

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Béke Gabriella**

**A bőr immunrendszer vizsgálata homeosztatis és gyulladásos állapotokban**

**DEBRECENI EGYETEM**

**PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS**

**ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2020**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A bőr immunrendszer vizsgálata homeosztatis és gyulladásos állapotokban**

**Béke Gabriella**

**Témavezető:**

**Dr. Szegedi Andrea**



**DEBRECENI EGYETEM**

**PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS**

**ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2020**

# Tartalomjegyzék

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke .....	6
Bevezetés.....	8
Irodalmi áttekintés .....	9
1. A humán bőr.....	9
1.1. A bőr anatómiája .....	9
1.2. A bőr feladatai .....	10
1.3. A SIS.....	11
1.3.1. A SIS sejtjei .....	12
1.3.1.1. KC-k.....	12
1.3.1.2. DC-k .....	15
1.3.1.3. T-sejtek.....	19
2. Az atópiás dermatitisz .....	22
2.1. A betegség epidemiológiája .....	22
2.2. Az AD pathogenezise.....	23
2.2.1. Az epidermális barrier .....	23
2.2.2. Az epidermális barrier és az AD.....	25
2.2.3. A genetikai tényezők szerepe a betegség kialakulásában – A genetikai barrierkárosodás okai.....	26
2.2.4. A környezeti tényezők szerepe a betegség kialakulásában - A szerzett úton létrejött barrierkárosodás okai.....	28
2.2.5. Mikróbák szerepe AD-ban .....	29
2.2.6. Az veleszületett immunitás szerepe AD-ban.....	30
2.2.7. Az adaptív immunitás szerepe AD-ban.....	31
Célkitűzések.....	33
Anyagok és módszerek.....	35
1. Vizsgálati anyagok gyűjtése és mintaelőkészítés .....	35
A. Bőrbiopsziák .....	35
B. Vérminták .....	36
2. RNS izolálás, Reverz Transzkripció és QRT-PCR.....	36
3. RNS szekvenálás és analízis .....	37
4. Útvonal analízis.....	38

5.	IHC és rutin festések.....	40
6.	Whole-slide imaging.....	40
7.	Sejt izolálás és sejtenyésztés.....	41
8.	A DC-k fenotípusának karakterizálása.....	41
9.	Áramlási citometria.....	42
10.	Kemokin Array vizsgálatok.....	43
11.	ELISArray és konvencionális ELISA vizsgálatok.....	43
12.	Statisztikai analízis.....	44
	A. Bőrbiopsziákkal végzett kísérletek esetében.....	44
	B. Vérmintákkal végzett kísérletek esetében.....	44
	Eredmények.....	45
I.	Különböző egészséges bőrterületek immuntopográfiai jellemzése.....	45
	I.1. Az RNS szekvenálás és az IPA analízis jelentős különbségeket tár fel az SGR és az SGP bőrterületek között.....	45
	I.1.1. RNS szekvenálás.....	45
	I.1.2. Ingenuity Pathway Analízis.....	46
	I.1.3. További analízis és validációs stratégiák.....	50
	I.2. Jelentős különbségek azonosíthatók az SGR és SGP bőrterületek veleszületett immunválaszai között.....	53
	I.2.1. Az AMP-k expressziója szignifikánsan magasabb az SGR bőrben.....	53
	I.2.2. A kemokinek expressziója szignifikánsan nagyobb az SGR bőrben.....	55
	I.2.3. A veleszületett immunrendszer receptor és pro-inflammatorikus citokin expressziós mintázatában nem mutatkozik jelentős különbség az SGR és SGP bőrrégiók között.....	56
	I.3. A barrier molekulák kifejeződése különbözik az SGR és SGP bőrben.....	57
	I.4. Az SGR bőrterület $T_h17$ /IL-17 dominanciával jellemezhető.....	58
	I.4.1. A $T_h1$ , $T_h2$ és $T_h22$ sejtekhez köthető molekulák expressziója igen alacsony mindkét bőrrégióban.....	58
	I.4.2. A $T_h17$ sejtek specifikus funkciót jelző molekulák nagyobb expressziót mutattak az SGR bőrben.....	59
	I.5. A fókuszált bioinformatikai útvonal analízis az IL-17 útvonal központi szerepét erősíti az SGR bőrben.....	59
II.	AD-ben szenvedő betegeket periériás vérből izolált dendritikus sejtek fenotípusos és funkcionális jellemzése.....	62
	II.1. Az AD-s betegek vérből izolált pre-DC-k szignifikánsan több FcεRI-et fejeznek ki, valamint érési markereik tendenciózus változást mutatnak.....	62

II.2. Az AD-s betegek vér pre-DC-i AD-specifikus és érettségi állapottal összefüggésbe hozható kemokinek termelésére képesek .....	64
II.2.1. A kemokin termelés meghatározása Proteome Profiler Chemokine Array segítségével	64
II.2.2. A fokozott kemokintermelés meghatározása két különböző ELISA technikával.....	66
Megbeszélés .....	68
Immuntopográfiai különbségek az emberi bőrben.....	68
A perifériás vérben keringő DC-k szerepe AD-ben .....	73
Összefoglalás .....	77
Summary .....	79
Irodalomjegyzék .....	80
Tárgyszavak .....	89
Key words .....	90
Köszönetnyilvánítás.....	91
Publikációs lista .....	92
Függelék – Saját közlemények jegyzéke.....	95

## Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

<b>AD</b>	Atópiás dermatitisz	<b>LCE</b>	Late Cornified Envelope
<b>AHR</b>	Aryl Hydrocarbon Receptor	<b>LCN</b>	Lipocalin
<b>AMP</b>	Antimikrobiális peptid	<b>LGP2</b>	Laboratory of Genetics and Physiology 2
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin, Marha szérum albumin	<b>LOR</b>	Loricrin
<b>CAMP</b>	Cathelicidin	<b>LPS</b>	Lipopoliszaccharid
<b>CARD</b>	Caspase Recruitment Domain	<b>MA</b>	Mask Area, Maszkolt terület
<b>CCL</b>	Chemokine Ligand, Kemokin Ligand	<b>MBL</b>	Mannose Binding Lectin, Mannózkötő lektin
<b>cDNS</b>	Komplementer DNS	<b>MDA5</b>	Melanoma Differentiation Associated Gene 5
<b>CLDN</b>	Claudin	<b>mDC</b>	Mieloid dendritikus sejt
<b>CLR</b>	C-típusú lektin receptor	<b>Mf</b>	Makrofág
<b>CRD</b>	Carbohydrate Recognition Domain	<b>MMR</b>	Makrofágok mannózreceptora
<b>DAMP</b>	Danger-Associated Molecular Pattern, Veszély-asszociált molekuláris mintázat	<b>mRNS</b>	Messenger RNS
<b>DC</b>	Dendritikus sejt	<b>MT</b>	Megbízhatósági Tartomány
<b>DCD</b>	Dermcidin	<b>NALP</b>	NACHT-, LRR-, és PYD (NLRP)-domént tartalmazó proteinek
<b>dDC</b>	Dermális dendritikus sejt	<b>NK</b>	Natural Killer Cell, Természetes ölő sejt
<b>DIS</b>	Dermal Immune System, Dermális immunrendszer	<b>NKT</b>	Natural Killer T cell, Természetes ölő T sejt
<b>EDC</b>	Epidermális Differenciációs Komplex	<b>NLR</b>	Nod-like receptor
<b>FA</b>	Field Area	<b>NMF</b>	Natural Moisturizing Factor, Természetes hidratáló faktor
<b>FACS</b>	Fluoreszcencia Aktivált Sejtválogatás és Analízis	<b>PAMP</b>	Pathogen-Associated Molecular Pattern, Pathogén-asszociált molekuláris mintázat
<b>FBS</b>	Foetal Bovine Serum, Főtális borjú szérum	<b>PBMC</b>	Periferal Blood Mononuclear Cell, Perifériális vér mononukleáris sejt
<b>FC</b>	Fold Change, x-szeres változás	<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline, Foszfát puffer
<b>FLG</b>	Filaggrin	<b>PCA</b>	Principal Component Analysis, Főkomponens Analízis
<b>FSC</b>	Forward Light Scatter	<b>pDC</b>	Plazmacitoid dendritikus sejt
<b>GWAS</b>	Genome-Wide Association Study, Teljes genom asszociációs vizsgálat	<b>PGN</b>	Peptidoglikán
<b>HIES</b>	Hiper IgE szindróma	<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor, Mintázatfelismerő receptor
<b>IDC</b>	Inflammatorikus dendritikus sejt	<b>QRT-PCR</b>	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, Kvantitatív Valós-idejű polimeráz láncreakció
<b>IDEC</b>	Inflammatorikus dendritikus Epidermális sejt	<b>RIG-I</b>	Retinoic Acid Inducible Gene I
<b>IHC</b>	Immunhisztokémia	<b>RLR</b>	RIG-like receptor
<b>IPA</b>	Ingenuity Pathway Analysis	<b>RNáz</b>	Ribonukleáz
<b>IVL</b>	Involucrin	<b>ROI</b>	Regions of Interest
<b>KC</b>	Keratinocita	<b>S.</b>	Staphylococcus aureus
<b>KRT</b>	Keratin	<b>aureus</b>	
<b>LC</b>	Langerhans sejt	<b>SALT</b>	Skin Associated Lymphoid Tissue, Bőr-asszociált limfoid szövet
		<b>SB</b>	Stratum basale

<b>SC</b>	Stratum corneum	<b>T-bet</b>	T-box expressed in T cell
<b>SCORAD</b>	Scoring of Atopic dermatitis	<b>Tc</b>	Citotoxikus T sejt
<b>SD</b>	Standard deviáció	<b>TCM</b>	Centrális memória T sejt
<b>SG</b>	Startum granulosum	<b>TEM</b>	Effektor memória T sejt
<b>SGP</b>	Sebaceous Gland Poor, Faggyúmirigyben szegény	<b>TEWL</b>	Transepidermal Water Loss, Transzepidermális vízvesztés
<b>SGR</b>	Sebaceous Gland Rich, Faggyúmirigyben gazdag	<b>TF</b>	Transzkripció faktor
<b>SIS</b>	Skin Immune System, Bőr immunrendszer	<b>Th</b>	Helper T sejt, Segítő T sejt
<b>SLE</b>	Systemic Lupus Erythematosus, Szisztémás lupusz eritematózus	<b>TIP</b>	TNF-et és iNOS-t termelő dendritikus sejt
<b>SLPI</b>	Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor	<b>DC</b>	
<b>SRA</b>	Sequence Read Archive	<b>TJ</b>	Tight junction
<b>SS</b>	Stratum spinosum	<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>SSC</b>	Side Light Scatter	<b>Treg</b>	Regulatórikus T sejt
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription	<b>TRM</b>	Szöveti rezidens memória T sejt
		<b>TSLP</b>	Thymic Stromal Lymphopietin

## Bevezetés

Az emberi szervezet egyik legnagyobb szervét képező bőr folyamatos fizikai, kémiai és mikrobiológiai környezeti hatásoknak van kitéve. Saját és a szervezet homeosztázisa fenntartása érdekében számos feladatot lát el. Statikus fiziko-kémiai barrier – más néven permeabilitási barrier (környezettől való fizikai elhatárolódás, patogén kórokozók bejutásának gátlása, megfelelő hidratáltság és pH biztosítása, hőszabályozás és fényvédelem) – funkciója mellett számos dinamikus működési folyamat fenntartásában (szöveti újjáépülés, transzportfolyamatok, exokrin és neuroendokrin feladatok ellátása, bizonyos vitaminok és hormonok szintézise) vesz részt. A bőrt alkotó különböző sejtféleségek, valamint az általuk termelt szolubilis mediátor molekulák alakítják ki a szerv saját immunrendszerét, mely aktív működése révén védi az emberi test mélyebben fekvő szöveteit (immunológiai barrier). A bőr immunológiai barrier funkcióját a klasszikus immunsejtjei [dendritikus sejtek (DC-k), T sejtek és innate immunsejtek, mint a makrofágok (Mf-ok), granulociták stb.], valamint szervspecifikus sejtjei, mint a keratinociták (KC-k), fibroblasztok, mirigy epithél sejtek stb. látják el. Ezek együttesen egy komplex, jól koordinált rendszert képeznek, így az immunhomeosztázis fenntartásához járulnak hozzá [1, 2].

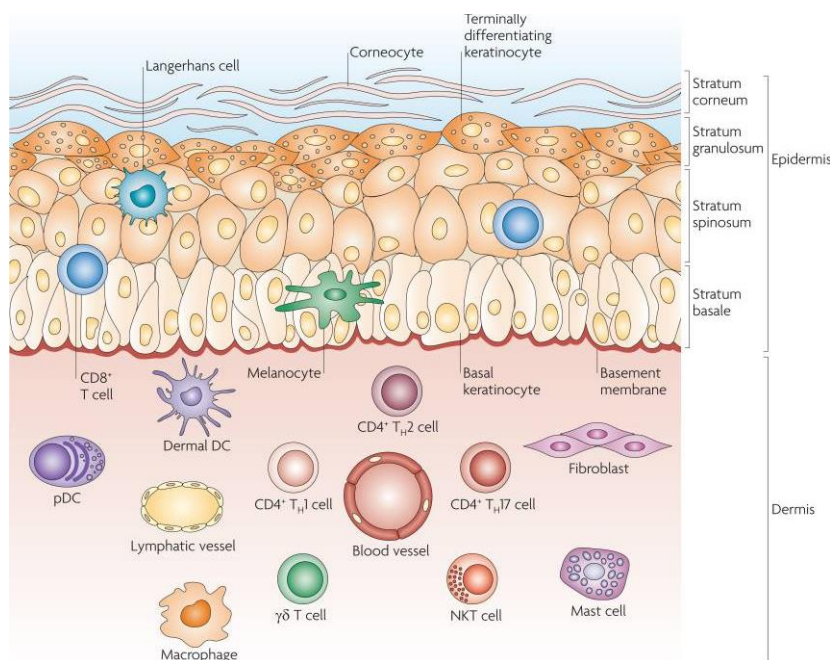
PhD munkám során a bőr fentebb felsorolt számos funkciója közül az immunológiai folyamatokban betöltött szerepét vizsgáltam részletesebben egészséges és patológiás állapotokban.

## Irodalmi áttekintés

### 1. A humán bőr

#### 1.1. A bőr anatómiája

A humán bőr, anatómiáját tekintve, 3 fő részre osztható. A külvilág felé eső része az epidermisz, mely alatt közvetlenül a dermisz helyezkedik el. A dermisz alatt a bőralja található. Az epidermisz 4 rétegből áll. Legelső rétege a *stratum basale* (SB), mely folyamatosan megújul. Egyetlen sejsora differenciálatlan, oszlopos alakú epidermális sejtekből, úgynevezett bazális KC-kból áll, melyek között folyamatosan osztódó sejtek találhatóak. Az SB felett a *stratum spinosum* (SS) foglal helyet. Poligonális alakú KC-i differenciációs és érési folyamatokon mennek keresztül. Ebben a rétegben már keratin szintézis is zajlik. Az SS-t követő réteg a *stratum granulosum* (SG). Sejtjeinek citoplazmájában sötét csomókat, keratohialin granulumokat láthatunk. Ezek a sejtek aktívan termelik a keratin fehérjét és a lipid molekulákat. Az epidermisz legkülső sejtrétege a *stratum corneum* (SC), melyet organelumoktól mentes, elhalt KC-k alkotnak. Egyes bőrterületeken egy ötödik réteg a *stratum lucidum* is kimutatható. Az SG tight junction (TJ, szoros kapcsolat) nevű sejtkapcsoló elemei és az SC réteg felelősek elsősorban a bőr fiziko-kémiai barrier funkciójáért.



1. ábra A bőr anatómiája és fontosabb sejtei

(Forrás: Nestle, F.O., et al., Skin immune sentinels in health and disease., Nat. Rev. Immunol., 2009. 9(10):679-91. [1])

A hámszövetben a KC-kon kívül egyéb sejtek is jelen vannak, köztük a melanin termelésért felelős epidermális melanociták, a DC-k egyik alcsoportját képező Langerhans sejtek (LC-k), valamint az SB és az SS rétegekben előforduló CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-sejtek (T<sub>c</sub>). A dermisz nagy sejtdiverzitást mutat. Fő sejtfeleségei a következők: dermális DC-k (dDC), plazmacitoid DC (pDC), CD4<sup>+</sup> 1-es típusú helper T sejtek (T<sub>h1</sub>), T<sub>h2</sub>, T<sub>h17</sub>, T<sub>h22</sub>, γδT-sejtek, természetes ölő T-sejtek (NKT), Mf-ok, hízósejtek, fibroblasztok [1].

### **1.2. A bőr feladatai**

A bőr számos alapvető funkcióval rendelkezik, többek között feladata a permeabilitási és az immunológiai barrier kialakítása és fenntartása is. A többi epithél felszínnel ellentétben a bőr permeabilitási barrier feladatát két fő rétege is segíti, az SC és a TJ réteg. A bőr immunrendszerét (Skin Immune System, SIS) különböző sejtfeleségekből és oldható mediátor molekulákból álló komplex hálózat alkotja [3, 4]. A test különböző régióiban elhelyezkedő bőr anatómiai és szövettani felépítését jelentős különbségek jellemzik. Ez abból adódik, hogy a különböző testterületeken az SC vastagsága eltérő, valamint a változó számú faggyú-, eccrin- és apokrin mirigy következtében az eltérő bőrfelületeken különböző kémiai környezet alakul ki. A legfrissebb kutatások ezzel a változatos kémiai milióval párhuzamosan a topográfiaileg eltérő bőrterületek mikrobióta összetételében is különbségeket mutattak ki [5, 6]. Eredményeik alapján a specifikus kommenzális flóra összetétele valójában a nedves, száraz vagy faggyúban gazdag bőr mikrokozmoszhoz társulva, három fő mintázatot mutat.

Ugyanakkor az egészséges bőr permeabilitási és immunológiai barrierje jelenleg egységesnek ismert az egész testfelszínen/testfelületen - habár közelmúltbeli kutatások eredményei vitatják ezt a dogmát. Mivel a mikrobióta jelentős hatást gyakorol a bőr immunrendszerére, a mikrobióta régió specifikus elhelyezkedésének feltárása felvetette annak lehetőségét, hogy a bőr immun és permeabilitási barrierjének régió specifikus eltérései lehetnek, de ezt senki nem vizsgálta eddig [7, 8]. Először saját kutatócsoportunk mutatta ki, hogy a bőr mikrobióta és a kémiai milió fent említett heterogenitásához hasonlóan finom topográfiai különbség létezik a SIS expressziós mintázatában és aktivitásában a humán bőr faggyúmirigyben gazdag és a szegény régiói között [Sebacous Gland Rich (SGR) és Sebacous Gland Poor

(SGP) Skin] [9]. Az SGR bőrben, az epidermális KC-kban egy erőteljesebb, de mégis homeosztatis, nem gyulladáso thymic stromal lymphopietin (TSLP) kifejeződést észleltünk, melyet a linolsav, a faggyú fő komponense szabályoz. Ezen kívül szignifikánsan nagyobb számú, de nem aktivált CD11c<sup>+</sup> DC-t, CD4<sup>+</sup> T-sejtet, valamint egy jellegzetes citokin expressziós mintázatot mutattunk ki.

### **1.3. A SIS**

A bőr fiziko-kémiai barrier funkcióját régen felismerték, azonban az immunológiai folyamatokban betöltött szerepét csak később bizonyították be. Streilein 1978-ban alkotta meg a bőr-asszociált lymphoid szövet (Skin Associated Lymphoid Tissue, SALT) fogalmát, miszerint a bőr immunvédelmét szolgáló immunsejtek folyamatosan vándorolnak a bőr, a nyirokcsomók és a perifériás vér között [10]. Streilein és munkatársai elsősorban az adaptív immunsejtek, valamint a cirkuláló innate sejtek szerepét emelték ki a SALT leírása során. A későbbi kutatások azonban a bőr szövetspecifikus sejtjeinek, elsősorban a keratinocitáknak immunológiai működését tárták fel, és mivel ezen sejtes elemek túlnyomó többsége a egészséges bőrben is jelen van, Bos és Kapsenberg a SIS kifejezést vezette be [11]. A bőr kompartmentjeinek részletes feltárása során kezdetben úgy tűnt, hogy a krónikus gyulladáso bőrbetegségek kialakulásához főként a bőr dermális rétegében elhelyezkedő sejtek járulnak hozzá, ezért Nickoloff és mtsai a bőrt dermális immunrendszerként (Dermal Immune System, DIS) definiálták [12], azonban ez a terminológus nem terjedt el. Napjainkban ismét a SIS elnevezés lett a leginkább elfogadott, melyben az azt alkotó immunsejtek „őrszem” szerepét hangsúlyozzák és a szöveti sejtek immunológiai szerepe ismét jelentősen felértékelődött. Ugyanakkor, mint említettük, saját kutatásaink előtt senki nem vetette fel annak lehetőségét, hogy a SIS működésében topográfiai eltérések lennének a humán bőrfelszínen.

### 1.3.1. <sup>1</sup>A SIS sejtjei

#### 1.3.1.1. KC-k

\*„A bőr epidermális sejtjeit döntő többségben (>90%) a KC-k alkotják. Képesek a környezetükben lévő patogén kórokozók felismerésére, és az immunválasz szabályozására olyan módon, hogy az ártalmatlan (kommenzális mikrobák) és káros (patogének) hatásokat meg tudják különböztetni egymástól [1].

A KC-k szenzorai: A KC-k számos Toll-Like Receptort (TLR) expresszálnak a felszínükön (TLR1,2,4,5,6), valamint citoplazmájukban (TLR3,7,9). Ezen szenzorokkal ismerik fel a patogénekből származó mikrobiális termékeket, az úgynevezett PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern)-molekulákat, mint például a lipopoliszaccharidot (LPS/TLR4), peptidoglikánt (PGN/TLR2), flagellint (TLR5), nukleinsavakat (TLR3,7,9) [13-15]. A PAMP-molekulák ligációja a TLR-ekhez a KC szignálútjainak aktiválódásához vezet, és részben antimikrobiális peptidok (AMP-k) termelésével a kórokozó elpusztításához, részben citokinek és kemokinek felszabadulása révén a természetes és az adaptív immunválasz kialakulásához járul hozzá. A KC-k TLR expressziója kritikus lehet a bőr immunválasz irányultságának szempontjából, ezen receptorok aktiválása humán KC-kon elsődlegesen Th1 típusú immunválasz kialakulásához vezet [1, 13-15]. A KC-k képesek haptének, toxinok, irritánsok [DAMP-molekulák (Danger Associated Molecular Pattern)] felismerésére is a citoplazmatikus Nod-Like Receptorai (NLR, nucleotid-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing géncsalád által kódolt) révén. Ez a folyamat az inflammaszóma képződésén keresztül pro-inflammatorikus szignálútjainak aktiválódásához és adapter proteinek kötődésével kaspáz-1 aktiválódáshoz vezet, majd végül IL-1 $\beta$  és IL-18 termelést eredményez. A folyamat eredményeként gyulladás alakul ki és bizonyos esetekben sejthalál indukálódik. Az NLR-ek közé tartozó fehérjék a NALP-ok [NACHT-, LRR-, és PYD (NLRP)-domént tartalmazó proteinek], a NOD1 és a NOD2 [Caspase Recruitment Domain, (CARD)-domént tartalmazó fehérjék]. A humán epidermális KC-k a NALP fehérjék számos tagját expresszálják, köztük a NALP 1-8-at, a 10-11-et és a 13-14-et. A KC-kon ezen kívül megjelennek a C-típusú Lektin

---

<sup>1</sup>A \*-gal jelzett idézőjelbe tett szövegrészek az Immunológiai Szemlében magyarul íródott összefoglaló elsőszerzős közleményemből lettek átemelve, többségében szó szerint – Béke Gabriella, Kapitány Anikó, Dajnoki Zsolt, Hajdú Krisztina, Gáspár Krisztián, Bíró Tamás, Szegedi Andrea: A bőr immunrendszerének felépítése és működése. Immunológiai Szemle 7:(2) PP. 13-20. 8 P. (2015)

Receptorok (CLR) és a RIG-Like Receptorok (RLR) egyes képviselői is. A CLR család tagjai kalcium-dependens lektinszerű receptorok, melyek szénhidrát felismerő doménjükön keresztül (CRD-Carbohydrate Recognition Domain) ismerik fel és kötik meg a különböző baktériumokból, vírusokból és gombákból származó ligandumokat. Ezen receptoroknak is fontos szerepük van az immunhomeosztázis fenntartásában. Megkülönböztetünk membránkötött [makrofágok mannózureptora (MMR), DC-SIGN, dectin-1, dectin-2] és szolubilis [mannózkötő lektin (MBL)] CLR-eket [16]. Az RLR-ek egyszálú és kétszálú virális nukleinsavakat ismernek fel. Három fő képviselőjük ismert: a RIG-I (Retinoic Acid Inducible Gene 1), az MDA5 (Melanoma Differentiation Associated Gene 5) és az LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2). Jelátviteli útvonalaikban hasonlóságot mutatnak a TLR-ekhez, illetve az egyes NOD fehérjékhez hasonlóan CARD doménekkal rendelkeznek. [17].

A KC-k mediátorai – AMP-k: A KC-k veleszületett immunválasz mediátorokat termelnek. Itt kiemelendő az AMP-k csoportja. Ezek a peptidok nagyon sok élőlényben megtalálhatóak (növények, állatok, baktériumok), már több mint 1200 fajtájukat azonosították. 12-50 aminosavból épülnek fel. Szerkezetük szerint 4 féle peptidet különböztethetünk meg:  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -lemez, „extended” és hurkos fehérje szerkezetűek lehetnek. Antimikrobiális aktivitással bírnak, de ezen kívül számos más funkcióval, úgynevezett alarmin funkciókkal is rendelkeznek. Többek között hatással vannak a citokin és kemokin termelésre, szerepük van az angiogenezis és a sebgyógyulás folyamatában. Számos bőrgyógyászati kórkép esetén írták már le a kóros termelődésüket, például pikkelysömörben, rosaceában, atópiás dermatitiszben (AD) és aknéban. Az AMP-k termelése az eukarióta sejtek egy evolúciósan konzervált védekező mechanizmusa a patogének ellen. A károsodott epithélium felszínén termelődnek, ahol megelőzik a gazdaszervezet mikrobiális invázióját a közvetlen patogénölés által, valamint odatoborozzák a gazdaszervezet immunsejtjeit és modulálják a citokin és kemokin termelést. A bőrben az AMP-k legfőbb forrása a KC, amely béta-defenzineket (humán  $\beta$ -defenzin 1-4), cathelicidint (CAMP, LL-37), psoriasint (S100A7), dermcidint (DCD), ribonukleázokat (RNáz 5,7), SLPI-t (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor), elafint, lizozimot, adrenomedullint és kemokin ligand 20-at (CCL20) termel. A béta-defenzinek erősítik a veleszületett és az adaptív immunrendszer működését is azáltal, hogy fokozzák a monociták, T-limfociták, DC-k és a hízósejtek kemotaxisát a fertőzés helyére. Feladatuk az is, hogy fokozzák a

citokinek termelését a monocitákban és az epitheliális sejtekben. A CAMP-nak is fontos szerepe van a citokin és kemokin termelés szabályozásában, szintén rendelkezik kemotaktikus hatással (monociták, hízósejtek, T sejtek és neutrofil granulociták), stimulálja a sebgyógyulást, a reepithelizációt, az angiogenezist és a neovaszkularizációt [1, 2, 18-20].

A KC-k mediátorai – Citokinek: A KC-k konstitutívan szekretálnak vagy indukálás által felszabadítanak számos citokint, beleértve az IL-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, -7, -8, -10, -15, -18, -19, -20-at és a tumor nekrozis faktor alfát (TNF-  $\alpha$ ) [1, 2]. A KC-k legismertebb citokinjei az interleukin-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), az IL-1 béta (IL-1 $\beta$ ) és az IL-18 az **IL-1 család** tagjai közé tartoznak. Az IL-1 család tagjai fontos szerepet játszanak a fertőzésekkel szembeni védekezés, majd az azt követő gyulladás kialakításában. Az **IL-1 $\alpha$** -t és az **IL-1 $\beta$** -t számos sejt, köztük a KC-k is termelik. Ezen citokineknek T sejt és DC aktiváló hatásuk van, valamint részt vesznek a pro-inflammatorikus fehérjék indukációjában (maguk is a B sejtek érését fokozó pro-inflammatorikus citokinek) és a T<sub>h</sub>17 sejtek differenciálódásában. A KC-k az IL-1 $\alpha$  és - $\beta$  inaktív formáját termelik; az IL-1 $\beta$  aktív formájának nagy mennyiségű szekréciója egy veszélyszignál hatására, inflammaszóma aktiválódáson keresztül történik meg. Az **IL-18**-at a KC-k mellett szintén sok sejtféleség termeli; célsejtjei T sejtek, természetes ölő sejtek (NK), Mf-ok, epithél sejtek. Az IL-18 az IL-12 citokin jelenlétében IFN $\gamma$  indukciót eredményez, de az IL-1 $\beta$ -val ellentétben nincs lázkeltő hatása. Fokozza az NK sejtek citotoxicitását, és elősegíti a T<sub>h</sub>1-es vagy a T<sub>h</sub>2-es típusú immunválasz kialakulását [1, 2, 21].

A KC-k mediátorai – Kemokinek: A KC-k kemokinek fontos forrásai is, és kemokin receptorokat is expresszálnak, így képesek módosítani az immunválaszt a bőrben a különböző sejttípusok odavonzása által. Ezek főként a limfocitákra, a DC-kre, az Mf-okra és a neutrofil granulocitákra hatnak. A kemokinek szerkezetük szerint négy különböző csoportba sorolhatjuk: CCL, CXCL, XCL és CX<sub>3</sub>CL típusú kemokinek. A legfontosabbak a CCL20, CXCL9, -10, -11, melyek termelésével a KC-k az immunsejtek működését módosítják az alábbi mintázatban: (a CCL20 a DC-kre hat és az effektor T<sub>h</sub>17 sejtek bőrbe történő migrációját segíti elő; a CXCL9,-10,-11 az effektor T<sub>h</sub>2 sejtek bőrbe történő migrációját segíti elő). A CXCL1 és CXCL8 (IL-8) termeléssel a neutrofil granulocitákat toborozzák a bőrbe [1, 2].”

### 1.3.1.2. DC-k

A DC-k professzionális antigénprezentáló sejtek, melyek a természetes és az szerzett immunitásban egyaránt közreműködnek. A DC-k az antigénprezentáló tulajdonságuk segítségével képesek beindítani az adaptív immunválaszt, valamint annak típusát is determinálják. A DC-k által elindított immunogén T sejt immunválasz típusát ( $T_{h1}/T_{h2}/T_{h17}$ ) és minőségét, illetve adott körülmények között a tolerancia biztosítását az adott DC-re jellemző antigént kötő mintázat felismerő receptorok (Pattern Recognition Receptor, PRR) minősége, az expresszált kostimuláló molekulák és az érés során termelt citokinek, valamint egyéb mediátorok határozzák meg, melyek szoros összefüggést mutatnak a DC érettségének szintjével és a szöveti környezettel [22, 23].

A vér mieloid DC-knek (mDC) 2 fő csoportját különböztetik meg. Az egyik csoportot a  $CD1c^+BDCA1^+$  mDC-k képezik, melyek koexpresszálnak CD11b és CD11c markereket, míg a másik csoportba a  $CD141^+BDCA3^+$  mDC-k tartoznak, melyek CD11b markerre negatívak és sejt felszínükön csak kisebb mértékben expresszálnak CD11c-t és CLEC9A-t. Ezeket az mDC-eket a CD14 és CD16 molekuláris markerek segítségével különíthetjük el a monocitáktól.

A bőrben lévő DC-eket eredetük és elhelyezkedésük alapján különböző típusokba sorolja az irodalom, valamint megkülönböztetünk alapállapotban (steady state) és gyulladásos körülmények között megjelenő DC altípusokat is. Az **LC-k** a gyulladástól mentes epidermiszben találhatóak, az epidermális KC-ákkal közvetlen kapcsolatban állnak. Egy speciális intracitoplazmatikus organelummal rendelkeznek, melyet Birbeck granuláris testként ismerünk. Egérben a langerin (CD207), míg emberben a CD1a expressziójuk által különíthetjük el más sejtfeleségektől. Irodalmi adatok alapján Fc $\epsilon$ RI (IgE), CD32, CD39 (ATP-áz), CD45, CD324 (E-cadherin), CD326 (EpCAM) markereket is kifejeznek felszínükön. Az érett LC-k CD80, CD83 és CD86 markereket expresszálnak. Egyes kutatási adatok szerint CD1c, CD11b, CD11c<sup>lo</sup>, CX3CR1 és SIPR $\alpha$  molekulákkal is jellemezhetőek [1, 24-28].

Az epidermális DC-k további alcsoportját a szintén mieloid eredetű **inflammatorikus dendritikus epidermális sejtek (IDEC)** képezik, melyeket az LC-ktől a CD206 mannóz receptor kifejeződésével, a CD1a sejt felszíni marker alacsony expressziójával

és a Birbeck granulumok hiányával különböztetünk meg. Ezen sejtek csak a gyulladt epidermiszben találhatóak meg, szerepüket elsősorban az AD-ben írták le. Fc $\epsilon$ RI-et is fokozottan expresszálnak. További sejtfelszíni markereik a CD1b, CD1c, CD11b, CD11c, CD23 (Fc $\epsilon$ RII), CD36, CD80, CD86, CD209 és a HLA-DR [1, 24, 26-28].

A bőr dermális rétegében mieloid vagy plazmacitoid eredetű DC-k detektálhatóak. A mieloid **dDC**-k egyenletes eloszlást mutatva, közvetlenül a dermo-epidermális junctionok alatt helyezkednek el a nyugalmi, gyulladásmentes állapotban lévő dermiszben [1, 24, 26]. A dDC-eket általánosan jellemzi a CD1c (BDCA-1) és CD11c markerek együttes megjelenése, továbbá CD1b, CD36, CD205, CD206, CD209, MHCII és FXIIIa molekulák kifejeződése, valamint a CD207 és a Birbeck granulumok hiánya, bár az irodalmi adatok nem teljesen egyértelműek e tekintetben. A CD11c<sup>+</sup>-CD1c<sup>+</sup> pozitív dDC-k 3 fő populációját különíti el az irodalom:

1. **CD1a<sup>+</sup> populáció**, mely a dDC-k érettebb fenotípusát képviseli. Jellemző rájuk a PRR-ek alacsonyabb szintű, valamint a ko-stimulációs molekulák (CD80, CD83, CD86) fokozottabb kifejezése. Kifejezik emellett a CD91-et (LRP1-et) is, mely bizonyos hősök fehérjét kötő receptorként működik. A naiv CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek proliferációját indukálják, erős T-sejt stimuláló kapacitással rendelkeznek, az adaptív immunválasz kialakításában van fontos szerepük. A CD1a<sup>+</sup> DC-k általában magas CD1c expresszióval jellemezhetők, míg kisebb részük, mely a CD1a markert alacsony szinten fejezi ki, CD141 pozitívást mutat [26-28].
2. A **CD14<sup>+</sup> populáció** éretlenebb fenotípussal bír, PRR-eket fokozottan expresszál. Csökkent T-sejt stimuláló kapacitása miatt kevésbé tudja indukálni a naiv T-sejtek proliferációját, a veleszületett immunválasz kialakításához járul hozzá. Változó CD1a, CD1c (BDCA1) és CD163 expressziót mutatnak. Jellemzőik továbbá, hogy alacsony szinten fejezik ki a CD80 és CD86 aktivációs markereket, és kevésbé indukálják a naiv T-sejtek proliferációját. Ezek a sejtek éretlen állapotban kifejezhetnek patogén felismerő receptorokat, nevezetesen TLR2-t, TLR4-et, CD206-ot és CD209-et (DC-SIGN) [1, 25].
3. **CD141<sup>+</sup> (BDCA-3) populáció**, melyet az XCR1, TLR3, CLEC9A, CADM1, FLT3 markerekkel jellemeznek. Ezt a sejtpopulációt CD14 expressziójuk alapján két alpopulációra osztják (CD14<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> ill. CD14<sup>-</sup>CD141<sup>+</sup>). Ezeket a sejteket

CD1c kifejezésük alapján további alcsoportokba sorolják (CD141<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> ill. CD141<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>) [26-28].

1. táblázat A bőrben található DC-k típusai

Sejttípus		Eredet	Lokalizáció	Sejtfelszíni markerek	Funkció
<b>Langerhans sejt (LC)</b>		mieloid	epidermisz	CD45RO, CD1a, CD11c, MHC-I, -II, CD207 (langerin), IgE, FcεRI, CD13, CD32, CD33, CD39 (ATPáz), CD324 (E-cadherin), CD326 (EpCAM), HLA-DR, -DQ, -DP, Birbeck granulum	Antigén prezentáció bizonyos fertőzések alatt, tolerancia indukció lehetősége
<b>CD11c<sup>+</sup> Dermális dendritikus sejt (dDC)</b>	<b>CD14<sup>+</sup></b>	mieloid	dermisz	CD45RO, CD11c, CD1b, CD1d, változó CD1a, CD1c (BDCA1) és CD163 expresszió, kevés CD80 és CD86, változó CD141 (BDCA3). Éretlen állapotban TLR2, TLR4, CD206 (MMR), CD209 (DC-SIGN), éretten sok CD83. Ezen kívül CD36-ot, CD91-et és CD205-öt is expresszálnak.	Antigén prezentáció, citokin és kemokin szekréció
	<b>CD1a<sup>+</sup></b>			CD45RO, CD1a, CD1b, CD1c (BDCA1) expresszió magas, CD1d, CD11c, CD13, CD33, változó CD141 (BDCA3), CD206 (MMR), CD209 (DC-SIGN), sok CD80 és CD86, HLA-DR, MHC-I, -II	
<b>Plazmacitoid dendritikus sejt (pDC)</b>		plazmacitoid	dermisz	CD45RA, CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4), HLA-DR, MHC-II	Virális infekciók eliminálása, I-es típusú interferonok (IFNα) termelése, funkcionális szerep psoriasisban, saját DNS LL-37 komplex felismerés
<b>Inflammatorikus dendritikus epidermális sejt (IDEC)</b>		mieloid	gyulladt epidermisz és dermisz	CD1a, CD1b, CD1c, CD11b, CD11c, FcεRI,-II (CD23), CD36, CD206 (MMR), MHCII, IgE	T <sub>h</sub> 2-T <sub>h</sub> 1 váltás, IL-12 termelés, krónikus gyulladás atópiás dermatitiszben
<b>Inflammatorikus dermális dendritikus sejt (TNF-és iNOS termelő dendritikus sejtek (TIP-DC))</b>		mieloid	gyulladt dermisz	CD11c, MHC-II, TNF, iNOS, IL-12/23p40	TNF-α és nitrogén-monoxid termelés, gyulladás psoriasisban

Átelemelve – Béke Gabriella, Kapitány Anikó, Dajnoki Zsolt, Hajdú Krisztina, Gáspár Krisztián, Bíró Tamás, Szegedi Andrea: A bőr immunrendszerének felépítése és működése. Immunológiai Szemle 7:(2) PP. 13-20. 8 P. (2015)

A bőrbetegségek esetén a gyulladáshoz vezető folyamatokban nem csupán az aktivált dDC-k, hanem a TNF és iNOS termelésre képes gyulladáshoz vezető DC-k (Inflammatory DC, **IDC**), más néven **TIP** (TNF-et és iNOS-t termelő) **DC**-k is részt vesznek. Az előbbi megnevezéssel az emberben előforduló DC-eket illetik, míg az utóbbi típusúakat egérben írták le. Az inflammatorikus DC-k is mieloid eredetűek és pikkelysömörben azonosították őket. Az IDC-k MHC-II és CD11c pozitívak, valamint sejtfelszínükön CD14-et, CD163-at, CD206-ot és CD209-et fejeznek ki, de nem expresszálnak CD1c és CD141 markereket. „Az IDC-kből felszabaduló TNF- $\alpha$  indukálja a KC-k ICAM-1 és IL-8 expresszióját, valamint az IL-1 $\beta$  és IL-6 pro-inflammatorikus citokinek termelését. Emellett az iNOS katalizálja a nitrogén-monoxid (NO) termelést a gyulladt szövetben, ami a vérerek vazodilatációját eredményezi a pikkelysömörös bőrben. Emellett az IDC-k nagy mennyiségben termelik a proinflammatorikus IL-23-at, ami T<sub>H</sub>17 polarizációhoz vezet, ennek következményeként szintén nagy jelentősége van pikkelysömörben. [1, 24, 26-28].”\*

A **pDC-k** a DC-k egy speciális alcsoportját képviselik. Plazmasejtszerű morfológiát mutatnak, MHC-II, IL-3R, HLA-DR, CD4, CD123 (immunoglobulin-like-7), CD303 (BDCA-2), CD304 (BDCA-4), TLR7 és TLR9 markereket fejeznek ki, de CD11c markerre negatívak. Az egészséges bőrben ritkán találhatóak meg, viszont a pikkelysömör és a szisztémás lupusz eritematózus (SLE) pathogenezisében fontos szerepük van, mivel I-es típusú interferonokat termelnek. A pDC-k egyensúlyi állapotban a vérben cirkulálnak, valamint a nyirokszövetekben helyezkednek el, például a nyirokcsomókban és a mandulákban, és csak gyulladáshoz vezető körülmények között jelennek meg a bőrben és egyéb perifériás szövetekben. TLR7 és TLR9 receptoraikon keresztül saját DNS/RNS fragmentumokat kötnek meg, és IFN- $\alpha$ -t termelnek. „Pszoriázisban, a léziós bőrterületen az I-es típusú interferon szignálút vonal aktivitása igen magas. Az egészséges bőrhöz képest a pikkelysömörben szenvedő betegek érintett és nem érintett bőrterületein az aktivált pDC-k száma megnövekedett. A pDC-k aktivációjában nagy jelentőséget tulajdonítanak az LL37 AMP-nek, melyet a KC-k és a neutrofilek termelnek. Ezen peptid nagy mennyiségben expresszálódik a pszoriázisos léziókban. [1, 2, 26-29].”\* Ezzel ellentétben egy másik gyulladáshoz vezető bőrbetegség, az AD tekintetében azt látjuk, hogy az egészséges egyedekhez képest az AD-s páciensek vérében nagy számban cirkulálnak a pDC-k, de bőrükben történő megjelenésük sokkal kevésbé kifejezett. Ez,

a lokálisan csökkent I-es típusú interferon termeléssel együtt, az AD-s betegek bakteriális és virális fertőzésekre való nagyobb fogékonyságát eredményezi.

### 1.3.1.3. T-sejtek

Az egészséges bőrben  $\text{cm}^2$ -enként 1 millió T-sejt van jelen, ez összeadva több mint 20 milliárd sejtet jelent a teljes bőrben, ami duplája a vér teljes T-sejt mennyiségének. Az epidermisz T-sejtei leginkább a bazális és szuprabazális rétegben, az LC-k közelségében helyezkednek el. A dermisz T-sejtei a dermál-epidermál junkciók alatt, a posztkapilláris venulák és a bőrfüggelékek körül fordulnak elő [1, 2, 30].

A kórokozók elsődleges eltávolítását követően fennmaradó hosszú élettartamú memória T-sejteket 3 csoportra oszthatjuk [31].

1. A **centrális memória T-sejtek ( $T_{CM}$ )** a másodlagos nyirokszerveket recirkulálják, folyamatosan keringenek ezen szervek (lép, nyirokcsomók) és a vér között, a bőrben nem fordulnak elő. CCR7 receptort és CD62L (L-szelektin) molekulát fejeznek ki felszínükön [31, 32].
2. Normál bőrben a  $\text{CD45RO}^+$  **szöveti rezidens memória T-sejtek ( $T_{RM}$ )** vannak jelen, melyek a patogén re-expozíció esetén a tartós, hatékony, helyi és gyors immunválaszt biztosítják, ezenkívül az immunmediált gyulladásos és autoimmun bőrbetegségek pathomechanizmusában is nagy szereppel bírnak. A dermiszt a  $\text{CD4}^+T_{RM}$ , míg az epidermiszt a  $\text{CD8}^+T_{RM}$  sejtek lakják. Hosszú élettartamúak, nem vándorolnak ki a bőrből [1, 2, 30].
3. A harmadik csoportba tartozó rövidebb élettartamú **effektor memória T sejteket ( $T_{EM}$ )** 2 nagy csoportra oszthatjuk tovább, a  $\text{CD4}^+$  helper és a  $\text{CD8}^+$  citotoxikus sejtekre. Ezek száma közel egyenlő a normál bőrben, fertőzések elleni küzdelem az alapvető feladatuk, majd ezt leküzdve számuk lecsökken, átadják helyüket a  $T_{RM}$  sejteknek. Képesek vándorolni a bőr és vér között. A gyulladásos bőrbetegségek kapcsán a  $\text{CD4}^+$   $T_H$  sejtek 5 alpopulációját kell megemlíteni:  $T_{h1}$ ,  $T_{h2}$ ,  $T_{h9}$ ,  $T_{h17}$  és  $T_{h22}$  sejtek [32, 33].

A  **$T_{h1}$  sejtek** I-es típusú citokin molekulákat, főleg IFN- $\gamma$ -t, IL-2-t és TNF-et termelnek.  $T_{h1}$  típusú immunválasz indul be az intracelluláris patogének (Mycobaktériumok, vírusok) elleni védekezés során. Ez a típusú immunválasz jelenik meg a kontakt

dermatitisz, valamint a pszoriázis korai fázisában. A T-sejtek Th1 polarizációját az IFN- $\gamma$ -val és az IL-18-cal együtt az IL-12 indukálja, mely STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) és STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) transzkripciósfaktor (TF) keresztül a T-bet (T-box expressed in T cell) TF-t aktiválja [32, 34, 35].

**2. táblázat** A bőrben található T-sejtek típusai

T-sejt alpopulációk	Indukáló/Polarizáló citokinek	Transzkripciósfaktorok és regulátorok	Kemokin receptorok	Ligandok	Citokin termelés
Th1	IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$	T-bet (TBX-21), STAT1, STAT4	CXCR3, CCR6	CXCL9, CXCL10, CCL20 (MIP-3 $\alpha$ )	IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2
Th2	IL-4	GATA3, STAT6, STAT5	CCR4, CCR10, CCR8	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC), CCL27, CCL28, CCL8	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-9, IL-25, IL-31, IL-33
Th9	IL-4, TGF- $\beta$	PU.1, IRF4	Nem meghatározott	Nem meghatározott	IL-9, IL-10
Nem-pathogén Th17	TGF- $\beta$ , IL-6	ROR $\gamma$ t, STAT3	CCR6	Nem meghatározott	IL-10, IL-17
Pathogén Th17	TGF- $\beta$ 3, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-21, IL-23	ROR $\gamma$ t, T-bet	Nem meghatározott	Nem meghatározott	IL-6, IL-8, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, IL-26, IFN- $\gamma$ , GM-CSF
Th22	IL-6, TNF- $\alpha$	AHR	CCR6, CCR4, CCR10	CCL27	IL-22
nTreg	IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10	FOXP3	Nem meghatározott	Nem meghatározott	TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35
Th3	Nem meghatározott	Nem meghatározott	Nem meghatározott	Nem meghatározott	TGF- $\beta$
Tr1	IL-27, TGF- $\beta$	c-Maf	Nem meghatározott	Nem meghatározott	IL-10
LAG3 Treg	Nem meghatározott	Nem meghatározott	Nem meghatározott	Nem meghatározott	IL-10

Átelemelve, kiegészítve – Béke Gabriella, Kapitány Anikó, Dajnoki Zsolt, Hajdú Krisztina, Gáspár Krisztián, Bíró Tamás, Szegedi Andrea: A bőr immunrendszerének felépítése és működése. Immunológiai Szemle 7:(2) PP. 13-20. 8 P. (2015)

A II-es típusú citokineket, mint az IL-4-et, IL-5-öt, IL-13-at és IL-31-et a **Th2 típusú sejtek** termelik. A T-sejtek Th2 irányú differenciációs folyamatát a STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) IL-4 citokin általi aktiválása segíti elő, ezzel fokozva a GATA-3 (GATA-binding protein-3) kifejeződését. Th2 immunválasz fiziológias szerepe a parazitákkal, férgekkel szembeni védekezés, az allergiás

betegségek, például az asztma, az AD, a krónikus orrmelléküreg-orrnyálkahártyagyulladás és étel allergiák esetében is ez jellemző [32, 34, 35].

A ***T<sub>h</sub>17 sejtek*** az akne, a pszoriázis és az AD, valamint több autoimmun kórkép esetében is jelen vannak. Fiziológiás szerepük az extracelluláris gombás és bakteriális fertőzésekkel szembeni védelemben van, de a bőr barrier homeosztázisának fenntartásában, a mikrobiótával való együttélés biztosításában is fontos a szerepük. Esetükben 2 szubpopulációt kell megkülönböztetnünk. A nem-pathogén ***T<sub>h</sub>17(β) sejtek*** IL-6 és TGF-β hatására a RORγt TF aktiválódásával differenciálódnak, IL-17A, IL-17F és IL10 effektor citokineket termelnek, valamint CCL20-at és CXCR6-ot expresszálnak. A nem-pathogén ***T<sub>h</sub>17(β) sejtek*** az IL-23 citokin hatására pathogén *T<sub>h</sub>17-té*, másnéven ***T<sub>h</sub>17(23) sejtekké*** alakulnak át. Az IL-6, IL-1β és IL-23 citokin kombináció által indukált pathogén *T<sub>h</sub>17 sejtek* az IL-17A és IL-17F mellett IL-22-t, CCL9-et és CXCR3-at kezdenek kifejezni [32-37].

A ***T<sub>h</sub>22*** alpopuláció differenciálódását az IL-6 és TNF-α segíti elő az AHR aktiválódásán keresztül. IL-22 effektor citokin termelés jellemzi. Kezdetben gyulladásos folyamatok kialakulásában (pszoriázis, AD, allergiás kontakt dermatitisz, szkleroderma) tulajdonítottak neki szerepet, ma inkább homeosztatisz szerepét emelik ki [1, 30, 32, 34, 35, 38].

Napjainkban egyre több kutatás foglalkozik egy nemrég felfedezett helper T-sejt altípussal. A ***T<sub>h</sub>9*** sejttípus naiv T-sejtekből vagy *T<sub>h</sub>2* sejtekből IL-4 és TGF-β hatására alakul ki. IL-9 citokint termel. Az IL-9 termelő sejtek száma pszoriázisban és AD-ban is megemelkedik [32, 39, 40].

A tímusz eredetű vagy periférián képződő ***regulátorikus T sejtek (Treg)*** feladata a fiziológiás és pathológiás immunválaszok aktivitásának csökkentése. Hiányukban vagy genetikai defektusuk hatására számos bőrbetegség, mint például pszoriaziform dermatitisz, ekcematózus dermatitisz, alopecia areata alakul ki. Ezidáig két nagyobb csoportot írtak le: a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nTreg és a Foxp3<sup>-</sup> Treg sejteket. A ***CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nTreg sejtek*** a tímuszban jönnek létre és sejtkontaktusok kialakítása révén a periférián hatnak. A perifériás vér T-sejteinek 5-10%-át képezik. Sejtfelszíni markermolekulákat, például a CD28-at és CTLA-4 (citotoxikus T limfocita

antigén-4)-et expresszálnak. Különböző kemokin- és mintázatfelismerő receptorokat fejeznek ki, és szuppresszor citokineket (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35) termelnek. A **Foxp3<sup>+</sup>Treg**-ek is immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek, de nem a tímuszban alakulnak ki, hanem a periérián. Ez a populáció magában foglalja a **Tr1**, a **Th3** és a **LAG3<sup>+</sup>Treg** sejteket [32, 35, 41, 42].

## 2. Az atópiás dermatitisz

Az AD egy igen gyakori, krónikus lefolyású, nem fertőző, de erőteljes viszketéssel járó, jellegzetes lokalizációkban – főként a száraz, faggyúmirigyekben szegény bőrterületeken – megjelenő, immunmediált gyulladással járó bőrbetegség, mely súlyos életminőség romláshoz vezet [43] (**2. ábra**). Az esetek túlnyomó többségében más allergiás betegségekkel (étel allergiák, allergiás orrüreg-kötyőhártya gyulladás és asztma) társul és ezek a betegségek egy karakteres időrendi megjelenést mutatnak az érintett betegeken, melyet együttesen „atópiás march”-ként/menetelésként emlegetnek [44]. A betegség egy multifaktoriális kórkép, azaz a genetikai hajlam mellett a különböző környezeti tényezők (specifikus és nem-specifikus faktorok) további oki illetve súlyosbító körülményként hathatnak kialakulására.

### 2.1. A betegség epidemiológiája

A fejlett országokban élők 10-20%-a érintett ebben a kórképben, míg a fejlődő országokban ez az arány alacsonyabb, de folyamatosan növekszik [45, 46]. Az AD bármely életkorban kialakulhat, de leggyakrabban korai gyermekkorban kezdődik. A gyermekkori AD prevalenciája 20-25%. Az esetek 60%-ában a betegség már az első életévben jelentkezik (early-onset, azaz korai megjelenésű). A legkorábbi klinikai tünetek a bőr szárazsága és érdessége. Az ekcematózus elváltozások 2 hónapos kort megelőzően általában nem fordulnak elő. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a betegség lehet folyamatosan fennálló vagy relapszusos-remissziós jellegű/természetű ismétlődő fellángolásokkal. A betegség az érintett gyermekek 80%-ában enyhe lefolyást mutat. Irodalmi adatok arról számolnak be, hogy a betegség az esetek legfeljebb 70%-ában nagyban javul vagy akár meg is szűnhet a késői gyermekkorig, viszont hosszútávú fennmaradásában a családi halmozódás és a korai az allergén szenzitizációk kockázati tényezőt jelentenek. Az AD felnőtt korban is kialakulhat (adult-onset), prevalenciája 7-10%-ra tehető [47, 48].



**2. ábra** Az AD jellegzetes klinikai megjelenése és lokalizációja különböző korú betegekben

(A) Csecsemőkben az AD általában akut lefolyású; a tünetek főként arcon és a lábak extenzor felszínén jelennek meg. A törzs ugyancsak érintett lehet, ugyanakkor a pelenkával fedett részek általában tünetmentesek. (B) 1-2 éves kortól polimorf módon jelennek meg a változatos bőrtünetek, melyek leginkább a hajlatokra lokalizálódnak. (C) Serdülőkben és fiatal felnőttekben lichenifikált és hámló plakkok jelennek meg a hajlatokban, a csuklókon, a bokákon és a szemhéjakon. A fej és nyak típusú AD-ben a törzs felső része, a vállak és a hajas fejbőr is involvált. Felnőttekben néha csak krónikus ekcéma jelenik meg a kezeken vagy prurigo-szerű léziók fejlődnek ki.

(Forrás: Weidinger , S. és Novak., N., Atopic dermatitis., Lancet, 2016. 387(10023): 1109-1122. [43])

## 2.2. Az AD pathogenezeise

### 2.2.1. Az epidermális barrier

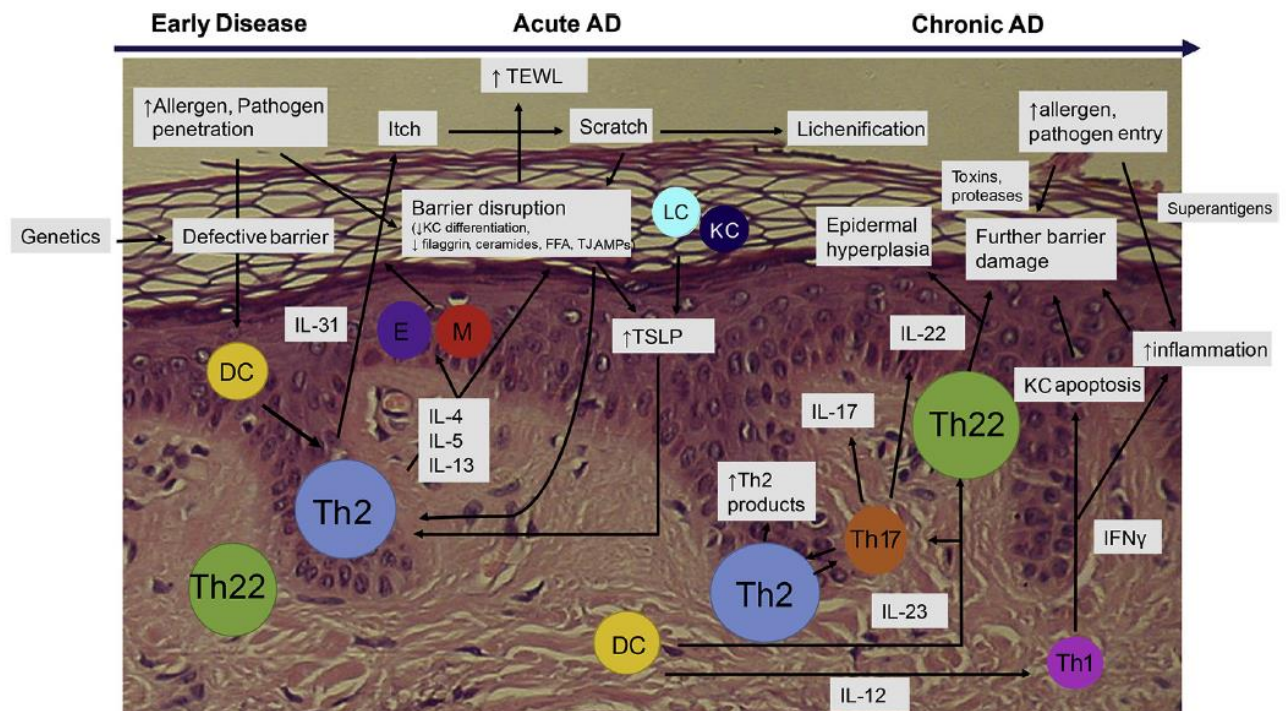
Ahogy már fent is említettük, a bőr epidermális barrierjének legfőbb feladata, hogy szervezetünket fizikailag elhatárolja a külső környezettől, valamint megvédje az onnan érkező kémiai és fizikai hatásoktól, mint pl. a patogén kórokozók bejutásától vagy az UV sugárzástól. Ezen túlmenően megfelelő hidratáltságot és pH-t kell biztosítani [49, 50]. Az epidermisz szövettanilag 4 fő rétegre osztható, de a fiziko-kémiai barrier funkciókért ebből csak 2, az SC és az SG felel. A barrier felépítő elemek közé a KC-k, a bennük található strukturális fehérjék, a sejtek közötti kapcsolatok, valamint a sejtek közötti lipid mátrix tartozik [51].

Az SG KC-i keratohyalin granulomokkal rendelkeznek, melynek egyik fő komponense a pro-filaggrin molekula. A KC-k differenciálódási folyamata során a pro-filaggrin defoszforilálódik és belőle hasítással 10-12 filaggrin (Filament Aggregating Protein, FLG) molekula keletkezik az SG-ben. A *FLG* gén az 1q21 kromoszóma régióban található az epidermális differenciációs komplexen (EDC) belül. A fehérje fő funkciója az SC mechanikai szilárdságának és integritásának biztosítása, a keratin filamentumok párhuzamos rendezése és a desmosómákhoz való rögzítése. A FLG monomerek proteázok hatására aminosavakká (Glu, Arg, His) és rövidebb peptidekké degradálódnak, majd hidrolizálódnak a SC felső rétegeiben. A folyamat végeredményeként a hasítási termékekből természetes hidratáló faktorok (Natural Moisturizing Factor, NMF) keletkeznek [52].

AZ NMF-ek protektív feladatai közé tartoznak a permeabilitási barrier homeosztázisának szabályozása, a túlzott transepidermális vízvesztés (transepidermal water loss, TEWL) megakadályozása, az SC hidratációjának és integritásának fenntartása, a savas pH biztosítása, az antimikrobiális védelem, valamint a ceramid metabolizmusban résztvevő enzimek aktivációja és a szerin-proteáz kaszkád szabályozása [53, 54]. Kiemelendő, hogy a FLG mellett más struktúrfehérjék is részt vesznek a TEWL megakadályozásában. Ezek az ún. „Cornified Envelope”-ot alkotó loricrin (LOR), involucrin (IVL), envoplakin és periplakin.

A KC-kat összekapcsoló elemeknek több típusa van. Ezek egy része felelős a sejtek szoros egymáshoz kapcsolásáért, más részük a sejtközötti anyagátvitel szabályozásában vesz részt. Az adherens junctionok a sejtek szoros összekapcsolását végzik. Közéjük tartoznak az SG és SC sejtjeit összekötő dezmoszómák és dezmoszómák felépülő dezmoszómák és a korneodezmoszin alkotta korneodezmoszómák. Hozzájuk intracelluláris keratin filamentumok rögzülnek, és együttesen alakítják ki a sejtek alakját és az epidermisz ellenálló és rugalmas szerkezetét. Az SG-ben más típusú sejtkepcsoló elemek is találhatóak, melyeket TJ-nek neveznek. Ezen szoros kapcsolat kialakításában főként a claudin (CLDN) és okkludin nevű fehérjék vesznek részt; feladatuk a víz és az ionok áramlásának szabályozása.

Az SC-ban a KC-k, illetve korneocyták között elhelyezkedő, a ceramidokból, koleszterolból és zsírsavészterekből felépülő lamelláris lipid mátrix legfontosabb feladata, hogy meggátolja a TEWL-t és a vízdékony molekulák penetrációját, valamint, hogy biztosítsa az epidermális barrier rugalmasságát [52, 55].



**3. ábra** Az AD-ben kialakuló barrierkárosodás következményei – Az AD pathogenezise

Az AD akut stádiumában a sérült bőrbarrieren keresztül allergének és patogének fokozott penetrációja alakul ki, mely – a DC-k aktivációján keresztül – Th<sub>2</sub> sejtek proliferációját váltja ki. A Th<sub>2</sub> sejtek citokineket termelnek, melyek lecsökkentik, illetve megszakítják a szerkezeti fehérjék kifejeződését és károsítják az epidermális lipidtermelést; ezen változások az akut léziókban tovább fokozzák a barriersérülés mértékét és lecsökkentik a bőr hidratáltsági fokát. A Th<sub>2</sub> citokinek (IL-4, IL-5, IL-13) aktiválják a hízósejteket (M) és eozinofil granulocitákat (E), melyek által felszabadított faktorok hozzájárulnak az AD-re jellemző viszketés és gyulladás kialakulásához. Egy másik Th<sub>2</sub> citokin, az IL-31 fokozza a viszketést, így állandósítva a barriersérülést. Az aktivált keratinociták (KC) fokozzák a TSLP expresszióját és termelését, mely felerősíti a Th<sub>2</sub> választ. Krónikus AD-ben a felerősödő Th<sub>22</sub> immunválasz hozzájárul az epidermális hiperplázia kialakulásához és a barrierdiszfunkció fenntartásához. Emellett az interferon IFN<sub>γ</sub>-t termelő Th<sub>1</sub> sejtek megsokszorozzák a gyulladás mértékét, a KC-k apoptózisát és a barrier sérülésének mértékét. Krónikus állapotban a meggyengült barrieren keresztül fokozódik az allergének és patogének penetrációja, mely mind direkt, mind indirekt módon (a bőr immunfolyamatainak további aktiválódásán keresztül) növeli a barriersérülés mértékét. AMP: antimikrobiális peptidek; FFA: szabad zsírsavak; LC: Langerhans-sejt; TJ: tight junction.

(Forrás: Malik, K., et al., An update on the pathophysiology of atopic dermatitis., *Dermatol Clin.*, 2017. 35(3):317-326. [55])

### 2.2.2. Az epidermális barrier és az AD

AD esetén a bőr fizikokémiai barrierjének működése sérül (3. ábra). A barrierkárosodás kialakulhat a barrier bármely – az előző fejezetben részletezett –

alkotórészének genetikai defektusa vagy szerzett hiánya révén. Az atópiás száraz bőrt megnövekedett TEWL és csökkent vízmegkötő képesség jellemzi, melyet a SC inter- és intracelluláris komponenseinek megváltozott szintje okoz. Ezzel párhuzamosan fokozódik a KC eredetű és a környezetből származó proteázok aktivitása, valamint a pro-inflammatorikus citokinek felszabadulása is, mely végeredményben a SC integritásának és kohéziójának felbomlásához, így a bőrbarrier összeomlásához vezet. [52]. Mindezek együttesen hozzájárulnak a percután allergén expozíció növekedéséhez [52, 56].

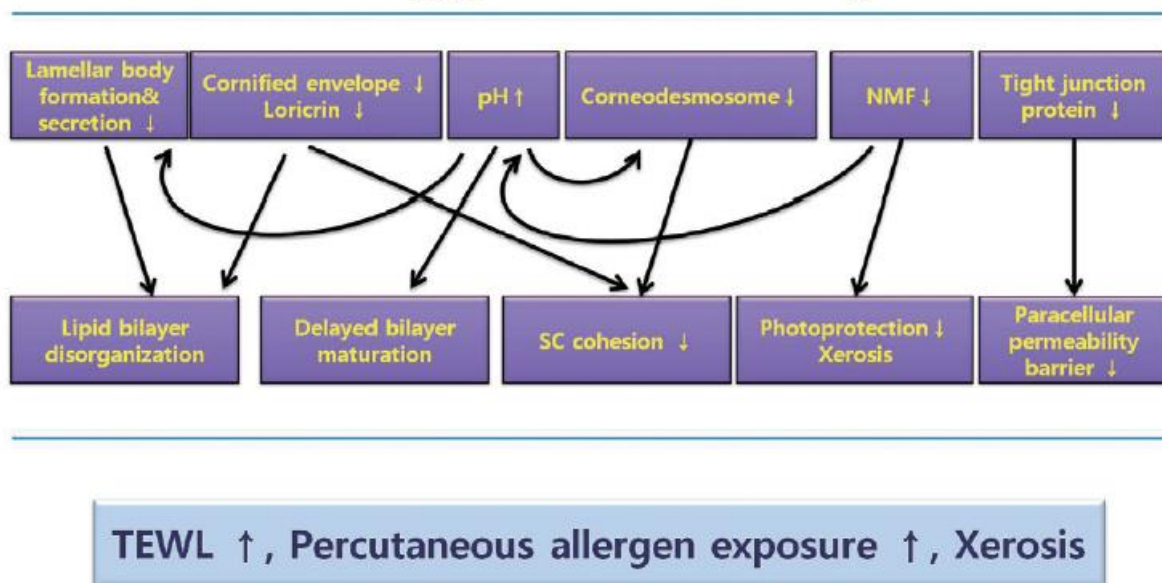
Az AD-ben megjelenő barrierkárosodás kialakulására vonatkozóan 2 fő teória született. Az **inside-out hipotézis** szerint az immunaktiváció hatására barrier károsodás alakul ki, míg az az **outside-in teória** szerint a fizikokémiai barrier károsodás az elsődleges kiindulási folyamat, melynek következtében a természetes és a szerzett immunitásban is zavar keletkezik [50] (lásd részletesen a 2.2.3 és 2.2.4. fejezetekben). Az AD különböző molekuláris vagy celluláris fenotípusokkal jellemzett alcsoportjait azonosították, mely arra utal, hogy heterogén betegcsoportról van szó (gyermekkor vs. felnőttkori, intrinsic vs. extrinsic, kaukázusi vs. ázsiai) [57]. Mind a T-sejtek, mind a DC-k központi szerepet játszanak a bőrgyulladás kialakulása során [58-61]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az AD egy T<sub>h</sub>2-mediált betegség, melynek krónikus fázisában a T<sub>h</sub>1 és T<sub>h</sub>22 sejtek egyidejű jelenléte is megfigyelhető. Nemrégiben bizonyos kutatók már a T<sub>h</sub>17 sejtek szerepét is leírták az AD pathomechanizmusában [62]. A megváltozott adaptív immunfunkciók mellett számos kutatás célozta meg a bőr barrier integritásának károsodását, valamint a veleszületett immunválasz zavarát is, közöttük saját munkacsoportunk is (lásd részletesen a 2.2.5., 2.2.6. és 2.2.7. fejezetekben) [9, 63, 64].

### **2.2.3. A genetikai tényezők szerepe a betegség kialakulásában – A genetikai barrierkárosodás okai**

Az AD kialakulásához hozzájáruló egyik legerősebb rizikó faktor a pozitív családi kórtörténet (azaz atópiával járó betegségekkel, főleg AD-vel rendelkező felmenők) [65]. Az ikervizsgálatok azt mutatják, hogy az örökletesség 75%-os, mely azért nagy valószínűséggel egy túlbecsült adat. GWAS tanulmányok alkalmával 34 olyan specifikus genomi régiót azonosítottak, amelyek valószínűleg egy vagy több olyan génavariánst hordoznak, melyek AD-ra hajlamosítanak. Ezek az AD lókuszon

elhelyezkedő gének részben olyan gének, amelyek hozzájárulhatnak az immunrendszeri abnormalitások kialakulásához; különös tekintettel a veleszületett immunválasz szignálútvonalaiban és a T-sejt aktiválódás folyamatában, valamint a T<sub>H</sub>2 sejtek differenciálódásában vesznek részt. A GWAS vizsgálatok alapján az immunológiai folyamatokban résztvevő gének mutációin túl, az epidermális barrier felépítésében szerepet játszó, főként az EDC részét képező gének érintettek leginkább a betegség kialakulásában [66-70].

## Filaggrin Deficiency



**4. ábra** A FLG hiány következményei AD-ben

A filaggrinhiány következtében kialakuló barriersérülés következtében a lipid kettősréteg dezorganizálódik, késik a lipid kettősréteg érése, felbomlik a SC kohéziója, valamint lecsökken a paracelluláris permeabilitási barrier funkciója és a barrier fotoprotekciós képessége. Mindezen kóros változások központi szereppel bírnak az AD pathogenezisében. NMF: natural moisturizing factors; SC: stratum corneum; TEWL: transepidermal water loss.

(Forrás: Lee, H.J. és Lee, S.H., epidermal permeability vbarrier defects and barrier repair therapy in atopic dermatitis., Allergy Asthma Immunol. Res., 2014. 6(4): 276-87. [52])

Az AD legerősebb genetikai kockázati tényezőit is ebben a csoportban lehet megtalálni. Ezek pedig a FLG fehérjét kódoló FLG gén szemi-domináns null mutációi, melyek végeredményben a FLG kifejeződés csökkenéséhez vagy ezen fehérje teljes hiányához vezetnek (**4. ábra**). A FLG mutációi közül leggyakrabban az R501X és a 2282del4 fordul elő, míg ritkábban előforduló mutációi az S3247X, az R2447X és a 3702delG [71]. Vannak FLG mutációval nem rendelkező betegek is, esetükben más faktorok állnak a kórkép kialakulásának hátterében. Ezek közül a LEKTI

(lymphoepitheliális Kazal-típus-kapcsolt inhibitor) névre hallgató szerin-proteáz inhibitor a KC-k differenciálódási folyamatainak szabályozásában vesz részt. Az azt kódoló SPINK5 mutációját szintén kapcsolatba hozták az AD kialakulásával [72]. Ez a defektus fokozott szerin proteáz (kallikrein 5 és 7) aktivitáshoz vezet, mely serkenti a korneodezmoszómakat alkotó fehérjék lebontását, megnövelve ezzel a barrier kóros áteresztőképességét. Ezen túlmenően a TJ-specifikus integrális membránfehérjék, így a CLDN1 és CLDN2 génjének variánsai, illetve azok hiánya is vezethet az AD létrejöttéhez [73].

#### **2.2.4. A környezeti tényezők szerepe a betegség kialakulásában - A szerzett úton létrejött barrierkárosodás okai**

AD-ben a genetikai determináltság mellett a környezeti faktorok hozzájárulása is igen jelentős. Nagyobb az AD kockázat azoknál, akik nagyvárosban (urbanizációs hatások) vagy olyan régióban élnek, ami alacsonyabb ultraibolya sugárzásnak van kitéve, illetve ahol száraz éghajlati viszonyok uralkodnak. Ezen kívül a nyugati étrend (cukorban és többszörösen telítetlen zsírsavakban gazdag) követése, az ismétlődő antibiotikum használat, a kis családméret és magas szintű iskolázottság szintén nagy szereppel bírhat a betegség kialakulása szempontjából [74].

Az urbanizáció és az iskolázottság nem csupán környezeti faktorként járul hozzá az AD kialakulásához, hanem a szerzett úton létrejött barrierkárosodással is nagyban összefügg. Az emberek tisztaságra való törekedésének növekedésével egyre nagyobb mennyiségű tisztítószer felhasználására kerül sor. A szintetikus detergensok, szappanok gyakori alkalmazása a bőr pH-ját növeli, így többféle szerin proteáz enzim szerzett módon kialakuló fokozott aktivitását idézi elő, mely a barrierkárosodás kialakulását okozhatja [75].

Kutatások kimutatták, hogy az AD-s betegek bőre megváltozott lamelláris lipidmátrix termelődést mutat, mely az SC sav, lipid, enzim összetételének csökkenéséhez, ennek következtében pedig károsodott barrierfunkcióhoz vezet. A szfingomielin-deaciláz enzim aktivitása fokozódik AD-ben, amely csökkent ceramid termelést eredményez, és a lipid mátrix megváltozott összetételével károsítja a barrier működését. A detergensok, szappanok hatása miatt emelkedő bőrfelszíni pH tovább kedvez a lipidbontó enzimek működésének [51, 75].

A szerzett barrierkárosodással kapcsolatban az is bizonyított, hogy gyulladásos körülmények között a T<sub>H</sub>2 citokinek (IL-4 és IL-13) a FLG és egyéb, a barrier felépítésében szerepet játszó struktúrfehérjék (LOR, INV) expresszióját gátolják. Ennek következtében szerzett FLG hiány alakul ki [52] (**4. ábra**).

Akár genetikai, akár a szerzett módon jön létre a FLG hiány, ez a keratinfilamentumok elégtelen aggregációjához vezet, emellett a TJ-ök képződésében is csökkenés mutatkozik. Ezen túlmenően a bőr pH-ja is megemelkedik, mely a szerin proteáz enzimek aktiválódását segíti, a T<sub>H</sub>2 típusú gyulladást fokozza, továbbá a baktériumok, így pl. a *Staphylococcus (S.) aureus* kolonizációjára is nagyobb esély van (**4. ábra**) [52, 76].

Ahogy már az előző fejezetben említettük, a TJ kóros működése és az AD kialakulása között is kapcsolat van. A TJ-k károsodhatnak szerzett módon is, nagy valószínűséggel az IL-17 citokin által okozott barrierkárosodás miatt [77, 78].

#### **2.2.5. Mikróbák szerepe AD-ban**

Teljes metagenom vizsgálatok alátámasztották, hogy az AD-asszociált mikrobiom eltérések a bőrfelszíni mikrokörnyezet befolyásolásával, valamint a gazdaszervezet immunrendszerével való kölcsönhatásokon keresztül növelheti az AD fellángolások kockázatát [79]. Úgy tűnik, hogy ebben a *S. aureus*-nak van a legjelentősebb szerepe, mivel az AD-s bőr gyakran kolonizált ezzel a pathogénnel [43]. Az AD fellángolásokat a bőr mikrobióta diverzitásának csökkenése jellemzi, melyet az *S. aureus* elszaporodása/túlsúlya, illetőleg más baktériumfajok arányának csökkenése jellemez [80, 81]. Fajsztípus vizsgálatokból kiderült, hogy a súlyos AD-val rendelkező betegek esetén az *S. aureus*, miközben a kevésbé súlyos tünetekkel rendelkező páciensek esetében az *S. epidermidis* dominanciája figyelhető meg [82]. A bőr kommenzális baktériumok, úgymint az *S. epidermidis* és az *S. hominis* AMP termelésük révén védelmet jelenthetnek az *S. aureus*-szal szemben [83]. Az epidermális barrier zavara következtében a bőr pH-ja emelkedik, mely szintén hozzájárul az *S. aureus* elszaporodásához. A bőr immunrendszere is hatást gyakorol a mikrobióta összetételre. A bőr immunsejtjei által termelt AMP-k a pathogén kórokozók

kolonizációját gátolják. AD-ben ezek kifejeződése kisebb mértékű, mivel termelésüket mérséklék a bőrbetegségekre jellemző  $T_H2$  típusú citokinek (IL-4, IL-5, IL-13). Az AMP termelés csökkenése ilyen módon hozzájárul a mikrobiális diszbiózis létrejöttéhez (3. ábra) [84].

#### **2.2.6. Az veleszületett immunitás szerepe AD-ban**

AD-ben, a barrierkárosodás következményeként, fokozódik a környezeti ártalmak bejutása a bőrbe. A környezetből érkező ingerek hatására a KC-kban a TLR2 receptor aktiválódásán keresztül egy IL-7 szerű citokin, TSLP szabadul fel, mely DC, NK sejt és hízósejt aktiválódáshoz vezet. Az így stimulált DC-k a naiv T-sejtek proliferációját és azok  $T_H2$  irányú differenciálódását eredményezik. Ennek hatására emelkedik a  $T_H2$ -típusú citokinek (IL-4, IL-5, IL-13) termelődése, melyek visszahatva a KC-kra tovább fokozzák azok TSLP felszabadítását, és ilyen módon, mintegy ördögi kört alkotva  $T_H2$  dominanciát hoznak létre [85-87].

Az AD-ban a KC-k által termelt TSLP mellett egyéb betegség-specifikus citokinek (IL-25 és IL-33) szintje is megnő, mely  $T_H2$  és innate lymphoid 2 sejtek (ILC2) aktivációjához vezet. Ennek következtében ezek a sejtek IL-5 és IL-13 citokineket termelnek, és tovább fokozzák a  $T_H2$ -típusú immunválaszt [88].

Ahogy azt már fentebb is említettük, a veleszületett immunitás fontos elemeiként számon tartott/részét képező AMP-k fő forrásai a KC-k. AD-ben a legfontosabb szereppel az CAMP és a humán  $\beta$ -defenzinek (HBD-2, HBD-3) bírnak, melyeknek fontos szerepe van a patogén ölés és a TJ integritásának fenntartásában. Viszont azt is tudjuk, hogy a  $T_H2$  citokinek negatív hatással vannak az AMP termelésre, így hozzájárulnak az infekciók kialakulásához az AD-s bőrön, mely tovább fokozza a gyulladást és az epidermális barrier károsodását. A TLR2 gén mutációjának köszönhetően szintén megnőhet a bakteriális és virális fertőzések esélye AD-s betegekben [59, 89].

A DC-k morfológiailag és funkcionálisan meghatározott alcsoportjaiba antigén felvételre és bemutatásra szakosodott sejtek tartoznak. AD esetében a DC-k emelkedett számban vannak jelen, emellett egy dinamikus DC alcsoport eloszlást

láthatunk a gyulladás különböző fázisaiban. Az LC-k az AD-ben szenvedő betegek lézionális és nem-lézionális bőrterületein egyaránt jelen vannak. Ezek a sejtek az egészséges bőrben lévő LC-kkel ellentétben FcεRI-et fejeznek ki, és az epidermiszbe jutó antigén hatására beindítják az immunválaszt. Az AD-ra jellemző másik DC alcsoport az IDEC, melyek fő feladata az inflammatorikus citokinek termelése és a gyulladás folyamatának fenntartása. A pDC-k szinte teljesen hiányoznak az AD-s bőrből, mivel a T<sub>H</sub>2-típusú citokinek a pDC-k apoptózisát okozzák [90-92] (**3. ábra**).

### **2.2.7. Az adaptív immunitás szerepe AD-ban**

Az AD-ban a DC-khez hasonlóan a T-sejtek száma is megnő. A betegség akut és krónikus fázisát más-más T-sejt populációk aktivitása jellemzi. Korábban a T<sub>H</sub>2-T<sub>H</sub>1 citokin váltással jellemezték a krónikus gyulladás kialakulását, az akut léziókban pedig a T<sub>H</sub>2 sejtek szerepét emelték ki, ma már azonban a betegségnek mind az akut, mind a krónikus szakában a T<sub>H</sub>2-T<sub>H</sub>22 sejtek és citokinmilió jelenlétét hangsúlyozzák [93, 94].

A KC-kból felszabaduló IL-25, IL-33 és TSLP citokinek, valamint a CCL17 és CCL22 kemokinek hatására az LC-k és a dDC-k aktivált állapotba kerülnek. Az aktivált DC-k T<sub>H</sub>2 sejteket stimulálva, azokat IL-4, IL-5, IL-13 és IL-31 citokinek termelésére serkentik. Ezek a citokinek a KC-kban génexpressziós változásokat indukálnak, a barrier funkció zavarát okozzák, valamint viszketési tüneteket produkálnak. Csökkentik a terminális differenciálódásért felelős gének működését, a TJ-k felépítésében szerepet játszó CLDN expresszióját, az FLG-t, valamint egyéb a barrier felépítő struktúrális fehérjék termelődését (LOR, IVL), így járulva hozzá a barrier károsodás létrejöttéhez. A T<sub>H</sub>2 sejtek által termelt IL-4, IL-5, IL-13 negatívan hat a KC-k AMP produkciójára, mely az AD-s bőrön az *S. aureus* infekciók kialakulását segíti. Emellett növeli a kallikreineket, melyek a korneodezmoszómák degradációjáért felelősek. Az IL-31 okozza a pruritus kialakulását, szintje jelentősen emelkedett AD-ban. Az akutból krónikus fázisba történő átmenetet egy jelentős T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>22 és T<sub>H</sub>17 infiltráció jelzi, mely a KC-ban olyan válaszokat indukál, hogy azok az epidermiszbe további immunsejteket vonzzanak, megváltoztassák a KC-k differenciálódását, és az epidermisz megvastagodását idézzék elő [43, 55, 59, 62, 95, 96].

Az AD-s felnőttek és a gyermekek szérumban és bőrlézióiban az IL-9 mennyisége is emelkedett. Ez a citokin a T<sub>h</sub>9 sejtekből származik. Az IL-9 feladata a T-sejtek túlélésének, proliferációjának és a gyulladásos mediátorok szekréciójának szabályozása. Ezen kívül részt vesz az ILC-k aktiválásában, melyekben fokozza az IL-5 és az IL-13 termelést. A keratinocitákban az IL-9 vascular endothelial growth factor (VEGF) felszabadulást indukál, mely összefüggésben áll az AD-ban megjelenő epidermális változásokkal. Irodalmi adatok szerint az AD-s bőr és a szérumban IL-9 szintjei és a SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis), a szérumban IgE és a CCL17 között korreláció mutatható ki [55, 97].

A T<sub>h</sub>22-höz köthető markerek megnövekedett expressziója figyelhető meg az AD akut és krónikus fázisában is. Utóbbiban ez még kifejezettebb. Az IL-22-t összefüggésbe hozták a betegség súlyosságával. Emellett epidermális hiperpláziát indukál, gátolja a terminális differenciálódást és szabályozza a bőr barrier funkcióját [55, 62, 97].

AD-ban a T<sub>h</sub>17 sejtek szerepe továbbra is ellentmondásos. Azt gondolják, hogy a robusztus T<sub>h</sub>2 citokinszignál a T<sub>h</sub>17 immuntengelyre gátló hatással van. Az IL-17 jelen van a bőrléziókban; itt a hámsejtek és a KC-k gyulladásos citokin termelését módosítja, valamint csökkenti a FLG és barrier gének kifejeződését [43, 55, 62, 95](**3. ábra**).

## Célkitűzések

### **Kérdésfelvetés 1.: Homogén-e a SIS a topográfiaileg eltérő bőrterületeken?**

Az utóbbi évek kutatásai bebizonyították, hogy a mikrobióta a topográfiaileg eltérő bőrterületeken jellegzetes diverzitást mutat, azaz nem egységes az egyes bőrrégiókban. Így például a zsíros (faggyúmirigyben gazdag bőr, pl. arc) bőrterületeken a *Propionibacterium* és a *Staphylococci* fajok, a nedves (apokrin mirigyben gazdag bőr pl. lágyékhajlat) területeken a *Corynebacteria* és a *Staphylococci* speciesek vannak jelen, a száraz (mirigyben szegény bőr, pl. lábszár) bőrrégiókra pedig az *Actinobacteria*, *Proteobacteria* és *Bacteroides* egyes fajainak jelenléte jellemző [6, 82]. Viszont arra vonatkozó vizsgálatok mindezidáig még nem zajlottak, hogy a mikrobióta és a környezete által mutatott bőr regionális eltéréseket követi-e a bőr immuntopográfiai változékonysága.

Ezért munkacsoportunk több évvel ezelőtt egy olyan széleskörű vizsgálatsorozatot kezdett el, melynek célja a SIS tanulmányozása különféle bőrrégiókban egészséges körülmények között, valamint egyes bőrbetegségekben (pl. AD, rosacea, hidradenitis suppurativa). Ezen kísérletek részeként PhD munkám során a faggyúmirigyben szegény („száraz”) és faggyúmirigyben gazdag („zsíros”) egészséges bőrrégiók immunmiliójának összehasonlító elemzését végeztem el.

### **Kérdésfelvetés 2: Mik a vérben keringő DC-k jellemzői AD-ben?**

A T-sejtek mellett a DC-k tekinthetők az AD pathogenezis fő résztvevőinek, mivel mind T-sejt polarizáló képességük, mind pedig közvetlen citokin és kemokin termelésük révén hozzájárulnak az AD-re jellemző gyulladás kialakulásához. Nemrégiben felmerült, hogy a perifériás vér ún. pre-DC-i nemcsak a bőr egészséges dermális DC-inek, hanem a bőr gyulladásos DC-inek előfutárai is lehetnek [28, 98]. Ugyanakkor kevés információval rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy a vér DC-i részt vesznek-e AD-s betegekben a betegségre jellemző citokin-kemokin profil kialakításában.

Korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy az AD-s és az egészséges kontroll vér pre-DC-inek T-sejt-polarizáló citokin termelése között különbség van [61]. Ezen kísérletsorozatot folytatva, PhD munkám második felében, a sejtek részletes

fenotípusos jellemzését végeztük el, különös tekintettel aktiválódási és érési szakaszaikra, valamint kemokin termelésükre. Ezen túlmenően megvizsgáltuk azt is, hogy az AD-s vér pre-DC-i különböznek-e az egészséges egyének *de novo* mieloid pre-DC-itől, illetve a *Staphylococcus* enterotoxin B-vel (SEB) és TSLP-vel stimulált (így egy AD-s mikrokörnyezetet imitáló) pre-DC-iktől.

# Anyagok és módszerek

## 1. Vizsgálati anyagok gyűjtése és mintaelőkészítés

### A. Bőrbíopsziák

A teljes vastagságú bőrbíopsziákat (0.5-1 cm<sup>2</sup>) 20 plasztikai műtéten átesett donorok normál bőrterületeiről vettük (10-et SGP, 10-et pedig SGR bőrterületekről). A műtéti beavatkozások előtt a donorok a Helsinki Deklaráció irányelveinek megfelelően, írásbeli hozzájárulásukat adták mintáiknak kutatási célból történő felhasználásához (**3. táblázat**).

**3. táblázat** Az RNS szekvenálási, Kvantitatív Valós-idejű Polimeráz Láncreakció (QRT-PCR) és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokra felhasznált teljes vastagságú bőrbíopsziák összefoglaló táblázata

Donorok	Életkor	Nem	Lokalizáció	Faggyúmirigyek száma
<b>SGP bőr (n=10)</b>				
SGP 1	77	Férfi	Lábszár	-
SGP 2	85	Férfi	Lábszár	-
SGP 3	72	Nő	Alkar	-
SGP 4	81	Nő	Alkar	-
SGP 5	40	Férfi	Alkar	-
SGP 6	72	Nő	Alkar	-
SGP 7	86	Nő	Kézfej	-
SGP 8	56	Nő	Lábszár	-
SGP 9	64	Férfi	Lábszár	-
SGP 10	56	Nő	Lábszár	-
Átlag életkor±SD	68.9±14.8			
<b>SGR bőr (n=10)</b>				
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	56	Férfi	Váll	+++
SGR 8	47	Férfi	Hajas fejbőr	++
SGR 9	19	Nő	Arc (középső rész)	+++
SGR 10	66	Férfi	Arc (oldalsó rész)	+++
Átlag életkor±SD	52.5±16.5			

A bőrminták csoportosítása az általunk felállított pontrendszer alapján történt a faggyúmirigyek számát és nagyságát figyelembe véve, a fénymikroszkóp 10x-es nagyítása mellett. Negatív (-) minta: az egységnyi területre eső faggyúmirigyek száma  $n \leq 1$ ; pozitív (+) minta: az egységnyi területre eső faggyúmirigyek száma  $n \geq 3$ ; a faggyúmirigy területe %-ban kifejezve a dermális felszínhez képest: (+): 5-15%, (++) : 15-30%, (+++) : >30%.

A tanulmányt a Debreceni Egyetem Helyi Etikai Bizottsága hagyta jóvá. Az összes biopsziát 2 részre vágtuk. A minták egyik felét immunhisztokémiai vizsgálatok végzése céljából formalinos fixálást követően paraffinba ágyasztuk, másik felét RNAlater nevű reagensbe (Qiagen, Hilden, Németország) helyeztük és az RNS izolálás megkezdéséig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A Hematoxylin-Eosin festést követően a mintákat a faggyúmirigyek száma alapján 2 csoportba soroltuk. A szövettani metszeteket a fénymikroszkóp 10x-es nagyításán vizsgáltuk, és a mintát SGP-ként definiáltuk, ha az egységnyi területre eső faggyúmirigyek száma  $n \leq 1$ , és SGR-ként, ha  $n \geq 3$  volt.

## **B. Vérminták**

Perifériális vérmintákat gyűjtöttünk 12 krónikus (súlyos) AD-ben szenvedő páciensztől (8 férfi, 4 nő, átlag életkor:  $25.5 \pm 7.5$ ), míg egészséges kontrollként 10 buffy coat-ot használtunk. Az összes beteg teljesítette a Hanifin és Rajka által felállított diagnosztikai kritériumokat. A tanulmányban résztvevő páciensek súlyos bőrtünetekkel rendelkeztek, a vérvételt megelőzően minimum 4 hétig nem részesültek orális glükokortikoid vagy más szisztémás immunmoduláns kezelésben, valamint anti-hisztaminnal vagy topikális kortikoszteroidokkal sem lettek kezelve a vérvétel előtti minimum 5 napban. A betegség súlyosságát a SCORAD index alapján állapítottuk meg ( $49.3 \pm 11.1$ ), ezen kívül a totál szérum IgE szintek is meghatározásra kerültek ( $2.598 \pm 1.402$  kU/l). A hiper IgE szindróma (HIES) klinikai pontrendszer alapján az összes betegnél kizártuk ezen szindróma lehetőségét). A betegek a Helsinki Deklaráció irányelveinek megfelelően, írásbeli hozzájárulásukat adták mintáiknak kutatási célból történő felhasználásához. A tanulmány a Debreceni Egyetem Helyi Etikai Bizottságának jóváhagyásával készült.

## **2. RNS izolálás, Reverz Transzkripció és QRT-PCR**

Az összes mintát a bőr alatti zsírszövet eltávolítását követően Tri Reagens oldatban (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) homogenizáltuk egy Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Németország) elnevezésű szövet lizáló készülék, és a hozzátartozó, előzőleg autoklavozott acél golyók segítségével, majd totál RNS-t izoláltunk a humán bőrmintákból. Az RNS-ek koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométer (Thermo Scientific, Bioscience, Budapest, Magyarország) segítségével határoztuk meg. Az RNS minták minőségét Dr. Pólska Szilárd, a Debreceni Egyetem Genomi

Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának kutatási munkatársa ellenőrizte Agilent 2100 BioAnalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) használatával. A reverz transzkripció kísérletek kivitelezéséhez minden esetben 1 µg totál RNS-t írtunk át komplementer DNS-sé (cDNS) High Capacity cDNA Archive Kit-et használva, a gyártó által ajánlott utasításokat és hő protokollt követve. Ezt megelőzően a mintákat DNáz I enzim (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kezelésnek vetettük alá, kiküszöbölendő az esetleges genomiális DNS szennyeződést. A QRT-PCR mérések során a reakciókat triplikátumokban végeztük, és a gyártó által tervezett FAM-MGB assay-eket, valamint TaqMan® Gene Expression Master Mix-et alkalmaztunk (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A mérésekhez használt primerek listája a **4. táblázatban** található. Az összes reakciót egy LightCycler® 480 System (Roche Magyarország Kft., Budaörs, Magyarország) berendezésen futtattuk le. A célgének relatív mRNS szintjeit az összehasonlító  $\Delta\Delta CT$  módszerrel határoztuk meg, a normalizálás minden esetben a PPIA mRNS expressziójára történt.

**4. táblázat** A QRT-PCR kísérletek során használt primerek

Célgén	Assay ID	Célgén	Assay ID	Célgén	Assay ID	Célgén	Assay ID
<b>CAMP</b>	Hs00189038_m1	<b>CCL23</b>	Hs00270756_m1	<b>KRT17</b>	Hs00356958_m1	<b>PPIA</b>	Hs99999904_m1
<b>CCL2</b>	Hs00234140_m1	<b>CCL24</b>	Hs00171082_m1	<b>KRT79</b>	Hs00418343_m1	<b>S100A7</b>	Hs00752780_s1
<b>CCL3</b>	Hs00234142_m1	<b>CLDN16</b>	Hs00198134_m1	<b>LCE1F</b>	Hs00820275_sH	<b>S100A8</b>	Hs00374264_g1
<b>CCL19</b>	Hs00171149_m1	<b>DEFB4B</b>	Hs00175474_m1	<b>LCN2</b>	Hs01008571_m1	<b>S100A9</b>	Hs00610058_m1
<b>CCL20</b>	Hs00355476_m1	<b>FLG</b>	Hs00856927_g1	<b>LOR</b>	Hs01894962_s1		

### 3. RNS szekvenálás és analízis

A szekvenáláshoz használt cDNS könyvtár előállítására 1 µg teljes RNS-ből TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) segítségével történt a gyártó által meghatározott protokoll szerint. Nevezetesen, a poli-A végű RNS-ek tisztítása oligodT-konjugált mágneses gyöngyökkel, míg fragmentálásuk 94°C-on 8 percig zajlott. Ezt követően az egyszálú cDNS molekulák előállítására random primerek és SuperScript II reverz transzkriptáz enzim (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával történt. A folyamat következő lépésében a kettőszálú cDNS

szintetizálását, a duplaszálú cDNS vég javítását és a 3' végek adenilálását hajtottk végre, melyet az Illumina index adapterek mintához történő ligálása követett. Ezután az adaptor ligált cDNS fragmensek PCR-rel történő felsokszorosítása következett. A cDNS fragment méret eloszlások és a molaritás ellenőrzése Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) műszerrel történt. A szekvenálás előtt az RNS-szekvencia könyvtárakat 10nM-os koncentrációra hígítottuk, majd az 5 könyvtárból egy mix készült. A szekvenálás egy Illumina HiScan SQ készüléken (Illumina, San Diego, CA, USA) zajlott, egyirányú 50bp-os szekvencia leolvasással (ez mintánként 16-18 millió olvasat létrejöttét eredményezte). A minőségellenőrzést és az ún. de-multiplexelést CASAVA szoftverrel végeztük. Ezután a TopHat és Cufflinks algoritmusok alkalmazásával a szekvenált adatok ráillesztése a Human Genom v19-re, valamint a bam fájlok legenerálása is megtörtént. A további statisztikai analízisekhez a StrandNGS szoftvert használtuk, míg a bam fájlok importálása és normalizálása a DESeq szoftver használatával valósult meg. A statisztikailag szignifikáns génexpressziós mintázatok azonosítása a felállított kondíciók között nem-paraméteres Wilcoxon Mann-Whitney teszttel történt. A könyvtárkészítés, a szekvenálás és az azt követő adat analízis a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában Dr. Póliska Szilárd közreműködésével valósult meg. Az RNS szekvencia adatokat a Sequence Read Archive (SRA) adatbázisba (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) töltöttük; az adatok az SRP126212 referencia szám alatt érhetők el.

#### **4. Útvonal analízis**

A gének megfelelő útvonalakhoz történő hozzárendeléséhez egy interaktív útvonalelemzést végeztünk el az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftver (Qiagen, Valencia, CA, USA) web-alapú applikációjának segítségével, annak alapértelmezett elemzési paramétereinek felhasználásával. Az általunk betáplált génlista azokat a géneket tartalmazta, amelyek szignifikánsan eltérő génexpressziót mutattak az SGR és az SGP mintacsoportok között. Az analízis célja az volt, hogy prediktálja azokat az over-reprezentált (azaz szignifikáns mértékben „feldúsult”) útvonalakat, gén hálózatokat és „upstream” regulátor molekulákat (transzkripciós faktorok, citokinek, kemokinek), amelyek segíthetnek a 2 bőrrégió közötti funkcionális és molekuláris különbségek karakterizálásában. A génlistát a StrandNGS szoftverből közvetlenül az

IPA szoftverbe importáltuk, hogy elvégezhessük az IPA Core Analízist. Ennek általános beállításai a következők voltak:

1. A Fold Change értékek megadása
2. Referencia szett megadása: Ingenuity Knowledge Base (csak a gének)
3. A génszimbólumok megadása
4. Faj megjelölése: Homo sapiens
5. A kapcsolatok tartalmazzák a Direkt és Indirekt kapcsolatokat
6. p határérték: 0.05
7. Tartalmazzon endogén molekulákat
8. Prediktálja:
  - a. A betegségeket és biológiai funkciót
    - i. Betegségek és zavarok
    - ii. Molekuláris és celluláris funkciók
    - iii. Fiziológiai rendszerfejlődést és funkciókat
  - b. A kanonikus útvonalakat
  - c. A molekulákat
  - d. Az upstream regulátorokat

Az IPA analízissel azonosított immunrendszerhez köthető molekulákat, valamint a jelenlegi és előző tanulmányunkban [9] QRT-PCR és immunhisztokémiai módszerekkel detektált, szignifikáns különbséget mutató molekulákat egy fókuszált útvonal analízisnek is alávetettük. Ehhez a Cytoscape ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)) szoftver (v. 3.5.1) CluoGo (v.2.3.5) és CluePedia (v. 1.3.5) applikációit alkalmaztuk, melyek a Gene Ontology (GO) Biological Process (BP), GO Immune System Process (ISP), GO Molecular Function (MF), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) és Reactome Pathways adatbázisokat használják. A szigorú analízisünk során, csak a statisztikailag szignifikáns mértékben ( $p < 0.05$ ) „feldúsult” útvonalakat, valamint azokat a biológiai folyamatok részét képező csoportokat ábrázoltuk, melynek tagjai között minimum 9 olyan gén szerepelt, melyet a mi bemenő (betáplált) génlistánk is tartalmazott.

## 5. IHC és rutin festések

Az immunhisztokémiai vizsgálatokra a paraffinba ágyazott szövetekből metszeteket készítettünk, majd azokat deparaffináltuk. A deparaffinálási lépést követően a metszeteket rehidráltuk, majd hőindukált antigénfeltárást végeztünk, és az endogén peroxidázok gátlására 10 perces 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő előkezelést alkalmaztunk. A festések során használt elsődleges anti-humán antitesteket az **5. Táblázatban** foglaltam össze.

**5. táblázat** Az IHC vizsgálatok során alkalmazott elsődleges antitestek

Antitest neve	Klonalitás	Izotípus	Hígítás	Gyártó	Katalógus szám
<b>S100A8</b>	Poliklonális	nyúl, IgG	1:800	Sigma-Aldrich	HPA024372
<b>Lipocalin/NGAL</b>	Poliklonális	nyúl, IgG	1:600	Invitrogen	PA5-32476
<b>CCL2/MCP1</b>	Monoklonális	egér, IgG	1:300	Novus Biologicals	NBP2-22115
<b>CCL20/MIP-3-α</b>	Monoklonális	egér, IgG	1:100	LifeSpan Biosciences	LS-B7409
<b>KRT17</b>	Poliklonális	nyúl, IgG	1:100	Abcam	ab53707
<b>Loricrin</b>	Monoklonális	nyúl, IgG	1:400	Novus Biologicals	NBP1-33610
<b>Filaggrin</b>	Monoklonális	egér, IgG	1:300	Abcam	ab17808

Az elsődleges antitesttel történő inkubálások egy éjszakán keresztül 4°C-on nedves kamrákban zajlottak. Ezután HRP-konjugált anti-egér/anti-nyúl másodlagos antitesteket alkalmaztunk (15 perces inkubálás nedves kamrában a gyártó ajánlása alapján). Az antitesttel történő inkubálás előtt és után a mintákat 3-szor 5 percig mostuk, míg az immunjelek előhívására Vector® VIP és ImmPACT™ NovaRED™ Kit-et (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtunk. A háttérfestés metilzölddel történt. Az adott fehérje detektálása minden metszeten párhuzamosan, egy időben zajlott, hogy a fehérjeszintek összehasonlíthatóak legyenek. Minden festés esetében használtunk pozitív, negatív és izotípus kontrollokat a megfelelő normalizálás érdekében. A mintákon Hematoxylin-Eosin festéseket is végeztünk. A faggyúmirigyek számának meghatározása pathológus által történt.

## 6. Whole-slide imaging

A szövettani metszetek digitalizálását egy Zeiss sima-apokromatikus objektívvel és Hitachi 3CCD progresszív scan color kamerával felszerelt Panoramic SCAN digitális metszet szkennelővel végeztük el. Az immunfestések kiértékelésére a Panoramic

Viewer 1.15.2 szoftver (3DHistech) HistoQuant és NuclearQuant applikációját használtuk. Ezt követően kiválasztottuk a vizsgálni kívánt területeket (Regions of interest (ROI)) (n=20/metszet). A ROI-k kijelölése „vakon” [az adott bőrminta területi eredetének (SGR, SGP) ismerete nélkül] történt olyan módon, hogy a kijelölt terület reprezentálja a teljes bőrmetszet festődési mintázatát. Majd a szoftver segítségével lemértük az összterületet (Field area [FA (mm<sup>2</sup>)]) és a maszkolt területet (Mask area [MA (mm<sup>2</sup>)]). Az FA a ROI-k összterületét mutatja, az MA reprezentálja a pozitív területet. Az MA/FA értékeket minden ROI esetében kiszámoltuk. Az egyes fehérjék mennyiségének meghatározása két független vizsgáló által történt a Panoramic Viewer szoftver segítségével.

### **7. Sejt izolálás és sejtenyésztés**

A Perifériális Vér Mononukleáris Sejtek (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) kinyerése az egészséges kontrollok és az AD-s betegek perifériás véréből Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Svédország) gradiens centrifugálással történt. A PBMC-kből ezt követően CD1c<sup>+</sup> (BDCA1<sup>+</sup>) Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) segítségével a gyártó által előírt utasításokat követve CD1c<sup>+</sup> mieloid DC-ket izoláltunk. A kiszeparált DC-ket 1% antibiotikum mix-et (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Ausztria) és 10% főtális borjú szérumot (FBS) tartalmazó (Lonza Group Ltd., Bázél, Svájc) RPMI 1640 médiumban (Miltenyi Biotech GmbH) tenyésztettük 48 órán keresztül, azok stimulálását 30 ng/ml TSLP (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) és 100 ng/ml Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) jelenlétében végeztük. A DC-ket (5-6x10<sup>5</sup>) 96-lyukú sejtenyésztő edényekben 200 µl tenyésztő médiumban tartottuk fent, felülúszójukat kemokin vizsgálatokra használtuk fel. Mivel a kísérletek során relatíve kevés sejt volt kinyerhető, így a frissen izolált sejteken Fluoreszcencia Aktivált Sejtválogatás és Analízis (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) vizsgálatokat nem tudtunk végezni; azonban előzetes kísérleteket végeztünk annak lehetőségét kizárva, hogy a sejtek fenntartása szignifikánsan módosíthatja-e a sejtfelszíni marker vizsgálatok eredményeit.

### **8. A DC-k fenotípusának karakterizálása**

Az inkubációt követően a dendritikus sejteket összegyűjtöttük, majd 5% FBS-t és 0.5mM EDTA-t tartalmazó foszfát pufferrel (PBS) mostuk, végül FACS pufferben [1%

marha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS] vettük fel, és szétosztottuk egy 96-lyukú sejtenyésztő edény 4 férőhelyébe (1-et negatív kontrollként, 1-et izotípus kontrollként, 2-őt pedig a festésre felhasználva). A sejteket a következő festékekkel-jelölt sejtfelszíni marker specifikus antitestekkel festettük meg: APC-Cy7 anti-humán CD11c és PerCP-Cy5.5 anti-humán CD11c (a CD11c<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> azonosítására), APC anti-humán CD1a és APC anti-humán CD207 (az LC kizárására), PE anti-humán FcεRI, APC-Cy7 anti-humán CD206, PerCP-Cy5.5 anti-humán CD83 and PE anti-humán CD86 (a sejtek jellegzetességeinek, érési és aktivációs állapotának vizsgálatára). A festések során alkalmazott izotípus kontrollok a következők voltak: PE egér IgG2b, κ izotípus kontroll, APC egér IgG1, κ izotípus kontroll, PerCP/Cy5.5 egér IgG1, κ izotípus kontroll, APC/Cy7 egér IgG1, κ izotípus kontroll (Biolegend, San Diego, CA, USA). A sejteket 30 percig 4°C-on fénytől elzárt körülmények között inkubáltuk az antitestekkel. A megfestett sejteket FACS pufferes mosást követően Intracellular Fixation Buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA) reagenssel fixáltuk 20 percig szobahőmérsékleten, fénytől elzárt körülmények között. A sejteket a fixálást követően mostuk, és a mérés megkezdéséig FACS pufferben tartottuk 4°C-on. A sejtfelszíni markerek expresszióját áramlási citometriával vizsgáltuk.

## **9. Áramlási citometria**

Az áramlási citometriás vizsgálatokat 96-lyukú sejtenyésztő edényben, fixált sejteken végeztük egy BD FACS Array készüléken (Becton Dickinson, San Jose, CA). A sejtek detektálásához, valamint a szennyeződések és az összecsapódott sejtek kizárásához Forward (FSC) és Side Light Scattered (SSC) alkalmaztunk. A PE fluoreszcens jelet egy 532nm-es lézerrel gerjesztettük, a detektálás 585/42nm-es sávszűrő filterrel történt. Az APC jelet 635nm-es lézerrel gerjesztettük, és 660/20nm-es filterrel detektáltuk. A PerCP-Cy5.5-festéket 532nm-es lézerrel 695/40nm-es filterrel, míg az APC-Cy7-festett mintákat 635nm-es lézer segítségével gerjesztettük és 780/60nm-es filter alkalmazásával detektáltuk. Egy-egy mintából 100.000-500.000 sejt került lemérésre. Az exportált adatok kiértékelése FCS Express 4 Flow Cytometry szoftver (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA) segítségével történt.

## 10. Kemokin Array vizsgálatok

A kemokin termelést a Proteome Profiler Human Chemokine Array (R&D Systems, Abingdon, UK) segítségével határoztuk meg a gyártó által előírt protokollt követve az előzőleg frissen izolált stimulálatlan sejtek felülúszójából (5 AD-s és 5 egészséges kontroll mintából, lásd a **6. táblázatban** jelölve).

## 11. ELISArray és konvencionális ELISA vizsgálatok

A CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, CCL17, CCL22 kemokinek felszabadulását 5 AD-s és 5 egészséges kontroll mintából vizsgáltuk a Human Common Chemokines Multi-Analyte ELISArray kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével a gyártói utasításokat követve. Az AD pathogenezisében fontos szerepet játszó CCL17, CCL18 és CCL22 kemokinek mennyiségének pontos meghatározását a CCL17/TARC, a CCL18/PARC és a CCL22/MDC Quantikine ELISA kitékkel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) végeztük el a gyártó által előírt módon. A konvencionális ELISA kísérletek esetében a stimulálatlan és stimulált sejtek felülúszóit egyaránt vizsgáltuk (lásd a **6. táblázatban** jelölve).

**6. táblázat** Az AD-s betegek adatai

Betegek	Életkor	Nem	SCORAD	Emelkedett IgE szint
1. **	40	Férfi	55	Igen
2.	37	Férfi	72	Igen
3. *	25	Nő	41	Igen
4. *	22	Férfi	39	Igen
5. **	25	Nő	42	Igen
6.	10	Férfi	38	Igen
7. **	25	Nő	41	Nem elérhető
8. *	23	Férfi	52	Igen
9. *	23	Férfi	59	Igen
10. *	25	Nő	51	Igen
11. **	23	Férfi	39	Igen
12. **	28	Férfi	63	Igen
Átlag életkor±SD	25.5±7.5			

Szérum IgE referencia tartomány: 0-100 kU/L. A táblázatban \*-gal jelölt betegek DC-inek felülúszóját használtuk a kemokinek Proteome Profiler Array segítségével történő azonosítására. A táblázatban \*\* -gal jelölt betegek DC-inek felülúszóját használtuk az ELISArray és a konvencionális ELISA kísérletekhez

## **12. Statisztikai analízis**

### **A. Bőrszövetekkel végzett kísérletek esetében**

A statisztikai analíziseket a 6-os verziójú GraphPad Prism szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével végeztük el. A két csoport közötti statisztika összehasonlításra párosítatlan (kétmintás)  $t$ -próbát alkalmaztunk. A csoportok közötti különbségeket átlag $\pm$ SEM formátumban adtuk meg. A statisztikailag szignifikáns különbségek határát a  $p < 0.05$  értéknél állapítottuk meg (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### **B. Vérmintákkal végzett kísérletek esetében**

A statisztikai analízishez a 18.0 verziójú SPSS szoftvert használtuk (SPSS, Chicago, IL, USA). Az adatok eloszlásának megállapítására a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Az egyes változók esetében meghatározásra került az átlag $\pm$ 95%-os megbízhatósági tartomány (95% MT), vagy az átlag $\pm$ szórás (SD). Mivel az adatok normál eloszlást mutattak, a kísérleti adatok összehasonlítását kétmintás  $t$ -próbával végeztük el. A vizsgált adatok varianciájának homogenitását F-próba segítségével elemeztük. Mindegyik teszt esetében a szignifikancia szint  $p < 0.05$  volt.

## Eredmények

### I. Különböző egészséges bőrterületek immuntopográfiai jellemzése

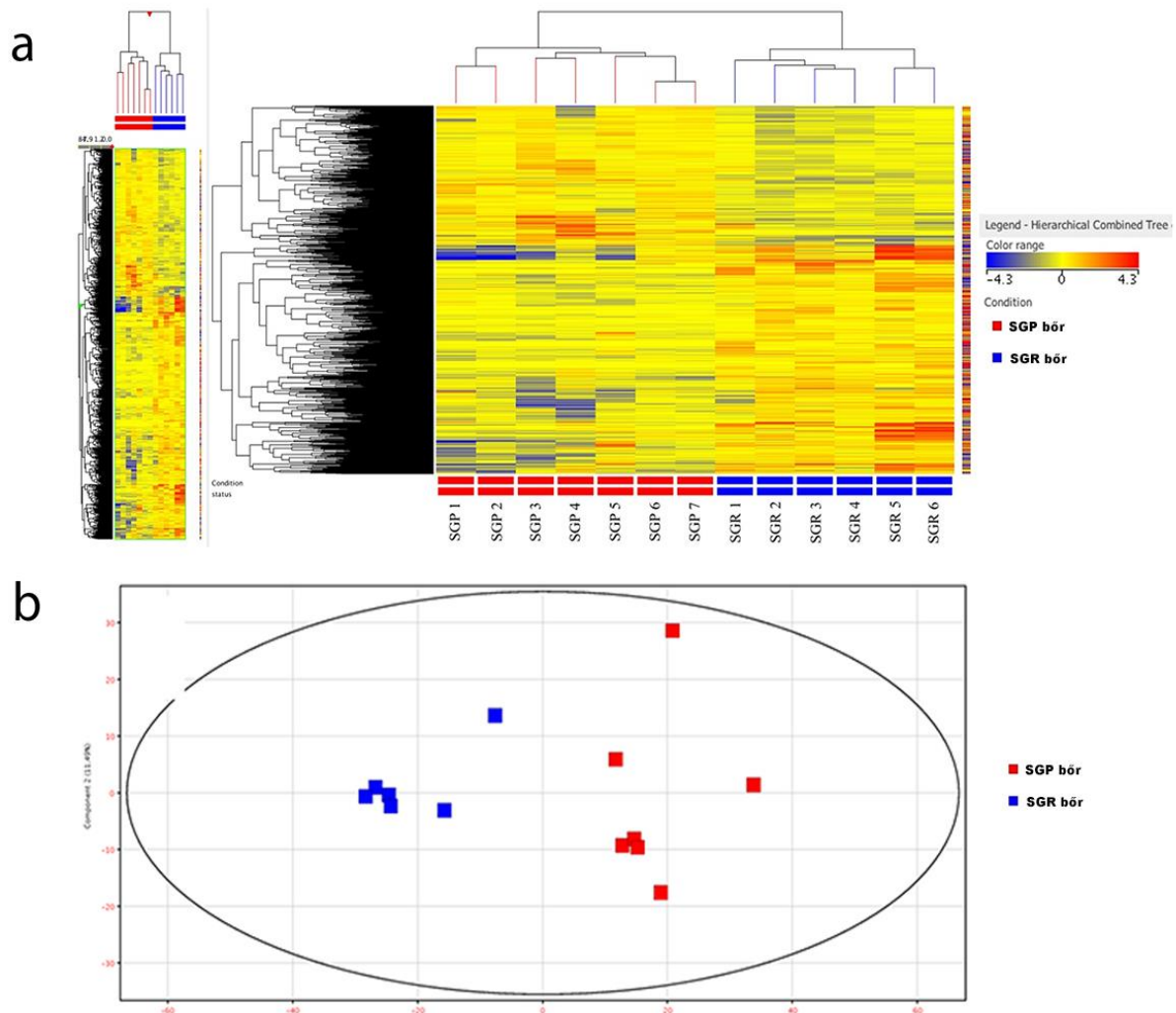
#### I.1. Az RNS szekvenálás és az IPA analízis jelentős különbségeket tár fel az SGR és az SGP bőrterületek között

##### I.1.1. RNS szekvenálás

Ahhoz, hogy mélyrehatóan analizáljuk az SGR és SGP bőrrégiók közötti eltéréseket, RNS szekvencia analízist hajtottunk végre 6 SGR és 7 SGP donor teljes vastagságú bőrbioopsziáinak lizátumából izolált RNS-ekből. Ezt követően – a szekvenálás eredményeként kapott adataink felhasználásával – ún. hő térképet (heatmap) **(5.a ábra)** és Principal Component Analysis (PCA) ábrákat **(5.b ábra)** készítettünk a StrandNGS szoftvert alkalmazva. A szoftver által automatikusan generált hő térkép célja, hogy az adott bőrterületekről (SGP vagy SGR) származó minták génexpressziós profilja alapján bizonyítékot szolgáltatson a két bőrterületet érintő azonosítható különbségekről. Kiemelendő, hogy a szoftver által generált hő térkép alapján a két régió génexpressziós mintázata egyértelműen elkülöníthető volt egymástól. Ehhez hasonlóan a PCA ábra (melyet szintén a szoftver készített) is rávilágított a már előbb említett különbségekre a két régió között. A PCA elemzést mutató ábrán minden pont egy egyéni bőrmintát reprezentál (a pontok színei az SGP és SGR bőrterületeket jelzik), míg az egyes pontok közötti távolságok a minták génexpressziós profiljai közötti különbségek mértékét reprezentálják. Ezek alapján egyértelműen látszik, hogy az azonos színű pontok két különböző csoportba rendeződnek (piros: SGP, kék: SGR), valamint, hogy a piros és kék csoportok között jelentős távolságok vannak. Fontos emellett hangsúlyozni, hogy a hő térkép és PCA ábrák azt is jelzik, hogy egy adott csoporton (SGP vagy SGR) belül a csoporthoz tartozó minták eredetüktől (azaz a test pontos bőrrégiójától) függetlenül hasonló génexpressziós profilt mutatnak. Ez figyelhető meg a hő térképen a minták színrendszere alapján is (piros: magasabb expresszió, kék: alacsonyabb expresszió), miközben a PCA ábrán az egy adott régióhoz tartozó pontok relatíve kis távolságra találhatók egymástól a másik régióhoz tartozó pontokhoz képest.

Az SGR és SGP minták génexpressziós profiljának eltéréseit a Mann-Whitney nem-paraméteres statisztikai teszttel ( $p < 0.05$ ) határoztuk meg. Ezzel az elemzéssel 1083

gént azonosítottunk, melyek statisztikailag szignifikánsan eltérő kifejeződést mutattak az SGR bőrterületen az SGP bőrterülethez viszonyítva. Ezekből 672 gén magasabb, míg 411 gén alacsonyabb expressziót mutatott az SGR szövetben.



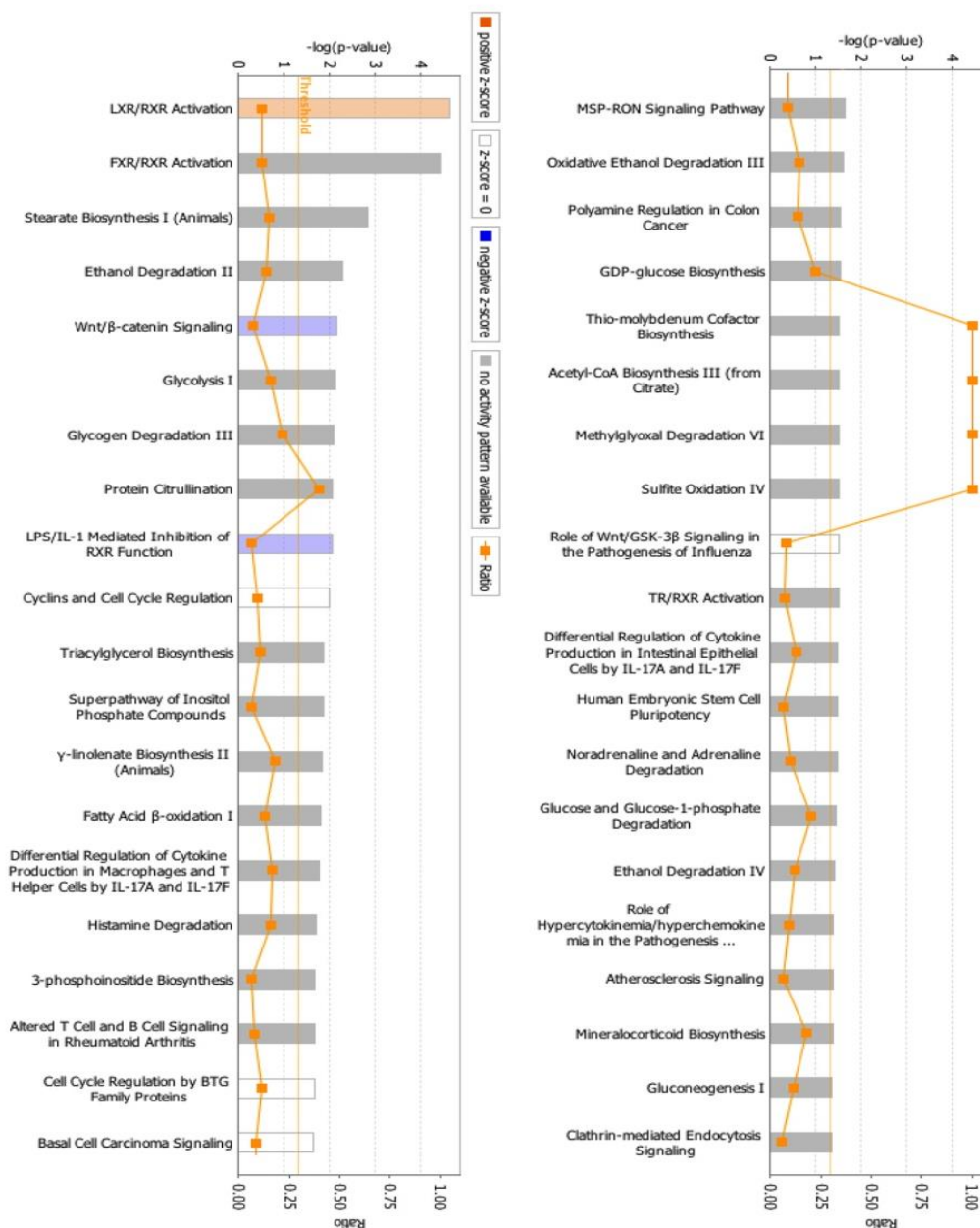
**5. ábra** A StrandNGS szoftver által generált heatmap és PCA

**a.** A heatmap-et a StrandNGS szoftver automatikusan generálta az SGR (n=6) és SGP (n=7) bőrrégiók között szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) eltérő expressziót mutató génekből. Az ábrán jól látható, hogy a szoftver a 2 mintacsoportot egyértelműen elkülönítette egymástól a minták különböző génextpressziós profilja alapján. Ezt szemlélteti a hőtésképen a minták színrendszere (piros: magasabb expresszió, kék: alacsonyabb expresszió). **b.** A szoftver által készített PCA ábra megjeleníti az összes szekvenált mintát. Az ábrán található pontok egy-egy egyedi bőrmintát reprezentálnak, a pontok színei a minta típusát jelzik (piros: SGP, kék: SGR), a pontok közötti távolságok a minták génextpressziós profiljai közötti különbségeket mutatják.

### I.1.2. Ingenuity Pathway Analízis

A fent említett 1083 gént az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftvert használva 2 különböző típusú funkcionális, standard, nem-restriktív útvonal analízisnek vetettük alá.

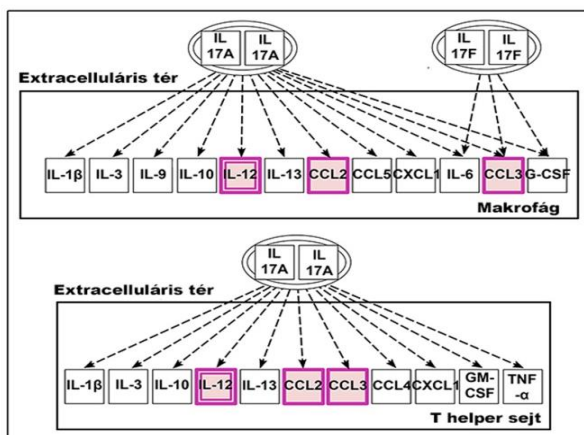
a



6.a ábra A nem-restriktív Kanonikus IPA Útvonal Analízis eredményei

A nem-restriktív Kanonikus IPA Útvonal Analízis 40 szignifikáns biológiai útvonalat azonosított, melyeket az IPA szoftver a meghatározott szignifikancia szintek alapján sorbarendezte. Ebből a 40 kanonikus útvonalból a szignifikancia sorban megjelenő első 14, a lipid metabolizmusban játszik szerepet (pl. LXR/RXR aktiváció, FXR/RXR aktiváció, Sztearát bioszintézis I., stb.). A szignifikancia sorban az IL-17 útvonal volt az első legszignifikánsabb útvonal, mely bőr immunfunkciókhoz köthető. Emellett az egyetlen útvonal, mely valamelyest kapcsolatba hozható bőr immunműködésekkel, az LPS/IL-1 által szabályozott RXR funkció gátlása volt.

b



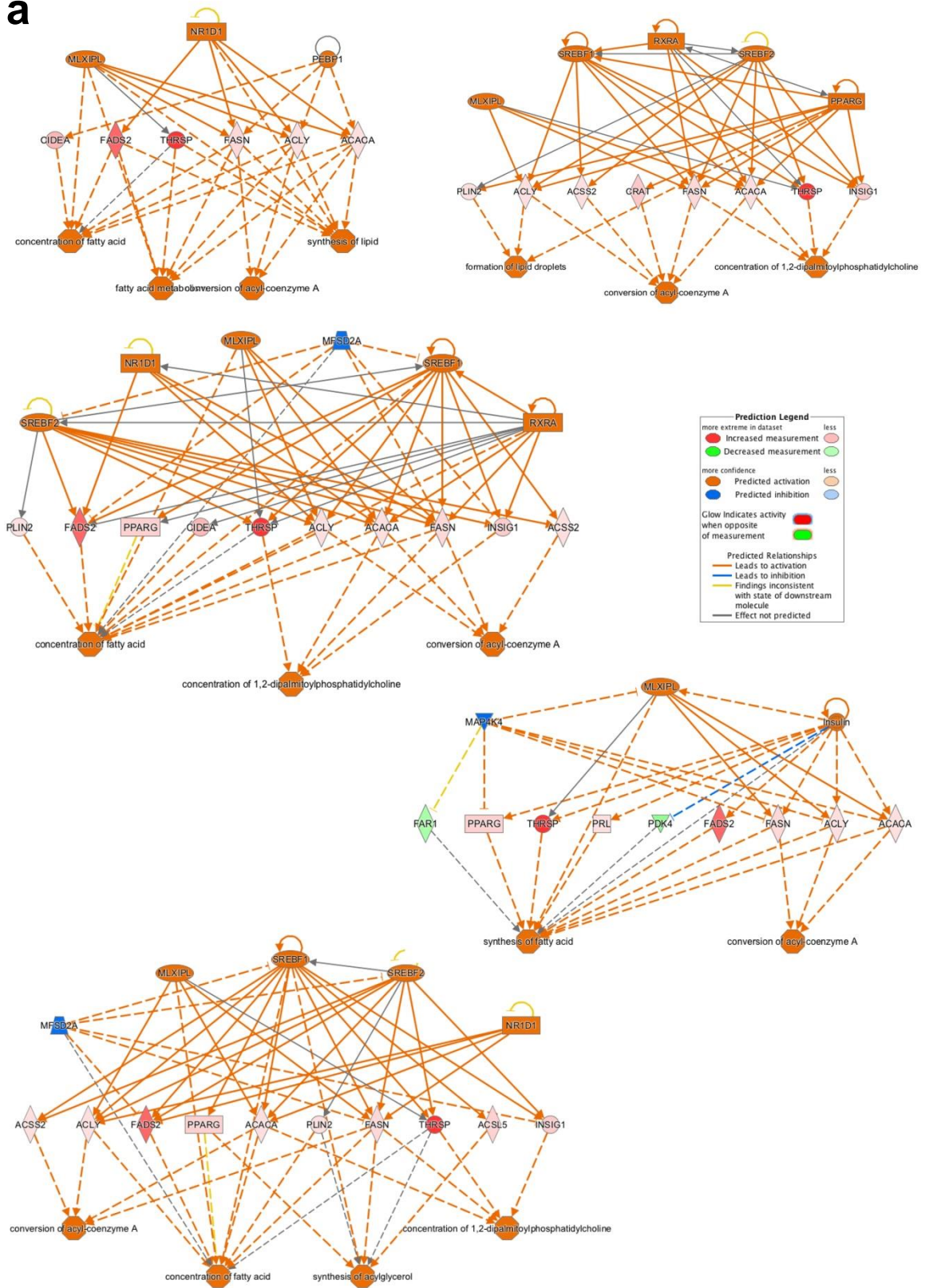
**6.b ábra** A nem-restriktív Kanonikus IPA Útvonal Analízis eredményei

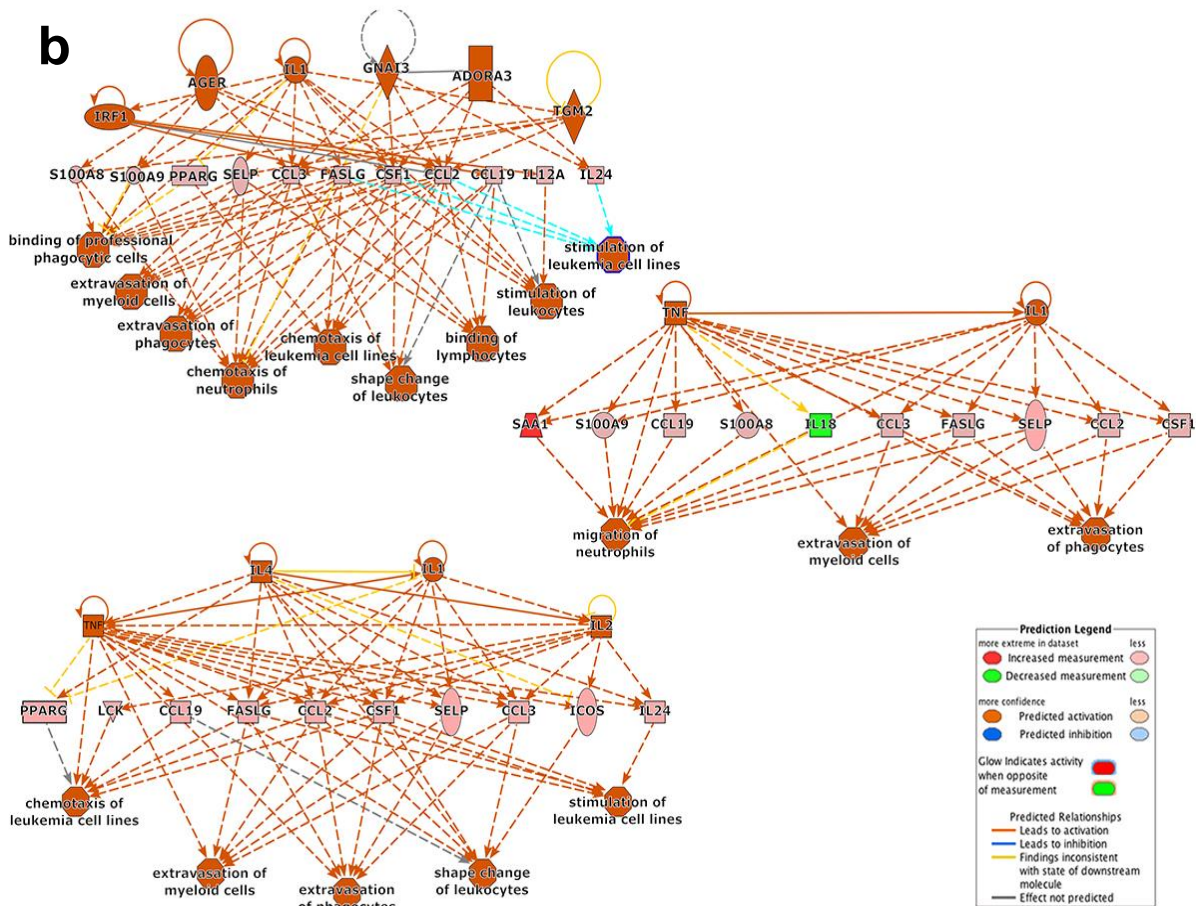
A kanonikus útvonalak között megjelent az IL-17 útvonal is. Az ábrán látható, hogy a makrofágokban és a T helper sejtekben zajló citokintermelés különbözőképpen szabályozódik az IL-17A és IL-17F molekulák által. A mi génlistákban is szereplő gének lila színű keretbe vannak foglalva.

Először a nem-restriktív kanonikus útvonal analízist (**canonical pathway analysis**) végeztük el, amely 40, statisztikailag szignifikáns mértékben „feldúsult” (azaz az SGR mintákban az SGP régiókhoz képest különböző mértékben megjelenő) útvonalat azonosított; ezeket a program automatikusan, a szignifikancia szintek alapján rendezte sorba (**6.a ábra**). A 40 kanonikus útvonalból a szignifikancia sorrendben megjelenő első 14 a lipid metabolizmushoz volt köthető (például LXR/RXR aktiváció, FXR/RXR aktiváció, Sztearát bioszintézis I., stb.). Ez a jelenség nem volt számunkra meglepő, mivel a 2 bőrterület definíciószerű anatómiai különbségei (a faggyúmirigyek jelenléte vagy hiánya) előre vetítették ezeket az eredményeket. Az első szignifikáns, kifejezetten a bőr immunrendszeréhez tartozó útvonal az IL-17-kapcsolt jelpálya volt (**6.b ábra**); emellett egyetlen, a bőr immunműködéséhez részben kapcsolódó útvonal az „LPS/IL-1 által mediált RXR funkciógátlás” volt.

Következő lépésként egy regulátor IPA elemzést (**regulatory IPA analysis**) hajtottunk végre. Ez az analízis 8 olyan jelpályahálózatot tárt fel, melyekben számos, az RNA szekvencia analízis során azonosított génpanelhez kapcsolódóan azonosította az „upstream” regulátorokat, valamint a „downstream” celluláris válaszokat. Ezek közül 3 olyan hálózatot azonosítottunk, melyek az immunológiai folyamatok és szignalizációs útvonalak részeként az IL-17-kapcsolt jelpályákban szereplő molekulákat tartalmaztak, úgymint a CCL2-t, S100A8-at és S100A9-et; a többi 5 hálózat, hasonlóan a fentiekhez, a zsírsanyagcseréhez volt köthető (**7. ábra**).

**a**





**7. ábra** A Regulátor IPA Analízis eredményei

A Regulátor IPA Analízis eredményeként megjelentek a celluláris- és lipid metabolizmushoz köthető regulátor hálózatok. Az elemzés 8 szignálút vonal hálózatot eredményezett, melyből 5 a lipid metabolizmussal kapcsolatos (7.a ábra), míg a másik 3, nagymértékben átfedő, a bőr immunrendszerhez kapcsolható regulátor hálózat (7.b ábra) volt. Ezek a hálózatok immunológiai folyamatokban jelennek meg és IL-17-hez köthető molekulákat tartalmaznak (CCL2, S100A8 és S100A9).

### I.1.3. További analízis és validációs stratégiák

A kétféle útvonal analízis, valamint korábbi, a munkacsoportunk által publikált [9] eredmények is rávilágítottak arra, hogy az SGR és SGP bőrterületek között jelentős különbségek érhetők tetten a veleszületett és adaptív immunválaszban, valamint a permeabilitási barrier kialakításában résztvevő molekulák kifejeződését illetően. Ezt megerősítendő egy másik módszer (QRT-PCR) segítségével, számos gént kiválasztva, „visszaellenőriztük” az expressziós mintázatokat (validálás) – egy megnövelt mintaszámot (SGP: n=10, SGR: n=10) felhasználva.

Az RNS szekvenálási adatainkat, valamint az irodalmi adatokat is figyelembe véve, a validálás során a bőr immunrendszer vizsgálni kívánt legfontosabb molekuláit 5 csoportba rendeztük:

1. AMP-k
2. Kemokinek
3. Barrier molekulák
4. Pro-inflammatorikus molekulák
5. T helper sejtekhez köthető molekulák

Mivel szerettük volna megtudni, hogy a 2 mRNS-alapú módszer (RNS szekvenálás és QRT-PCR) eredményei mutatnak-e hasonlóságot a kiválasztott gének expressziós szintjeinek változását és annak irányultságát illetően, ezért a QRT-PCR technikával detektált mRNS transzkript szinteket összehasonlítottuk az RNS szekvenálás által szolgáltatott adatokkal **(7. és 8. Táblázat)**.

Az összehasonlító elemzés során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált gének nagy részének kifejeződése, valamint azok változásának irányultsága hasonló volt a két módszerrel történő meghatározás esetében. Néhány esetben emellett szignifikáns különbséget tudtunk detektálni a megnövelt mintaszámon elvégzett QRT-PCR mérésekkel annak ellenére, hogy bizonyos gének expressziója (S100A7, DEFB4B, LCN2, CCL20, CCL24, IL-1B és KRT17) nem mutatott szignifikáns eltéréseket az RNS szekvenálási adatainkban **(7. és 8. Táblázat)**. Ez nem volt számunkra meglepő, hiszen a két különböző módszer egymást jól kiegészítő voltáról több publikáció is beszámolt korábban; kimutatták, hogy a QRT-PCR olyan esetben is képes volt szignifikáns génexpresszióbeli különbségeket detektálni, ahol a RNS szekvenálás csak tendenciát jelzett [99]. Végezetül, hogy további bizonyítékokat szolgáltatassunk a két bőrrégió kifejeződésbeli eltéréseiről, bizonyos molekulákat IHC módszerrel fehérjeszinten is megvizsgáltunk, egy képalkotó elemzéssel összekötve.

**7. táblázat** A veleszületett immunválaszban (AMP-k, kemokinek, pro-inflammatorikus citokinek), valamint a barrier kialakításában kitüntetett szerepet játszó molekulák génexpressziós adatainak összefoglaló táblázata

AMP-k	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
S100A7	<b>0.002</b>	40.36	0.076	3.14
S100A8	<b>0.028</b>	14.99	<b>0.017</b>	4.28
S100A9	<b>0.021</b>	17.49	<b>0.024</b>	3.50
DEFB4B (hBD-2)	<b>0.0002</b>	SGP-ben detekciós küszöb alatt	0.154	2.26
LCN2	<b>0.0003</b>	12.12	0.074	4.02
CAMP	0.329	1.83	0.384	1.41
Kemokinek	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
CCL2	<b>0.032</b>	1.78	<b>0.0001</b>	2.13
CCL3	<b>0.037</b>	3.58	<b>0.030</b>	2.64
CCL19	<b>0.005</b>	3.31	<b>0.026</b>	2.96
CCL20	<b>0.047</b>	3.44	0.116	2.77
CCL23	<b>0.013</b>	4.34	<b>0.044</b>	23.4
CCL24	<b>0.038</b>	3.68	0.073	2.32
Pro-inflammatorikus molekulák	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
TLR2	0.150	3.35	0.209	1.36
TLR3	0.468	1.17	<b>0.027</b>	-1.74
TLR4	0.267	2.29	0.929	-1.04
NLRP3	0.291	1.18	0.389	1.54
IL-1A	0.127	2.35	0.515	1.49
IL-1B	<b>0.003</b>	3.10	0.288	1.80
IL-6	0.120	3.10	0.192	-1.77
IL-8	0.414	2.87	0.429	-1.14
IL-33	0.110	1.36	0.720	1.24
TNFA	0.267	1.87	0.147	2.02
Barrier gének	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
LOR	0.434	-5.53	0.101	-2.30
FLG	0.092	-3.98	0.409	-1.40
LCE1F	0.168	-1.29	0.051	-2.27
CLDN16	0.122	-1.46	0.054	-2.02
KRT17	<b>0.002</b>	4.36	0.103	2.59
KRT79	<b>0.027</b>	2.29	<b>0.005</b>	7.72

A Fold Change (FC) értékek (azaz az adott gén relatív kifejeződésének mértékét jelző szám) kiszámítása az SGR és SGP mintákban mért átlagolt relatív expressziós értékek hányadosával történt (SGR/SGP). A két bőrterület között a statisztikailag szignifikáns expressziós különbségeket jelző p értékeket félkövér betűtípussal emeltük ki.

**8. táblázat** A T helper sejtek specifikus funkcióihoz köthető molekulák génextpressziós adatainak összefoglaló táblázata

T <sub>h</sub> 1 markerek	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
IL-12B	detekciós küszöb alatt		1.000	1
TBX21*	0.434	1.11	0.124	1.81
IFNG*	detekciós küszöb alatt		0.937	-1.02
TNFA	0.267	1.87	0.147	2.02
T <sub>h</sub> 2 markerek	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
IL-13*	detekciós küszöb alatt		0.272	-1.45
GATA3*	0.327	1.10	0.399	-1.44
T <sub>h</sub> 22 markerek	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
AHR	<b>0.006</b>	3.48	0.738	1.16
IL-22	detekciós küszöb alatt		0.292	1.13
T <sub>h</sub> 17 markerek	QRT-PCR		RNS szekvenálás	
	p-érték	SGR/SGP (FC)	p-érték	SGR/SGP (FC)
IL-1B	<b>0.003</b>	3.10	0.288	1.80
IL-6	0.120	3.10	0.192	-1.77
IL-23A	<b>0.002</b>	SGP-ben detekciós küszöb alatt	0.979	1.01
TGFB1	0.432	-1.21	1.000	1
RORC*	0.300	1.37	0.450	-1.15
IL-10*	0.079	3.26	0.336	1.32
IL-17A*	<b>0.0003</b>	SGP-ben detekciós küszöb alatt	1.000	1
CCL20	<b>0.047</b>	3.44	0.116	2.77

Az FC értékek (azaz az adott gén relatív kifejeződésének mértékét jelző szám) kiszámítása az SGR és SGP mintákban mért átlagolt relatív expressziós értékek hányadosásával történt (SGR/SGP). A két bőrterület között a statisztikailag szignifikáns expressziós különbségeket jelző p értékeket félkövér betűtípussal emeltük ki. Korábbi tanulmányunkban [9] már publikált molekulákat \*-gal jelöltük.

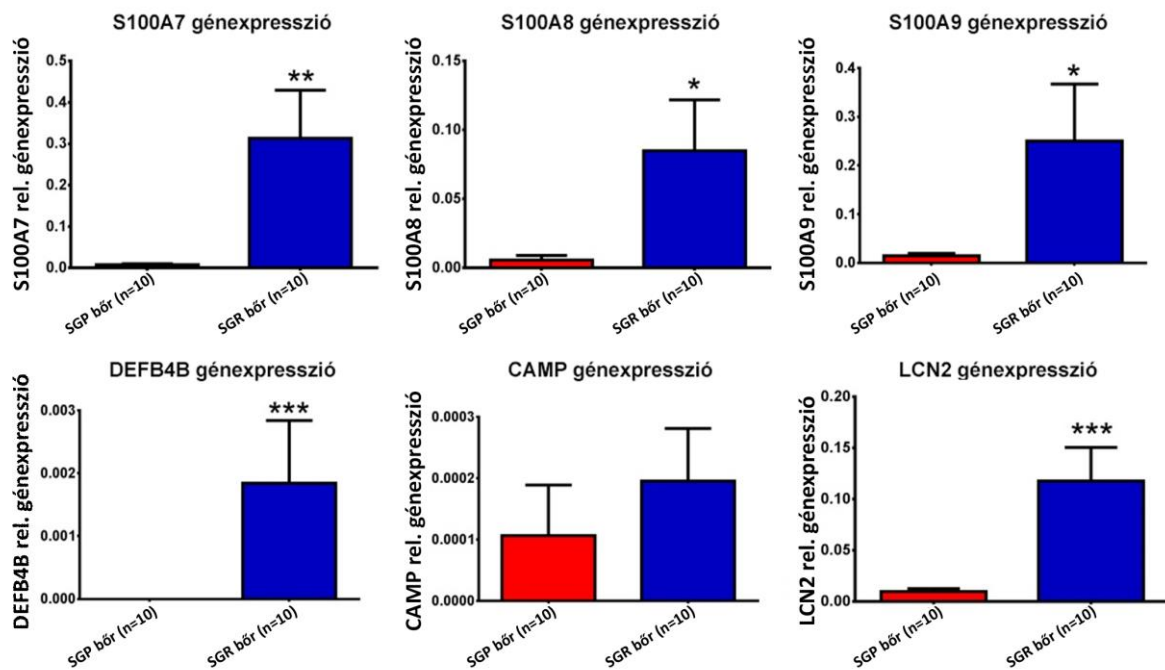
## I.2. Jelentős különbségek azonosíthatók az SGR és SGP bőrterületek veleszületett immunválaszai között

### I.2.1. Az AMP-k expressziója szignifikánsan magasabb az SGR bőrben

Elsőként az antibakteriális hatású és alarmin molekulaként funkcionáló AMP-k expresszióját vizsgáltuk. QRT-PCR módszerrel az S100A7 (psoriasin), S100A8, S100A9, humán  $\beta$ -defenzin-2 [hBD-2 (DEFB4B)] és lipocalin (LCN2) gének expressziója magas és szignifikánsan emelkedettnek adódott az SGR bőrben,

miközben ezen molekulák gyenge kifejeződést mutattak az SGP szövetben. Az RNS szekvenálást alkalmazva az összes AMP szintje emelkedett volt az SGR bőrben, viszont szignifikáns különbséget csak az S100A8 és S100A9 esetében mértünk. A CAMP expressziója nagyon alacsony volt mindkét bőrterület mintáit tekintve, bár egy enyhén emelkedett tendencia mutatkozott az SGR bőrben (**7. táblázat és 8. ábra**).

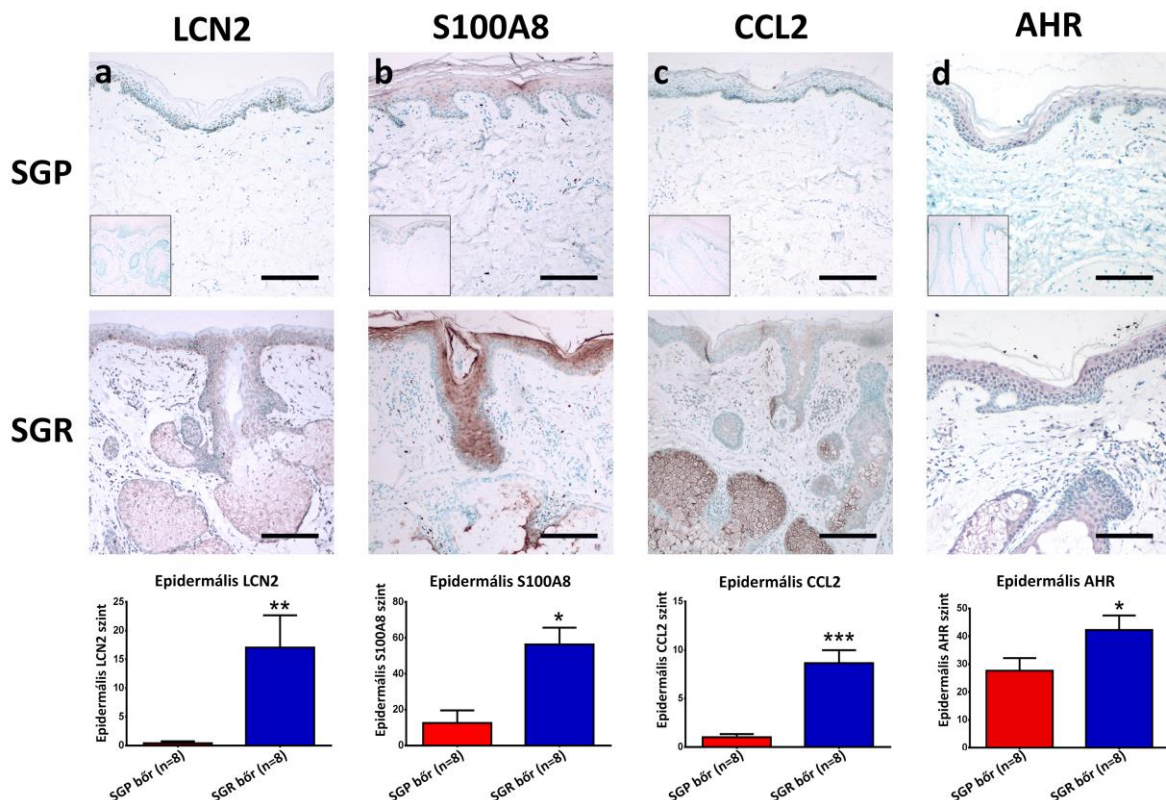
## Antimikrobiális peptidek



**8. ábra** Az AMP-k expressziós szintjének meghatározása az SGP és SGR bőrmintákban QRT-PCR módszerrel

Az oszlopok az adott bőrterülethez tartozó minták relatív mRNS expresszióinak átlagát mutatják átlag±SEM formátumban (\*p <0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001, Mann-Whitney U-tesztel meghatározva).

Az S100A8 és LCN2 molekulákat fehérjeszinten is vizsgáltuk; kimutattuk, hogy mindkét AMP szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen az SGR bőrterületen (**9.a és b ábra**). Az LCN2-t nem tudtuk detektálni az SGP bőrmintákban, de az SGR bőrben az epidermisz apikális sejtrétege és a szebociták enyhe, míg a folliculáris KC-k erős festődést mutattak. Az S100A8 immunfestés is jelentős különbségeket eredményezett; az SGP bőrterületen ezen fehérje alacsony szintű kifejeződését detektáltuk, míg az SGR bőr esetén az epidermális KC-k felső sejsorai, a folliculáris KC-k és a szebociták mutattak erős immunreaktivitást.



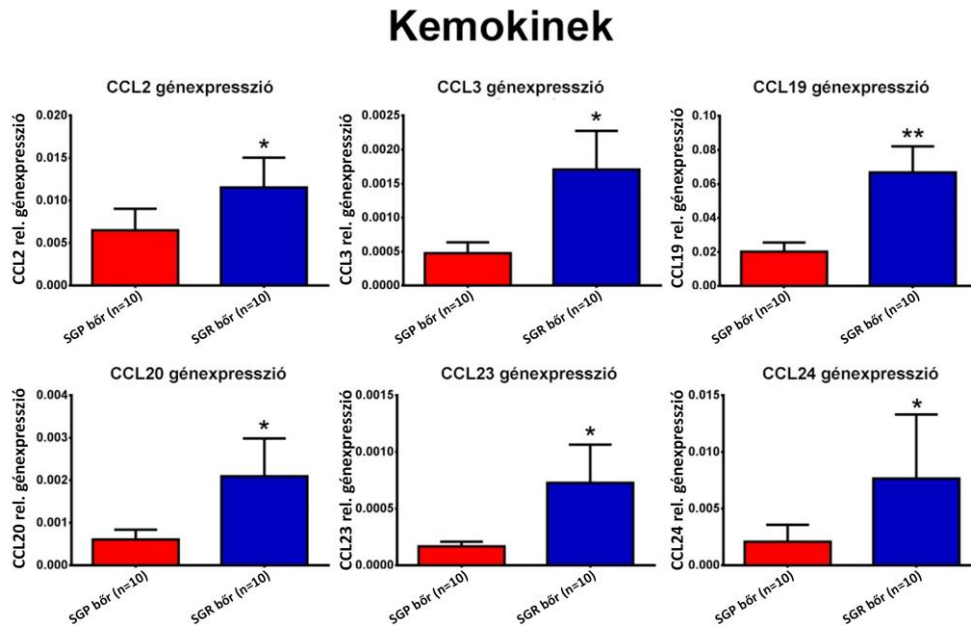
**9. ábra** A veleszületett immunrendszer molekuláinak fehérjeszintű expressziójának meghatározása jelentős különbségeket mutat az SGR és SGP bőrrégiókban

Az ábrán található az (a) LCN2, (b) S100A8, (c) CCL2 és (d) AHR fehérjék IHC technikával történő kimutatása és az epidermális fehérjeszintek mennyiségi meghatározása az SGP és SGR bőrmintákból készült szövettani metszeteken. A negatív kontroll festések képei az SGP minták bal alsó sarkában vannak bemutatva. A képek jobb alsó sarkában található méret skála 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl. Az oszlopok az adott bőrterülethez tartozó minták fehérje expressziójának átlagát mutatják  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$  formátumban (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , Mann-Whitney U-tesztel meghatározva).

### I.2.2. A kemokinek expressziója szignifikánsan nagyobb az SGR bőrben

Ezt követően az immunsejtek (KC-k, DC-k, Mf-ok) által termelt bizonyos kemokinek kifejeződését határoztuk meg. QRT-PCR módszerrel a CCL2, CCL19 és CCL20 molekulák expressziója jól detektálható, míg a CCL3, a CCL23 és a CCL24 szintje nagyon alacsony volt az SGP bőrben. Fontos eredményünk volt, hogy, ezt a módszert alkalmazva, az összes vizsgált kemokin szintjét szignifikánsan nagyobb mennyiség mértük az SGR bőrterületen (**10. ábra**). Ehhez hasonlóan ezen kemokinek jelentős – és a CCL2, CCL3, CCL19 és a CCL23 esetében statisztikailag szignifikánsan magasabb – expresszióját tudtuk igazolni az RNS szekvenálási vizsgálattal is SGR bőrben (**7. táblázat**). A CCL2 és CCL20 molekulákat fehérjeszinten is vizsgáltuk IHC-val. Az SGR bőrterületen a CCL2 nagy mennyiségben fejeződött ki a faggyúmirigyekben; megállapítottuk emellett, hogy habár az epidermális CCL2

pozitivitás mindkét bőrrégióban nagyon gyenge volt, a képkötő elemzést elvégezve szignifikánsan nagyobb expressziót mértünk az SGR bőrben (**9.c ábra**). A CCL20-at fehérjeszinten nem tudtuk detektálni sem a KC-kban, sem a szebocitákban egyik bőrrégió esetén sem.



**10. ábra** A kemokinek expressziós szintjének meghatározása az SGP és SGR bőrmintákban QRT-PCR módszerrel

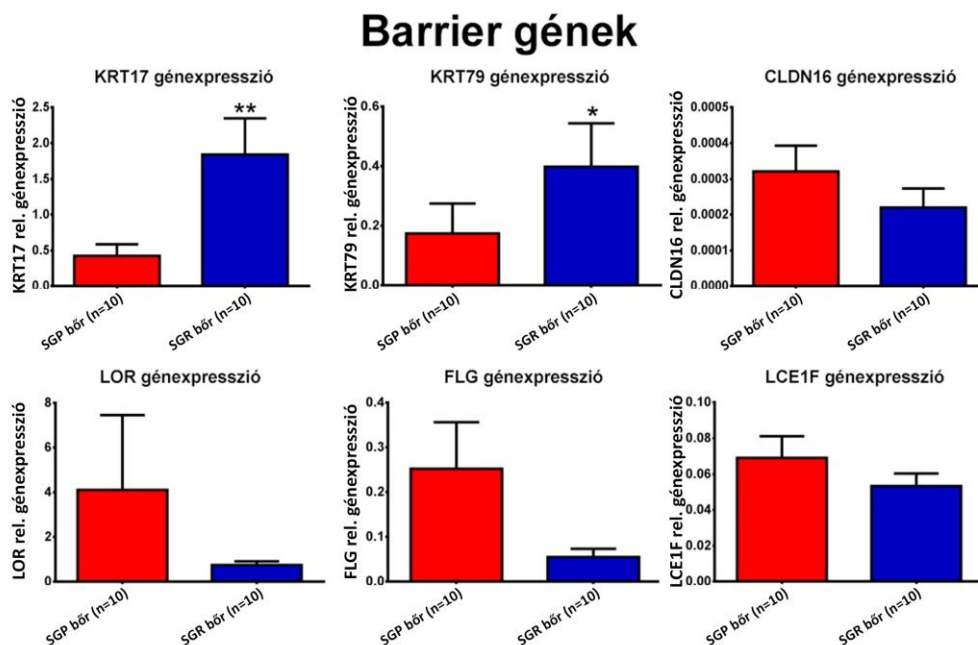
Az oszlopok az adott bőrrégióhoz tartozó minták relatív mRNS expresszióinak átlagát mutatják átlag±SEM formátumban (\*p <0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001, Mann-Whitney U-tesztel meghatározva).

### I.2.3. A veleszületett immunrendszer receptor és pro-inflammatorikus citokin expressziós mintázatában nem mutatkozik jelentős különbség az SGR és SGP bőrrégiók között

Mivel irodalmi adatok szerint a bőr mikrobióta jellegzetes és markáns regionális különbségeket mutat [5, 6, 100], ezért megvizsgáltuk a KC-k jól ismert molekuláris szenzorainak – nevezetesen a TLR2, TLR3, TLR4 és NLRP3 – kifejeződését is. Az RNS szekvenálás a vizsgált receptorok esetén hasonló génexpressziós szinteket azonosított a két mintacsoportban. Az egyetlen kivétel a TLR3 volt, amely szignifikánsan emelkedett expressziót mutatott az SGR bőrben. QRT-PCR mérések is hasonló adatokat szolgáltatottak; azaz a fent említett receptorok expressziójában nem volt szignifikáns különbség a 2 bőrrégió között (**7. táblázat**).

A következő lépésben a pro-inflammatorikus citokinek, nevezetesen az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-33 és TNF- $\alpha$  mRNS szintjét vizsgáltuk. A szekvenálási adatok szerint

hasonló mértékű génkifejeződéssel volt jellemezhető a két bőrrégió. Ehhez hasonlóan a QRT-PCR módszerrel sem mutatott ki szignifikáns különbségeket ezen molekulák mRNS szintjében az IL-1 $\beta$  kivételével, ami szignifikánsan nagyobb expressziót mutatott az SGR mintákban (**7. táblázat**).



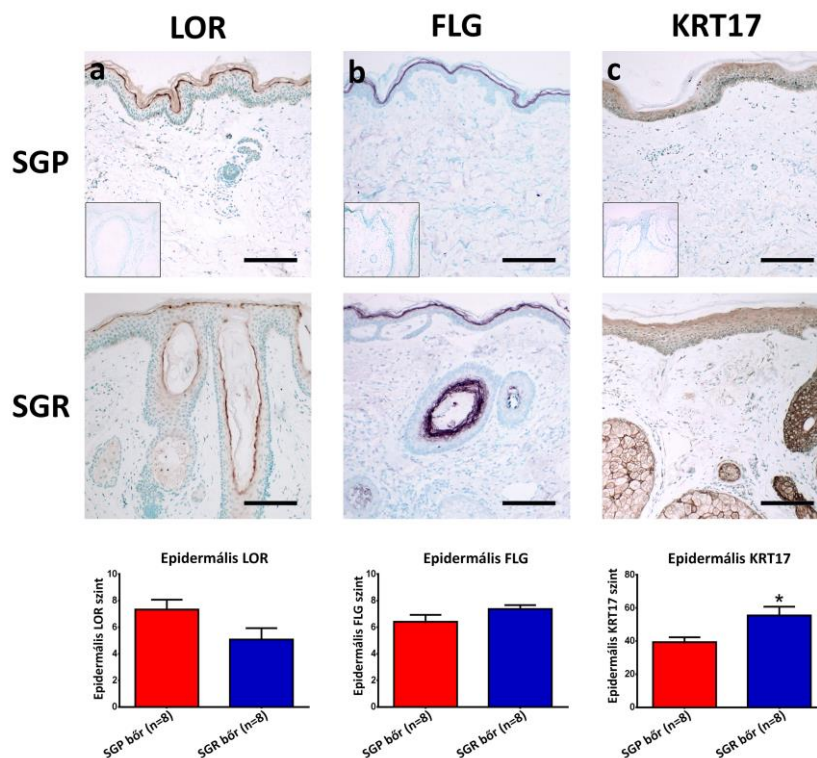
**11. ábra** A barrier molekulák expressziós szintjének meghatározása az SGP és SGR bőrmintákban QRT-PCR módszerrel

Az oszlopok az adott bőrterülethez tartozó minták relatív mRNS expresszióinak átlagát mutatják átlag $\pm$ SEM formátumban (\*p <0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001, Mann-Whitney U-tesztel meghatározva).

### I.3. A barrier molekulák kifejeződése különbözik az SGR és SGP bőrben

Azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy az epidermális barrier kialakításában és fenntartásában kulcsfontosságú szerepet betöltő molekulák kifejeződése különbözik-e a két bőrterület között. QRT-PCR-rel a LOR, a late cornified envelope 1F (LCE1F), a CLDN16 és a FLG csökkent expressziót mutatott, míg a keratin KRT17 és a KRT79 magasabb szintjét mértük az SGR bőrben; az utóbbi 2 molekula esetében a különbség statisztikailag szignifikáns volt a két bőrterület között. Hangsúlyozandó, hogy az eltérő mintázatokat az RNS szekvenálási adatok is megerősítették (**7. táblázat és 11. ábra**). A KRT17-et, a LOR-t és a FLG-t fehérjeszinten is vizsgáltuk IHC-val. A FLG és a LOR esetén nem tudtunk szignifikáns különbségeket azonosítani a két mintacsoport között, habár a LOR expressziója tendenciózusan csökkent volt az SGR bőrterületen. Mindkét fehérje egyenletes és erős pozitívítását tudtuk detektálni az epidermisz granulás rétegeiben és a SC alatt. A szőrtüszők KC-i szintén mutattak FLG és LOR

immunpozitivitást az SGR bőrben (**12.a és b ábra**). A KRT17 szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen az SGR bőrben az SGP-hez viszonyítva. Az SGP mintákban az epidermisz felső sejtjeiben, míg az SGR bőrmintákban a felső sejtjeiben erősebb pozitivitással, de az egész epidermiszben detektáltuk a KRT17-specifikus immunreaktivitást. Érdekes módon a follikuláris KC-kban találtuk a legerősebb kifejeződést, habár a szebociták is jelentős pozitivitást mutattak (**10.c ábra**).



**12. ábra** A barrier molekulák fehérjeszintű expressziójának meghatározása jelentős különbségeket mutat az SGR és SGP bőrrégiókban

Az ábrán található az (a) LOR, (b) FLG és a (c) KRT17 fehérjék IHC technikával történő kimutatása és az epidermális fehérjeszintek mennyiségi meghatározása az SGP és SGR bőrmintákból készült szövettani metszeteken. A negatív kontroll festések képei az SGP minták bal alsó sarkában vannak bemutatva. A képek jobb alsó sarkában található méret skála 100  $\mu$ m-t jelöl. Az oszlopok az adott bőrterülethez tartozó minták fehérje expressziójának átlagát mutatják átlag $\pm$ SEM formátumban (\*p <0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001, Mann-Whitney U-teszttel meghatározva).

#### I.4. Az SGR bőrterület T<sub>h</sub>17/IL-17 dominanciával jellemezhető

##### I.4.1. A T<sub>h</sub>1, T<sub>h</sub>2 és T<sub>h</sub>22 sejtekhez köthető molekulák expressziója igen alacsony mindkét bőrrégióban

Következő lépésként az egyes T sejt alpopulációk érési és jelátviteli citokinjeinek, valamint TF-ainak kifejeződését hasonlítottuk össze az SGR és SGP bőrmintákban. A T<sub>h</sub>1 (IL-12B, TBX21, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), a T<sub>h</sub>2 (IL-13, GATA3) és a T<sub>h</sub>22 (AHR, IL-22) sejtekre jellemző molekulák génexpressziós szintjében nem volt különbség a 2

bőrrégióban. QRT-PCR-rel az IL-12B és az IL-22 egyik bőrterületről származó minták esetében sem volt detektálható, miközben az AHR expressziója szignifikánsan nagyobb volt az SGR bőrben (**8. táblázat**). A TBX21, az IFN- $\gamma$ , az IL-13 és a GATA3 QRT-PCR-rel történő kimutatását már az előző tanulmányunkban elvégeztük [9]; ezeket az adatokat a **8. táblázatban** \*-gal jelöltük). Ezek után IHC-t alkalmaztunk annak érdekében, hogy kiderítsük, mi lehetett a felelős az AHR kifejeződésében mért eltéréseiért a 2 bőrterület között. Az immunfestéssel szignifikánsan nagyobb mennyiségű AHR fehérjét tudtunk kimutatni az SGR mintákban; az AHR-t főként a KC-k expresszálták (azok sejtmagjai festődtek), de citoplazmatikus festődést is detektáltunk az epidermiszben. Emellett az dermisz néhány sejtje is mutatott AHR-specifikus immunpozitivitást (**9.d ábra**).

#### **I.4.2. A $T_{h17}$ sejtek specifikus funkciót jelző molekulák nagyobb expressziót mutattak az SGR bőrben**

Habár az RNS szekvenálási adatok önmagukban nem tártak fel szignifikáns különbségeket a  $T_{h17}$  sejtek specifikus funkcióihoz köthető molekulák [IL-1 $\beta$ , IL-6, RORC, IL-23A, IL-17A, CCL20 és Transforming Growth Factor béta (TGF- $\beta$ )] kifejeződésében, a fentebb bemutatott mélyreható bioinformatikai analízisek (IPA) statisztikailag szignifikáns mértékben „feldúsult” biológiai mechanizmusként azonosították a  $T_{h17}$  útvonalat (**6.b ábra**). Ezért a  $T_{h17}$  sejtekhez köthető molekulák kifejeződését tovább vizsgáltuk QRT-PCR-rel. Korábbi eredményeinkkel [9] tökéletes összhangban az IL-17A szignifikánsan nagyobb expresszióját detektáltuk az SGR bőrben (az expressziós különbség a RORC és az IL-10 esetében nem volt szignifikáns). Emellett megállapítottuk, hogy az IL-1 $\beta$ , IL-23A és CCL20 specifikus mRNS-ek szintjei ugyancsak jelentősen és szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) megemelkedtek az SGR bőrterületeken az SGP-hez képest (az IL-6 esetében csak tendenciaszerűen magasabb expressziót tudtunk kimutatni) (**8. táblázat**).

#### **I.5. A fókuszált bioinformatikai útvonal analízis az IL-17 útvonal központi szerepét erősíti az SGR bőrben**

Végső lépésként a jelen és előző munkánk [9] során azonosított, szignifikánsan eltérő gén (RNS szekvenálás, QRT-PCR) és fehérje (IHC) szintű kifejeződést mutató, az immunrendszerhez kapcsolódó molekulák további mélyreható bioinformatikai útvonal analízisét végeztük el. Az elemzésbe az alábbi molekulákat vontuk be: AHR, CCL2,



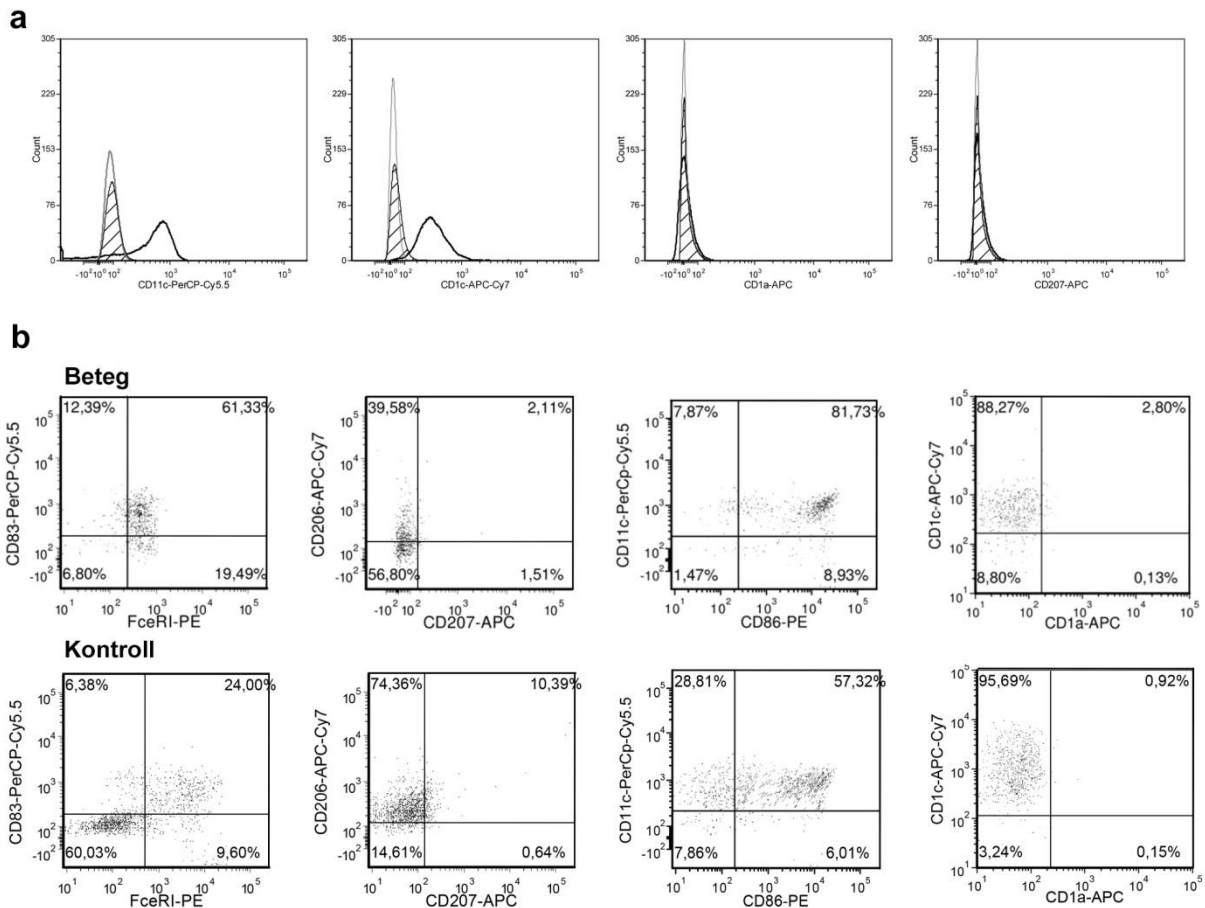
melyeket szintén sikerült a szignifikánsan „feldúsult” útvonalak között azonosítani (citokin aktivitás, citokin-citokin receptor aktivitás, külső stimulusra adott válasz pozitív regulációja, leukocita kemotaxis, stb.) **(13. ábra)**.

Ezek az adatok együttesen azt sugallják, hogy az emberi szervezet elsődleges védelmi vonalát képező bőr immunrendszer aktivitásában jellegzetes különbségek azonosíthatók az SGR és SGP régiók között.

## II. AD-ben szenvedő betegeket periériás véréből izolált dendritikus sejtek fenotípusos és funkcionális jellemzése

### II.1. Az AD-s betegek véréből izolált pre-DC-k szignifikánsan több FcεRI-et fejeznek ki, valamint érési markereik tendenciózus változást mutatnak

Kísérleteink során 12 súlyos krónikus AD-ben szenvedő beteg és 10 egészséges kontroll periériás vérmintáját használtuk fel. A PBMC-k kinyerését követően CD1c<sup>+</sup> DC-eket szeparáltunk, majd ezeken hajtottuk végre a kísérleteket.



14. ábra A vér DC-k FACS analízise

**a. Az AD-s betegektől származó CD1c<sup>+</sup> vér DC-k sejtfelszíni markereinek ex vivo vizsgálata.** A mintákat fekete, a negatív kontrollokat szürke, míg az izotípus kontrollokat sávozott hisztogramok mutatják. A betegek és a kontrollok eredményeit 1-1 reprezentatív ábrával szemléltetjük. A vizsgált sejtek többsége CD1c és CD11c markerekre pozitív, míg CD1a és CD207 markerekre negatív volt.

**b. Az AD-s betegektől és az egészséges kontrolloktól származó CD1c<sup>+</sup> DC-k felszínén megjelenő különböző sejtfelszíni markerek expressziója.** Az AD-s betegek DC-i szignifikánsan több FcεRI-et, és kevesebb CD206-ot képesek expresszálni, mint az egészséges kontroll DC-k.

A vérből izolált CD1c<sup>+</sup> pre-DC-k fenotípusának meghatározásához, valamint a FACS elemzés során detektált nem-releváns események kiküszöböléséhez a CD1c<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> pre-DC-k szoftveres kikapuzását végeztük el. A kikapuzott sejtek több mint 90%-a

pozitivitást mutatott mind CD1c, mind CD11c markerekre; ezek a sejtek ugyanakkor nem expresszáltak sem CD207-et (Langerin, LC marker), sem CD1a-t (**14.a ábra**).

**9. táblázat** Az AD-s és kontroll pre-DC-k sejtfelszíni markereinek expressziója ex vivo és AD-specifikus stimulálást követően

Sejtfelszíni markerek	AD pre-DC-k (stimulálatlan)	Egészséges pre-DC-k (stimulálatlan)	p-érték	AD pre-DC-k (stimulált)	Egészséges pre-DC-k (stimulált)	p-érték
CD1c <sup>+</sup> (%)	>90	>90	-	>90	>90	-
CD11c <sup>+</sup> (%)	>90	>90	-	>90	>90	-
CD1a <sup>+</sup> (%)	<10	<10	-	<10	<10	-
CD207 <sup>+</sup> (%)	<10	<10	-	<10	<10	-
FcεRI <sup>+</sup> (%)	58.70 [46.22; 71.18]	29.76 [20.59; 38.93]	<b>0.004</b>	60.21 [45.24; 75.19]	29.95 [8.80; 51.10]	<b>0.044</b>
CD206 <sup>+</sup> (%)	48.61 [37.42; 59.80]	64.76 [50.45; 79.06]	0.536	38.48 [25.55; 51.40]	54.42 [44.27; 64.57]	0.116
CD86 <sup>+</sup> (%)	83.44 [75.83; 91.05]	74.53 [67.10; 81.95]	0.12	90.64 [85.54; 95.74]	84.05 [74.25; 93.85]	0.22
CD83 <sup>+</sup> (%)	63.04 [54.72; 71.36]	57.95 [48.21; 71.69]	0.96	68.67 [53.24; 84.09]	50.15 [30.46; 69.84]	0.18

Az AD-s betegek véréből szeparált CD1c<sup>+</sup> és CD11c<sup>+</sup> DC-k szignifikánsan több FcεRI-et expresszáltak, mint az egészséges kontrollokból származó sejtek. A CD206 mannóz receptor, melyről azt gondolják, hogy a kevésbé érett sejteken fejeződik ki, ritkábban fordult elő, míg a CD83 és CD86 (érési és aktivációs markerek) molekulák konzekvensen gyakrabban jelentek meg az AD-s páciensektől származó sejteken, mint az egészséges kontroll sejteken (bár ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns). A különbségek a stimulálást követően sem tudták elérni a szignifikancia szintet, de az említett tendencia megfigyelhető volt. A sejtfelszíni markereket expresszáló sejtek százalékos értékeit átlag±95% konfidencia intervallum formátumban adtuk meg. A statisztikailag szignifikáns expressziós különbségek p értékeiket félkövér betűtípussal jelöltük.

Az FcεRI jelenlétének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a receptor expressziója szignifikánsan nagyobb volt az AD-s pre-DC-k felszínén, mint egészséges pre-DC-ken (**9. táblázat és 14.b ábra**); megállapítottuk továbbá, hogy a különbség szintén szignifikáns a SEB/TSLP kombinációval stimulált sejtek esetén is (**9. táblázat**). A DC-k aktivációs és érési állapotát jelző sejtfelszíni markerek vizsgálata azt mutatta, hogy ezeknek a molekuláknak a megjelenése is változott az AD-s betegekből származó DC-ken. A CD206 mannóz receptor, ami az irodalmi adatok alapján éretlen sejteken nagyobb számban expresszálódik, ritkábban jelent meg a stimulált vagy simulálatlan AD-s pre-DC-k felszínén, mint az egészséges sejteken (**9. táblázat**). A CD83 és CD86 markerek egy ellentétes expressziós mintázatot mutattak, mivel az AD-s betegekből

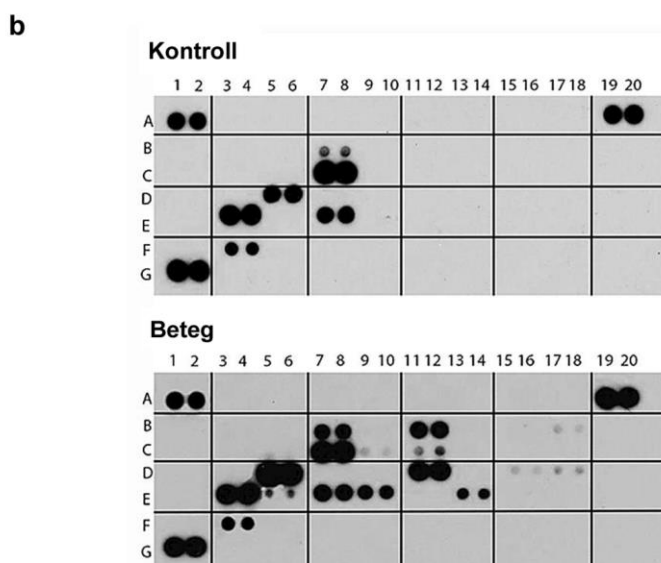
származó (akár stimulált, akár stimulálatlan) sejteken gyakrabban fejeződtek ki, mint a kontroll sejteken (**9. táblázat és 14.b ábra**). Habár az AD-s DC-ken a 3 vizsgált sejt felszíni marker egyike sem mutatott szignifikánsan megváltozott expressziót, a változás minden esetben következetes és egy irányba mutató volt; ez a jelenség arra utal, hogy az AD-s pre-DC-k korai érési stádiumban vannak.

## II.2. Az AD-s betegek vér pre-DC-i AD-specifikus és érettségi állapottal összefüggésbe hozható kemokinek termelésére képesek

### II.2.1. A kemokin termelés meghatározása Proteome Profiler Chemokine Array segítségével

**a**

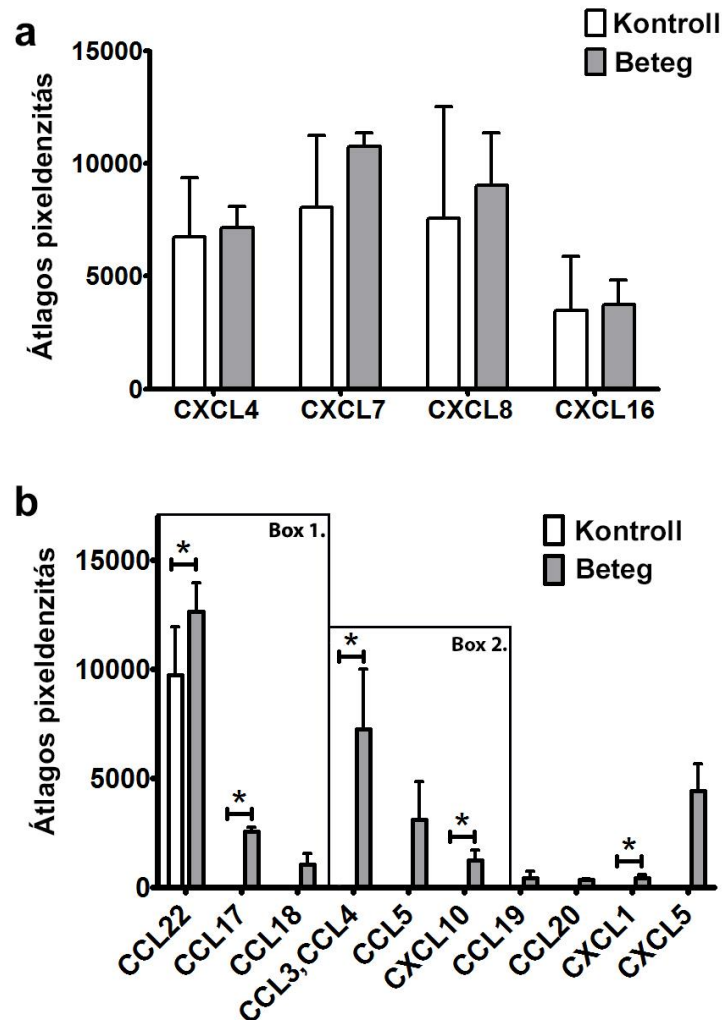
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Referencia pont																			Referencia pont
B			CCL21	MEC			CXCL16	TIG2			CXCL5	CCL26	CX3CL1	CXCL1						
C			CCL14	CCL1			CXCL8	LCF			CXCL10	CXCL11	XCL1	CCL2						
D			CCL7	CCL22			Midkine	CXCL9			CCL3, CCL4	CCL15	CCL20	CCL19						
E			CXCL7	CCL18			CXCL4	CCL5			CXCL12	CCL17	CXCL17							
F			Minta Kontroll	Minta Kontroll			Minta Kontroll	Negatív Kontroll												
G	Referencia pont																			Referencia pont



**15. ábra** Az AD-s betegektől és az egészséges kontrolloktól származó pre-DC-k által termelt kemokinek azonosítása Proteome Profiler Array segítségével

**a.** A membránhoz kötött kemokinpróbák elhelyezkedése (duplikátumokban). **b.** Az egészséges kontrolloktól és az AD-s betegektől származó pre-DC-k által termelt kemokinek bemutató reprezentatív dot blot-ok. Az AD-s betegekre és az egészséges kontrollokra jellemző kemokinek relatív fehérje expresszióinak mennyiségét az egyedi pontok kontroll mintára normalizált átlagos képpontsűrűségével határoztuk meg.

Az AD-s betegektől származó DC-k kemokintermelő képességének meghatározását Proteome Profiler Chemokine Array végeztük el (**15. ábra**), ami egyszerre képes mérni 31 különböző humán kemokin felszabadulását.



**16. ábra** A Proteome Profiler Array segítségével azonosított kemokinek

**a.** Az AD-s és egészséges kontroll pre-DC-k által termelt hasonló expressziós szinteken mozgó kemokinek. Az oszlopok 5 AD-s és 5 kontroll minta fehérje expresszióinak átlagát mutatják átlag±SD formátumban. **b.** A főként vagy kizárólagosan az AD-s pre-DC-k által termelt kemokinek. Az 1. dobozban (Box 1) az AD-specifikus, míg a 2. dobozban (Box 2) a DC-k éréseben szerepet játszó kemokinek találhatóak. Az oszlopok 5 AD-s és 5 kontroll minta fehérje expresszióinak átlagát mutatják átlag±SD formátumban (\* $p < 0.05$ ). Az AD-s betegekre és az egészséges kontrollokra jellemző kemokinek relatív fehérje expresszióinak mennyiségét az egyedi pontok kontroll mintára normalizált átlagos képpontsűrűségével határoztuk meg.

Ezen vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az AD-s DC-k által termelt kemokinek 2 csoportba rendeződnek (**16.a és b ábra**). Az első csoportba azok a kemokinek sorolhatók (CXCL4, CXCL7, CXCL8 és CXCL16), melyeket hasonló mennyiségben detektáltunk mind az AD-s betegek, mind pedig az egészséges kontroll DC-k

felülúszóiban **(16.a ábra)**. A második csoportot azon kemokinek alkotják (CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL5 és CXCL10), melyeket szignifikánsan nagyobb mennyiségben vagy kizárólagosan az AD-s pre-DC-k termeltek. A CCL5, CCL18, CCL19, CCL20 és CXCL5 esetében nem szignifikáns ( $p > 0.05$ ), míg a CCL3, CCL4, CCL17, CCL22, CXCL1 és CXCL10 esetén statisztikailag szignifikáns ( $p < 0.05$ ) különbséget tudtunk kimutatni **(16.b ábra)**. Kiemelendő, hogy a második csoport kemokinjei között 3 jól ismert, az AD pathogenezisében fontos szerepet játszó molekulát (CCL17, CCL18, CCL22) **(16.b ábra Box 1)**, valamint az érő/érett DC-kre jellemző markereket (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10) **(16.b ábra Box 2)** sikerült azonosítanunk.

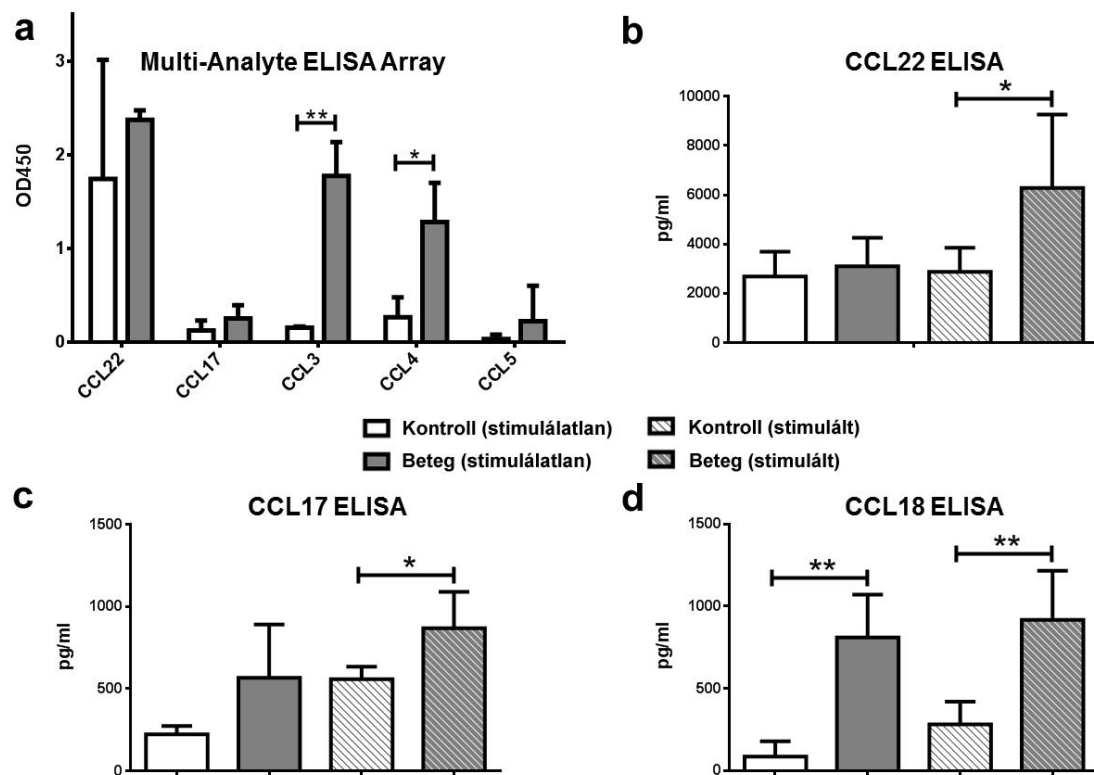
### **II.2.2. A fokozott kemokintermelés meghatározása két különböző ELISA technikával**

A második csoport legfontosabb kemokinjeinek (érésben lévő DC-kre jellemző kemokinek: CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10; AD markerek: CCL17, CCL22) termelődését a Multi-Analyte ELISArray módszer segítségével is meghatároztuk a stimulálatlan sejtek felülúszóiból **(17. ábra)**.

Hasonlóan a Proteome Profiler Chemokine Array-jel kapott eredményekhez, a CCL3-at és a CCL4-et szignifikánsan nagyobb mennyiségben tudtuk detektálni az AD-s pre-DC mintákban, mint az egészséges kontroll pre-DC-k felülúszóiban **(17.a ábra)**. Érdekes módon a CCL17, a CCL22 és a CCL5 esetében nem mutatkozott szignifikáns különbség a 2 mintacsoport között **(17.a ábra)**, ami a 2 technika eltérő érzékenységből, illetve a minták közötti szórásból adódhatott. A CXCL10-et az AD-s mintákban nagyon alacsony szinten, míg a kontroll sejtek felülúszóiban egyáltalán nem tudtuk kimutatni (ezen eredményeket nem ábráztuk).

Az AD immunpatológiájában fontos szerepet betöltő CCL17, CCL18 és CCL22 kemokinek mennyiségét egy még precízebb és megbízhatóbb technikával, a konvencionális szendvics ELISA módszerrel is meghatároztuk a stimulálatlan és stimulált pre-DC-k felülúszóiból. A stimulálatlan AD-s DC-kből nagyobb mennyiségű CCL17 és CCL22 szabadult fel, mint a kontroll sejtekből; kiemelendő, hogy az AD-specifikus stimulálást követően a különbség statisztikailag is szignifikáns lett a 2 mintacsoport között **(17.b és c ábra)**. Megállapítottuk továbbá, hogy a CCL18 termelés

mennyisége szignifikánsan nagyobb mind a stimulálatlan, mind a stimulált AD-s DC-k felülúszóiban az egészséges kontroll sejtekéhez képest (17.d ábra).



**17. ábra** Az AD-specifikus és éréshez köthető kemokinek meghatározása ELISA technikával

**a.** Kemokinek detektálása Multi-Analyte ELISArray segítségével 5 AD-s és 5 kontroll pre-DC felülúszóból. Hasonlóan a Proteome Profiler Array által kimutatott eredményekhez, az AD-s pre-DC-k szignifikánsan nagyobb mennyiségű CCL3-at és CCL4-et termelnek, mint a kontroll pre-DC-k. A CCL5, CCL17 és CCL22 esetében ezzel a technikával nem sikerült statisztikailag szignifikáns különbségeket detektálnunk a 2 mintacsoport között. **b-d.** Az AD-specifikus kemokinek mennyiségének meghatározása (vizsgálata) konvencionális ELISA-val. Az AD-s pre-DC-k a szövetspecifikus stimulálást követően szignifikánsan több CCL17 és CCL22 termelésére képesek, míg CCL18 felszabadításra stimulálást követően és anélkül is képesek. Az oszlopok 5 AD-s és 5 kontroll minta fehérje expresszióinak átlagát mutatják átlag±SD formátumban (\*p < 0.05).

Mindezen adatok arra utalnak, hogy AD-betegek perifériás véréből izolált CD1c<sup>+</sup> DC-ek a korai érés jezeit hordozzák, valamint fokozódik bennük számos, részben a betegségre jellemző kemokin termelése és felszabadulása.

## Megbeszélés

### **Immuntopográfiai különbségek az emberi bőrben**

Vizsgálataink első részében az egészséges SGR és SGP bőrterületek veleszületett és adaptív immunműködését, valamint barrier funkciójának átfogó és összehasonlító elemzését végeztük el, mivel a korábbi adatok megkérdőjelezték a bőr immunrendszer egységes természetét. Figyelembe véve azt a tényt, hogy 2 egészséges bőrrégiót vizsgáltunk, meglepetéssel tapasztaltuk, hogy az RNS szekvenálás eredményeként relatíve sok olyan gént tudtunk azonosítani, melyek szignifikánsan eltérő mértékben fejeződtek ki az SGR és SGP mintákban. Kiemelkedő eredmény volt továbbá, hogy az IPA Kanonikus Útvonal Analízis rávilágított az IL-17 szignálút vonal fontosságára is az SGR bőrterületen. Ezek az eredmények arra sarkalltak minket, hogy részletesen tanulmányozzuk az IL-17 által befolyásolt veleszületett immun- és barrier milliót az említett 2 egészséges bőrrégióban és ennek során 5 különböző (a bőrfunkciókban fontos szerepet játszó) molekulacsoport tulajdonságait és markereit elemeztük. Habár közölt adataink többnyire transzkriptomikai vizsgálatok és csak kisebb mértékben immunfestések eredményei (ezért megkövetelik és indokolják további proteomikai és funkcionális vizsgálatok lefolytatását), megállapítható, hogy az emberi bőr SGR és SGP régiói között markáns immuntopográfiai és barrier különbségeket találtunk.

Az AMP-k expressziójának tanulmányozása során az SGR és SGP bőrminták között figyelemre méltó különbségeket azonosítottunk. Az AMP-k a veleszületett immunrendszer jelentős effektor mediátorai, melyek antimikrobiális aktivitásukon túlmenően számos egyéb feladatot látnak el. Szerepet játszanak az angiogenezis szabályozásában, a sebgyógyulásban, a sejtek proliferációs és differenciálódási folyamataiban, továbbá immunmoduláns hatással is rendelkeznek, például citokin- és kemokintermelést stimulálnak [20, 101-103]. Korábbi publikációk arról számoltak be, hogy a hBD-1, hBD-2, hBD-3 és a humán CAMP az egészséges bőr differenciált epidermális rétegeiben alacsony szinten detektálható [104, 105], miközben az RNáz7 fehérjét az egészséges KC-k nagy mennyiségben expresszálják [106]. Azt is megfigyelték, hogy az S100A7 a normál bőr egyik legfontosabb AMP-je [107]. Azonban meg kell jegyezni, hogy ezekben a kutatásokban nem határozták meg az egészséges bőrminták eredetét [108-113]. Mindeztáig egyetlen kutatócsoport vizsgálta néhány AMP (S100A7, hBD-3 és RNáz7) regionális jelenlétét a különböző

egészséges bőrterületeken. Ők IHC vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy ezek a fehérjék nagyobb mennyiségben expresszálódnak a homlokon (jellegzetesen SGR régió), mint a lábszáron (jellegzetesen SGP régió) [114]. Ezek az adatok nagyfokú egyezést mutatnak a mi jelenlegi eredményeinkkel. Más kutatócsoportok az S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2, CAMP és LCN2 molekulákat gén- és fehérjeszinten sem tudták detektálni, vagy jelenlétüket az egészséges bőrben egyáltalán nem (is) vizsgálták [110, 112]. Jelenlegi munkánk során sikerült detektálni ezen AMP-k (S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2, CAMP és LCN2) alacsony szintű génkifejeződését az SGP bőrben is, ugyanakkor a CAMP kivételével az összes AMP expressziója szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrterületen. Továbbá, az S100A8 és LCN2 fehérjéket IHC-val mindkét régióban ki tudtuk mutatni; ezek a fehérjék az SGR bőrmintákban szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen.

A vizsgált kemokinekről, melyeket főként a veleszületett immunsejtek termelnek, meglepően kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre az egészséges bőrt illetően [89, 115-117]. Saját eredményeink azt mutatták, hogy a CCL3, CCL23 és CCL24 alig volt mérhető az SGP mintákban, miközben a CCL2, CCL19 és CCL20 molekulák mRNS expressziója magas szinten detektálható ugyanitt. Ezzel szemben az összes vizsgált kemokin nagy mennyiségben expresszálódott az SGR mintákban, és expressziójuk szignifikánsan emelkedettebb volt az SGP mintákhoz viszonyítva. Korábban Nakayama és mtsai [118] anélkül, hogy megnevezték volna a vizsgált régiót, az egészséges bőrben alacsony CCL20 fehérje expressziót tudtak kimutatni immunfestéssel, miközben Nagao és mtsai [119] a CCL2 és CCL20 fehérjéket nem tudták detektálni immunfluoreszcens festéssel [118, 119]. Mi azt találtuk, hogy a faggyúmirigyek mutattak CCL2 festődést SGR bőrben, ugyanakkor, mind a CCL2, mind a CCL20 immunreaktivitás nagyon alacsony volt, vagy teljesen hiányzott, az epidermiszben mindkét régióban. Ezen kemokinek célsejtjei a T sejtek, de hatnak a DC-kre és a Mf-okre is [89, 113, 115, 116]. A kapott adataink jól korrelálnak az előző megfigyeléseinkkel [9], miszerint a DC-k és T sejtek szignifikánsan nagyobb számban vannak jelen az SGR bőrterületen.

A legfontosabb KC szenzorok (TLR2, TLR3, TLR4, NLRP3) és a veleszületett immunsejtek által termelt pro-inflammatorikus citokinek (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-33, TNF- $\alpha$ ) esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a 2 bőrrégió között.

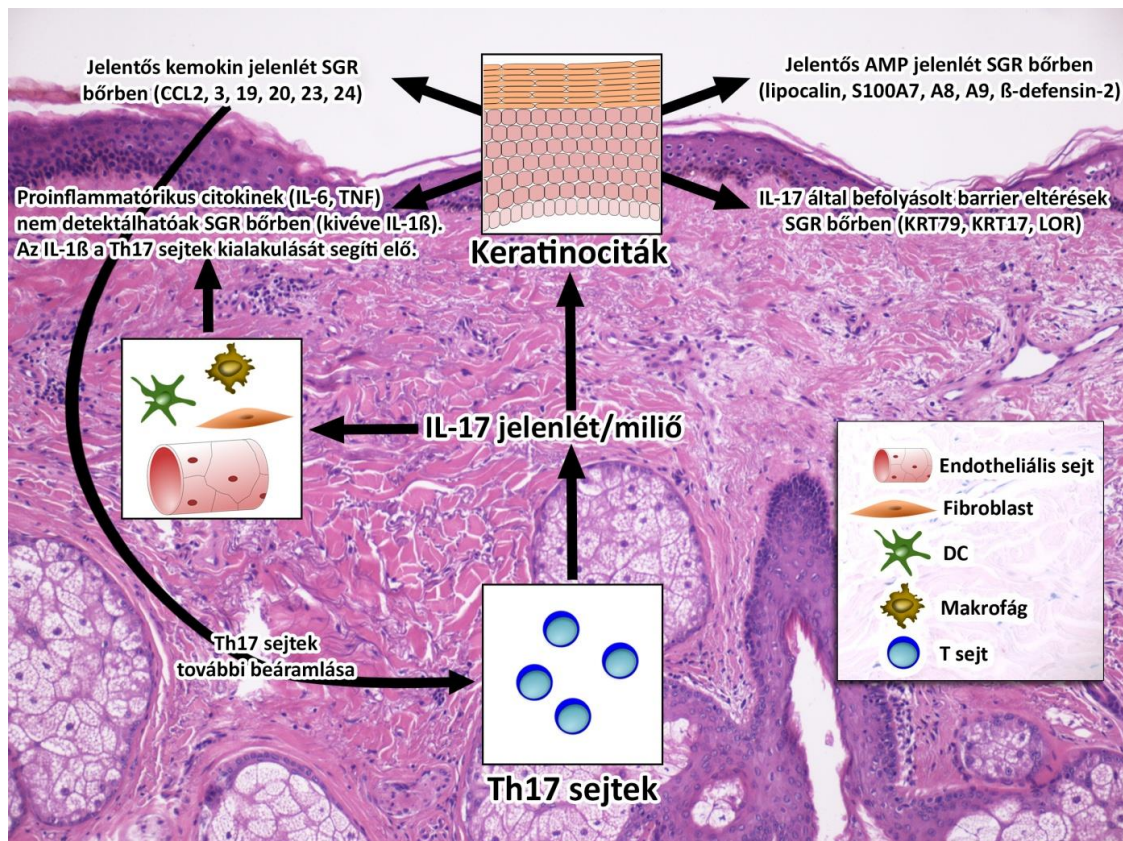
Ezek az eredmények nem voltak meglepőek, hiszen az összes vizsgált minta egészséges, gyulladásmentes bőrterületről származott. Az egyetlen kivételt az IL-1 $\beta$  jelentette, mely szignifikánsan nagyobb génexpressziót mutatott az SGR bőrterületen. Ez a molekula szerepet játszhat a későbbiekben tárgyalt T<sub>h</sub>17/IL-17 citokinmillió kialakításában ezen bőrrégióban [120, 121].

A késői terminális epidermális differenciálódási markerek (LOR, LCE1F, FLG), valamint a CLDN16 TJ molekula kifejeződése többnyire tendenciózan alacsonyabb volt az SGR bőrterületen, mint az SGP bőrterületen (habár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns). Ez arra utalhat, hogy az epidermális barrier gyengébb lehet az SGR régióban. Ezt korábbi publikációk is alátámasztják, melyek bemutatták, hogy a transepidermális vízvesztés mértéke, melynek növekedése jól korrelál a károsodott barrier funkcióval, magasabb a jellemzően SGR bőrterületeken (az arc különböző területei) [52], mint a jellemzően SGP bőrrégióban (alkar, kar) [122, 123]. Ezzel ellentétben a KRT17 és KRT79 mRNS expressziója, melyek inkább a proliferáló sejtekre jellemzőek, szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrben. Továbbá a KRT17, amit általában az epithélium bazális sejtjei expresszálják (mint például az SGP bőrben), az SGR bőrben az epidermisz összes sejtrétege fokozottan expresszálja. Ennek további jelentősége, hogy korábbi publikációkban az találták, hogy a T<sub>h</sub>17/T<sub>h</sub>22 útvonalhoz köthető citokinek (IL-17, IL-22) gén- és fehérjeszinten is fokozták az epidermális KRT17 kifejeződést [124-126], valamint mRNS szinten csökkentették a LOR expresszióját [127]. Ezért a KC-k barrier molekuláit érintő ezen változások a később tárgyalt, az SGR bőrt jellemző T<sub>h</sub>17/IL-17 citokinmillió következményei lehetnek.

A legfontosabb, hogy a T<sub>h</sub>17 szignálút vonal komponenseinek (T<sub>h</sub>17 érési citokinek és T<sub>h</sub>17 effektor kemokin [32]) expressziója jelentős, és több esetben (IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-23A, CCL20) szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrterületen (az SGP bőrterülettel összehasonlítva). Ezek az adatok jól korrelálnak előző eredményeinkkel [9], ahol szintén szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-17A mRNS-t és fehérjét tudtunk detektálni QRT-PCR és IHC technikák segítségével. Ebben a tanulmányban amellet, hogy újra meg tudtuk erősíteni a T<sub>h</sub>17 sejtek jelenlétét az SGR bőrrégióban, ezen túlmenően az IL-17 központi jelentőségét is megfigyeltük az SGR bőrben, mivel a fentebb részletezett különbségek a 2 bőrterület között az AMP-k, a kemokinek és a

barrier molekulák kifejeződésében jól magyarázhatók az IL-17 hatásával. Korábban az is bebizonyosodott, hogy az IL-17 képes fokozni az IL-1 $\beta$ , hBD-2, CAMP, S100A7, S100A8, S100A9, LCN2, CCL2, CCL20 [111, 127] és KRT17 [124, 126] után mRNS és fehérje expresszióját, miközben csökkentik a LOR kifejeződést a KC-kban [127]. A fókuszált útvonal analízisünk, mely funkcionális csoportokba rendezte a 2 bőrterület között szignifikánsan eltérően expresszálódott immunrendszerhez köthető molekulákat, szintén megerősítheti ezen molekulák fontos szerepét az SGR bőr régió-specifikus immunmilliójének fenntartásában. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az SGR bőrben detektált IL-17 hatás nem gyulladásos válasznak, hanem homeosztatis jelenségnek tűnik, mivel a neutrofil kemoattraktánsok (mint például az ebben a tanulmányban RNS szekvenálással meghatározott CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8) expressziója, a pro-inflammatorikus citokintermelés (lásd **7. táblázat**), valamint a neutrofil infiltráció mértéke (lásd előző tanulmányunk [9]) nem volt szignifikáns az SGR bőrben. Érdekes módon a pro-inflammatorikus molekulák közül csak az IL-1 $\beta$  mutatott szignifikánsan emelkedettebb expressziót az SGR bőrben. Úgy véljük, hogy ez a magasabb IL-1 $\beta$  szint segítheti elő a T<sub>h</sub>17 sejtek fejlődését és IL-17 millió kialakulását, amit az előzőekben már részletesen tárgyaltunk [128].

Ezzel párhuzamosan azt gondoljuk, hogy a bőr immun- és barrier paramétereiben fennálló nevezetes különbségek az SGR és SGP bőrterületek között kapcsolatban állhatnak az eltérő régiókban található mikrobióta összetételben és a bőrfelszíni mikromillióban mutakozó eltérésekkel, mivel jól ismert, hogy mind a szébum, mind a bőr mikrobióta befolyásolhatja a sejtek immunfunkcióit a mikrokörnyezetükben [129-132]. Fontos azt is szem előtt tartani, hogy a szébum és mikrobióta összetételben fennálló különbségek a 2 bőrrégió között a pubertás során fejlődnek ki. Naik és mtsai [133] egy mesterséges mikrobióta váltást hozott létre egérbőrön. Azt figyelték meg, hogy az új kommenzálisok belépése IL-17A indukcióhoz vezet, mely a bőr egy relatíve konzervált reakciója, valamint ezek a T sejt válaszok a bőr veleszületett immunválaszait (S100A8, S100A9 termelés) képesek elősegíteni [133]. Mivel a pubertás során egy hasonló, de fiziológias mikrobióta váltás jön létre a humán bőrfelszínen, azt feltételezzük, hogy az SGR bőr Th17/IL-17 immunmillióje a bőr immunrendszeri adaptáció maradványa lehet a pubertás alatt az SGR bőrben és a serdülőkbán gyakori acne kialakulásával is összefüggésben állhat [134] (**18. ábra**).



**18. ábra** Az egészséges SGR bőr egy nem gyulladásos  $T_h17$ /IL-17 milliővel jellemezhető

Az egészséges SGR bőr egy nem gyulladásos  $T_h17$ /IL-17 milliővel rendelkezik, ami az antimikrobiális peptidek (S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2 és LCN2), kemokinek (CCL2, CCL3, CCL19, CCL20, CCL23 és CCL24) és barrier molekulák (KRT17, KRT79 és LOR) szignifikánsan megváltozott expressziójával jár együtt. A fent bemutatott molekulák közül az S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2, LCN2, CCL2, CCL20, KRT17 és a LOR IL-17-hez köthető molekulák. Ezzel ellentétben ez a bőrterület a neutrofil kemoattraktánsok kifejeződésével, a neutrofil infiltrációval és a gyulladásos citokinek termelésével járó gyulladásos IL-17 hatásokkal nem jellemezhető. Ezek alapján azt gondoljuk (úgy véljük), hogy az IL-17-nek homeosztatisz szerepe lehet az egészséges SGR bőrben. Emellett a gyulladáskeltő molekulák közül az IL-1 $\beta$  az egyetlen olyan faktor, mely emelkedett expressziót mutat, és ami hozzájárulhat a  $T_h17$  sejtek, valamint az SGR bőr IL-17 környezetének kialakulásához.

A bőr immunrendszernek kulcsszerepe van az immun-mediált gyulladásos és autoimmun betegségek pathogenezisében. Ezeknek a betegségeknek egy része speciális bőrterületekre lokalizálódik, mint például az akne, rosacea és a bőrre lokalizált lupusz, melyek leginkább az arcon, a fejen és a mellkason jelennek meg, melyek SGR területek. A bőr immunrendszer összetételét és aktivációját mindeztáig az egész testen egységesnek tekintették, és ezen betegségek régió-specifikus megjelenésének háttérében más okokat feltételeztek (szébum, mikrobióta, hormonális változások, napfény). Jelenlegi adataink lehetővé teszik e kérdés új aspektusból történő vizsgálatát, és felvetik annak a lehetőségét, hogy a bőr immunrendszer régió-specifikus jellege is hozzájárulhat a régió-specifikus immun-mediált bőrbetegségek

kialakulásához. Az SGR bőr nem-gyulladásos  $T_H17/IL-17$  által vezérelt immun- és barrierkörnyezete valószínűleg hajlamosíthatja ezt a bőrterületet a gyulladásos  $T_H17$  típusú immunmediált bőrbetegségek kialakulására, a nyugalmi homeosztatisz körülmények felborulása (a székumban, mikrobiótában, hormonális állapotban bekövetkező változások vagy napsugárzás miatt) után. A szakirodalomban közölt adatok alátámasztják ezt a hipotézist, mivel az akne, a rosacea és a lupusz összes formájában (DLE, SCLE, SLE) a bőrt főként a gyulladásos típusú  $T_H17$  sejtpopuláció infiltrálják, ezek felelősek elsősorban a bőrgyulladás kialakulásáért e fenti betegségekben [135-139]. Korábbi saját adataink szintén felvetik annak lehetőségét, hogy az immunológiai toleranciában keletkező zavaroknak, a nem gyulladásos  $T_H17$  ( $\beta$ ) sejtekről gyulladásos típusú  $T_H17(23)$  sejtekre történő váltásnak speciális szerepe lehet a SGR bőrterületre lokalizálódó gyulladásos bőrbetegségek kialakulásában [9]. Vizsgálataink szerint az SGR bőrben nyugalmi állapotban egy homeosztatisz, tolerogén epidermális TSLP expresszió detektálható, miközben a rosacea kialakulása során szignifikáns TSLP csökkenés figyelhető meg egy jelentős gyulladásos DC és IL-17/IFN- $\gamma$  citokin környezettel jellemezhető  $T_H17(23)/T_H1$  sejt bevándorlással [9, 134].

### **A perifériás vérben keringő DC-k szerepe AD-ben**

Az egészséges bőr immunrendszert karakterizáló kutatásaink mellett egy, az immunrendszer kóros megváltozásával járó gyulladásos bőrbetegségen, az AD-n is folytattunk vizsgálatokat. Az AD-s betegek vérében keringő  $CD1c^+$  pre-DC-k fenotípusos jellegzetességeit és kemokintermelő képességét eddig kevésbé vizsgálták. Azt tartják a pre-DC-kről, hogy a bőr nyugalmi és gyulladásos dermális DC-inek előalakjaiként funkcionálhatnak [28, 140]. A vér pre-DC-k vizsgálata információt szolgáltat arról, hogy a bőr mDC-i AD-specifikus tulajdonságaikat hol és mikor nyerik el, azaz, hogy pl. kizárólag a bőr mikrokörnyezetében vagy már a vérben is rendelkeznek betegség-specifikus jellegzetességeikkel. Ezek a kérdések a közvetlenül a perifériás vérből szeparált DC-k vizsgálatával válaszolhatóak meg, szemben a monocitákból in vitro körülmények között differenciáltatott DC-vel. Habár ez a módszer azonos mennyiségű vérből kiindulva kevesebb sejtet eredményez, a sejtek tulajdonságaikat tekintve sokkal hasonlóbbak a fiziológias körülményekhez.

A DC-k FcεRI kifejeződését az AD-s bőrben már több mint 20 éve tanulmányozzák [141, 142]. Ezen marker magas expressziót mutat mind az LC-k, mind pedig az IDEC sejtek felszínén, és valószínűleg gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok szabályozásában vesz részt [143]. Saját eredményeinkkel meg tudtuk erősíteni ennek a receptornak szignifikánsan emelkedett kifejeződését a vérben keringő pre-DC-k felszínén [144, 145]. A vér CD1c<sup>+</sup> prekursor sejtek felszínén sok FcεRI receptor található, mely az AD-s betegek emelkedett szérum IgE szintjének eredménye lehet. A vér DC-k ezt a receptort az IgE-mediált allergén prezentációra használják [144]. Továbbá a specifikus IgE, valamint a receptor sejt felszíni jelenléte az antigénfelvétel- és prezentáció hatékonyságát növeli a bőrbe érkezés után [143, 146].

A CD206 mannóz receptor kifejeződése alapján éretlen és érett DC-ket különböztethetünk meg, mivel a legtöbb érett DC nem expresszálja felszínén nagy mennyiségben ezt a fehérjét [147-149]. Ezt a markert az AD-s és az egészséges kontroll csoportban is detektáltuk, azonban kevesebb AD-s pre-DC-n volt jelen; ez arra utalhat, hogy az AD-s DC-k (elő)érett állapotban vannak. A vér DC-k felszínén jelenlévő CD83 és CD86 érési és aktivációs markerek kifejeződésével kapcsolatban az irodalmi adatok ellentmondásosak [145, 146]. Ezen markerek szintje az AD betegek pre-DC-in nagyobb volt, habár az AD-s betegektől származó DC-k CD206, CD83 és CD86 molekulái nem mutattak szignifikánsan eltérő expressziót még a stimulálást követően sem. Ezek kifejeződésének következetes és egyirányú változása viszont azt sugallja, hogy az AD-s pre-DC-k (elő)érett állapotban vannak. Jelenlegi eredményeink esetében a szignifikancia hiánya és az ezen érési markerekhez kapcsolódó szakirodalmi adatok inkonzisztenciája egy nemrég publikált megfigyeléssel magyarázható; e szerint a vér egy valószínűleg nem teljes CD1c<sup>+</sup> populációja, hanem inkább alpopulációja lehet korai érési fázisban. Ebben a vizsgálatban az AD-betegek vérében jelenlévő DC-k egy nagyobb populációját azonosították, melyben a nagyobb és aktívabb DC-ket dekoncentrált magokkal és alacsony DAPI intenzitással detektálták. Az AD-ra jellemző citokinprofil kialakítását ennek a sejtpopulációnak tulajdonították [61].

Mivel a DC-k fontos kemokin források, valamint mivel az AD-s betegek vérében lévő sejtek kemokin termeléséről kevés információ áll rendelkezésre, kísérleteink során az AD pre-DC-k kemokinintermelését vizsgáltuk. Az AD-s pre-DC-k által ex vivo termelt

legfontosabb kemokinek azonosítására Proteome Profile Chemokine Array-t alkalmaztunk, aminek eredményét ELISArray módszerrel kívántuk megerősíteni. Ezenkívül egy precízebb módszer, a hagyományos szendvics ELISA segítségével felmértük egy szövetspecifikus mikrokörnyezet stimuláló hatását is, melynek során összehasonlítottuk a nem stimulált sejtek, valamint a TSLP-vel és a SEB-vel stimulált DC-k kemokintermelő képességét.

A Proteome Profiler Chemokine Array módszer segítségével kapott eredményeink szerint a kemokinek két csoportra oszthatók: 1) az AD-s és kontroll pre-DC-k által hasonló mennyiségben termelt kemokinek; 2) az AD pre-DC-k által nagyobb mennyiségben termelt kemokinek. Az első csoport vizsgálata során megállapítottuk, hogy mind az AD-s, mind az egészséges pre-DC-ek hasonlóan nagy mennyiségben termelték a CXCL4-et, a CXCL7-et, a CXCL8-at és a CXCL16-ot, ami arra utal, hogy termelődésük a vér pre-DC-kre jellemző, de az AD jelenlététől független.

A második csoport tagjai (a CCL3, a CCL4, a CCL5, a CCL17, a CCL18 és a CCL22, a CXCL10 kivételével) nagyobb mennyiségben szabadultak fel az AD-s betegek vérpre-DC-iből (Proteome Profiler Array és ELISA segítségével detektálva). Közülük a CCL17, a CCL18 és a CCL22 az AD-hez köthető kemokinek, melyeket az AD-s betegek bőr DC-i is termelnek, és fontos szerepet játszanak a Th2 immunválasz szabályozásában, valamint a memória T-sejtek vándorlásában [90, 146, 149]. A gyulladásos folyamatokhoz köthető CXCL10, CCL3, CCL4 és CCL5 génexpresszióját nemcsak az AD-s betegek bőrén, hanem más gyulladásos bőrbetegségekben szenvedő betegek bőrén is kimutatták, ami arra utal, hogy ezen kemokinek emelkedett szintje a krónikus gyulladás általános jellemzője, azaz nem AD-specifikus faktor.

Az AD-s betegek vér DC-inek fentebb részletezett kemokintermelési mintázata az érésükről is információt adhat, mivel a DC-ek különböző érési szakaszaikban különböző kemokin-kombinációkat termelnek [150-153]. A korai érési stádiumban levő DC-k nagy mennyiségben termelik a CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 és CXCL10 kemokineket. Vizsgálatunkban az AD-s pre-DC-k CCL3, CCL4, CCL5 és CXCL10 gyulladásos kemokintermelése tovább erősítette megfigyelésünket, hogy azok (elő)érett (vagy korai érési stádiumban levő) állapotban vannak.

Összefoglalva eredményeinket megállapítható, hogy az AD-s betegek vér pre-DC-inek kemokin termelése és sejtfelszíni marker jellegzetességei azt jelzik, hogy ezek a sejtek (elő)érett állapotban vannak, és már a perifériás vérben képesek AD-specifikus kemokinek termelésére. A DC-k AD-specifikus kemokintermelő és citokin felszabadító képességét figyelembe véve úgy gondoljuk, hogy nemcsak a bőr, hanem már a vér mikrokörnyezete is jelentősen befolyásolja az AD-s DC-k fejlődését. Mindemellett valószínűsíthető, hogy ezen DC-k kemokin- és a citokinprofilja még intenzívebbé és betegség specifikusabbá válik a szövetspecifikus stimulációt követően. Az AD-s betegek vérének egy egyedülálló citokinkészlet jellemzi (IL-4, IL-10, IL-13, CCL17 és TSLP) [60, 154-162], mely lehetővé teszi, hogy ezek a sejtek elérjék az érés korai szakaszát. Az ezekkel a molekulákkal szemben alkalmazott új biológiai terápiák (pl. Dupilimab vagy anti-TSLP mAB) módosíthatják ezeknek a citokineknek a hatását mind a vérben, mind a bőrben, ezáltal befolyásolva a sejtek érését és működését [163].

## Összefoglalás

Kísérleteink első részében teljes transzkriptóm és útvonalelemzést végeztünk a faggyúmirigyekben gazdag (SGR) és szegény (SGP) bőrrégiók között fennálló lehetséges immunotopografikus különbségek feltárása végett. Megállapítottuk, hogy a különböző bőrterületek karakterisztikus veleszületett és szerzett immun-, valamint barriermilióval rendelkeznek, hiszen szignifikánsan magasabb kemokin (CCL2, 3, 19, 20, 23, 24) és antimikrobiális peptid (S100A7, A8, A9, lipokalin,  $\beta$ -defenzin-2) szinteket, megváltozott barrierfunkciót (keratin 17, 79), valamint egy nem-gyulladásos  $T_H17/IL-17$  dominanciát azonosítottunk az SGR régiókban (az SGP területekhez viszonyítva). A pro-inflammatórikus molekulák (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-33, TNF- $\alpha$ ) esetében alacsony szinteket mértünk mindkét régióban. Adataink magyarázatot nyújthatnak egyes immun-mediált és autoimmun bőrbetegségek jellegzetes topografikus megjelenésére. Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a kísérletes bőrgyógyászati gyakorlatban gyakran használt „egészséges kontroll bőrminta” kifejezés csak abban az esetben legyen elfogadható, ha a kutatók gondosan megnevezik az egészséges bőrrégió lokalizációját.

Munkánk második részében az AD-s betegek perifériás véréből izolált mieloid pre-dendritikus sejtek (pre-DC) fenotípusos jellemzését, valamint kemokintermelésük ex vivo vizsgálatát végeztük el; emellett tanulmányoztuk a pre-DC-ket *Staphylococcus enterotoxin B*-vel (SEB) és thymic stromal lymphopoietin-nel stimulált (így egy AD-s mikrokörnyezetet imitáló) környezetben is. A sejtfelszíni markerek kifejeződését áramlásos citometriával, míg a kemokintermelést chemokine antibody array-vel és megerősítő ELISA módszerrel vizsgáltuk. AD-s pre-DC-k magasabb Fc $\epsilon$ RI szinteket fejeztek ki, míg az érési és aktivációs markerek tendenciózusan változtak. A sejtek magas szinten expresszálták az AD-re (CCL17/18/22), valamint az érési folyamatokra (CCL3/4/5) jellemző kemokineket. A CCL3/4 és a CCL18 termelése AD-specifikus stimuláció nélkül is szignifikánsan magasabb volt, míg a CCL17 és CCL22 termelése csak a stimulációt követően nőtt meg szignifikáns mértékben. Mindezen adatok arra utalnak, hogy az AD-s keringő pre-DC-k korai érési fázisban vannak és atópiás jellegzetességeket mutatnak a szövet-specifikus stimuláció nélkül is; tehát, hogy

fejlődésüket nemcsak a bőr mikrokörnyezete, hanem már a vérben lévő lokális milliő is befolyásolja.

## Summary

In the first part of our study we performed whole transcriptomic and subsequent pathway analyses to assess the potential immunotopographical differences between sebaceous gland rich (SGR) and sebaceous gland poor (SGP) regions. We found that different skin regions exhibit a characteristic innate and adaptive immune and barrier milieu as we could detect significantly increased chemokine (CCL2, 3, 19, 20, 23, 24) and antimicrobial peptide (S100A7, A8, A9, lipocalin,  $\beta$ -defensin-2) expression, altered barrier (keratin 17, 79) functions, and a non-inflammatory Th17/ IL-17 dominance in SGR skin compared to SGP. Regarding pro-inflammatory molecules (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-33, TNF- $\alpha$ ), similarly low levels were detected in both regions. Our data may explain the characteristic topographical localization of some immunemediated and autoimmune skin disorders. In addition, we also propose that the term “healthy skin control sample,” widely used in experimental Dermatology, should only be accepted if researchers carefully specify the exact region of the healthy skin (along with the site of the diseased sample).

In the second part of our work we aimed at investigating the phenotypic features and chemokine production of myeloid pre-dendritic cells of patients with AD ex vivo and after stimulation with Staphylococcus enterotoxin B and thymic stromal lymphopoietin, representing an AD-like microenvironment. The expression of cell surface markers was measured by flow cytometry, while chemokine production was monitored with chemokine antibody array and confirmed by enzyme-linked immunoassays. AD pre-dendritic cells expressed higher levels of Fc $\epsilon$ RI and the maturation and activation markers tended to be altered. They produced both AD (CCL17/18/22) and maturation-related (CCL3/4/5) chemokines at higher level than controls. The production of CCL3/4 and CCL18 were significantly higher even without AD-specific stimulation, while the production of CCL17 and CCL22 were significantly higher only after stimulation. These results indicate that circulating AD pre-dendritic cells are premature and bear atopic characteristics even without tissue-specific stimulation, suggesting that their development is not only influenced by the skin microenvironment, but even earlier by the local milieu in the blood.

## Irodalomjegyzék

1. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
2. Di Meglio, P., G.K. Perera, and F.O. Nestle, *The multitasking organ: recent insights into skin immune function*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 857-69.
3. Yoshida, K., et al., *Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis*. J Dermatol Sci, 2013. **71**(2): p. 89-99.
4. Brandner, J.M., et al., *Epidermal tight junctions in health and disease*. Tissue Barriers, 2015. **3**(1-2): p. e974451.
5. Grice, E.A., et al., *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome*. Science, 2009. **324**(5931): p. 1190-2.
6. Grice, E.A. and J.A. Segre, *The skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 244-53.
7. Belkaid, Y. and S. Tamoutounour, *The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 353-66.
8. Baldwin, H.E., et al., *The Role of Cutaneous Microbiota Harmony in Maintaining a Functional Skin Barrier*. J Drugs Dermatol, 2017. **16**(1): p. 12-18.
9. Dajnoki, Z., et al., *Sebaceous Gland-Rich Skin Is Characterized by TSLP Expression and Distinct Immune Surveillance Which Is Disturbed in Rosacea*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(5): p. 1114-1125.
10. Streilein, J.W., *Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions*. J Invest Dermatol, 1983. **80 Suppl**: p. 12s-16s.
11. Bos, J.D. and M.L. Kapsenberg, *The skin immune system Its cellular constituents and their interactions*. Immunol Today, 1986. **7**(7-8): p. 235-40.
12. Nestle, F.O., et al., *Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6535-45.
13. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
14. Lebre, M.C., et al., *Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(2): p. 331-41.
15. Miller, L.S. and R.L. Modlin, *Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(2): p. 262-3.
16. Plato, A., S.E. Hardison, and G.D. Brown, *Pattern recognition receptors in antifungal immunity*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(2): p. 97-106.
17. Szabo, A. and E. Rajnavolgyi, *Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses*. Am J Clin Exp Immunol, 2013. **2**(3): p. 195-207.
18. Gallo, R.L. and L.V. Hooper, *Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 503-16.
19. Wiesner, J. and A. Vilcinskas, *Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system*. Virulence, 2010. **1**(5): p. 440-64.
20. Nakatsuji, T. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 887-95.

21. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 701-21 e1-70.
22. Gogolak, P., et al., *Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses*. J Mol Recognit, 2003. **16**(5): p. 299-317.
23. Pulendran, B. and D. Artis, *New paradigms in type 2 immunity*. Science, 2012. **337**(6093): p. 431-5.
24. Zaba, L.C., J.G. Krueger, and M.A. Lowes, *Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 302-8.
25. Romani, N., et al., *Epidermal Langerhans cells--changing views on their function in vivo*. Immunol Lett, 2006. **106**(2): p. 119-25.
26. Boltjes, A. and F. van Wijk, *Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 131.
27. Haniffa, M., M. Gunawan, and L. Jardine, *Human skin dendritic cells in health and disease*. J Dermatol Sci, 2015. **77**(2): p. 85-92.
28. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets*. Immunology, 2013. **140**(1): p. 22-30.
29. Nestle, F.O., et al., *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 135-43.
30. Clark, R.A., *Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 362-70.
31. Mueller, S.N., et al., *Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 137-61.
32. Nomura, T., K. Kabashima, and Y. Miyachi, *The panoply of alphabetaT cells in the skin*. J Dermatol Sci, 2014. **76**(1): p. 3-9.
33. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 978-85.
34. Steward-Tharp, S.M., et al., *New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 123-48.
35. Bangert, C., P.M. Brunner, and G. Stingl, *Immune functions of the skin*. Clin Dermatol, 2011. **29**(4): p. 360-76.
36. Kurebayashi, Y., et al., *Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells*. Genes Cells, 2013. **18**(4): p. 247-65.
37. Martin, D.A., et al., *The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. 17-26.
38. Fujita, H., *The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases*. J Dermatol Sci, 2013. **72**(1): p. 3-8.
39. Schmitt, E., M. Klein, and T. Bopp, *Th9 cells, new players in adaptive immunity*. Trends Immunol, 2014. **35**(2): p. 61-8.
40. Schlapbach, C., et al., *Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity*. Sci Transl Med, 2014. **6**(219): p. 219ra8.

41. Loser, K. and S. Beissert, *Regulatory T cells: banned cells for decades*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 864-71.
42. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 307-8.
43. Weidinger, S. and N. Novak, *Atopic dermatitis*. Lancet, 2016. **387**(10023): p. 1109-1122.
44. Gordon, B.R., *The allergic march: can we prevent allergies and asthma?* Otolaryngol Clin North Am, 2011. **44**(3): p. 765-77, xi.
45. Deckers, I.A., et al., *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): p. e39803.
46. Williams, H., et al., *Is eczema really on the increase worldwide?* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 947-54 e15.
47. Abuabara, K., et al., *The prevalence of atopic dermatitis beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies*. Allergy, 2018. **73**(3): p. 696-704.
48. Silverberg, J.I. and J.M. Hanifin, *Adult eczema prevalence and associations with asthma and other health and demographic factors: a US population-based study*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(5): p. 1132-8.
49. Baroni, A., et al., *Structure and function of the epidermis related to barrier properties*. Clin Dermatol, 2012. **30**(3): p. 257-62.
50. Elias, P.M. and M. Steinhoff, *"Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(5): p. 1067-70.
51. Cork, M.J., et al., *New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 3-21; quiz 22-3.
52. Lee, H.J. and S.H. Lee, *Epidermal permeability barrier defects and barrier repair therapy in atopic dermatitis*. Allergy Asthma Immunol Res, 2014. **6**(4): p. 276-87.
53. McAleer, M.A. and A.D. Irvine, *The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(2): p. 280-91.
54. Levin, J., S.F. Friedlander, and J.Q. Del Rosso, *Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 1: the role of filaggrin in the stratum corneum barrier and atopic skin*. J Clin Aesthet Dermatol, 2013. **6**(10): p. 16-22.
55. Malik, K., K.D. Heitmiller, and T. Czarnowicki, *An Update on the Pathophysiology of Atopic Dermatitis*. Dermatol Clin, 2017. **35**(3): p. 317-326.
56. Kubo, A., K. Nagao, and M. Amagai, *Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 440-7.
57. Szegedi, A., *Connections between atopic dermatitis and ageing*. Br J Dermatol, 2020. **182**(1): p. 9-10.
58. Brunner, P.M., D.Y.M. Leung, and E. Guttman-Yassky, *Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic dermatitis*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2018. **120**(1): p. 34-41.
59. Werfel, T., et al., *Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(2): p. 336-49.
60. Aleksza, M., et al., *Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 2002. **147**(6): p. 1135-41.

61. Nagy, G., et al., *The atopic skin-like microenvironment modulates the T-cell-polarising cytokine production of myeloid dendritic cells, as determined by laser scanning cytometry*. Exp Dermatol, 2014. **23**(4): p. 276-8.
62. Guttman-Yassky, E., J.G. Krueger, and M.G. Lebwohl, *Systemic immune mechanisms in atopic dermatitis and psoriasis with implications for treatment*. Exp Dermatol, 2018. **27**(4): p. 409-417.
63. Mocsai, G., et al., *Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter the skin barrier in patients with atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 2014. **170**(3): p. 617-24.
64. Dajnoki, Z., et al., *Immune-mediated Skin Inflammation is Similar in Severe Atopic Dermatitis Patients With or Without Filaggrin Mutation*. Acta Derm Venereol, 2016. **96**(5): p. 645-50.
65. Apfelbacher, C.J., T.L. Diepgen, and J. Schmitt, *Determinants of eczema: population-based cross-sectional study in Germany*. Allergy, 2011. **66**(2): p. 206-13.
66. Ellinghaus, D., et al., *High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis*. Nat Genet, 2013. **45**(7): p. 808-12.
67. Paternoster, L., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis*. Nat Genet, 2011. **44**(2): p. 187-92.
68. Sun, L.D., et al., *Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Chinese Han population*. Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 690-4.
69. Hirota, T., et al., *Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population*. Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1222-6.
70. Paternoster, L., et al., *Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis*. Nat Genet, 2015. **47**(12): p. 1449-1456.
71. Irvine, A.D., W.H. McLean, and D.Y. Leung, *Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases*. N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1315-27.
72. Liang, Y., C. Chang, and Q. Lu, *The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms*. Clin Rev Allergy Immunol, 2016. **51**(3): p. 315-328.
73. De Benedetto, A., et al., *Tight junction defects in patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 773-86 e1-7.
74. Flohr, C. and J. Mann, *New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis*. Allergy, 2014. **69**(1): p. 3-16.
75. Cork, M.J., et al., *Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 1892-908.
76. Howell, M.D., et al., *Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 150-5.
77. De Benedetto, A., et al., *Reductions in claudin-1 may enhance susceptibility to herpes simplex virus 1 infections in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(1): p. 242-246 e5.
78. Yuki, T., et al., *Impaired Tight Junctions in Atopic Dermatitis Skin and in a Skin-Equivalent Model Treated with Interleukin-17*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0161759.
79. Chng, K.R., et al., *Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare*. Nat Microbiol, 2016. **1**(9): p. 16106.
80. Bjerre, R.D., et al., *The role of the skin microbiome in atopic dermatitis: a systematic review*. Br J Dermatol, 2017. **177**(5): p. 1272-1278.

81. Kong, H.H. and J.A. Segre, *Skin microbiome: looking back to move forward*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(3 Pt 2): p. 933-9.
82. Byrd, A.L., et al., *Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis*. Sci Transl Med, 2017. **9**(397).
83. Nakatsuji, T., et al., *Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against Staphylococcus aureus and are deficient in atopic dermatitis*. Sci Transl Med, 2017. **9**(378).
84. Nomura, I., et al., *Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3262-9.
85. Jariwala, S.P., et al., *The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(11): p. 1515-20.
86. Takai, T., *TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms*. Allergol Int, 2012. **61**(1): p. 3-17.
87. Soumelis, V., *TSLP: from allergy to vaccine adjuvant*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 293-5.
88. Ong, P.Y., *New insights in the pathogenesis of atopic dermatitis*. Pediatr Res, 2014. **75**(1-2): p. 171-5.
89. Homey, B., et al., *Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 178-89.
90. Guttman-Yassky, E., et al., *Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1210-7.
91. Wollenberg, A., H.C. Rawer, and J. Schaubert, *Innate immunity in atopic dermatitis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **41**(3): p. 272-81.
92. Schakel, K. and A. Hansel, *News from dendritic cells in atopic dermatitis*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2011. **11**(5): p. 445-50.
93. Brunner, P.M., E. Guttman-Yassky, and D.Y. Leung, *The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **139**(4S): p. S65-S76.
94. Gittler, J.K., et al., *Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(6): p. 1344-54.
95. Weidinger, S., et al., *Atopic dermatitis*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**(1): p. 1.
96. Chu, C.C., P. Di Meglio, and F.O. Nestle, *Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases*. Semin Immunol, 2011. **23**(1): p. 28-41.
97. Otsuka, A., et al., *The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis*. Immunol Rev, 2017. **278**(1): p. 246-262.
98. Johnson-Huang, L.M., et al., *Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases*. J Clin Immunol, 2009. **29**(3): p. 247-56.
99. Suarez-Farinas, M., et al., *RNA sequencing atopic dermatitis transcriptome profiling provides insights into novel disease mechanisms with potential therapeutic implications*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(5): p. 1218-27.
100. Dreno, B., et al., *Microbiome in healthy skin, update for dermatologists*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016. **30**(12): p. 2038-2047.
101. Choi, K.Y., L.N. Chow, and N. Mookherjee, *Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation*. J Innate Immun, 2012. **4**(4): p. 361-70.

102. Clausen, M.L. and T. Agner, *Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier*. Curr Probl Dermatol, 2016. **49**: p. 38-46.
103. Niyonsaba, F., et al., *Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases*. Exp Dermatol, 2017. **26**(11): p. 989-998.
104. Gallo, R.L., et al., *Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6): p. 823-31.
105. Brogden, N.K., et al., *The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation*. Skin Pharmacol Physiol, 2012. **25**(4): p. 167-81.
106. Harder, J. and J.M. Schroder, *RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46779-84.
107. Glaser, R., et al., *Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 57-64.
108. Ong, P.Y., et al., *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1151-60.
109. Nomura, I., et al., *Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p. 1195-202.
110. de Jongh, G.J., et al., *High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(6): p. 1163-73.
111. Guttman-Yassky, E., et al., *Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7420-7.
112. Kamsteeg, M., et al., *Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis*. Br J Dermatol, 2010. **162**(3): p. 568-78.
113. Suarez-Farinas, M., et al., *Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(4): p. 954-64 e1-4.
114. Wittersheim, M., et al., *Differential expression and in vivo secretion of the antimicrobial peptides psoriasin (S100A7), RNase 7, human beta-defensin-2 and -3 in healthy human skin*. Exp Dermatol, 2013. **22**(5): p. 364-6.
115. Tokura, Y., M. Kobayashi, and K. Kabashima, *Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals*. Exp Dermatol, 2008. **17**(2): p. 81-90.
116. Nedoszytko, B., et al., *Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis*. Postepy Dermatol Alergol, 2014. **31**(2): p. 84-91.
117. Cardamone, C., et al., *Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity*. Immunol Lett, 2016. **178**: p. 10-4.
118. Nakayama, T., et al., *Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis*. Int Immunol, 2001. **13**(1): p. 95-103.
119. Nagao, K., et al., *Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 744-52.
120. Gu, C., L. Wu, and X. Li, *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. Cytokine, 2013. **64**(2): p. 477-85.

121. Gaffen, S.L., et al., *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(9): p. 585-600.
122. Rougier, A., et al., *Relationship between Skin Permeability and Corneocyte Size According to Anatomic Site, Age, and Sex in Man*. Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1988. **39**(1): p. 15-26.
123. Schnetz, E., et al., *Intra-and inter-individual variations in transepidermal water loss on the face: facial locations for bioengineering studies*. Contact Dermatitis, 1999. **40**(5): p. 243-7.
124. Shi, X., et al., *IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1- and STAT3-dependent mechanisms*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(12): p. 2401-8.
125. Jin, L. and G. Wang, *Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis*. Med Res Rev, 2014. **34**(2): p. 438-54.
126. Donetti, E., et al., *Interleukin 22 early affects keratinocyte differentiation, but not proliferation, in a three-dimensional model of normal human skin*. Exp Cell Res, 2016. **345**(2): p. 247-54.
127. Nograles, K.E., et al., *Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1092-102.
128. Muhr, P., et al., *Primary human keratinocytes efficiently induce IL-1-dependent IL-17 in CCR6+ T cells*. Exp Dermatol, 2010. **19**(12): p. 1105-7.
129. Lai, Y., et al., *Activation of TLR2 by a small molecule produced by Staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defense against bacterial skin infections*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(9): p. 2211-21.
130. Nakatsuji, T., et al., *Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(4): p. 985-94.
131. Gallo, R.L. and T. Nakatsuji, *Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(10): p. 1974-80.
132. Lovaszi, M., et al., *Sebum lipids influence macrophage polarization and activation*. Br J Dermatol, 2017. **177**(6): p. 1671-1682.
133. Naik, S., et al., *Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1115-9.
134. Szegedi, A., et al., *Acne: Transient Arrest in the Homeostatic Host-Microbiota Dialog?* Trends Immunol, 2019. **40**(10): p. 873-876.
135. Jue, S.G., G.W. Dawson, and R.N. Brogden, *Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use*. Drugs, 1985. **29**(4): p. 330-41.
136. Tanasescu, C., et al., *IL-17 in cutaneous lupus erythematosus*. Eur J Intern Med, 2010. **21**(3): p. 202-7.
137. Kelhala, H.L., et al., *IL-17/Th17 pathway is activated in acne lesions*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105238.
138. Buhl, T., et al., *Molecular and Morphological Characterization of Inflammatory Infiltrate in Rosacea Reveals Activation of Th1/Th17 Pathways*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(9): p. 2198-2208.
139. Mendez-Flores, S., et al., *Cytokines and Effector/Regulatory Cells Characterization in the Physiopathology of Cutaneous Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 7074829.

140. Haniffa, M., et al., *Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells*. *Immunity*, 2012. **37**(1): p. 60-73.
141. Bieber, T., *IgE-binding molecules on human Langerhans cells*. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 1992. **176**: p. 54-7.
142. Wang, B., et al., *Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI*. *J Exp Med*, 1992. **175**(5): p. 1353-65.
143. Bieber, T., *The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI)*. *Immunobiology*, 2007. **212**(6): p. 499-503.
144. Maurer, D., et al., *Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation*. *J Immunol*, 1996. **157**(2): p. 607-16.
145. Stary, G., et al., *Dendritic cells in atopic dermatitis: expression of Fc epsilon RI on two distinct inflammation-associated subsets*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005. **138**(4): p. 278-90.
146. Novak, N., T. Bieber, and S. Kraft, *Immunoglobulin E-bearing antigen-presenting cells in atopic dermatitis*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2004. **4**(4): p. 263-9.
147. Cochand, L., et al., *Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **21**(5): p. 547-54.
148. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 389-400.
149. Mellman, I., S.J. Turley, and R.M. Steinman, *Antigen processing for amateurs and professionals*. *Trends Cell Biol*, 1998. **8**(6): p. 231-7.
150. Imai, T., et al., *Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine*. *Int Immunol*, 1999. **11**(1): p. 81-8.
151. Vissers, J.L., et al., *Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(5): p. 785-93.
152. Adema, G.J., et al., *A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells*. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 713-7.
153. Godiska, R., et al., *Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells*. *J Exp Med*, 1997. **185**(9): p. 1595-604.
154. Schaniel, C., et al., *Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells*. *J Exp Med*, 1998. **188**(3): p. 451-63.
155. Hashimoto, S., et al., *Macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 produced by monocyte derived dendritic cells reflects the disease activity in patients with atopic dermatitis*. *J Dermatol Sci*, 2006. **44**(2): p. 93-9.
156. Renz, H., et al., *Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma*. *J Invest Dermatol*, 1992. **99**(4): p. 403-8.
157. Jujo, K., et al., *Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis*. *J Allergy Clin Immunol*, 1992. **90**(3 Pt 1): p. 323-31.

158. Kakinuma, T., et al., *Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(3): p. 535-41.
159. Folster-Holst, R., et al., *Soluble CD30 plasma concentrations correlate with disease activity in patients with atopic dermatitis.* Acta Derm Venereol, 2002. **82**(4): p. 245-8.
160. Novak, N., et al., *Characterization of monocyte subtypes in the allergic form of atopic eczema/dermatitis syndrome.* Allergy, 2002. **57**(10): p. 931-5.
161. Mihaly, J., et al., *TSLP expression in the skin is mediated via RARgamma-RXR pathways.* Immunobiology, 2016. **221**(2): p. 161-5.
162. Mocsai, G., et al., *Investigation of Skin Barrier Functions and Allergic Sensitization in Patients with Hyper-IgE Syndrome.* J Clin Immunol, 2015. **35**(7): p. 681-8.
163. Hamilton, J.D., et al., *Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(6): p. 1293-1300.

## **Tárgyszavak**

Antimikrobiális peptidek, barrier funkció, kemokinek, IL-17, faggyúmirigy, bőr, T-sejtek, atópiás dermatitisz, dendritikus sejtek, sejtfelszíni markerek.

## **Key words**

Antimicrobial peptides, barrier function, chemokines, IL-17, sebaceous gland, skin, T cells, atopic dermatitis, dendritic cells, cell surface markers.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof Dr. Szegedi Andreának, hogy lehetővé tette számomra a tudományos munkavégzést a DE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Nem Önálló Tanszéken, és hogy folyamatos útmutatásával hozzájárult a szakmai fejlődésemhez, valamint doktori disszertációm elkészítéséhez.

Hálával és köszönettel tartozom Prof. Dr. Bíró Tamásnak a témában nyújtott konstruktív javaslataiért.

Hálásan köszönöm kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Kapitány Anikónak, Dr. Dajnoki Zsoltnak, Mócsai Gábornak, Dr. Janka Eszter Annának, Hegedűs Csabának, Toka Farkas Tündének, Dr. Mihály Johannának és Dr. Póliska Szilárdnak, hogy munkám során tanácsokat és szakmai támogatást nyújtottak nekem.

Hálás köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak támogatásukért, türelmükért.

A disszertáció elkészítését 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. 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.

A kutatási projekt további támogatói az OTKA K108421, az OTKA-PD 112077, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023-"VÉD-ELEM" projekt és a Debreceni Egyetem RH-885/2013.

# 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/148/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

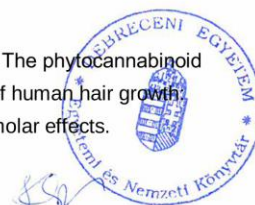
Jelölt: Béke Gabriella  
Neptun kód: X7WN64  
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10055057

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Béke, G.**, Dajnoki, Z., Kapitány, A., Gáspár, K., 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.  
IF: 4.716
2. Kapitány, A., **Béke, G.**, Nagy, G., Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., Gáspár, K., Boros, G., Dajnoki, Z., Bíró, T., Rajnavölgyi, É., Szegedi, A.: CD1c+ Blood Dendritic Cells in Atopic Dermatitis are Premature and Can Produce Disease-specific Chemokines. *Acta Derm.-Venereol.* 97 (3), 325-331, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2540>  
IF: 3.127

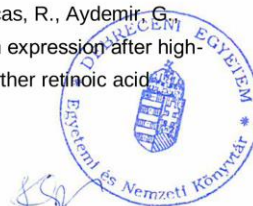
## További közlemények

3. Medgyesi, B., Dajnoki, Z., **Béke, G.**, Gáspár, K., Szabó, I. L., Janka, E., 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.* [Epub ahead of print], 2020.  
IF: 6.29 (2018)
4. Szabó, I. L., Lisztes, E., **Béke, G.**, Tóth, K. F., Paus, R., Oláh, A., Bíró, T.: The phytocannabinoid (-)-cannabidiol (CBD) operates as a complex, differential modulator of human hair growth: anti-inflammatory submicromolar versus hair growth inhibitory micromolar effects. *J. Invest. Dermatol.* 140, 484-488, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.690>  
IF: 6.29 (2018)





5. Jenei, A., Dajnoki, Z., 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: 6.29 (2018)
6. Szöllősi, A. G., Vasas, N., Angyal, Á., Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., **Béke, G.**, Lisztes, E., Szegedi, A., Kawada, N., Yanagida, T., Mori, T., Kemény, L., Bíró, T.: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 138 (2), 365-374, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>  
IF: 6.29
7. Bohn, T., Planchon, S., Leclercq, C. C., Renault, J., Mihály, J., **Béke, G.**, Rühl, R.: Proteomic responses of carotenoid and retinol administration to Mongolian gerbils. *Food Funct.* 9 (7), 3835-3844, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8FO00278A>  
IF: 3.241
8. Dajnoki, Z., Kapitány, A., **Béke, G.**, Szegedi, A.: A thymic stromal lymphopoietin szerepe a bőrben és egyéb barriereken. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (3), 119-125, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.3.6>
9. Khasawneh, A., Baráth, S., 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
10. Landrier, J. F., Kasiri, E., Karkeni, E., Mihály, J., **Béke, G.**, Weiss, K., Lucas, R., Aydemir, G., Salles, J., Walrand, S., de Lera, Á. R., Rühl, R.: Reduced adiponectin expression after high-fat diet is associated with selective up-regulation of ALDH1A1 and further retinoic acid receptor signaling in adipose tissue. *Faseb J.* 31 (1), 203-211, 2017.  
IF: 5.595





11. Dajnoki, Z., **Béke, G.**, Kapitány, A., Mócsai, G., Gáspár, K., Rühl, R., Hendrik, Z., Juhász, I., Zouboulis, C. C., Bácsi, A., Bíró, T., Töröcsik, D., Szegedi, A.: Sebaceous gland rich skin is characterized by TSLP expression and distinct immune surveillance which is disturbed in rosacea.  
J. Invest. Dermatol. 137 (5), 1114-1125, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.025>  
IF: 6.448
12. Dajnoki, Z., **Béke, G.**, Mócsai, G., Kapitány, A., Gáspár, K., Steuer-Hajdu, K., Emri, G., Nagy, B., Kovács, I., Beke, L., Dezső, B., Szegedi, A.: Immune-mediated Skin Inflammation is Similar in Severe Atopic Dermatitis Patients With or Without Filaggrin Mutation.  
Acta Derm.-Venereol. 96 (5), 645-650, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2272>  
IF: 3.653
13. **Béke, G.**, Kapitány, A., Dajnoki, Z., Steuer-Hajdu, K., Gáspár, K., Bíró, T., Szegedi, A.: A bőr immunrendszerének felépítése és működése.  
Immunol. Szle. 7 (2), 4-11, 2015.
14. Aydemir, G., Kasiri, Y., Birta, E., **Béke, G.**, Garcia, A. L., Bartók, E. M., Rühl, R.: Lycopene-derived bioactive retinoic acid receptors/retinoid-X receptors-activating metabolites may be relevant for lycopene's anti-cancer potential.  
Mol. Nutr. Food Res. 57 (5), 739-747, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200548>  
IF: 4.909
15. Harangi, J., **Béke, G.**, Harangi, M., Mótyán, J. A.: The digestable parent cyclodextrin.  
J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 73 (1-4), 335-339, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10847-011-0061-0>  
IF: 1.886

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 61,171**

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

7,843

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, 2020.05.25.

## Függelék – Saját közlemények jegyzéke

Elsőszerzős közleményeim:

1. **Béke, G.**, Dajnoki, Z., Kapitány, A., Gáspár, K., Medgyesi, B., Póliska, S., Hendrik, Z., Péter, Z., Törocsik, D., Bíró, T., Szegedi, A. Immunotopographical differences of human skin (2018) *Frontiers in Immunology*, 9 (MAR), art. no. 424. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00424.
2. Kapitány, A., **Béke, G.**, Nagy, G., Doan-Xuan, Q.M., Bacso, Z., Gáspár, K., Boros, G., Dajnoki, Z., Bíró, T., Rajnavölgyi, É., Szegedi, A. CD1c+ blood dendritic cells in atopic dermatitis are premature and can produce disease-specific chemokines (2017) *Acta Dermato-Venereologica*, 97 (3), pp. 325-331. DOI: 10.2340/00015555-2540.