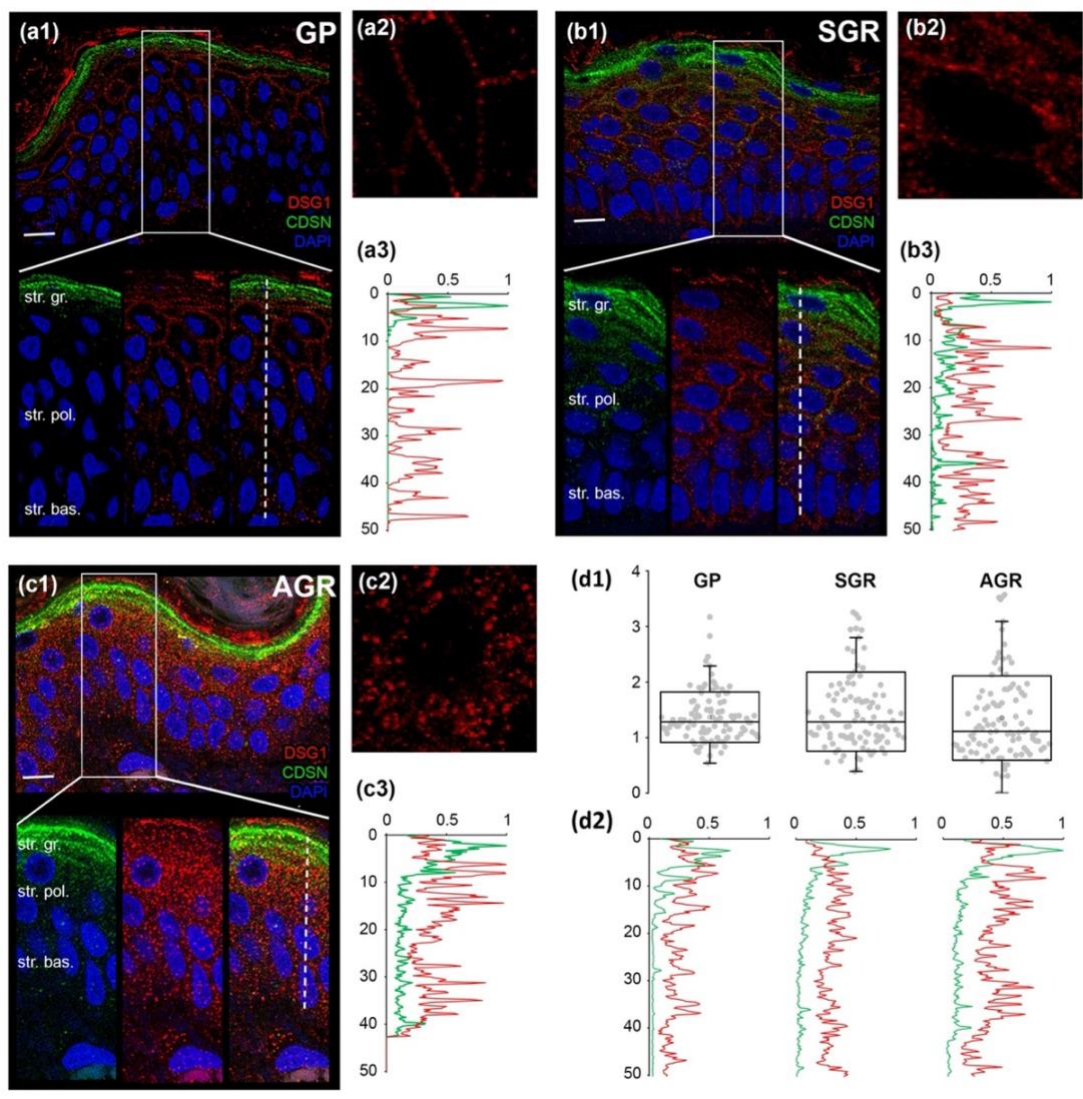
9. ábra Meggyengült sejtkapcsoló komponensek figyelhetők meg az SGR és az AGR bőrrégiókban a GP területekhez képest

A KRT1, TGM5, CDSN, DSG1, CLDN1, OCLN, ABCA12, KLK5 és KLK7 molekulák epidermális immun-festésének és mennyiségi meghatározásának reprezentatív ábrái az egészséges GP, AGR és SGR bőr régiókban. Skála = 100 μ m. A grafikonokon a fehérjeszintre vonatkozó átlag \pm 95% -os konfidencia intervallumot ábrázoltuk (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA teszt kiegészítve Sidac post hoc teszttel). Rövidítések: ABCA12, ABC transzporter 12B; AGR, apokrin mirigyekben gazdag; CDSN, corneodesmosin; CLDN, claudin; DSG1, desmoglein 1; SGP mirigyben szegény; KLK, kallikrein; KRT, keratin; OCLN, occludin; SGR, faggyúmirigyekben gazdag; TGM, transzglutamináz.

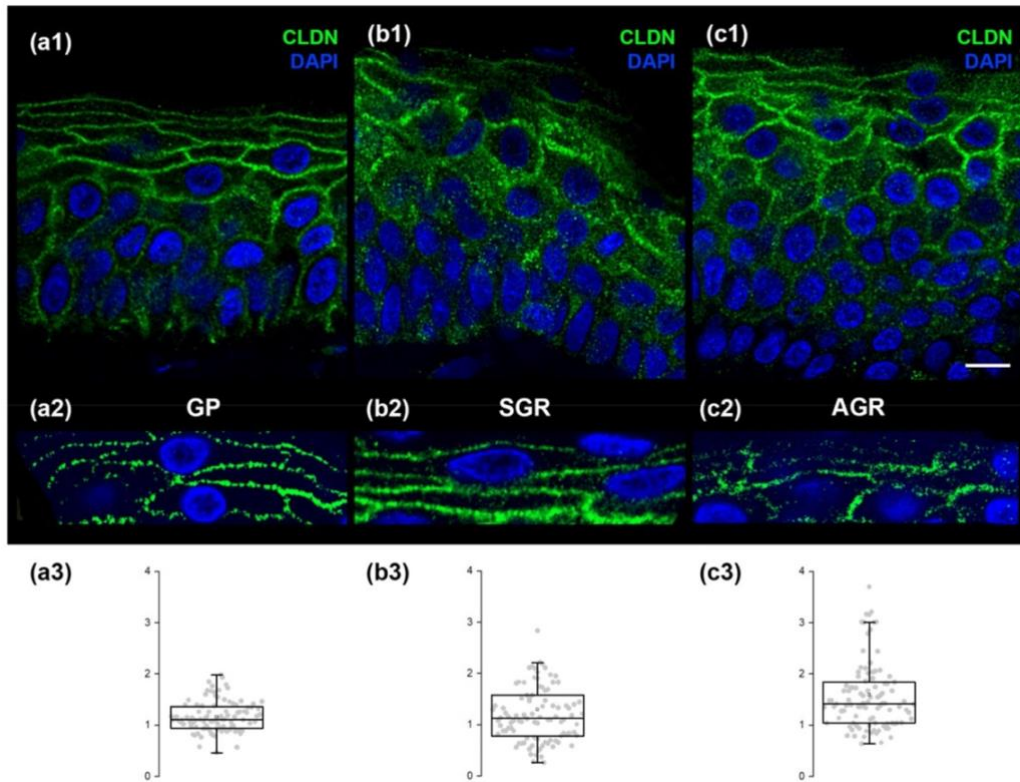
5.1.5. A sejtkapcsoló struktúrák organizációjának vizsgálata a különböző bőrrégiókban

Következő lépésként megnéztük, hogy a korneodezmoszóma és a TJ sejtkapcsoló struktúrák molekuláinak fehérje expressziójának csökkenése az AGR és SGR területeken együtt jár-e a sejtkapcsoló struktúrák organizációjának megváltozásával. Ennek a vizsgálata konfokális mikroszkópia segítségével valósult meg. A korneodezmoszómákat reprezentáló DSG1 és CDSN molekulákat kettős IF festéssel detektáltuk (**10. ábra (a1, b1 és c1)**). Ahogyan azt vártuk, a CDSN molekula a GP bőrterületeken a SG rétegben mutatott erős expressziót, viszont a mélyebb rétegekben már nem volt kimutatható (**10. ábra (a1 és a3)**). A DSG1 fehérje is leginkább a SG rétegében lokalizálódott, csökkenő tendenciát mutatva a bazális epidermális rétegek felé (**10. ábra (a1 és a3)**). Mindkét fehérje esetében erős festődést és ko-lokalizációt tapasztaltunk (a korneodezmoszóma képződését jelzi) a SG 1-2 sejsorból álló rétegében (**10. ábra (a1, a3 és d2)**). Mivel a korneodezmoszómák organizációs szintje is érdekelt minket, ezért lemértük a két szomszédos immunfestett DSG1 pont közötti távolságokat a sejtmembrán keresztmetszetében, a SG rétegében. Megállapítottuk, hogy a DSG1 reprezentálta struktúrák a KC-k körül a membránban szabályosan helyezkedtek el a GP epidermiszben (**10. ábra (a2 és d1)**). A GP régióval szemben az SGR és AGR területeken a CDSN expressziójának kiszélesedését figyeltük meg a SS irányába (**10. ábra b1, b3, c1 és c3**), mind a SG-ban, mind a mélyebb rétegekben jelen volt ezeken a bőrrégiókban (**10. ábra b1, b3, c1 és c3**). Összességében elmondható, hogy a CDSN és a DSG1 kolokalizációja kevésbé volt jellemző és expressziójuk több sejtrétegre terjedt ki az SGR és AGR-régiókban, mint a GP területeken (**10. ábra b1, b3, c1, c3 és d2**). Továbbá a korneodezmoszómák térbeli eloszlása, amit a DSG1-pozitív pontok reprezentáltak, kevésbé volt szervezett, szabálytalan eloszlást mutatott az SGR bőrben, az AGR régiókban pedig még inkább megfigyelhető volt ez (**10. ábra b2, c2 és d1**).

A TJ struktúrákat reprezentáló CLDN1 molekula IF festődése a GP régióban a SG-ban volt a legerősebb (**11. ábra a1**), emellett a CLDN1 pontok eloszlása rendkívül szabályos volt ebben a bőrrégióban (**11. ábra a2 és a3**). Ezzel szemben az SGR és az AGR régiókban a CLDN1 immunfestődési mintázata kiszélesedett a SS felé (**11. ábra b1 és c1**), ráadásul a CLDN1 pontok szabálytalanul oszlottak el az SGR mintákban, az AGR bőr granuláris rétegében pedig még szabálytalanabb elrendeződést mutattak (**11. ábra b2, b3, c2 és c3**).



10. ábra Kevésbé organizált korneodezmoszómák jellemzik az SGR és AGR régiókat a GP bőrrel szemben. Kettős IF festéssel detektáltuk a DSG1 (piros) és a CDSN (zöld) molekulákat, száraz (GP; (a1)), zsíros (SGR; (b1)) és nedves (AGR; (c1)) bőrrégiók epidermiszében. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük meg. A CDSN molekula az összes vizsgált bőrrégió epidermiszének SG rétegében erős expressziót mutatott. Az SGR és AGR régiókban a CDSN expressziója a SS felé jelentős kiszélesedést mutat, amit a megnőtt egyéni vonalak (b3, c3) és a normalizált zöld görbék (d2) reprezentálnak. A DSG1 molekula festődése is megfigyelhető az SGR és AGR bőrrégiók epidermiszének mélyebb rétegeiben (összehasonlítva az a3, b3 és c3 egyéni vörös görbéit, a d2 normalizált vörös görbéivel). Az ábrán látható, hogy a DSG1 pontjai a GP epidermisz KC-i körül szabályosan helyezkednek el (a2), míg az SGR (b2) és még inkább az AGR (c2) bőrrégiókban a DSG1 pontok szabálytalanabb eloszlást mutatnak. Ezt a különbséget az adatpontok kisebb szóródása is jelzi a GP bőrrégiókban, az SGR és AGR területekhez képest (d1). A pontok a KC-k körül elhelyezkedő két szomszédos TJ struktúra közötti távolságot jelzik. A skála mérete 10 μm az összes képen. Az Y tengely a távolságot mutatja mikrométerben az a3, b3, c3, d1 és d2 ábrákon. Az X-tengely az immunfestés normalizált intenzitását jelzi az a3, b3, c3 és d2 ábrákon.



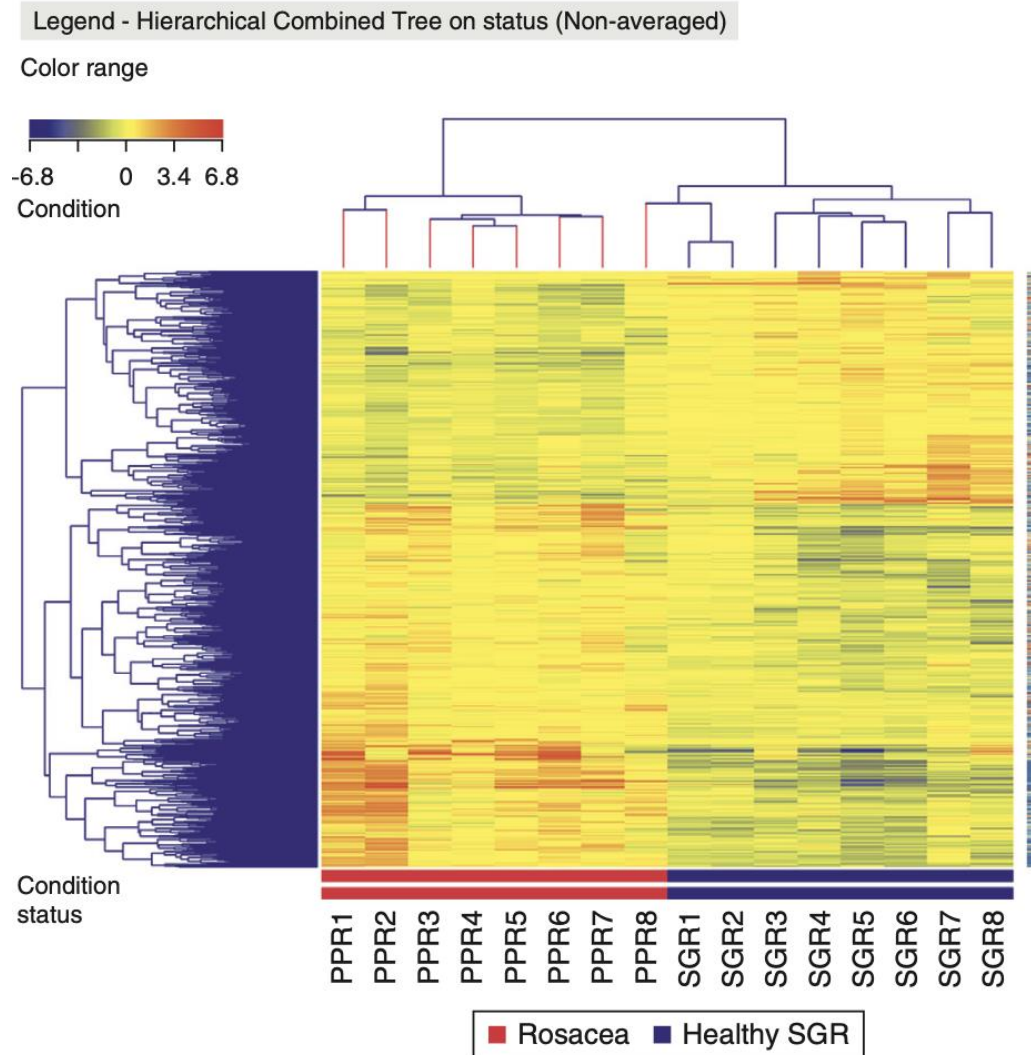
11. ábra A TJ-t reprezentáló CLDN1 szabályos mintázatot mutat a GP régiókban, míg az SGR és az AGR területeken kevésbé organizált módon van jelen

Az ábrán a CLDN1 eloszlását az 1 μm vastagságú konfokális optikai metszetek mikrográfjai mutatják be az epidermisz rétegeiben. A CLDN1 expressziója legerősebben a SG-ban figyelhető meg, az összes bőrrégió esetében (a1, b1, c1), míg SGR és az AGR bőrrégiókban a SS-ban is látható festődés (b1, c1). A CLDN1 immunfestése során a pontok eloszlása szabályosnak mutatkozott az GP bőrben (a2), míg az SGR-ben (b2) kevésbé egyenletes szerveződést mutatott, az AGR régióban pedig klaszterekbe rendeződtek (c2). A szabályosságban detektált különbségek számszerűsítését (a3, b3, c3) dobozdiagramként jelenítettük meg, ahol minden egyes pont a KC-k körül elhelyezkedő két szomszédos dezmoszóma struktúra közötti távolságot jelzi. Az (a3) adatpontok kisebb szórást mutatnak a (b3, c3) -hoz képest. A skála mérete: 10 μm . Az Y tengely a (a3, b3, c3) távolságokat jelöli mikrométerben.

5.2. A rosaceás bőr barrier vizsgálata

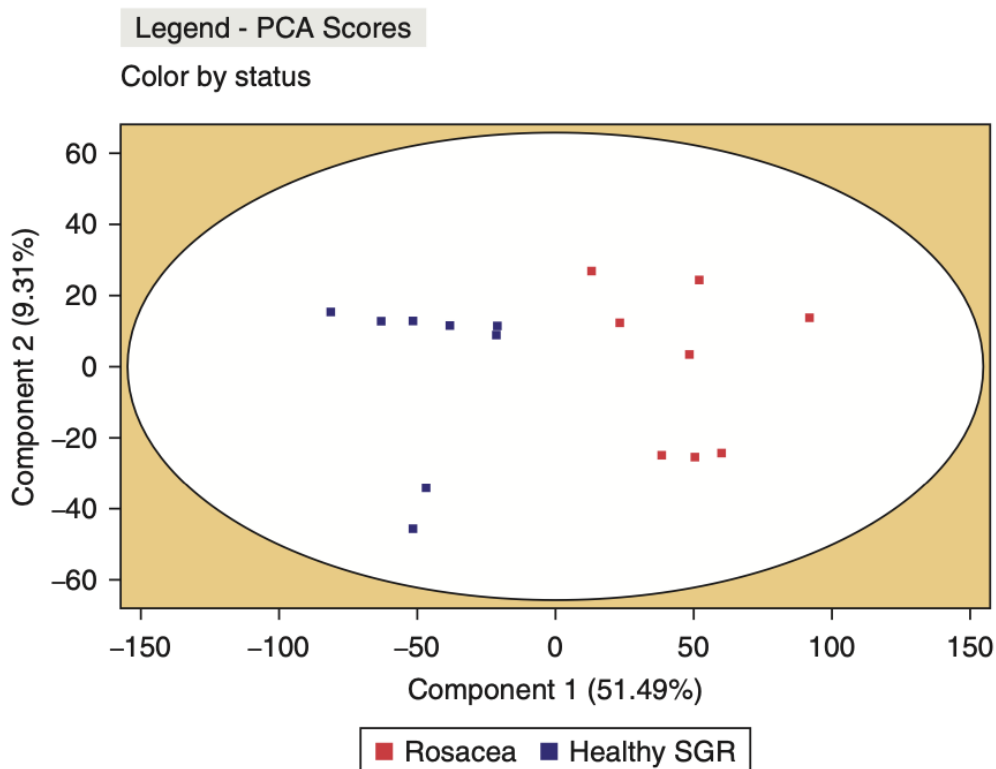
5.2.1. Heatmap, Principal Component Analysis (PCA)

A faggyúmirigyben gazdag bőr és a rosaceás bőr közötti génexpressziós mintázatok különbségeinek azonosítása céljából 8 egészséges SGR és 8 ROS donor bőrmintáinak lizátumából RNS szekvencia analízist végeztünk. A szekvenálás során kapott eredményeinket felhasználva a StrandNGS nevezetű szoftverrel heatmapet, azaz egy hőterképet (**12. ábra**), és egy Principal Component Analysis (PCA) ábrát (**13. ábra**) hoztunk létre. Ezen ábrák segítséget nyújtanak a két csoport közötti eltérések megjelenítésében és leolvasásában. A ROS és SGR bőrminták génexpressziós profiljának a különbsége jól megfigyelhető a szoftver által generált hőterképen. A PCA ábra is jól szemlélteti a két vizsgált csoport közötti különbséget. A PCA ábrán megjelenő pontok egy-egy donortól származó bőrmintát helyettesítenek, ahol a színek a rosaceás és az SGR bőrrégiókat jelentik (piros: papulopustulosus rosacea-PPR, kék: SGR). A pontok közötti távolságok a minták génexpressziós profilja közötti különbségek mértékét jelzik. Az ábrán jól látható, hogy a különböző színű pontok két csoportba rendeződnek, és a piros és kék csoport közötti távolság jelentősebb, mint az egyszínű csoporton belüli távolságok. A PCA ábrán az egy régióba tartozó pontoknál megfigyelhető az is, hogy általában relatív kicsi, míg máshol nagyobb távolságra vannak egymáshoz képest az egyszínű pontok. A vizsgálat során Mann-Whitney nem-paraméteres statisztikai teszttel ($p < 0,05$) határoztuk meg a ROS és SGR minták génexpressziós mintázatának különbségeit. A statisztikai küszöbértéket úgy határoztuk meg, hogy legalább 1,5-szeres változás (fold change [FC]) legyen a 2 mintacsoport között az egyes gének átlagos expressziójában, $p < 0,05$ statisztikai szignifikancia mellett. Az elemzés során 5136 gént (DEG) azonosítottunk, melyek szignifikánsan eltérő expressziót mutattak a ROS és az SGR bőrminták között. A DEG-ek közül 3133 gén magasabban, míg 2003 gén pedig alacsonyabb szinten expresszáldott a ROS-ban az SGR bőrrégióhoz képest.



12. ábra Heatmap

StrandNGS szoftver által generált heatmap, mely az SGR (n=8) és rosaceás (n=8) minták összehasonlításában szignifikánsan eltérő ($p < 0,05$) expressziót mutató géneket tartalmazza. A szoftver a két mintacsoportot egyértelműen elkülönítette egymástól génexpressziós profiljuk alapján. Az ábrán a piros a magasabb, a kék pedig az alacsonyabb expressziót jelöli.



13. ábra Principal Component Analysis (PCA)

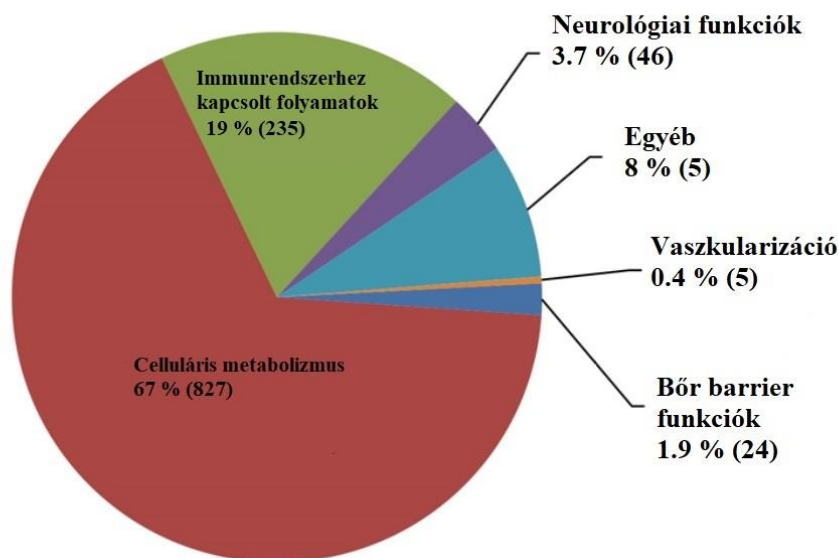
A StrandNGS szoftver által generált PCA ábrán a pontok 1-1 egyén bőrmintájának a teljes génexpressziós profilját reprezentálják, a piros pontok a rosaceás, a kék pontok pedig az SGR mintákat jelölik.

5.2.2. Pathway analízis 1

A DEG-ek működésének azonosításához több bioinformatikai elemzést is elvégeztünk a Cytoscape ClueGo bioinformatikai eszköz segítségével (149). Elsőként, hogy meghatározzuk a DEG-ek általános biológiai funkcióit, az összes olyan DEG-en útvonal analízist végeztünk, ahol az $FC \geq 1,5$ volt. Ahhoz, hogy a globális biológiai funkciókkal rendelkező, szignifikánsan feldúsult ($p \leq 0,05$) útvonalakat azonosítsuk, azt a kritériumot alkalmaztuk, hogy az összes útvonal legalább 50 gént tartalmazzon a bemenő génlistából. Ez alapján a ClueGO alkalmazás 1239 statisztikailag szignifikánsan „feldúsult” útvonalat azonosított.

Nem meglepő módon, az azonosított útvonalak elsősorban a celluláris metabolizmushoz (pl. ion-transzport, lipid-bioszintézis, transzferáz aktivitás), a veleszületett (pl. külső stimulusra/stresszre adott válasz, citokin szekréció, baktériummal szembeni védekező mechanizmus, NOD-szerű receptor jelátviteli útvonal és komplement aktiválás) és adaptív (pl. T sejt aktiválás, leukocita migráció, TNF és IFN-gamma termelés, kemokin jelátviteli

útvonal) immun mechanizmusokhoz kapcsolódtak. Emellett az idegrendszeri funkciókban (például az idegrendszer fejlődésében) és a vaszkularizációban (pl. az érrendszer fejlődésének szabályozásában, angiogenezisben) résztvevő gének is különbséget mutattak (**14. ábra**). Számunkra a legfontosabb információt az jelentette, hogy a bőr barrierrel kapcsolatos funkciókhoz is tartozott 24 útvonal (pl. epitélium fejlődése, hám morfogenezise, epiteliális sejtek differenciálódása és proliferációja) (**14. ábra**).



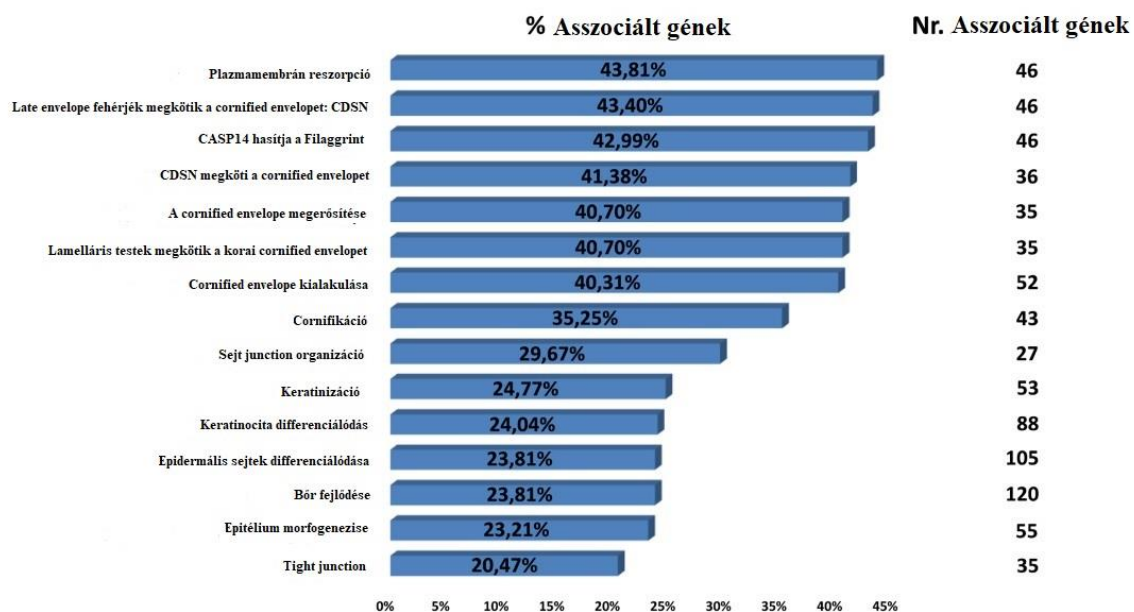
14. ábra Pathway analízis 1. - A CluGO által csoportosított útvonalak

Legnagyobb arányban szerepet játszó útvonalak a celluláris metabolizmus és az immunrendszerhez kapcsolt folyamatok voltak. De megjelentek az analízis során a neurológiai funkciókban, vaszkularizációban és a bőr barrier funkciókban szerepet játszó útvonalak is.

5.2.3. Pathway analízis 2

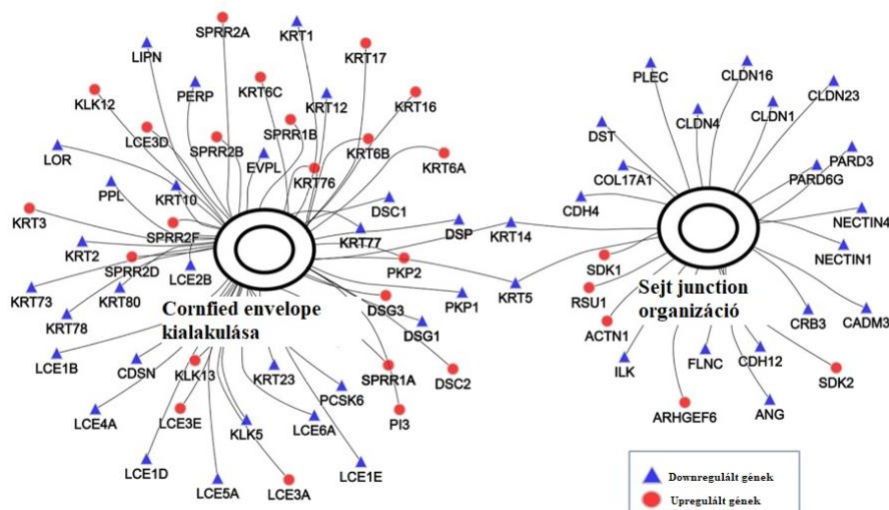
Bioinformatikai vizsgálataink folytatásaként elvégeztünk egy újabb bioinformatikai analízist a DEG-ek specifikusabb funkcióinak meghatározásának céljából. Az előző analízishez képest egy szigorúbb analitikai megközelítést alkalmaztunk, ahol az up- és downregulált DEG-eket két különálló klaszterként kezeltünk a ClueGO applikációban. Ez az analitikai megközelítés 426 szignifikánsan feldúsult útvonalat eredményezett, és ezek többsége (291) a veleszületett és az adaptív immunmechanizmusokhoz tartozott (pl. Th17 sejtek differenciálódása, toll-like receptor kaszkádok, T sejtek szelekciója, neutrofilek vándorlása).

Ezen túlmenően számos azonosított útvonal vagy a celluláris metabolizmushoz kapcsolódott (63 útvonal, pl. a mikrotubulusok mentén történő transzport, a specifikus granulátum membránfehérjék exocitózisa, a cAMP-re adott válasz), vagy a vaszkularizációban vett részt (2 útvonal, az érrendszer fejlődés és az angiogenezis pozitív szabályozása), vagy az idegrendszerhez (21 útvonal, pl. axonogenezis, gliasejtek differenciálódása, axon vezetés) köthető. Ami számunkra igazán releváns volt, hogy analízisünk során 15 olyan útvonalat azonosítottunk, ami a bőr valamely barrier funkciójával áll kapcsolatban (például keratinizáció, kornifikáció, TJ). További vizsgálatainkban ezekre az útvonalakra fókuszáltunk (**15. ábra, 16. ábra**).



15. ábra A CluGO által kinyert, barrierhez köthető útvonalak

Az ábrán az SGR és a ROS csoportok között szignifikánsan eltérő expressziót mutató gének ($FC > 1,5$) második útvonal analízise során feltárt, barrier funkciókhoz kapcsolódó, szignifikánsan feldúsult útvonalak láthatóak (a Cytoscape és a ClueGO használatával). A számoszlop az asszociált gének számát, a kék vízszintes oszlopok pedig a gének százalékos arányát jelzik.



16. ábra A ClueGo-val vizualizált reprezentatív, barrierhez kapcsolódó útvonalak. A kék háromszögek a downregulált, míg a piros körök az upregulált molekulákat reprezentálják (ROS vs SGR).

5.2.4. Az QRT-PCR és IHC vizsgálataink megerősítették a ROS bőrben detektált szignifikáns eltéréseket a legfőbb permeabilitási barrier komponensekkel kapcsolatban

Az RNS szekvenálás eredménye rávilágított arra, hogy a rosaceás bőr permeabilitási barrierje az egészséges zsíros bőrtől jelentősen eltér. Annak érdekében, hogy a ROS és az egészséges SGR bőr permeabilitási barrier különbségeit jobban megismerjük, a permeabilitási barrier fő csoportjaiba tartozó molekulák gén-expresszióját QRT-PCR módszerrel is validáltuk. Ezzel a módszerrel „visszaellenőrizhetjük” a szekvenálás során kapott génextpressziós mintázatok különbségeit. A korábban elvégzett analíziseink során kapott eredmények, valamint irodalmi adatok alapján kiválasztottuk a bőr permeabilitási barrier funkciójában résztvevő legfontosabb csoportokat és molekulákat: (1) a CE kialakításában (FLG, KRT1, KRT10, LCE1D, LCE1F, LOR, SPRR1A, SPRR2A, TGM1, TGM3 és TGM5); (2) az intercelluláris lipid lamellák képződésében (ABCA12); (3) a dezmoszóma organizációjában (CDH1, CDSN, DSG1, DSC1, PKP1); (4) a korneociták hámlási folyamatában (KLK5, KLK7 és KLK14); (5) a TJ kialakításában (CLDN1, CLDN16, CLDN23 és OCLN); (6) a barrier alarmin funkciókban (KRT6, KRT16 és KRT17) szerepet játszó molekulákat, de ezen kívül (7) néhány fontosabb AMP-t is megvizsgáltunk (S100A7, S100A8, S100A9, DEFB4B, LCN2 és CAMP).

A fent említett molekulacsoportok néhány képviselőjét IHC módszerrel is megvizsgáltunk, melyet egy képalkotó analízissel is összekötöttünk, ezáltal fehérje szintű kifejeződésükről is képet kaphattunk.

5.2.5. CE képzésében résztvevő molekulák vizsgálata

Elsőként a CE felépítésében résztvevő molekulákat vizsgáltuk meg QRT-PCR módszerrel, amely során azt kaptuk, hogy a vizsgált gének hasonlóan expresszálódtak, mint az RNS szekvenálás során. Eredményeink szerint a vizsgált barrier struktúrmolekulák többsége (KRT1, KRT10, FLG, LOR, LCE1D és LCE1F) downregulálódott, az SPRR1A és SPRR2A molekulák pedig upregulálódtak a ROS mintákban az egészséges kontrollokhoz képest (**17. ábra, 4. táblázat**). A kapott különbségek minden esetben statisztikailag szignifikánsnak mutatkoztak, kivéve a két late cornified envelope (LCE1D, LCE1F) és a SPRR1A molekula esetében. A peptid kereszt-kötésben szerepet játszó enzimek közé tartozó TGM1, TGM3 és TGM5 hasonló szinten fejeződött ki a ROS és az SGR bőrmintákban (**17. ábra**). A génszintű meghatározásokat követően további vizsgálatokat végeztünk néhány kiválasztott CE komponens esetében. Mivel fontosnak tartottuk, hogy fehérje szinten is megerősítsük a két bőrrégió közötti eltérő kifejeződést ezen molekuláknál, így IHC festéseket végeztünk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a LOR és a KRT1 fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a ROS-ban az SGR bőrhöz képest, míg az FLG fehérje hasonlóan expresszálódott mindkét mintacsoportban (**19. ábra, 4. táblázat**). Az enzimek közül TGM5 molekula festését végeztük el, viszont az fehérje szinten nem mutatott szignifikáns különbséget a ROS és az egészséges SGR bőrminták között (**19. ábra, 4. táblázat**).

5.2.6. Intercelluláris lipid lamellák képződésében résztvevő főbb molekulák vizsgálata

Az intercelluláris lipid lamellák képződésében fontos szerepet játszó molekulák közül az ABCA12 génszintű kifejeződését vizsgáltuk meg QRT-PCR módszerrel a ROS és az egészséges SGR bőrmintákban. Eredményeink azt mutatták, hogy az ABCA12 molekula mRNS szinten szignifikánsan alacsonyabban expresszálódott rosaceában a kontrollhoz képest (**17. ábra, 4. táblázat**).

5.2.7. *Dezmoszóma organizációjában szerepet játszó molekulák vizsgálata*

A dezmoszóma komponensek (DSG1, DSC1, CDSN, PKP1 és CDH1) génexpressziós szintjét is megvizsgáltuk QRT-PCR módszerrel. Megállapítottuk, hogy a CDSN kivételével az összes vizsgált molekula szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszáldott a ROS mintákban az SGR-hez képest. A CDSN mRNS-szintjében nem detektáltunk szignifikáns különbséget a két vizsgált mintacsoport között (**17. ábra, 4. táblázat**). Ezt követően két kiválasztott junction komponenst (DSG1, CDSN) fehérje szinten, IHC festéssel is vizsgáltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a DSG1 molekula, az mRNS szintű expressziójához hasonlóan, fehérje szinten is szignifikánsan alacsonyabb mértékben expresszáldott a ROS-ban az SGR mintákhoz képest. A dezmoszóma organizációjában szerepet játszó másik fontos fehérje, a CDSN mindkét bőr mintában hasonlóan fejeződött ki, megerősítve az mRNS szintű vizsgálatainkat, ahol szintén nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a két mintacsoport között (**19. ábra, 4. táblázat**).

5.2.8. *Korneociták hámlásában résztvevő főbb molekulák vizsgálata*

A következő vizsgálat során a bőr hámlásában kulcsfontosságú szerepet játszó enzimek (KLK5, KLK7 és KLK14) kifejeződését vizsgáltuk a két bőrterületen. Az mRNS szintű vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a KLK5, KLK7 és KLK14 expressziós szintjei nagyon hasonlóak voltak ROS és az SGR bőrmintákban (**18. ábra, 4. táblázat**).

5.2.9. *TJ molekulák vizsgálata*

Következőnek a TJ felépítésében részt vevő molekulák közül a CLDN1, CLDN16, CLDN23 és OCLN génexpressziós szintjét vizsgáltuk a két bőrrégióban. Ezen vizsgált junction komponensek esetében azt találtuk, hogy alacsonyabban expresszáldottak a rosaceás bőrmintákban az SGR bőrhöz képest (**18. ábra, 4. táblázat**). A TJ génszintű vizsgálatának megerősítése érdekében a CLDN1 molekula immunhisztológiai vizsgálatát is elvégeztük, amely során szignifikánsan alacsonyabb fehérje szintet detektáltunk a ROS mintákban az SGR bőrmintákhoz képest (**19. ábra, 4. táblázat**).

5.2.10. *Barrier alarmin molekulák vizsgálata*

A továbbiakban fontosnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk a KRT6, KRT16 és KRT17 molekulák kifejeződését is a két mintacsoportban, hisz ezen molekulák nagymértékben indukálódnak epidermális barrier károsodás során. Elsőként a kiválasztott barrier alarmin komponenseket mRNS szinten vizsgáltuk QRT-PCR módszer segítségével. Eredményeink azt

mutatták, hogy a KRT6, KRT16 és KRT17 génezpressziós szintje szignifikánsan megnőtt ROS-ban az SGR bőrhöz viszonyítva (**18. ábra, 4. táblázat**). Következő lépésként a KRT6 IHC festését végeztük el, ami megerősítette az mRNS szintű eredményeinket, mivel míg a KRT6 molekulát fehérje szinten nem tudtuk detektálni a zsíros bőrben, addig ROS-ban erőteljes expressziót figyelhattunk meg (**19. ábra, 4. táblázat**).

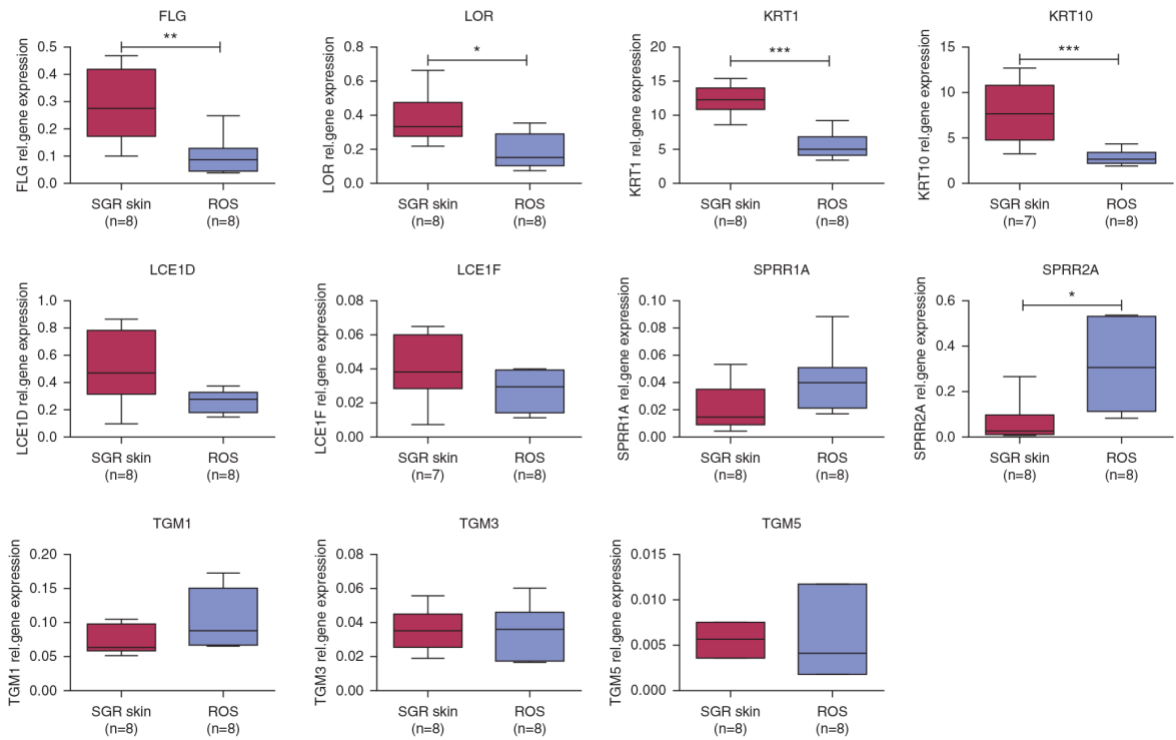
5.2.11. AMP-k vizsgálata

Fontosnak tartottuk, hogy a bőr immunológiai-barrier funkciójában szerepet játszó kulcsfontosságú komponensek, az AMP-k expressziós szintjét is megvizsgáljuk. Elsőként gén szinten néztük meg az S100A7, S100A8, S100A9, DEFB4B, LCN2 és CAMP expresszióját, QRT-PCR módszerrel. Eredményeink alapján elmondható, hogy az összes vizsgált AMP expressziója szignifikánsan upregulálódott a ROS mintákban az egészséges SGR bőrrégióhoz képest (**18. ábra, 4. táblázat**).

Annak az igazolására, hogy a megnövekedett mRNS-szintek megnövekedett fehérje szintet eredményeznek, megvizsgáltuk az S100A8 és az LCN2 molekulákat IHC módszer segítségével is. Eredményeink rávilágítottak, hogy az S100A8 és az LCN2 fehérje szinten is szignifikánsan magasabban expresszálódik a ROS mintákban, a kontroll mintákkal összehasonlítva (**19. ábra, 4. táblázat**).

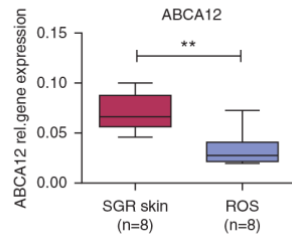
a

Cornified envelope kialakításában résztvevő molekulák



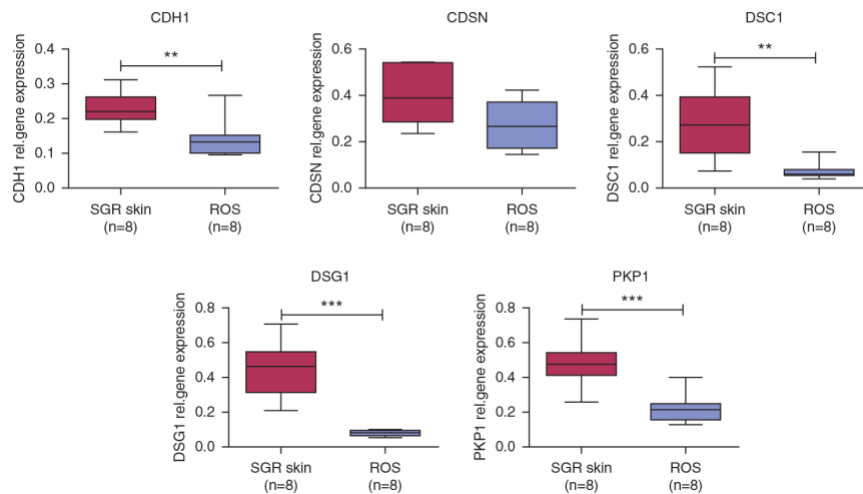
b

Intercelluláris lipid lamella képzésben résztvevő molekulák



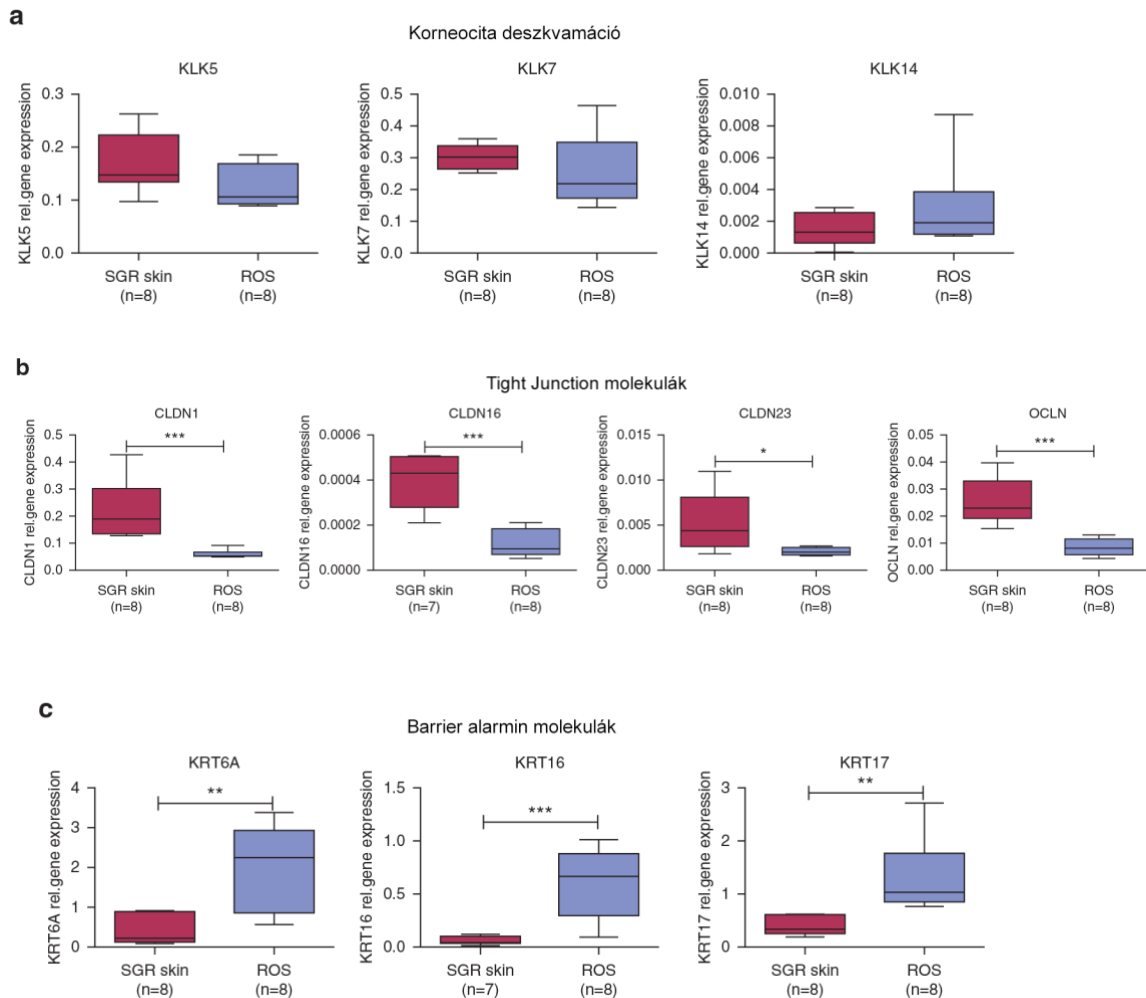
c

Dezmoszóma organizáció

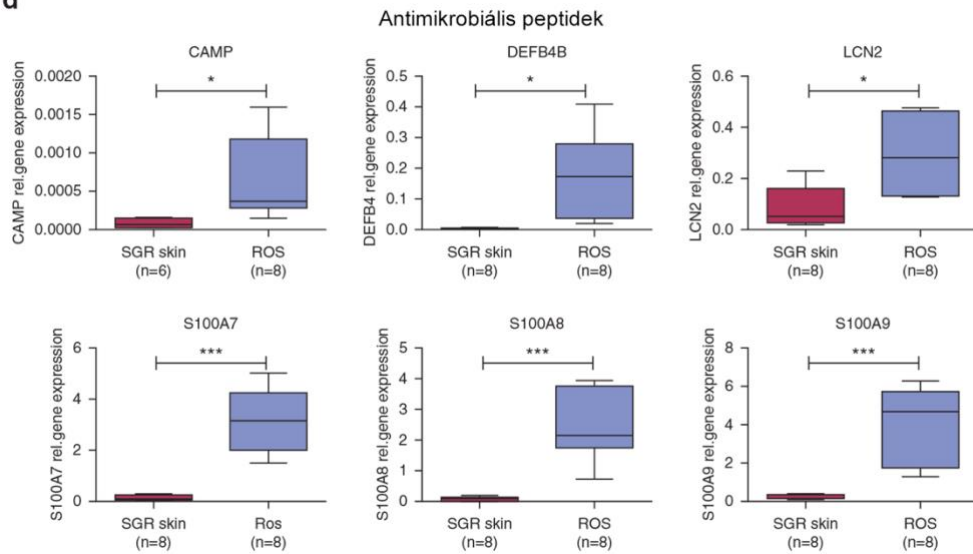


17. ábra A CE struktúrelemek, az intercelluláris lipid lamellák képződésért és a dezmoszóma szerveződésért felelős komponensek génszintű vizsgálata

A vizsgált komponensek közül többnek szignifikánsan megváltozott az expressziója rosaceában, QRT-PCR módszerrel vizsgálva. (a) a CE felépítésében (b) az intercelluláris lamellák képződésében részt vevő molekulák (c) dezmoszóma komponensek. A grafikonok a mért mRNA-transzkriptom szintek átlagát mutatják a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumokkal (* p 0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, kétmintás t-próbával meghatározva). CDSN, corneodesmoszin; DSG1, dezmoglein 1; ROS, rosacea; SGR, faggyúmirigyben gazdag bőrrégió

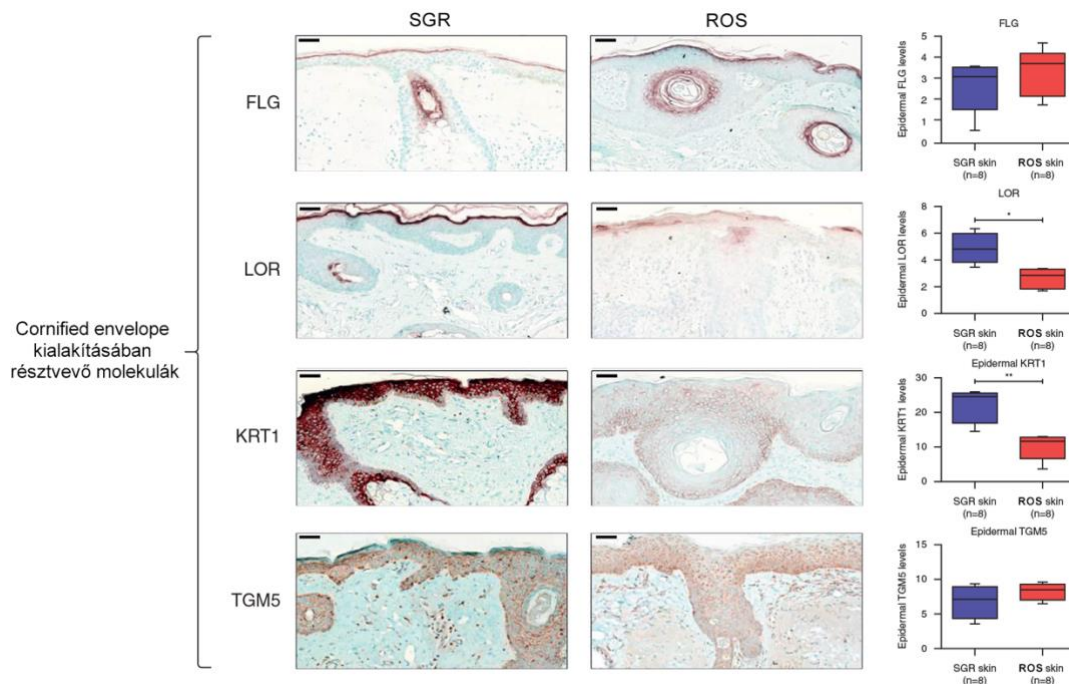


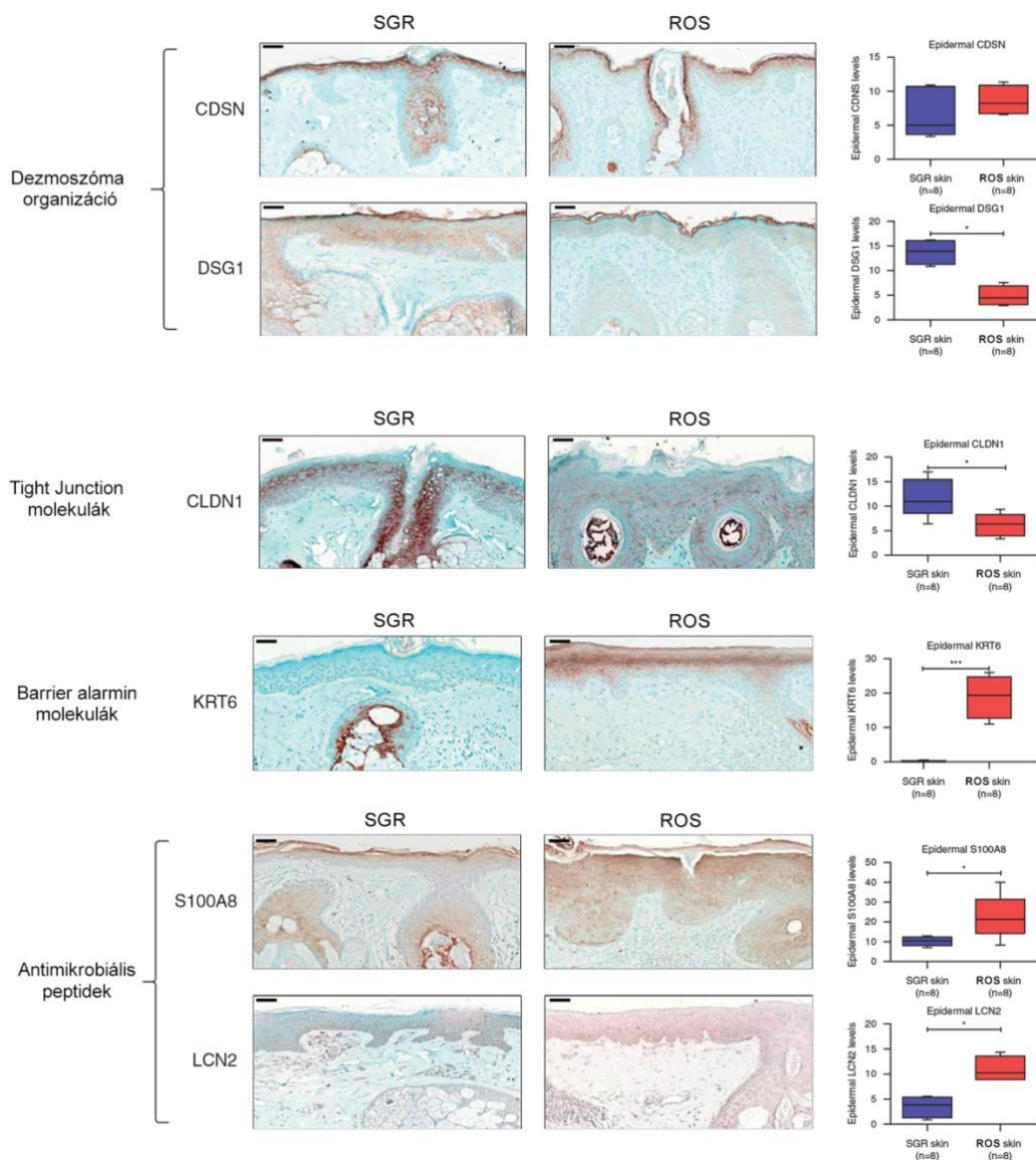
d



18. ábra A korneociták hámlásában szerepet játszó molekulák, TJ molekulák, barrier alarminok és AMP-k génszintű vizsgálata

A vizsgált komponenseknek szignifikánsan megváltozott expressziója QRT-PCR módszerrel vizsgálva ROS bőrben. a, korneociták hámlásában résztvevő molekulák. b, TJ molekulák c, barrier alarmin molekulák d, AMP-k. A grafikonok a mért mRNS-transzkriptom szintek átlagát mutatják a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumokkal (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, kétmintás t-próbával meghatározva). CAMP, cathelicidin; ROS, rosacea; SGR faggyúmirigyben gazdag bőrrégió.





19. ábra. Az SC és a TJ elemeinek fehérje szintű expressziója

Jelentős különbségek figyelhetők meg a bőr permeabilitási és immun barrierjével kapcsolatos molekulák fehérje szintű expressziójában a ROS és az egészséges SGR bőrminták között. A FLG, LOR, KRT1, TGM5, CDSN, DSG1, CLDN1, KRT6, S100A8 és LCN2 molekulák epidermális immunfestésének reprezentatív ábrái és mennyiségi meghatározásuk SGR és ROS bőrmetszetekben. A grafikonok a mért fehérjeszinteknek átlagát mutatják a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumokkal (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, kétmintás t-próbával meghatározva). CDSN, corneodesmosin; DSG1, desmoglein 1; ROS, rosacea; SGR, faggyúmirigyben gazdag bőr. Skála = 50 μm .

5.2.12. A ROS bőrre jellemző barrier változások hasonlóak az AD bőr barrierkárosodásához

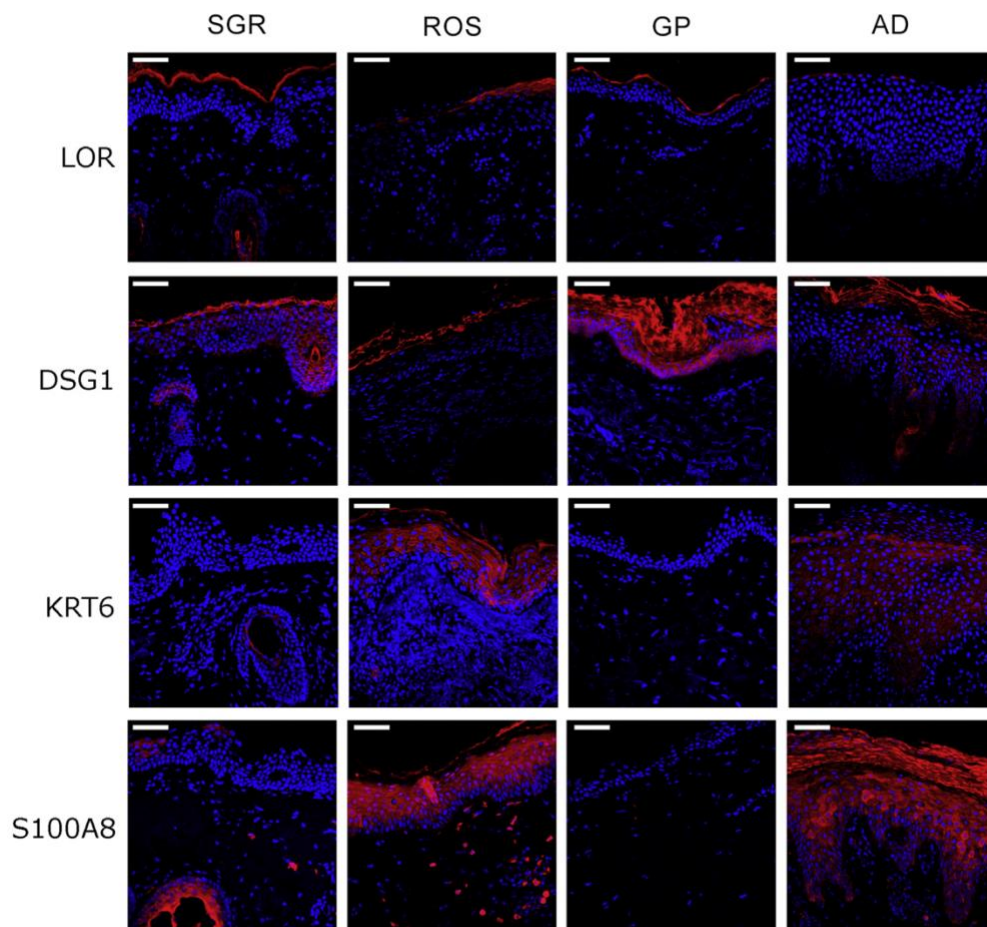
5.2.12.1. Irodalmi keresés

Mivel a rosaceában detektált barrier eltérések nagyon hasonlóknak tűntek az AD-ban ismert barrierkárhoz, ezért irodalmi áttekintést végeztünk az AD barrierkárosodás részletei tekintetében, és összehasonlítottuk a két betegség barrier eltéréseit (saját kontrolljukhoz viszonyítva) (**4. táblázat**). Megállapítottuk, hogy a ROS mintákban detektált barrier eltérések nagyon hasonlóak az AD léziós bőrnek barrier károsodásához (**4. táblázat**). Ez azért volt számunkra meglepő, mert a rosacea zsíros bőrterületre (arc), míg az AD száraz bőrrégióra (lábszár, alkar) lokalizálódó bőrgyulladás, és a két betegség között eddig semmilyen hasonlóságra nem figyeltek fel a bőrgyógyászati kutatások.

5.2.12.2. Fehérje szintű vizsgálatok (IF festés) megerősítették az AD és a ROS jellemző barrier károsodásainak hasonló jellegét

Vizsgálataink folytatásaként a ROS és az AD bőrt jellemző barrier elváltozások hasonlóságainak megerősítésére fehérje szintű vizsgálatokat végeztünk IF módszer alkalmazásával. Az IF vizsgálat a megfelelő kontroll csoportokon (SGR és GP egészséges bőrminták) is megtörtént. Az immunfestés eredménye szerint a CE molekulák közül a LOR, valamint a dezmoszómák és a TJ kulcskomponensei (DSG1 és CLDN1) is erősen downreguláltak a ROS és az AD mintákban, a kontroll csoportokhoz képest (**20. ábra**).

A KRT6 barrier alarmin molekula és az S100A8 AMP fehérje szinte teljesen hiányzott az egészséges bőrmintákban, míg a ROS és az AD bőrmintákban magasán expresszálódtak ezek a molekulák (**20. ábra**). Az IF vizsgálataink alapján elmondható, hogy a vizsgált fehérjék mintázata hasonló volt ROS-ban és AD-ben (**20. ábra**).



20. ábra IF vizsgálatok ROS és AD-s bőrben

Hasonló barrier károsodás jellemzi a ROS és AD-s bőrt. A vizsgálatban ROS, AD, valamint a megfelelő kontroll minták (SGR és GP) immunfestése történt. Az ábrák a LOR, DSG1, KRT6 és S100A8 molekulák epidermális immunfluoreszcens festését reprezentálják SGR, ROS, GP és AD bőrmetszetekben. AD, atópiás dermatitis; DSG1, dezoglein; ROS; rosacea; GP, faggyúmirigyben szegény bőrrégió; faggyúmirigyben gazdag bőrrégió. Skála = 50 µm.

4. táblázat

Változó	RNSseq (ROS vs SGR)		QRT-PCR (ROS vs SGR)		IHC (ROS vs SGR)		ROS vs EK irodalom		AD vs EK irodalom	
	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNA adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
FLG	NS		2,60E-03	2,95 ↓	NS		NS mRNS	(150)	↓ fehérje és mRNS	(151-155)
KRT1	3,28E-03	2,86 ↓	< 1,00E-4	2,20 ↓	4,80E-03	2,22 ↓	# ↓ fehérje és mRNS		↓ fehérje. és mRNS	(154, 156)
KRT10	3,28E-03	2,52 ↓	9,00E-04	2,75 ↓	nm		NS mRNS	(150)		
LCE1D	2,32E-03	3,57 ↓	3,42E-02	1,97 ↓	nm		# ↓ mRNS		↓ mRNS	(153)
LCE1F	NS		NS		nm		# NS mRNS			
LOR	8,65E-03	2,95 ↓	1,16E-02	2,03 ↓	2,11E-02	1,81 ↓	NS mRNS	(150)	↓ mRNS	(151, 153, 154)
SPRR1A	1,17E-02	3,26 ↑	NS		nm		# NS mRNS		↑ mRNS	(154)
SPRR2A	1,63E-03	8,64 ↑	2,59E-02	4,96 ↑	nm		↑ mRNS		↑ mRNS	(153, 154)
TGM1	NS		NS		nm		# NS mRNS		nincs elérhető adat	
TGM3	NS		NS		nm		# NS mRNS		nincs elérhető adat	
TGM5	NS		NS		NS		# NS fehérje és mRNS		nincs elérhető adat	

Intercelluláris lipid lamellák képződése	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
	ABCA12B	NS		1,00E-03	2,09 ↓	nm		# ↓ mRNS		nincs elérhető adat

Korneodezmoszó ma organizációja	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
	CDH1	3,57E-02	1,38 ↓	5,10E-03	1,60 ↓	nm		# ↓ mRNS		nincs elérhető adat
CDSN	3,57E-02	1,92 ↓	NS		NS		# NS mRNS		nincs elérhető adat	
DSC1	1,13E-03	2,49 ↓	1,50E-03	4,03 ↓	nm		# ↓ mRNS		↓ fehérje	(156)
DSG1	2,32E-03	1,85 ↓	< 1,00E-4	5,76 ↓	1,60E-03	2,86 ↓	# ↓ fehérje és mRNS			
PKP1	1,63E-03	2,79 ↓	5,00E-04	2,19 ↓	nm		# ↓ mRNS		nincs elérhető adat	

Változó	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
	KLK5	8,65E-03	1,69 ↓	NS		nm		↑ exp. and akt.	(118, 150)	NS fehérje
KLK7	NS		NS		nm		# NS mRNS		NS fehérje	(152, 158)
KLK14	NS		NS		nm		# NS mRNS		NS fehérje és mRNS	(152, 157)
Változó	RNSseq (ROS vs SGR)		QRT-PCR (ROS vs SGR)		IHC (ROS vs SGR)		ROS vs EK irodalom		AD vs EK irodalom	
Tight junction molekulák	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
CLDN1	7,78E-04	2,22 ↓	1,30E-03	3,75 ↓	2,67E-02	1,91 ↓	↓ fehérje és mRNS	(150)	↓ mRNS	(153)
CLDN16	1,17E-02	1,68 ↓	< 1,00E-4	3,44 ↓	nm		# ↓ mRNS		NS mRNS	
CLDN23	1,13E-03	3,28 ↓	1,26E-02	2,56 ↓	nm		# ↓ mRNS		↓ mRNS	
OCLN	NS		< 1,00E-4	3,04 ↓	nm		# ↓ mRNS		NS fehérje és mRNS	

Barrier alarmin molekulák	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
KRT6A	4,57E-03	5,03 ↑	3,70E-03	4,92 ↑	1,00E-03	109,28 ↑	# ↑ fehérje és mRNS		↑ mRNS	(151, 154)
KRT16	1,57E-02	2,50 ↑	6,00E-04	9,76 ↑	nm		# ↑ mRNS		↑ mRNS	
KRT17	8,65E-03	4,16 ↑	1,28E-02	3,26 ↑	nm		# ↑ mRNS		↑ mRNS	(154)

AMPk	p-érték	FC	p-érték	FC ²	p-érték	FC ²	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)	fehérje/ mRNS adat	(Ref.)
DEFB4B	7,78E-04	84,35 ↑	3,82E-02	62,35 ↑	nm		# ↑ mRNS		NS mRNS	(154)
CAMP	4,58E-02	2,91 ↑	3,44E-02	7,90 ↑	nm		↑ fehérje és mRNS	(159)	vitatott	(160-162)
LCN2	3,28E-03	6,93 ↑	3,15E-02	3,46 ↑	4,60E-03	3,08 ↑	# ↑ fehérje és mRNS		nincs elérhető adat	
S100A7	1,13E-03	19,30 ↑	< 1,00E-4	19,68 ↑	nm		# ↑ mRNS		↑ mRNS	(153, 154)
S100A8	7,78E-04	24,75 ↑	2,00E-04	21,75 ↑	4,54E-02	2,20 ↑	# ↑ fehérje és mRNS		↑ mRNS	
S100A9	7,78E-04	29,64 ↑	7,00E-04	18,57 ↑	nm		# ↑ mRNS		↑ mRNS	

4. táblázat Papulopustuláris rosacea és a faggyúmirigyekben gazdag bőr barrier komponenseinek összehasonlító táblázata

A táblázatban a bőr barrier funkciójában szerepet játszó molekulák 7 fő csoportját foglaltuk össze. Az első oszlop a vizsgált molekulákat jelöli. A második, harmadik, és negyedik oszlop a kutatásunkban alkalmazott módszereink, RNSseq, QRT-PCR és IHC eredményeit foglalja össze. Minden csoportban 8 mintát vizsgáltunk az összes vizsgált molekulára vonatkozóan. A papulopustuláris rosaceában a vizsgált molekulára vonatkozóan rendelkezésre álló irodalmi adatokat az 5. oszlopban foglaltuk össze, jelenlegi eredményeinket pedig az 1-3 oszlop tartalmazza. Az 5. oszlopban a # azt jelzi, hogy tudomásunk szerint tanulmányunk új, korábban még nem közölt adatokat szolgáltat, míg a # hiánya már a meglévő irodalmi adatokat jelzi. Az AD-ban a kérdéses molekula vonatkozásban rendelkezésre álló irodalmi adatok a 6. oszlopban találhatóak. Az 5. és 6. oszlop összehasonlítása rávilágít a két bőrbetegség barrier károsodása között megjelenő hasonlóságokra. Rövidítések: ABCA12B, ABC transzporter 12B; akt., aktivitás; CAMP, cathelicidin; CDH1, cadherin 1; CDSN, corneodesmosin; CLDN, claudin; DEFB4B, human defensin beta 2; DSC1, desmocollin 1; DSG1, desmoglein 1; EK, egészséges kontroll; exp., expresszió; FC, fold change; FLG, filaggrin; KLK, kallikrein; KRT, keratin; LCE, late cornified envelope; LCN2, lipocalin 2; LOR, loricrin; nm, nem meghatározott; NS, nem szignifikáns; OCLN, occludin; PKP1, plakophilin; feh, fehérje; Ref., referencia; ROS, rosacea; S100, S100 calcium-kötő fehérje; SGR, faggyúmirigyben gazdag bőrrégió; SPRR, small proline-rich protein; TGM, transzglutamináz. ¹ A fehérje és az mRNS szintek közötti statisztikai elemzéseket kétmintás t-próbával határoztuk meg. A félkövér betűtípus a jelentős eltéréseket mutató adatokat jelöli. ² A nyílak jelzik a jelentős változások irányát.

6. MEGBESZÉLÉS

Az emberi bőr nem homogén szerv, hiszen a bőr anatómiai és fiziológiai tulajdonságaiban jelentős regionális különbségeket figyelhetünk meg, illetve a legújabb tanulmányok szerint a különböző bőrterületek mikrobióta összetételében és immun aktivitásában is markáns eltérések vannak (12-14, 163, 164). Ebből kiindulva feltételeztük, hogy az eltérő bőrrégiók permeabilitási barrierje is különböző. A jelen dolgozatban is részletezett kutatásunk célja az volt, hogy funkcionális mérésekkel, illetve mRNS és fehérje alapú vizsgálati módszerekkel részletesen, átfogó módon elemezzük a topográfiaileg eltérő egészséges bőrrégiók permeabilitási barrierjét. Funkcionális vizsgálatunk során azt kaptuk, hogy a TEWL szignifikánsan magasabb volt az SGR és AGR bőrrégiókban, mint a GP területeken, ami arra utalhat, hogy az AGR és az SGR régiók gyengébb permeabilitási barrierrel rendelkeznek. Ez a megállapítás hasonló volt a Kleesz és munkatársai által elvégzett kutatás eredményeihez, ahol szintén magasabb TEWL-t mutattak ki az SGR és az AGR bőrrégiókban a GP régióhoz képest, és a három bőrrégió közül az AGR bőrrégióban mérték a legmagasabb TEWL-t (165). A funkcionálisan eltérően működő regionális barrieriek molekuláris vizsgálata során az egyes, barrieret alkotó komponens csoportok különböző eltéréseit tudtuk azonosítani. Az intracelluláris struktúrfehérjék molekuláris analízise során az eltérő bőrterületek között nem detektáltunk lényeges különbségeket. Ezzel szemben, bár a sejtkapcsoló struktúrák mRNS szinten mindhárom bőrrégióban hasonló mértékben voltak jelen (**8. ábra**), több korneodezmoszóma és TJ molekula esetében szignifikánsan csökkent fehérje expressziót detektáltunk az AGR és az SGR bőrterületeken (**8. ábra**) a GP bőrrégióhoz képest. Az a tény, hogy a különbségek csak a sejtkapcsoló struktúrák (extracelluláris molekulák) komponenseinek expressziójában és csak fehérje szinten fordultak elő, arra utal, hogy elsősorban extracellulárisan folyó proteolitikus degradáció lehet a felelős az AGR és az SGR bőrterületeken megfigyelt gyengébb permeabilitási barrierért, nem pedig az intracelluláris vagy extracelluláris komponensek csökkent termelődése. Elképzelésünket az is alátámasztotta, hogy a KLK5 és a KLK7 extracelluláris proteázok mRNS szintjének mérése során szignifikánsan magasabb expressziót detektáltunk az AGR és az SGR bőrben, szemben a GP régióval. Ezen kívül a vizsgált kallikreinek fehérje szinten is emelkedést mutattak az AGR és SGR bőrrégiókban, az apokrin- és a faggyúmirigyek általi termelődésüknek köszönhetően. Ezek az eredményeink összhangban állnak azzal a korábbi tanulmánnyal is, amelyben a szerzők az arcról és a hónaljából gyűjtött verejték mintákban magasabb KLK szintet mutattak ki (166); azonban fontosnak tartjuk a jövőben a TJ molekulák KLK-k általi közvetlen proteolitikus lebomlását zimográfiai elemzéssel is megerősíteni.

Mivel a KLK5 és a KLK7 fő hasítási célpontjai a DSG1, a DSC1 és a CDSN molekulák, ezért azt feltételezzük, hogy ezek az enzimek lehetnek közvetlenül felelősek a korneodezmoszómák degradációjáért az SGR és az AGR bőrrégiókban (147, 167). Továbbá a KLK-k többféle, a TJ degradációjában szerepet játszó enzimet (pl. PAR2, mátrix metallo-proteázok) is képesek aktiválni, melyek legalább részben, szintén felelősek lehetnek a TJ gyengeségéért az SGR és az AGR régiókban (168-170). Ezenkívül a régióspecifikus baktériumok és gombák, a Propionibaktérium és Malassezia az SGR-ben; Corynebaktérium, Proteobacteria és Staphylococcus aureus az AGR bőrben (163, 164) is hatással lehetnek a permeabilitási barrierre, exogén szerin- és cisztein peptidázok termelésével (171-177).

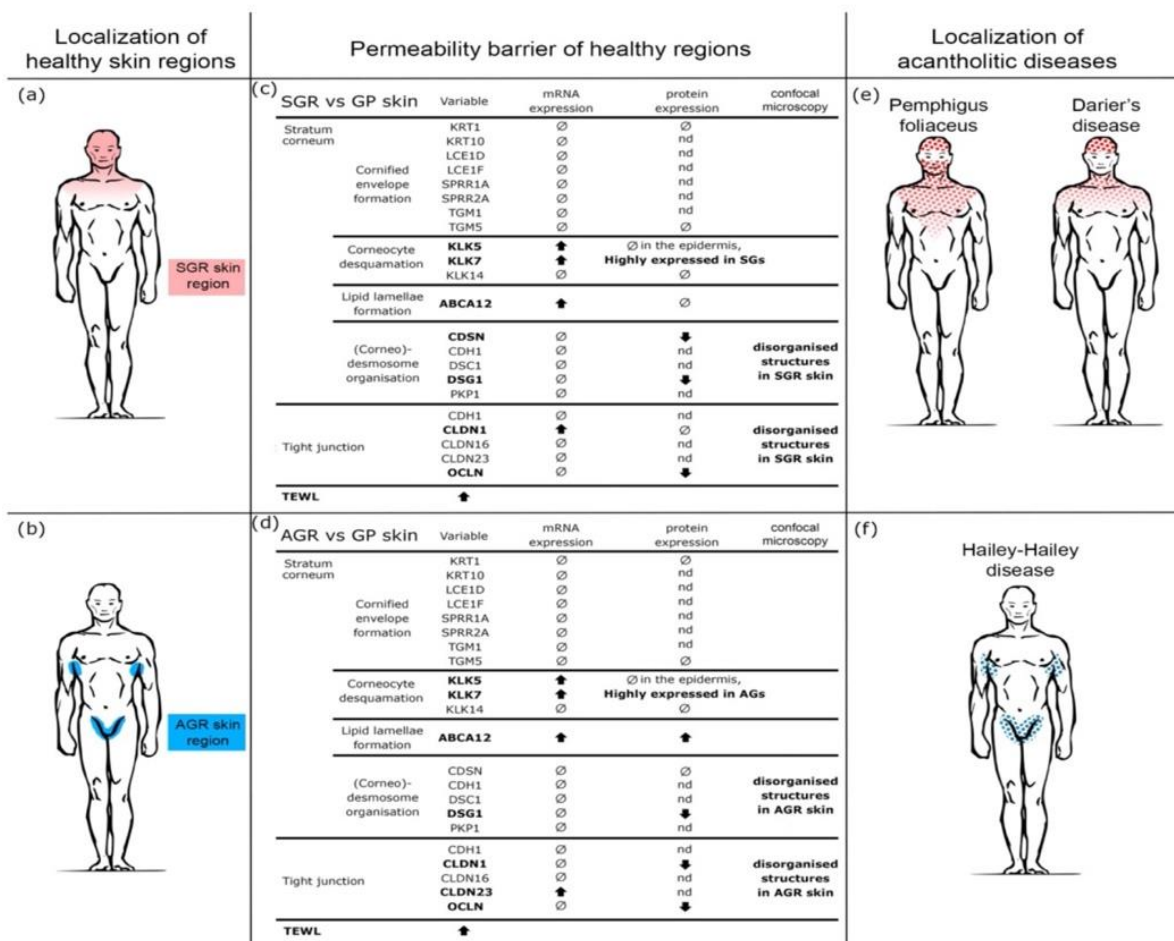
Az ABCA12 lipid transzporter egy olyan molekula, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a lipid lamellák képződésében. mRNS szintű vizsgálattal ez a molekula erős upregulációt mutatott az SGR és AGR régiókban, valamint fehérje szinten is jelentős növekedést mutatott az AGR régiókban a GP-hez képest. Az ABCA12 expressziójában megjelenő különbségek kiemelik bőrünk heterogén jellegét; azonban ennek pontos értelmezéséhez további vizsgálatokra van szükségünk.

A molekuláris eredményeink megerősítésére, valamint a korneodezmoszómák és TJ-ök organizációjának és eloszlásának megértéséhez a különböző bőrrégiókat konfokális mikroszkóppal is vizsgáltuk. Eredményeink megerősítették a fentebb találtakat, miszerint a vizsgált molekulák szerveződése is eltérő a régiók között. A korneodezmoszómák és TJ molekulák a GP régióban szabályosan oszlanak el, ahogy az várható volt. Ezzel szemben az AGR és az SGR területeken a kapcsoló struktúrák rendezetlen módon voltak jelen.

Összefoglalva elmondható, hogy az egészséges AGR és SGR bőrrégiókra magasabb TEWL és emelkedett KLK enzim szint jellemző, bizonyos korneodezmoszóma és TJ fehérjék pedig csökkent expressziót mutatnak, emellett szabálytalanul eloszló korneodezmoszómák és TJ-ök figyelhetők meg a két régióban, a GP területhez képest. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az AGR és az SGR régiók permeabilitási barrierje bőrünk gyenge pontjai, melynek klinikai következményei is felismerhetőek. Eredményeink magyarázatot adhatnak néhány akantolitikus bőrbetegség, köztük a pemphigus foliaceus (PF), (178-180) a Darier-kór (DD) (181, 182) és a Hailey-Hailey betegség (HHD) esetében azon kérdésekre, hogy miért bizonyos életkorban és miért bizonyos bőrrégióban jelennek meg ezen kórképek (182, 183) **(21. ábra)**.

Ezeknek a bőrbetegségeknek közös jellemzője a KC adhézió elvesztése károsodott dezmoszóma/korneodezmoszóma képződés következtében, melyet DD-ben és HHD-ben mutációk, PF-ban pedig autoantitestek okoznak (178-184) DD-ben és HHD-ban az ATP2A2 és az ATP2C1 Ca^{2+} pumpa génjeinek mutációi okoznak károsodott dezmoszóma/korneodezmoszóma képződést (179, 180, 184), és habár ezek a gének az egész élet során, és minden KC-ban jelen vannak, maga a klinikai tünetek mégis általában serdülőkor után jelentkeznek, és szinte mindig az SGR/AGR területeken (179, 183, 184). Úgy gondoljuk, hogy azért a pubertás után manifesztálódnak a DD és a HHD dezmoszómáinak genetikai változásai, és azért leginkább az SGR és AGR bőrrégiókban, mert ezekben a régiókban gyengébb permeabilitási barrier jellemző, ami a serdülőkor után jelenik meg, a serdülőkori mikrobióta változás, a megnövekedett KLK enzim szint, a kapcsoló fehérjék degradációja és a következményesen meggyengült dezmoszómák és TJ-k eredményeként. A két betegség jellegzetes SGR/AGR lokalizációja (**21. ábra**) és pubertás utáni megjelenése is magyarázható tehát az eredményeink alapján. A PF-ben bár az egész bőrfelületen kötődnek az anti-desmoglein1 antitestek a dezmoszómákhoz, a hólyagok kialakulásának első és domináns klinikai jelei mégis az SGR területeken jelentkeznek, ahol a korneodezmoszómák/TJ-k gyengeségei eleve szenzitívebbé teszi ezeket a régiókat a betegség kialakulására. Ezekből az adatokból jelentős terápiás következmények is levonhatóak. Azon enzimek szabályozása, melyek az extracelluláris kapcsoló molekulák fokozott degradációjáért és ennek következtében az SGR/AGR bőrterületek meggyengült sejtkapcsolataiért valószínűleg felelőssé tehető, a lokálisan alkalmazott inhibitorok vagy antibiotikumok-antimycotikumok használatával késleltetheti vagy akadályozhatja ezen betegségek megjelenését.

Összefoglalva elmondható, hogy a bőrünk topográfiai szempontból egy heterogén, nem egységes szerv, melyet nemcsak regionálisan eltérő kémiai és mikrobiális környezet valamint eltérő immunaktivitás, hanem eltérő permeabilitási barrier funkció is jellemez. A topográfiailag eltérő bőrterületek egyedi jellemzői jelentős hatással vannak a kialakult bőrbetegségek patogenezisére, fejlődésére és lokalizációjára. Ezeket az adatokat nem csak tudományosan, de terápiás megközelítéseknél is érdemes figyelembe venni.



21. ábra. Az SGR és az AGR bőrrégiókra jellemző meggyengült permeabilitási barrier magyarázatot adhat néhány akantolitikus bőrbetegség régióspecifikus előfordulására

(a, b) Az eltérő kémiai környezet, mikrobióta összetétel és immunaktivitás alapján három topográfiailag különböző egészséges bőrrégiót különböztethetünk meg: a mirigyekben szegény (GP), az apokrin mirigyekben (AGR) és a faggyúmirigyekben (SGR) gazdag bőrterületeket (c, d). Jelenlegi eredményeink alapján elmondható, hogy ezen egészséges bőrrégiókban a permeabilitási barrier jellegzetességei is eltérnek. Ezek a különbségek elsősorban a sejtkapcsoló struktúrákat érintik, ahol a fehérjekomponensek expressziója és sejtmembránbeli szerveződésük szignifikánsan alacsonyabb szintet mutatott az SGR és az AGR mintákban, a GP-hez képest. Ezek a különbségek leginkább fehérje szinten jelentkeznek, mely az enzimatis degradáció szerepére utal a sejtkapcsolatok meggyengülésében, az AGR és SGR területeken. Az eredmények összhangban vannak az ezeken a területeken detektálható erős KLK5 és KLK7 pozitivitással. A gyenge permeabilitási barrierrel az AGR és az SGR régiókban TEWL mérések is igazolták. (e, f) Vizsgálatunk eredményei magyarázatot adnak azokra a jól ismert, de magyarázattal eddig nem rendelkező klinikai megfigyelésekre, miszerint néhány akantolitikus bőrbetegség bizonyos bőrterületekre lokalizálódik. A Pemphigus foliaceus (PF) először az SGR bőrterületeken alakul ki, míg a Darier-kór (DD) és a Hailey-Hailey betegség (HHD) az SGR és az AGR bőrrégiókban fordul elő. Jelenlegi adataink azt mutatják, hogy ezek a bőrrégiók egyensúlyi állapotban is meggyengült permeabilitási barrierrel rendelkeznek, így ezek úgy mond a bőrünk gyenge láncszemei.

A rosaceás betegek érintett arcbőrének klinikai képe és a rajtuk elvégzett funkcionális vizsgálatok permeabilitás barrier eltérésekre utalnak (113, 114). Ennek ellenére a rosaceás bőr barrier zavarát molekuláris szinten eddig senki nem vizsgálta. Jelen tanulmányban ROS bőrminták teljes transzkriptom analízisét (RNASeq) végeztük el, majd a beteg bőr génextpressziós profilját összehasonlítottuk az egészséges SGR bőr profiljával. Eredményeink a bőr permeabilitási barrier legfontosabb komponenseinek súlyos károsodását jelezték ROS-ban. Az intakt bőrbarrier elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásához, mivel védi szervezetünket a különböző mikrobáktól és külső hatásoktól. Az irodalom az epidermisz legkülső rétegét, a SC-ot és a TJ-t tekinti a permeabilitási barrier legfőbb alkotóelemeinek (34, 185). A SC-ot alkotó molekulák további négy csoportba oszthatók: a CE kialakításában és az intercelluláris lipid lamellák képződésében résztvevő molekulák, a korneodezmoszóma komponensek és a korneociták hámlásában résztvevő molekulák (34, 185). A CE többféle intracelluláris fehérjéből épül fel, beleértve a FLG, LOR, LCE és SPRR fehérjéket, továbbá az envoplakint, periplakint, IVL-t és a keratohialin granulumból származó KRT filamentumokat (34, 93, 186, 187). Ezen fehérjék keresztkötését a TGM1, TGM3 és TGM5 enzimek katalizálják (188). Eredményeink alapján elmondható, hogy a FLG, LOR, KRT1, KRT10 és LCE1D molekulák szignifikánsan downregulálódtak, míg az SPRR2 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott ROS bőrben, az egészséges SGR bőrhöz viszonyítva. Fehérje szintű vizsgálatainkkal is megerősítettük a LOR és a KRT1 szignifikáns csökkenését a ROS bőrben. A TGM-ok expressziója sem mRNS, sem fehérje szinten nem mutatott szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között. A lipid lamellák képződése szintén fontos az intakt SC réteg kialakításában, ahol a lipoxigenázok (ALOX12B és ALOXB3) és a lipid transzporterek (ABCA12) nélkülözhetetlen szerepet játszanak a lipidek szintézisében és szállításában (59, 189, 190). Vizsgálatunkban az ABCA12 molekula szignifikánsan csökkent mRNS expressziót mutatott ROS-ban a kontroll bőrhöz képest. A SC másik alkotóeleme a dezmoszóma apparátus, mely a korneociták sejtadhéziójáért felelős (34, 185). Eredményeink szerint a dezmoszóma komponensek erősen károsodtak ROS-ban, amit a CDH1, CDSN, DSC1, DSG1 és PKP1 szignifikánsan csökkent génextpressziós szintje bizonyít. IHC festéssel a DSG1 molekula szignifikáns csökkenését fehérje szinten is sikerült megerősítenünk. A SC-ban a korneociták leválását, azaz a hámlást elsősorban a KLK enzimek (KLK5, KLK7 és KLK14) szabályozzák egy pH-dependens proteolitikus kaszkádon keresztül (55, 191). Tanulmányunkban a KLK5, KLK7 és KLK14 esetében hasonló génextpressziós szintet detektáltunk a léziós ROS-ban mint az egészséges bőrben; az enzimek fehérje szintjét és aktivitását azonban nem vizsgáltuk.

A SC mellett a TJ is fontos szerepet játszik a bőr barrier integritásának fenntartásában, mivel a SG szomszédos KC-ait összekötve megakadályozzák a víz és az oldott anyagok szabad áramlását. A TJ-t transzmembrán fehérjék alkotják, főként CLDN-ok és OCLN-ok (62, 192). Vizsgálatunkban a CLDN1, CLDN16, CLDN23 és OCLN mRNS szintje szignifikánsan csökkent a ROS-ban a kontroll csoporthoz képest. A CLDN1 szignifikáns csökkenését fehérje szinten, IHC módszerrel is bizonyítottuk.

A SC és a TJ összetevőkkel párhuzamosan két további molekulacsoport vizsgálatára összpontosítottunk: a kulcsfontosságú barrier alarminokra és az AMP-kre, mivel ezeknek a molekuláknak az expressziós szintje szoros kapcsolatban áll a permeabilitás barrier struktúrkomponenseinek szintjével (143, 193). Tanulmányunkban az összes vizsgált alarmin barrier molekula (KRT6A, KRT16 és KRT17) és AMP (CAMP, hBD-2, LCN2, S100A7, S100A8 és S100A9) szignifikánsan upregulálódott a ROS bőrben a kontroll bőrhöz képest. Az LCN2, S100A8 és KRT6 szignifikánsan magasabb jelenlétét fehérje szintű vizsgálatokkal is megerősítettük ROS-ban. Ismereteink szerint eddig csak egy tanulmány végzett teljes transzkriptom analízist rosaceás mintákon. Ebben a tanulmányban a szerzők különféle rosacea altípusok immunológiai tulajdonságainak vizsgálatára összpontosítottak, viszont barrier komponensekről nem közöltek adatokat (106). Egy másik tanulmányban Deng és munkatársai a CE komponenseit, közülük is a KRT10, FLG és LOR mRNS expresszióját vizsgálták különféle rosacea altípusokban (150). Megvizsgálták a CLDN1 TJ fehérje expresszióját is, és eredményeinkhez hasonlóan szignifikánsan alacsonyabb gén és fehérje szintet tudtak kimutatni rosaceában a kontroll mintákhoz képest. A KRT10 és LOR mRNS szintjének vizsgálatakor viszont a tanulmány szerzői nem találtak szignifikáns különbségeket a ROS és a kontroll minták között, fehérje szintű vizsgálatokat pedig nem végeztek (150). A KLK5 expressziójának mérését rosaceában egy másik munkacsoport is elvégezte, akik azt találták, hogy a molekula mRNS- és fehérje szintű expressziója jelentősen megnőtt rosaceában, valamint ezzel párhuzamosan megemelkedett enzimaktivitást is detektáltak; a szerzők azonban nem határozták meg, hogy melyik rosacea altípuson végezték el a vizsgálatokat (118, 194).

Vizsgálatunkban mi nem detektáltunk szignifikánsan emelkedett KLK5 mRNS szintet ROS-ban, illetve sem fehérje szintű vizsgálatot, sem enzimaktivitás mérést nem végeztük. Az AMP-k közül csak a cathelicidin expresszióját vizsgálták korábban ROS-ban, míg a hBD-2-re vonatkozó adatok csak okuláris rosaceában állnak rendelkezésre (118, 194, 195). E korábbi eredményekkel összhangban kutatásunk során mi is azt találtuk, hogy a cathelicidin és a hBD-2 mRNS expressziója szignifikánsan upregulálódott ROS-ban, az SGR mintákkal

összehasonlítva.

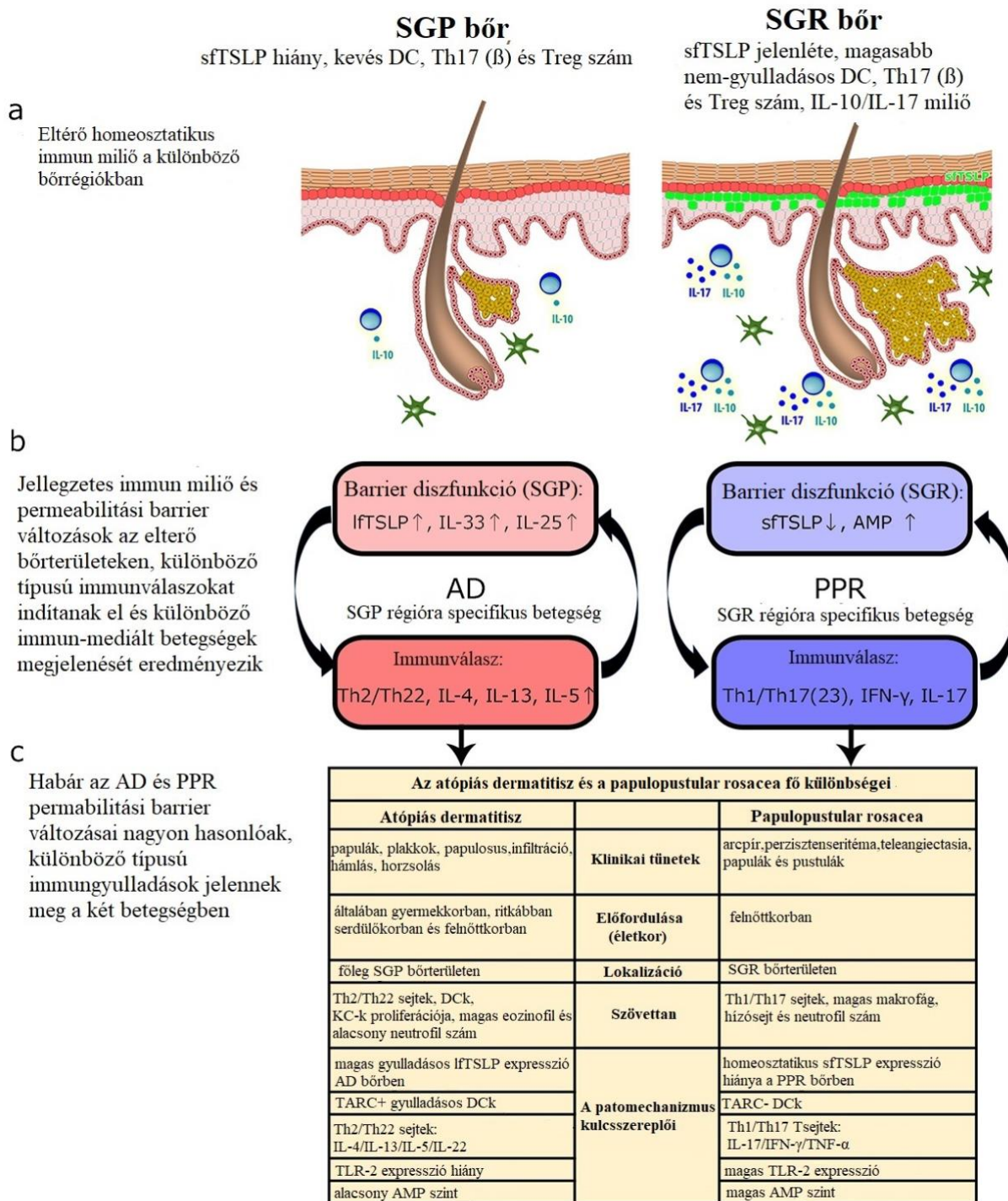
Összefoglalva tehát, a részletes molekuláris biológiai vizsgálatunk során, ideértve a teljes transzkriptom analízist és bioinformatikai elemzéseket, valamint QRT-PCR és kvantitatív IHC vizsgálatokat, azt találtuk, hogy ROS-ban a bőr permeabilitási barrierjének minden fő alkotóelemében súlyos károsodás mutatható ki, ami jelentősen hozzájárulhat a betegség patofiziológiájához. A barrier elváltozások vizsgálata nagy jelentőségűvé vált az elmúlt években. AD-ban bebizonyosodott, hogy a barrier változások képesek bőrgyulladást kiváltani, így iniciáló tényezőnek is tekinthetők a betegség patogenezisében. Ebből a szempontból érdekes, hogy nagyon hasonló barrier elváltozásokat figyeltünk meg ROS-ban és AD-ban. Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján elmondható, hogy a CE komponensek, a dezmoszóma és TJ molekulák, valamint az alarmin barrierok és AMP-k megváltozott expressziója valóban hasonlóságot mutat a két betegségben. Ezen hasonlóságokat fehérje szinten is megerősítettük bizonyos molekulák IF festésével. Meglepő a ROS és az AD bőrben jelen levő barrier károsodás közötti hasonlóság, mivel ezidáig elsősorban ezen betegségek eltérő klinikai jellemzőit és immunológiai jellegzetességeik közötti különbségeket hangsúlyozták (**21. ábra**).

Jól ismert, hogy az AD-ben megjelenő barrierkár iniciálója lehet a betegségre jellemző gyulladásnak, viszont eredményeink alapján jelenleg még nem tudtuk meghatározni, hogy a rosaceában megjelenő barrier károsodás a gyulladás elindítója vagy következménye. Rosaceában a barrier károsodását okozhatja a betegségre jellemző IL-17A és a Th1/Th17 típusú gyulladás, melyről az utóbbi időben bebizonyosodott, hogy a FLG, LOR és KRT10 mRNS szinteket szabályozza organotípusos 3D bőr ekvivalens modellben (196). Másrészt az is lehetséges, hogy a diszfunkcionális barrier a rosacea kialakulásának kiinduló tényezője. Amíg a barrier megváltozása AD-ben Th2 típusú gyulladást eredményez, az ehhez hasonló barrier zavar úgy tűnik rosaceában Th1/Th17 típusú gyulladást válthat ki. Ezen látszólagos ellentmondásra a magyarázatot az adja, hogy az AD a GP régióra, míg a rosacea kizárólag az SGR bőre lokalizálódik. Az SGR és a GP bőrfelületeken eltérő homeosztatisz immun- és permeabilitás barrier milió van jelen, mely eltérő szöveti környezetben azonos barrier károsodás okozhat eltérő típusú immunaktivációt és következményesen eltérő klinikai gyulladást (12, 13).

Az SGR és GP régiók eltérő szöveti-immun miliójére számos bizonyíték látott napvilágot az elmúlt években. Míg az SGR bőrrégiók szignifikánsan magasabb AMP-szintet mutatnak, illetve a nem-gyulladásos Th17 (β) és a szabályozó T sejtek száma, valamint a homeosztatisz „short” vagy rövid formájú (sf) Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) konstitutív

expressziója is magas ebben a régióban, addig ezzel ellentétben a GP bőrre egy alacsonyabb AMP-szint és T sejt szám jellemző, a TSLP pedig hiányzik steady-state állapotban (12, 13). A bőr ezen eltérő regionális tulajdonságai nagyon hasonlóak a bél barrierhez, ahol a regionális immunrendszerrel kapcsolatos különbségek már jól ismertek. A vékonybélben magas a Th17 (β) sejtek száma és a sTSLP is jelen van, míg a vastagbélben a Th17 (β) sejtek hiányoznak, és a sTSLP is csak a proximális szakaszban van jelen (197, 198). Felvetették, hogy a különböző bélszakaszok ezen egyedi immun- és barrier jellemzői különféle típusú immunmediált betegségekhez vezethetnek. A Crohn-betegségben a sTSLP hiánya a vékonybélben elősegítheti a gyulladást Th1/Th17 sejtek aktiválását (197, 198), míg ezzel ellentétben a colitis ulcerosa esetében a gyulladást, hosszú formájú (lf) TSLP szignifikánsan megnövekedett szintje indít el egy Th2 típusú gyulladást a vastagbélben (199). Ezen megállapítások alapján azt feltételezzük, hogy az SGR és a GP bőrregiók hasonló barrier károsodásai, eltérő homeosztatisz immun- és barrier környezetük miatt, különböző immunmediált bőrbetegségeket indítanak el, melyek egyedi klinikai tulajdonságait a különböző Th alcsoportok adják (AD az SGP míg a ROS az SGR területeken) (**22. ábra**). De Benedetto és munkatársai már korábban szintén felvetették annak a lehetőségét, hogy a barrier károsodás által elindított KC aktiváció különböző eredetű mediátorok termelődéséhez vezethet a szöveti környezettől függően, beleértve a pro-Th2 és a pro-Th17 típusú KC citokineket is, melyek eltérően befolyásolják a Th válasz jellemzőit és a klinikai képet (200).

Annak a meghatározásához, hogy a ROS barrier károsodása a betegség iniciálója, vagy pedig a gyulladás következménye, meg kell vizsgálni a barrier károsodás pontos idejét, és a jövőben részletesen elemezni kell a (papulopustuláris) ROS betegek peri-lézionális és/vagy non-lézionális bőr területeit is. Ezen felül hasonló kísérletekre van szükség a rosacea más altípusaiban is. Összegezve, eredményeink egyértelműen bizonyítják a ROS-betegek barrierjének súlyos károsodását az arcbőrben, ezért javasoljuk a bőr barrier-helyreállító kezelések alkalmazását a rosacea kezelésének klinikai irányelveibe illeszteni, hasonlóan az AD-hez.



22. ábra. A permeabilitási barrier megváltozásának lehetséges szerepe a papulopustuláris rosacea patogenezisében. Az AD és a PPR összehasonlításánál a bőrgyógyászok eddig elsősorban klinikai és immunológiai tulajdonságaik közötti különbségeket hangsúlyozták. Eredményeink alapján azonban ezt a két bőrbetegséget egy másik szempontból is vizsgálhatjuk, mivel mindkét betegséget súlyos, de hasonló bőr barrier károsodás jellemez, attól függetlenül, hogy eltérő bőrregiókban alakulnak ki. Feltételezésünk szerint (a) a bőrregiók (SGR és GP bőr) – ahol ezek a betegségek általában lokalizálódnak – eltérő immun- és permeabilitási barrier jellemzői határozzák meg (b) a barrier kárhoz kapcsolódó gyulladás jellegét, amely (c) különböző régió specifikus immun-mediált betegségek kialakulásához vezethet. Ez magyarázhatja a különbséget az AD és a PPR között.

Rövidítések: AD, atópiás dermatitis; AMP, antimikrobiális peptid; DC, dendritikus sejt; IFN- γ , interferon gamma; IL, interleukin; KC, keratinocita; lFTSLP, hosszú formájú Thymic Stromal Lymphopietin; sFTSLP, rövid formájú Thymic Stromal Lymphopietin; PPR, papulopustularis rosacea; GP, mirigyekben szegény; SGR, faggyúmirigyben gazdag; TARC, thymus- és aktiváció-szabályozott kemokin vagy CCL17; Th, T helper; Th17 (β), nem gyulladásos Th17 sejt; Th17 (23), gyulladásos Th17 sejt; TLR2, Toll-szerű 2 receptor; Treg, szabályozó T sejt

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A különböző bőrrégiók barrier funkciójának vizsgálata során első lépésként TEWL méréseket végeztünk egészséges SGR, AGR és GP bőrrégiókban. Megállapítottuk, hogy a vizsgált bőrrégiók közül az SGR és AGR régiókban szignifikánsabban magasabb TEWL detektálható, ami károsodott barrier funkcióra utal. Ennek tükrében gén és fehérje szintű vizsgálatokkal tanulmányoztuk a permeabilitási barrier legfontosabb molekuláit a különböző bőrrégiókban: a CE molekulákat (KRT1, KRT10, LCE1D, LCE1F, SPRR1A, SPRR2A, TGM1 és TGM5), a korneocita deszkvamációjában résztvevő enzimeket (KLK5, KLK7), az ABCA12 lipid transzport molekulát, a korneodezmoszóma (CDH1, CDSN, DSC1, DSG1, PKP1) és TJ komponenseket (CLD1, CLDN16, OCLN). A vizsgálatokat QRT-PCR, IHC, IF módszerrel végeztük, melyet konfokális mikroszkópiával egészítettünk ki. Eredmények alapján elmondható, hogy az egészséges AGR és SGR bőrrégiókban magasabb TEWL és KLK enzim szint detektálható, viszont bizonyos korneodezmoszómák és TJ fehérjék expressziója csökkent expressziót mutat. Emellett korneodezmoszómák és TJ-k szabálytalan eloszlása figyelhető meg ezekben a régiókban, a GP területekhez képest. Összefoglalva, az eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az AGR és az SGR régiók gyengébb permeabilitási barrierrel rendelkeznek.

A második kutatásunk során ROS betegek bőrmintáin vizsgáltuk a permeabilitási barrier jellegzetességeit molekuláris biológiai módszerekkel, SGR bőrhöz hasonlítva. A vizsgálatok során teljes transzkriptom analízist és bioinformatikai elemzéseket hajtottunk végre, melyek eredményeit QRT-PCR, IHC és IF módszerekkel erősítettünk meg. Eredményeink alapján elmondható, hogy ROS-ban a proliferációban szerepet játszó markerek (KRT6, 16, 17) szignifikánsan emelkedett expressziót, míg a differenciációért felelős markerek (FLG, LCE1, LOR, KRT1, 10) és a sejtkapcsoló struktúrák felépítésében résztvevő (CLDN1, 16, 23, CDH1, CDSN, DSC1, DSG1, PKP1) molekulák pedig szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutattak az SGR bőrhöz viszonyítva. Összefoglalva elmondható, hogy ROS-ban a permeabilitási barrier minden fő alkotóeleme esetében súlyos károsodás mutatható ki, ami jelentősen hozzájárulhat a betegség patofiziológiájához. AD-ban ismert, hogy a barrier változások képesek bőrgyulladást kiváltani, és így a betegség patogenezisének iniciáló faktoraként is tekinthetőek, ezért érdekes, hogy nagyon hasonló barrier elváltozásokat figyeltünk meg a ROS-ban.

8. SUMMARY

As a first step, in order to study barrier function, we performed transepidermal water loss (TEWL) measurements in the healthy sebaceous gland-rich (SGR), apocrine gland-rich (AGR) and gland-poor (GP) skin regions. We found significantly higher TEWL levels in the SGR and AGR regions compared to GP areas, which indicates that AGR and SGR regions may have impaired barrier function. Thus, we investigated the most important permeability barrier related molecules in different skin regions by gene and protein level studies: cornified envelope (CE) molecules (KRT1, KRT10, LCE1D, LCE1F, SPRR1A, SPRR2A, TGM1 and TGM5), enzymes taking part in desquamation (KLK5, KLK7), the ABCA12 lipid transporter molecule, the corneodesmosome (CDH1, CDSN, DSC1, DSG1, PKP1) and tight junction (TJ) components (CLD1, CLDN16, OCLN). Our investigations were performed by QRT-PCR and IHC, IF and the distribution of junction structures were visualized using confocal microscopy. According to our findings, higher TEWL and KLK levels were detected in the SGR/AGR skin areas, although the expression of corneodesmosome and TJ proteins were decreased in these regions. In addition, we also detected irregularly distributed corneodesmosomes and TJs in the SGR and AGR skin areas compared to GP skin. In summary, we found that SGR and AGR areas are characterized by weaker permeability barrier features compared to GP skin regions.

In our second study, using several molecular biological methods, we aimed to investigate the permeability barrier alterations in skin samples from patients with rosacea (ROS) and compared them to healthy SGR skin. In this study, transcriptome analysis and bioinformatics analyses were performed. Validation of the expression levels were performed by QRT-PCR, IHC and IF methods. According to our findings, the proliferation markers (KRT6, 16, 17) showed significantly higher expression levels in ROS, while molecules taking part in differentiation (FLG, LCE1, LOR, KRT1, 10) and cell junction formation (CLDN1, 16, 23, CDH1, CDSN, DSC1, DSG1, PKP1) were significantly downregulated compared to SGR skin. In conclusion, all major components of the permeability barrier in rosacea are severely impaired, which may significantly contribute to disease pathophysiology. In atopic dermatitis, it is known that barrier alteration induces skin inflammation and can be considered as an initiating factor in the pathogenesis of the disease, which is interesting since in our current study we detected very similar barrier alterations in rosacea.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(10):679-91.
2. Hänel KH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM. Cytokines and the skin barrier. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(4):6720-45.
3. Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*. 2020;160(2):116-25.
4. Qureshi MAS. Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(4).
5. Krueger GG, Stingl G. Immunology/inflammation of the skin--a 50-year perspective. *The Journal of investigative dermatology*. 1989;92(4 Suppl):32s-51s.
6. Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *Journal of dermatological science*. 2013;71(2):89-99.
7. Brandner JM, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck LA, De Benedetto A. Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue barriers*. 2015;3(1-2):e974451.
8. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity*. 2011;35(6):857-69.
9. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in dermatology*. 2012;30(3):257-62.
10. Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science (New York, NY)*. 2014;346(6212):954-9.
11. Kong HH, Segre JA. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Investigating the Skin Microbiome. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(5):e119-e22.
12. Dajnoki Z, Béke G, Kapitány A, Mócsai G, Gáspár K, Rühl R, et al. Sebaceous Gland-Rich Skin Is Characterized by TSLP Expression and Distinct Immune Surveillance Which Is Disturbed in Rosacea. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(5):1114-25.
13. Béke G, Dajnoki Z, Kapitány A, Gáspár K, Medgyesi B, Pólska S, et al. Immunotopographical Differences of Human Skin. *Frontiers in immunology*. 2018;9:424.
14. Jenei A, Dajnoki Z, Medgyesi B, Gáspár K, Béke G, Kinyó Á, et al. Apocrine Gland-Rich Skin Has a Non-Inflammatory IL-17-Related Immune Milieu, that Turns to Inflammatory IL-17-Mediated Disease in Hidradenitis Suppurativa. *The Journal of investigative dermatology*. 2019;139(4):964-8.
15. Henry J, Toulza E, Hsu CY, Pellerin L, Balica S, Mazereeuw-Hautier J, et al. Update on the epidermal differentiation complex. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2012;17(4):1517-32.
16. Boer M, Duchnik E, Maleszka R, Marchlewicz M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2016;33(1):1-5.
17. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic therapy*. 2004;17 Suppl 1:6-15.
18. Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *International journal of cosmetic science*. 2008;30(6):413-34.
19. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(4):328-40.
20. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 17):3069-70.
21. Addor FA, Aoki V. Skin barrier in atopic dermatitis. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2010;85(2):184-94.
22. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*. 2008;17(12):1063-72.
23. Nemes Z, Marekov LN, Steinert PM. Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to

- membranes directs residue specificity. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(16):11013-21.
24. Steinert PM, Candi E, Tarcsa E, Marekov LN, Sette M, Paci M, et al. Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell death and differentiation*. 1999;6(9):916-30.
 25. Backendorf C, Hohl D. A common origin for cornified envelope proteins? *Nature genetics*. 1992;2(2):91.
 26. Vanhoutteghem A, Djian P, Green H. Ancient origin of the gene encoding involucrin, a precursor of the cross-linked envelope of epidermis and related epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(40):15481-6.
 27. Candi E, Tarcsa E, Idler WW, Kartasova T, Marekov LN, Steinert PM. Transglutaminase cross-linking properties of the small proline-rich 1 family of cornified cell envelope proteins. Integration with loricrin. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(11):7226-37.
 28. Tarcsa E, Candi E, Kartasova T, Idler WW, Marekov LN, Steinert PM. Structural and transglutaminase substrate properties of the small proline-rich 2 family of cornified cell envelope proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(36):23297-303.
 29. Resing KA, Dale BA, Walsh KA. Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides. *Biochemistry*. 1985;24(15):4167-75.
 30. Resing KA, Johnson RS, Walsh KA. Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry*. 1993;32(38):10036-45.
 31. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3 Suppl 2):R2-6.
 32. Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*. 1993;18(1):92-9.
 33. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *The Journal of investigative dermatology*. 1996;106(5):989-92.
 34. Egawa G, Kabashima K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;138(2):350-8.e1.
 35. Hennings H, Steinert P, Buxman MM. Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1981;102(2):739-45.
 36. Yaffe MB, Murthy S, Eckert RL. Evidence that involucrin is a covalently linked constituent of highly purified cultured keratinocyte cornified envelopes. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;100(1):3-9.
 37. Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *Journal of cell science*. 1994;107 (Pt 2):693-700.
 38. Steinert PM, Candi E, Kartasova T, Marekov L. Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *Journal of structural biology*. 1998;122(1-2):76-85.
 39. DiColandrea T, Karashima T, Määttä A, Watt FM. Subcellular distribution of envoplakin and periplakin: insights into their role as precursors of the epidermal cornified envelope. *The Journal of cell biology*. 2000;151(3):573-86.
 40. Suzuki Y, Nomura J, Hori J, Koyama J, Takahashi M, Horii I. Detection and characterization of endogenous protease associated with desquamation of stratum corneum. *Archives of dermatological research*. 1993;285(6):372-7.
 41. Simon M, Jonca N, Guerrin M, Haftek M, Bernard D, Caubet C, et al. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20292-9.
 42. Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ. Desmosomes: intercellular

adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *International review of cytology*. 1999;185:237-302.

43. Simon M, Bernard D, Minondo AM, Camus C, Fiat F, Corcuff P, et al. Persistence of both peripheral and non-peripheral corneodesmosomes in the upper stratum corneum of winter xerosis skin versus only peripheral in normal skin. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;116(1):23-30.
44. Roop D. Defects in the barrier. *Science (New York, NY)*. 1995;267(5197):474-5.
45. Egelrud T, Lundström A. A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Archives of dermatological research*. 1991;283(2):108-12.
46. Hansson L, Strömquist M, Bäckman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T. Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(30):19420-6.
47. Egelrud T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta dermato-venereologica Supplementum*. 2000;208:44-5.
48. Sondell B, Thornell LE, Stigbrand T, Egelrud T. Immunolocalization of stratum corneum chymotryptic enzyme in human skin and oral epithelium with monoclonal antibodies: evidence of a proteinase specifically expressed in keratinizing squamous epithelia. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1994;42(4):459-65.
49. Sondell B, Thornell LE, Egelrud T. Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;104(5):819-23.
50. Franzke CW, Baici A, Bartels J, Christophers E, Wiedow O. Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(36):21886-90.
51. Williams ML. Lipids in normal and pathological desquamation. *Advances in lipid research*. 1991;24:211-62.
52. Warner RR. Water content from analysis of freeze-dried thin sections. *Journal of microscopy*. 1986;142(Pt 3):363-9.
53. Ohman H, Vahlquist A. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta dermato-venereologica*. 1994;74(5):375-9.
54. Walsh A, Chapman SJ. Sugars protect desmosome and corneosome glycoproteins from proteolysis. *Archives of dermatological research*. 1991;283(3):174-9.
55. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;124(1):198-203.
56. Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Toyama T, Ohka R, Takehara K, et al. Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121(3):542-9.
57. Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(9):3607-19.
58. Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2009;9(5):437-46.
59. Iwai I, Han H, den Hollander L, Svensson S, Ofverstedt LG, Anwar J, et al. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(9):2215-25.
60. Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight junctions: molecular architecture and function. *International review of cytology*. 2006;248:261-98.
61. Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, et al. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *European journal of cell biology*. 2002;81(5):253-63.
62. Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM. Tight junctions form a barrier in

- human epidermis. *European journal of cell biology*. 2010;89(11):839-42.
63. Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Current opinion in cell biology*. 2004;16(2):140-5.
 64. Cereijido M, Contreras RG, Shoshani L. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiological reviews*. 2004;84(4):1229-62.
 65. Stevenson BR, Keon BH. The tight junction: morphology to molecules. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998;14:89-109.
 66. Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *The Journal of cell biology*. 2000;149(1):13-6.
 67. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(6):883-917.
 68. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1993;123(6 Pt 2):1777-88.
 69. Matter K, Balda MS. Occludin and the functions of tight junctions. *International review of cytology*. 1999;186:117-46.
 70. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of cell biology*. 1994;127(6 Pt 1):1617-26.
 71. Matter K, Balda MS. Biogenesis of tight junctions: the C-terminal domain of occludin mediates basolateral targeting. *Journal of cell science*. 1998;111 (Pt 4):511-9.
 72. Nusrat A, Brown GT, Tom J, Drake A, Bui TT, Quan C, et al. Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(4):1725-34.
 73. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 9):1113-21.
 74. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 2002;156(6):1099-111.
 75. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(4):285-93.
 76. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;286(6):C1213-28.
 77. Kwiecien K, Zegar A, Jung J, Brzoza P, Kwitniewski M, Godlewska U, et al. Architecture of antimicrobial skin defense. *Cytokine & growth factor reviews*. 2019;49:70-84.
 78. Béke G, Kapitány A, Dajnoki Z, Steuer-Hajdu K, Gáspár K, Bíró T, et al. A bőr immunrendszerének felépítése és működése. *Immunology*. 2015;7(2):4-12.
 79. Harder J, Schröder JM, Gläser R. The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. *Experimental dermatology*. 2013;22(1):1-5.
 80. Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Current opinion in immunology*. 2008;20(4):401-7.
 81. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*. 2009;30(3):131-41.
 82. Aberg KM, Man MQ, Gallo RL, Ganz T, Crumrine D, Brown BE, et al. Co-regulation and interdependence of the mammalian epidermal permeability and antimicrobial barriers. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(4):917-25.
 83. Elias PM. Skin barrier function. *Current allergy and asthma reports*. 2008;8(4):299-305.
 84. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(7):503-16.
 85. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010;1(5):440-64.
 86. Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. Antimicrobial psoriasin

- (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nature immunology*. 2005;6(1):57-64.
87. Harder J, Schroder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(48):46779-84.
88. Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(11):1622-31.
89. Csósz É, Emri G, Kalló G, Tsapraillis G, Tózsér J. Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2015;29(10):2024-31.
90. Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature immunology*. 2001;2(12):1133-7.
91. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Annals of nutrition & metabolism*. 2015;66 Suppl 1:8-16.
92. Deckers IA, McLean S, Linssen S, Mommers M, van Schayck CP, Sheikh A. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PloS one*. 2012;7(7):e39803.
93. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*. 2006;38(4):441-6.
94. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(8):1892-908.
95. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10023):1109-22.
96. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(11):2625-30.
97. Ong PY, Leung DY. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Current allergy and asthma reports*. 2006;6(5):384-9.
98. De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(1):14-30.
99. Imokawa G. Lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(1 Suppl):S29-32.
100. Murata Y, Ogata J, Higaki Y, Kawashima M, Yada Y, Higuchi K, et al. Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *The Journal of investigative dermatology*. 1996;106(6):1242-9.
101. Pilgram GS, Vissers DC, van der Meulen H, Pavel S, Lavrijsen SP, Bouwstra JA, et al. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(3):710-7.
102. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(1):3-21; quiz 2-3.
103. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3 Suppl 2):R7-r12.
104. Gordon BR. The allergic march: can we prevent allergies and asthma? *Otolaryngologic clinics of North America*. 2011;44(3):765-77, xi.
105. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(6 Suppl):S118-27.
106. Buhl T, Sulk M, Nowak P, Buddenkotte J, McDonald I, Aubert J, et al. Molecular and Morphological Characterization of Inflammatory Infiltrate in Rosacea Reveals Activation of Th1/Th17 Pathways. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(9):2198-208.
107. Gallo RL, Granstein RD, Kang S, Mannis M, Steinhoff M, Tan J, et al. Rosacea comorbidities and future research: The 2017 update by the National Rosacea Society Expert Committee. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2018;78(1):167-70.

108. Steinhoff M, Buddenkotte J, Aubert J, Sulk M, Novak P, Schwab VD, et al. Clinical, cellular, and molecular aspects in the pathophysiology of rosacea. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings*. 2011;15(1):2-11.
109. Buechner SA. Rosacea: an update. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2005;210(2):100-8.
110. van Zuuren EJ. Rosacea. *The New England journal of medicine*. 2017;377(18):1754-64.
111. Gallo RL, Granstein RD, Kang S, Mannis M, Steinhoff M, Tan J, et al. Standard classification and pathophysiology of rosacea: The 2017 update by the National Rosacea Society Expert Committee. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2018;78(1):148-55.
112. Crawford GH, Pelle MT, James WD. Rosacea: I. Etiology, pathogenesis, and subtype classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004;51(3):327-41; quiz 42-4.
113. Darlenski R, Kazandjieva J, Tsankov N, Fluhr JW. Acute irritant threshold correlates with barrier function, skin hydration and contact hypersensitivity in atopic dermatitis and rosacea. *Experimental dermatology*. 2013;22(11):752-3.
114. Powell FC, Ni Raghallaigh S. Interventions for 'rosacea'. *The British journal of dermatology*. 2011;165(4):707-8.
115. Two AM, Wu W, Gallo RL, Hata TR. Rosacea: part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2015;72(5):749-58; quiz 59-60.
116. Preisz K, Kárpáti S. [Rosacea: pathogenesis, clinical forms and therapy]. *Orvosi hetilap*. 2010;151(30):1209-14.
117. Vemuri RC, Gundamaraju R, Sekaran SD, Manikam R. Major pathophysiological correlations of rosacea: a complete clinical appraisal. *International journal of medical sciences*. 2015;12(5):387-96.
118. Yamasaki K, Gallo RL. Rosacea as a disease of cathelicidins and skin innate immunity. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2011;15(1):12-5.
119. Steinhoff M, Schaubert J, Leyden JJ. New insights into rosacea pathophysiology: a review of recent findings. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;69(6 Suppl 1):S15-26.
120. Meyer-Hoffert U, Schröder JM. Epidermal proteases in the pathogenesis of rosacea. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings*. 2011;15(1):16-23.
121. Rusiecka-Ziółkowska J, Nokiel M, Fleischer M. Demodex - an old pathogen or a new one? *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2014;23(2):295-8.
122. Norn MS. Incidence of Demodex folliculorum on skin of lids and nose. *Acta ophthalmologica*. 1982;60(4):575-83.
123. Forton F, Seys B. Density of Demodex folliculorum in rosacea: a case-control study using standardized skin-surface biopsy. *The British journal of dermatology*. 1993;128(6):650-9.
124. Koller B, Müller-Wiefel AS, Rupec R, Korting HC, Ruzicka T. Chitin modulates innate immune responses of keratinocytes. *PloS one*. 2011;6(2):e16594.
125. Holmes AD. Potential role of microorganisms in the pathogenesis of rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;69(6):1025-32.
126. Mahla RS, Reddy MC, Prasad DV, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Frontiers in immunology*. 2013;4:248.
127. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological reviews*. 2009;227(1):106-28.
128. Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3 Suppl 2):R13-8.
129. Melnik BC. Endoplasmic reticulum stress: key promoter of rosacea pathogenesis. *Experimental dermatology*. 2014;23(12):868-73.
130. Yamasaki K, Kanada K, Macleod DT, Borkowski AW, Morizane S, Nakatsuji T, et al. TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(3):688-97.
131. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunologic*

research. 2008;41(2):87-102.

132. Meller S, Winterberg F, Gilliet M, Müller A, Lauceviciute I, Rieker J, et al. Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(5):1504-16.
133. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003;101(7):2620-7.
134. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer metastasis reviews*. 2011;30(1):83-95.
135. Jansen T, Plewig G. Rosacea: classification and treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1997;90(3):144-50.
136. Aroni K, Tsagrani E, Lazaris AC, Patsouris E, Agapitos E. Rosacea: a clinicopathological approach. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2004;209(3):177-82.
137. Sulk M, Seeliger S, Aubert J, Schwab VD, Cevikbas F, Rivier M, et al. Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(4):1253-62.
138. Pecze L, Szabó K, Széll M, Jósavay K, Kaszás K, Kúsz E, et al. Human keratinocytes are vanilloid resistant. *PloS one*. 2008;3(10):e3419.
139. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.
140. Earley S. Vanilloid and melastatin transient receptor potential channels in vascular smooth muscle. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2010;17(4):237-49.
141. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, et al. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Nature communications*. 2011;2:551.
142. Pozsgai G, Bodkin JV, Graepel R, Bevan S, Andersson DA, Brain SD. Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo. *Cardiovascular research*. 2010;87(4):760-8.
143. Borkowski AW, Gallo RL. The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(2):285-7.
144. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(1):91-7.
145. Schaubert J, Gallo RL. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(3):510-2.
146. McGovern JA, Meinert C, de Veer SJ, Hollier BG, Parker TJ, Upton Z. Attenuated kallikrein-related peptidase activity disrupts desquamation and leads to stratum corneum thickening in human skin equivalent models. *The British journal of dermatology*. 2017;176(1):145-58.
147. Kishibe M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *Journal of dermatological science*. 2019;95(2):50-5.
148. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. *Medical molecular morphology*. 2011;44(1):1-6.
149. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009;25(8):1091-3.
150. Deng Z, Chen M, Xie H, Jian D, Xu S, Peng Q, et al. Claudin reduction may relate to an impaired skin barrier in rosacea. *J Dermatol*. 2019;46(4):314-21.
151. Ghosh D, Ding L, Sivaprasad U, Geh E, Biagini Myers J, Bernstein JA, et al. Multiple Transcriptome Data Analysis Reveals Biologically Relevant Atopic Dermatitis Signature Genes and Pathways. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144316.
152. Brunello L. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):2.

153. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):773-86 e1-7.
154. Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, et al. Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol*. 2005;152(1):146-9.
155. Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Mechin MC, et al. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1094-102.
156. Totsuka A, Omori-Miyake M, Kawashima M, Yagi J, Tsunemi Y. Expression of keratin 1, keratin 10, desmoglein 1 and desmocollin 1 in the epidermis: possible downregulation by interleukin-4 and interleukin-13 in atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2017;27(3):247-53.
157. Rawlings AV, Voegeli R. Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell Tissue Res*. 2013;351(2):217-35.
158. Igawa S, Kishibe M, Minami-Hori M, Honma M, Tsujimura H, Ishikawa J, et al. Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2017;137(2):449-56.
159. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med*. 2007;13(8):975-80.
160. Ballardini N, Johansson C, Lilja G, Lindh M, Linde Y, Scheynius A, et al. Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2009;161(1):40-7.
161. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Othlinghaus N, Brockmeyer NH, Altmeyer P, et al. Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(1):17-24.
162. Patra V, Mayer G, Gruber-Wackernagel A, Horn M, Lembo S, Wolf P. Unique profile of antimicrobial peptide expression in polymorphic light eruption lesions compared to healthy skin, atopic dermatitis, and psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018;34(2):137-44.
163. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(3):143-55.
164. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(4):244-53.
165. Kleesz P, Darlenski R, Fluhr JW. Full-body skin mapping for six biophysical parameters: baseline values at 16 anatomical sites in 125 human subjects. *Skin pharmacology and physiology*. 2012;25(1):25-33.
166. Komatsu N, Tsai B, Sidiropoulos M, Saijoh K, Levesque MA, Takehara K, et al. Quantification of eight tissue kallikreins in the stratum corneum and sweat. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(4):925-9.
167. Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, et al. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *The British journal of dermatology*. 2005;153(2):274-81.
168. Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, et al. Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(1):18-25.
169. Nadeau P, Henehan M, De Benedetto A. Activation of protease-activated receptor 2 leads to impairment of keratinocyte tight junction integrity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;142(1):281-4.e7.
170. Henehan M, De Benedetto A. Update on protease-activated receptor 2 in cutaneous barrier, differentiation, tumorigenesis and pigmentation, and its role in related dermatologic diseases. *Experimental dermatology*. 2019;28(8):877-85.
171. Koziel J, Potempa J. Protease-armed bacteria in the skin. *Cell and tissue research*. 2013;351(2):325-37.

172. Li W, Zhang ZW, Luo Y, Liang N, Pi XX, Fan YM. Molecular epidemiology, in vitro susceptibility and exoenzyme screening of *Malassezia* clinical isolates. *Journal of medical microbiology*. 2020;69(3):436-42.
173. White TC, Findley K, Dawson TL, Jr., Scheynius A, Boekhout T, Cuomo CA, et al. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(8).
174. Nguyen TTH, Myrold DD, Mueller RS. Distributions of Extracellular Peptidases Across Prokaryotic Genomes Reflect Phylogeny and Habitat. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:413.
175. Dessinioti C, Katsambas AD. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clinics in dermatology*. 2010;28(1):2-7.
176. Williams MR, Nakatsuji T, Sanford JA, Vrbanac AF, Gallo RL. *Staphylococcus aureus* Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(2):377-84.
177. Hirasawa Y, Takai T, Nakamura T, Mitsuishi K, Gunawan H, Suto H, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular protease causes epidermal barrier dysfunction. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(2):614-7.
178. Ujiie I, Ujiie H, Iwata H, Shimizu H. Clinical and immunological features of pemphigus relapse. *The British journal of dermatology*. 2019;180(6):1498-505.
179. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet (London, England)*. 2019;394(10201):882-94.
180. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, et al. Pemphigus. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17026.
181. Savignac M, Simon M, Edir A, Guibbal L, Hovnanian A. SERCA2 dysfunction in Darier disease causes endoplasmic reticulum stress and impaired cell-to-cell adhesion strength: rescue by Miglustat. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(7):1961-70.
182. Dhitavat J, Fairclough RJ, Hovnanian A, Burge SM. Calcium pumps and keratinocytes: lessons from Darier's disease and Hailey-Hailey disease. *The British journal of dermatology*. 2004;150(5):821-8.
183. Sudbrak R, Brown J, Dobson-Stone C, Carter S, Ramser J, White J, et al. Hailey-Hailey disease is caused by mutations in *ATP2C1* encoding a novel Ca²⁺ pump. *Human molecular genetics*. 2000;9(7):1131-40.
184. Savignac M, Edir A, Simon M, Hovnanian A. Darier disease : a disease model of impaired calcium homeostasis in the skin. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(5):1111-7.
185. Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2018;67(1):3-11.
186. Carregaro F, Stefanini AC, Henrique T, Tajara EH. Study of small proline-rich proteins (SPRRs) in health and disease: a review of the literature. *Archives of dermatological research*. 2013;305(10):857-66.
187. Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, et al. Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *The Journal of cell biology*. 2000;151(2):389-400.
188. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;124(3):481-92.
189. Kelsell DP, Norgett EE, Unsworth H, Teh MT, Cullup T, Mein CA, et al. Mutations in *ABCA12* underlie the severe congenital skin disease harlequin ichthyosis. *American journal of human genetics*. 2005;76(5):794-803.
190. Krieg P, Fürstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(3):390-400.
191. Rippe F, Schreiner V, Doering T, Maibach HI. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *American journal of clinical dermatology*. 2004;5(4):217-23.
192. Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, et al. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum.

Journal of dermatological science. 2015;77(1):28-36.

193. Zhang X, Yin M, Zhang LJ. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*. 2019;8(8).

194. Morizane S, Yamasaki K, Kabigting FD, Gallo RL. Kallikrein expression and cathelicidin processing are independently controlled in keratinocytes by calcium, vitamin D(3), and retinoic acid. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(5):1297-306.

195. Gökçınar NB, Karabulut AA, Onaran Z, Yumuşak E, Budak Yıldırım FA. Elevated Tear Human Neutrophil Peptides 1-3, Human Beta Defensin-2 Levels and Conjunctival Cathelicidin LL-37 Gene Expression in Ocular Rosacea. *Ocular immunology and inflammation*. 2019;27(7):1174-83.

196. Pfaff CM, Marquardt Y, Fietkau K, Baron JM, Lüscher B. The psoriasis-associated IL-17A induces and cooperates with IL-36 cytokines to control keratinocyte differentiation and function. *Scientific reports*. 2017;7(1):15631.

197. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*. 2009;58(11):1481-9.

198. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology*. 2005;6(5):507-14.

199. Fornasa G, Tsilingiri K, Caprioli F, Botti F, Mapelli M, Meller S, et al. Dichotomy of short and long thymic stromal lymphopoietin isoforms in inflammatory disorders of the bowel and skin. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(2):413-22.

200. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(3 Pt 2):949-63.

10. KULCSSZAVAK

egészséges bőrrégiók, immunbarrier, permeabilitási barrier, rosacea, corneo(dezmoszóma),
tight junction

11. KEY WORDS

healthy skin regions, immune barrier, permeability barrier, rosacea, corneo(desmosomes),
tight junction

12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Prof Dr. Szegedi Andreának, hogy lehetőséget adott a DE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Nem Önálló Tanszéken, majd a Bőrgyógyászati Tanszéken a tudományos munkavégzésemre, illetve, hogy folyamatosan támogatásával hozzájárult a doktori disszertációm elkészítéséhez, segítséget nyújtott a szakmai fejlődésemhez.

Hálával tartozom a kutató csoportunk csoportvezetőinek, Dr. Kapitány Anikónak és Dr. Dajnoki Zsoltnak, akik a témában sok segítséget nyújtottak, és javaslataikkal segítettek végig a tanulmányaim során. Hálásan köszönöm a kollégáimnak és barátaimnak, Somogyi Orsolyának, Szabó Lillának, Dr. Janka Eszter Annának és Dr. Póliska Szilárdnak, akik a munkám során támogattak és tanácsokkal láttak el. Köszönetet szeretnék még mondani a szövettani laboratóriumban dolgozó kolléganőknek, Csapóné Sandra Ildikónak és Vágóczki Erzsébetnek, akik szakmai tudásukkal segítettek a laboratóriumban végzett munkámat. A disszertáció elkészítését az OTKA-K128250, a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú és EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, Európai Regionális Fejlesztési Alap és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. Köszönettel tartozom az Eötvös Lóránd Kutatói Hálózat Támogatott Kutatóhelyek Irodájának, az ELKH-DE Allergológiai Kutatócsoportnak. Köszönet a Naos Hungary Kft.-nek a dolgozat alapjául szolgáló kérdés, probléma felvetésért, valamint Szántai Szilviának, a Naos Hungary Kft munkatársának a folyamatos konzultációért, tanácsadásért.

Hálás köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak támogatásukért, türelmükért.

13. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**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/456/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Retzlerné Medgyesi Barbara
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10083376

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kapitány, A., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Jenei, A., Somogyi, O., Szabó, L., Gáspár, K., Méhes, G., Hendrik, Z., Dócs, K., Szűcs, P., Dajnoki, Z., Szegedi, A.: Regional Differences in the Permeability Barrier of the Skin: implications in Acantholytic Skin Diseases.
Int. J. Mol. Sci. 22 (19), 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910428>
IF: 6.208
2. **Retzlerné Medgyesi, B.**, Dajnoki, Z., Béke, G., Gáspár, K., Szabó, I. L., Janka, E. A., Pólska, S., Hendrik, Z., Méhes, G., Töröcsik, D., Bíró, T., Kapitány, A., Szegedi, A.: Rosacea is Characterized by a Profoundly Diminished Skin Barrier.
J. Invest. Dermatol. 140 (10), 1938-1950, 2020.
IF: 8.551

További közlemények

3. Dajnoki, Z., Somogyi, O., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Jenei, A., Szabó, L., Gáspár, K., Hendrik, Z., Gergely, P., Imre, D., Pólska, S., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Prens, E. P., Kapitány, A., Szegedi, A.: Primary alterations during the development of hidradenitis suppurativa.
J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 36 (3), 462-471, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.17779>
IF: 9.228 (2021)
4. Gáspár, K., Jenei, A., Khasawneh, A., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Dajnoki, Z., Janka, E. A., Szabó, I. L., Hendrik, Z., Méhes, G., Szegedi, A., Kapitány, A.: Comparison of Immune and Barrier Characteristics in Scalp and Skin Psoriasis.
Acta Derm.-Venereol. 100 (14), 1-7, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.2340/00015555-3553>
IF: 4.437





5. Jenei, A., Dajnoki, Z., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Gáspár, K., Béke, G., Kinyó, Á., Méhes, G., Hendrik, Z., Dinya, T., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Prens, E. P., Bíró, T., Szegedi, A., Kapitány, A.: Apocrine Gland-Rich Skin Has a Non-Inflammatory IL-17-Related Immune Milieu, that Turns to Inflammatory IL-17-Mediated Disease in Hidradenitis Suppurativa. *J. Invest. Dermatol.* 139 (4), 964-968, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.020>
IF: 7.143
6. Béke, G., Dajnoki, Z., Kapitány, A., Gáspár, K., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Póliska, S., Hendrik, Z., Péter, Z., Töröcsik, D., Bíró, T., Szegedi, A.: Immunotopographical Differences of Human Skin. *Front. Immunol.* 9, 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00424>
IF: 4.716
7. Khasawneh, A., Baráth, S., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Béke, G., Dajnoki, Z., Gáspár, K., Jenei, A., Pogácsás, L., Pázmándi, K. L., Gaál, J., Bácsi, A., Szegedi, A., Kapitány, A.: Myeloid but not plasmacytoid blood DCs possess Th1 polarizing and Th1/Th17 recruiting capacity in psoriasis. *Immunol. Lett.* 189, 109-113, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.005>
IF: 2.436

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 42,719

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,759**

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

Debrecen, 2022.10.20.



14. FÜGGELÉK – SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Elsőszerzős közleményeim:

1. Kapitány, A., **Retzlerné Medgyesi, B.**, Jenei, A., Somogyi, O., Szabó, L., Gáspár, K., Méhes, G., Hendrik, Z., Dócs, K., Szűcs, P., Dajnoki, Z., Szegedi, A.: Regional Differences in the Permeability Barrier of the Skin: implications in Acantholytic Skin Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (19), 1-15. 2021. DOI: 10.3390/ijms221910428.
2. **Retzlerné Medgyesi, B.**, Dajnoki, Z., Béke, G., Gáspár, K., Szabó, I. L., Janka, E. A., Póliska, S., Hendrik, Z., Méhes, G., Töröcsik, D., Bíró, T., Kapitány, A., Szegedi, A.: Rosacea is Characterized by a Profoundly Diminished Skin Barrier. *J. Invest. Dermatol.* 140 (10), 1938-1951, 2020.