

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

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

Retzlerné Medgyesi Barbara

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



**DEBRECENI EGYETEM**

**Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola**

Debrecen, 2023

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Retzlerné Medgyesi Barbara  
okleveles orvosi biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori  
Iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Kinyó Ágnes, PhD  
Kapitányné Dr. Mikó Edit, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora  
tagok: Dr. Kinyó Ágnes, PhD  
Kapitányné Dr. Mikó Edit, PhD  
Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora  
Dr. Lányi Árpád, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Bőrgyógyászati Tanszék Tanterme  
2023. június 19. 13:00

## BEVEZETÉS

A bőr 1,8 m<sup>2</sup>-es felületével az emberi test egyik legnagyobb méretű szerve. Számos fontos funkciója ismert, mellyel hozzájárul az emberi szervezet védelméhez, megfelelő működésének, homeosztázisának fenntartásához. Ezen funkciók ellátásában fontos szerepet játszanak a bőr immun- és permeabilitási barrierjének elemei. Az egészséges bőr anatómiai és szövettani felépítése bizonyos mértékben eltér a faggyú mirigyben gazdag (SGR, Sebaceous Gland Rich, zsíros), az apokrin mirigyben gazdag (AGR, Apocrine Gland Rich, nedves) és a mirigyekben szegény (GP, Gland Poor, száraz) bőrrégiókban, köszönhetően a stratum corneum eltérő vastagságának, illetve a faggyú, eccrin és apokrin mirigyek és a szőrtüszők változó számának. Ennek következménye egy diverz kémiai milió megjelenése a bőr felszínén. Az utóbbi évek kutatásai feltárták, hogy a kémiai milió változatosságával párhuzamosan a mikrobiom is különbözik az eltérő bőrterületeken. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai azt is kimutatták, hogy a bőr mikrobiomjához és kémiai miliójéhez hasonlóan a bőr immunológiai működésében (immunbarrier) is regionális eltérések detektálhatók. Szignifikáns különbséget igazoltunk az SGR, AGR és a GP bőrben található immunsejtek (DC-k, T sejtek) számában és aktivitásában, valamint rávilágítottunk arra, hogy az SGR és AGR régiókat egy nem gyulladásozó IL-17/IL-10 citokin környezet jellemzi, melyhez az IL-17-hez kapcsolódó kemokinek és antimikrobiális peptidok (AMP-k) emelkedett szintje is társul. Azt azonban eddig senki nem vizsgálta, hogy az immunológiai barrierhez hasonlóan a permeabilitási barrier is különbözik-e a három egészséges bőrrégióban. A bőr permeabilitási barrierjének (fiziko-kémiai barrier) legfőbb két fő eleme a SC réteg önmaga és a SG rétegben lévő tight junction (TJ) hálózat, melyek biztosítják a külső környezeti hatásokkal szembeni védelmet, valamint megakadályozzák a különböző patogének bőrbe való bejutását. Emellett szerepet játszanak még a bőrön keresztüli vízvesztés kontrollálásában, a bőr megfelelő hidratáltságának kialakításában. Disszertációm első részét megalapozó kutatás során a permeabilitási barrier fő elemeit vizsgáltuk a három egészséges bőrrégióban: a stratum corneum elemeit, melyek a cornified envelop képződésében, a korneocita deszkvamációban és a (korneo)dezmoszómák szerveződésében játszanak szerepet, valamint a tight junction molekulákat. Először ezen kutatásainkat összegzem. A permeabilitási barrier sérülése számos bőrbetegség fontos jellemzőjeként, sőt iniciáló okaként is ismert. A rosacea egy, a faggyúmirigyben gazdag bőrterületekre, azon belül az arca lokalizálódó immunmediált bőrbetegség, ahol az emelkedett pH és transzepidermális vízvesztés (TEWL), valamint csökkent hidratáltság és fokozottan száraz bőr permeabilitási barrier károsodásra utal. Kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a permeabilitási barrier eltéréseit molekuláris szinten rosaceában, disszertációm második felében erről számolok be.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

### **1. Az egészséges bőr permeabilitási barrier vizsgálata**

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

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

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

### **2. A permeabilitási barrier vizsgálata rosaceában**

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

1. Célul tűztük ki a génextpressziós mintázatok különbségeinek feltárását teljes transzkriptom analízissel
2. A SC és a TJ barrier molekulák gén (QRT-PCR) és fehérje (IHC) szintű vizsgálatait:

- a, CE képzésében résztvevő molekulák
  - b, Intercelluláris lipid lamellák képződésében szerepet játszó molekulák
  - c, Korneodezmoszóma komponensek és a korneociták leválásáért és keresztkötések kialakításáért felelős enzimek
  - d, TJ komponensek
  - e, Az immunológiai barrier kialakításában résztvevő AMP-k
3. További célunk volt a rosacea és az AD permeabilitási barrier jellegzeteségeinek összehasonlítása IF módszerrel

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Bőrbiopsziás minták gyűjtése és feldolgozása**

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

### **RNS izolálás, Reverz Transzkripció**

Az RNA *later*-ben tárolt mintákat homogenizáltuk, majd a bőrmintákból trizolos protokoll szerint RNS-t izoláltunk. Minőség ellenőrzés és DNáz I enzimes kezelés után a QRT-PCR-hez 1µg RNS-t írtunk át cDNS-sé (komplementer DNS). A cDNS szintézist High Capacity cDNA Archive Kit felhasználásával a gyártó által ajánlott protokoll szerint végeztük.

### **Kvantitatív Valós-idejű Polimeráz Láncreakció (QRT-PCR)**

A QRT-PCR vizsgálatokat a gyártó által tervezett FAM-MGB assay-vel, illetve a TaqMan® Gene Expression Master Mix felhasználásával, triplikátumban végeztük. A mérésekhez ABI PRISM® 7000 szekvenáló készüléket használtuk. A célgének relatív mRNS szintjét a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszerrel határoztuk meg, minden esetben a PPIA mRNS expresszióra normalizálva.

### **RNS szekvenálás (RNAseq)**

Az RNS szekvenáláshoz először cDNS könyvtárat hoztunk létre 1µg teljes RNS felhasználásával, TruSeq RNA Sample Preparation Kit segítségével a gyártó által előírt protokoll alapján. A poli-A végű RNS-eket oligodT-konjugált mágneses gyöngyökkel tisztítottuk meg, majd fragmentálásuk 94°C-on 8 percen keresztül zajlott. Az egyszálú cDNS átírásához random primereket és SuperScript II reverz transzkriptáz enzimet használtunk. A következő lépésként a második szál cDNS szintetizálása következett. A duplaszálú cDNS végek kijavítása és a 3' végek adenilálása után az Illumina index adapterek mintához történő ligálása történt meg, majd PCR-rel amplifikáltuk az adapterrel ligált cDNS fragmenseket. A cDNS fragmentumok méret eloszlását és molaritását Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip-en ellenőriztük le. Az RNS-szekvencia könyvtárakat a szekvenálás előtt 10nM-os koncentrációra állítottuk be és az 5 könyvtárat pool-oztuk. A szekvenálás egy Illumina HiScan SQ készüléken zajlott egyirányú 50bp-os szekvencia futtatással, ahol mintánként 16-18 millió leolvasást kaptunk. A minőségellenőrzéshez és a de-multiplexeléshez a CASAVA szoftvert alkalmaztuk. Ezután a szekvenált adatok illesztése Human Genom v19-re TopHat és Cufflinks algoritmusok alkalmazásával történt meg, így bam fájlkat hoztunk létre. A további statisztikai elemzésekhez a StrandNGS szoftvert használtuk, a bam fájl importálása és normalizálása pedig a DESeq szoftver segítségével valósult meg. A statisztikailag szignifikáns génexpressziós minták azonosításához nem-paraméteres Wilcoxon Mann-Whitney tesztet használtuk. A könyvtárkészítést, a szekvenálást és az azt követő adatok elemzését a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában Dr. Póliska Szilárd végezte el. Az RNS szekvencia adatok egy részét (SGR1-SGR6 minták) korábban közzétettük és a Sequence Read Archive (SRA) adatbázisban, a (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) PRJNA421246 hivatkozási szám alatt megtalálható. Míg az SGR7, SGR8 és ROS1-ROS8 minták az SRA adatbázisban a PRJNA592080 hivatkozási szám alatt érhetőek el.

### **Útvonal analízis/pathway analízis**

A DEG (eltérően expresszált gének) funkciójának azonosítása során többféle bioinformatikai elemzést is elvégeztünk, a Cytoscape CluGo alkalmazásával, több adatbázis felhasználásával:

Gene Ontology (GO), Biological Process (BP), GO Immune System Process (ISP), GO Molecular Function (MF), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG), Reactome Pathway és Reactome Reactions. Először, a DEG-ek általános biológiai funkciójának azonosítása során „pathway enrichment” analízist végeztünk minden eltérően expresszált génre, ha az (fold change)  $FC \geq 1,5$  volt. A statisztikailag szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) „feldúsult” útvonalak azonosításának érdekében a következő kritériumokat alkalmaztuk: az útvonalaknak legalább 50 gént kellett tartalmaznia az általunk bevitt génlistánkon szereplő gének közül. Ezután elvégeztünk egy második, szigorúbb kritériumú útvonal analízist, hogy részletesebben betekintést nyerjünk a barrierrel kapcsolatos szignifikáns DEG-ek funkcióival kapcsolatban. Az up- és downregulált DEG-eket két különböző klaszteranalízisnek vetettük alá a ClueGO pathway enrichment analízis során. Az alapján, hogy a DEG-ek nagy része upregulált (kb. 61%), az analízis kritériumai eltérőek voltak az up- és downregulált gének esetében. Az upregulált gének klaszterének legalább 30 gént kellett tartalmaznia a bevitt génlistából valamint az egyes útvonalakra jellemző géneknek legalább a 20%-át, míg a downregulált gének klaszterének esetében legalább 18 gént kell tartalmaznia a bemenő génlistánkból és az egyes útvonalakra jellemző gének legalább 12%-át. A fenti megközelítés lehetővé tette számunkra az egyes útvonalakhoz tartozó up- és downregulált DEG-ek megkülönböztetését és megjelenítését is.

### **Immunhisztokémia (IHC), immunfluoreszcens (IF) és rutin festések**

Az IHC vizsgálatokhoz a beteg és egészséges donoroktól származó bőrmintákból paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk. A vizsgálat során a metszeteket először deparaffináltuk, következő lépésként rehidráltuk, majd hővel indukált antigén feltárást végeztünk. A metszeteken egy 15 perces 3%-os  $H_2O_2$ -dal történő előkezelést is alkalmaztunk az endogén peroxidázok gátlásának érdekében. A festések során elsődleges anti-humán antitesteket használtunk. Ezt követően Horseradish peroxidase (HRP)-konjugált másodlagos anti-egér/anti-nyúl antitesteket alkalmaztunk. A mintákat az antitesttel történő inkubálás előtt és után is 3x5 percreg mostuk, majd a festődés detektálására ImmPACT™ NovaRED™ Kit-et vagy 3,3'-Diaminobenzidine-t (DAB)használtuk.

A metszeteken metil-zölddel történő háttérfestést is alkalmaztunk. A folyamat utolsó lépéseként a megfestett metszeteket a dehidratálást követően fedőlemezzel fedtük le. Az aktuálisan vizsgált fehérjék előhívása párhuzamosan zajlott az összes metszeten annak érdekében, hogy a vizsgált protein expressziók egymással összehasonlíthatóak legyenek a kiértékelés során. Pozitív, Ig és izotípus kontrollokat is alkalmaztunk a fehérjék festésének

normalizálásához. Az IF festések, hasonlóan az IHC festésekhez, deparaffinált metszeten történtek, és a kísérlet menete a másodlagos antitest alkalmazásáig hasonlóan történt. A primer antitestekkel való inkubálás után másodlagos antitesteket alkalmaztunk. A Haematoxylin-Eozin festéseket a tanszékünk szövettani laboratóriumában dolgozó asszisztensek végezték el az egészséges bőrterületekről származó mintákon, a faggyúmirigyek számának meghatározása céljából.

### **Metszetek digitalizálása Whole-slide imaging-gel**

A metszetek digitalizálása egy Zeiss sima-apokromatikus objektívű és Hitachi 3CCD progresszív scan color kamerával felszerelt Panoramic SCAN digitális metszet szkennelvel történt. Az immunfestések kiértékelését pedig a Panoramic Viewer 1.15.2 szoftver (3DHitech) HistoQuant applikációjának a segítségével végeztük. A kiértékelés során elsőként kiválasztottuk a vizsgálni kívánt területeket [Regions of interest (ROI)] (n=20/slide), majd a szoftver segítségével lemértük az összterületet (Field area [FA (mm<sup>2</sup>)] és a maszkolt területet [Mask area (MA (mm<sup>2</sup>)). A MA reprezentálja a pozitív területeket, míg a FA a ROI-k összterületét adja meg. Minden ROI esetében kiszámoltuk az MA/FA értékeket.

### **Transzepidermális vízvesztés mérése**

A méréseket 22–25 °C hőmérsékletű, 40–60% -os páratartalmú standardizált laboratóriumi körülmények között végeztük el, egészséges egyéneken (n=30), legalább 15 perces akklimatizáció után. A TEWL (g/hm<sup>2</sup>) méréséhez a Tewameter TM300 műszert használtunk. A méréseket három különböző bőrrégióon végeztük el: alkaron (GP régió), homlokon (SGR régió), és a hónaljban (AGR régió). Egy-egy régióban 3 mérést végeztünk, mely minden esetben 30 másodpercig tartott.

### **Konfokális mikroszkópia**

A konfokális mikroszkópiához minden mintacsoportból négy, paraffinba ágyazott 40 µm-es metszetet használtunk fel. A minták deparaffinálása után hővel indukált antigén feltárást végeztünk. A festéshez elsődleges és másodlagos antitestekkel inkubáltuk a mintáinkat, előbbivel 48 órán át 4 °C-on, míg utóbbival 2 órán keresztül szobahőmérsékleten.

Végül a mintákat tárgylemezre helyeztük, és VECTASHIELD® HardSet™ Antifade DAPI mounting médiummal fedtük le. Az immunfestett minták képalkotását egy 60-szoros olajimmerziós lencsével rendelkező konfokális eszközzel, az Olympus FV3000 készülékkel végeztük el. Az előre meghatározott beállítások (lézer teljesítmény, konfokális rekesz és

erősítés, detektor paraméterek) minden mintánál azonosak voltak. Több 1  $\mu\text{m}$  vastag optikai metszet jött létre, 0,5  $\mu\text{m}$ -re elkülönülve a Z tengely mentén.

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

### **Statisztikai analízis**

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

## **EREDMÉNYEK**

### **I. Az egészséges bőr permeabilitási barrier vizsgálatai**

#### ***I.1. A TEWL mérése a különböző bőrrégiókban***

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

#### ***I.2. A CE intracelluláris struktúrmolekulák expressziójának vizsgálata a különböző bőrrégiókban***

Mivel funkcionális vizsgálataink során szignifikáns eltérést detektáltunk a 3 bőrrégió permeabilitási barrierje között, ezért molekuláris szinten is tanulmányoztuk a permeabilitási barrier legfontosabb molekuláit. Elsőként a barrier funkcióban szerepet játszó SC komponensek

közül a CE kialakításában részt vevő molekulák gén szintű vizsgálatát végeztük el QRT-PCR módszerrel, majd fehérje szintű vizsgálatainkhoz kvantitatív IHC módszert alkalmaztunk. A CE kialakításában részt vevő molekulák (KRT1, KRT10, LCE1D, LCE1F, SPRR1A, SPRR2A, TGM1 és TGM5) vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns különbségeket a három bőrrégió között, sem gén, sem fehérje expresszió tekintetében.

### ***1.3. A KLK proteázok és az ABCA12 lipid transzporter expressziójának a vizsgálata a különböző bőrrégiókban***

A korneocita deszkvamációjában, azaz a hámlásban szerepet játszó KLK5 és KLK7 enzimek expresszióját is vizsgáltuk QRT-PCR módszerrel. Eredményeink alapján elmondható, hogy a KLK5 és KLK7 molekulák mRNS szinten szignifikánsan upregulálódtak az SGR és AGR bőrrégiókban a GP területekhez viszonyítva. A fehérje szintű vizsgálattal a két enzim hasonló expressziót mutatott a három bőrrégió interfollikuláris és follikuláris epidermiszének összehasonlítása során. Ugyanakkor a KLK5 és a KLK7 erősen festődött az AGR és az SGR régiók apokrin és faggyúmirigyeiben, ami lényeges különbségre utal a mirigyekben gazdag (AGR, SGR) és a GP bőrrégiók között fehérje szinten. Az enzimeken kívül az intercelluláris lipid lamellák kialakításában résztvevő ABCA12-t vizsgáltuk.

Ez a transzporter molekula szignifikánsan magasabb génexpressziós szintet mutatott SGR és AGR bőrrégiókban a GP területekhez képest, míg a fehérje szintű vizsgálat során az ABCA12 az AGR epidermiszben mutatott kismértékű, de szignifikáns emelkedést a GP bőrhöz képest.

### ***1.4. A korneodezmoszóma és TJ komponensek vizsgálata a különböző bőrrégiókban***

A korneodezmoszóma komponensek közé tartozó CDH1, CDSN, DSC1, DSG1 és PKP1 mRNS expressziójának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget a három egészséges bőrrégió között. Ezzel ellentétben a fehérje szintű vizsgálataink során a DSG1 és CDSN molekulák expressziója eltért a vizsgált bőrmintákban. A DSG1 fehérje szinten szignifikánsan kisebb mennyiségben volt kimutatható mind az SGR, mind az AGR bőrrégiókban, valamint a CDSN fehérje expressziója is jelentősen csökkent SGR-ben a GP bőrrégióhoz képest. A TJ komponensek gén szintű vizsgálata során kimutattuk, hogy a CLDN1 expressziója szignifikánsan emelkedett az AGR bőrterületeken a GP régiókhoz képest, míg a CLDN23 molekula az SGR területen mutatott emelkedést a GP bőrrégióhoz viszonyítva. A CLDN16, a CDH1 és az OCLN esetében viszont hasonló mRNS szintet figyeltünk meg mindhárom régióban. Fehérje szintű vizsgálataink szerint a CLDN1 molekula expressziója az AGR területen szignifikánsan lecsökkent a GP régióhoz képest, illetve az OCLN szintje mind az SGR, mind az AGR területeken alacsonyabb volt, mint a GP bőrben.

### ***I.5. A sejtkapcsoló struktúrák organizációjának a vizsgálata a különböző bőrrégiókban***

Következő lépésként megnéztük, hogy a korneodezmoszóma és a TJ sejtkapcsoló struktúrák molekuláinak fehérje expressziójának csökkenése az AGR és SGR területeken együtt jár-e a sejtkapcsoló struktúrák organizációjának megváltozásával. Ennek a vizsgálata konfokális mikroszkópia segítségével valósult meg. A korneodezmoszómákat reprezentáló DSG1 és CDSN molekulákat kettős IF festéssel detektáltuk. Ahogyan azt vártuk, a CDSN molekula a GP bőrterületeken a SG rétegben mutatott erős expressziót, viszont a mélyebb rétegekben már nem volt kimutatható. A DSG1 fehérje is leginkább a SG rétegében lokalizálódott, csökkenő tendenciát mutatva a bazális epidermális rétegek felé. Mindkét fehérje esetében erős festődést és ko-lokalizációt tapasztaltunk (a korneodezmoszóma képződését jelzi) a SG 1-2 sejt sorból álló rétegében. Mivel a korneodezmoszómák organizációs szintje is érdekelt minket, ezért lemértük a két szomszédos immunfestett DSG1 pont közötti távolságokat a sejtmembrán keresztmetszetében, a SG rétegében. Megállapítottuk, hogy a DSG1 reprezentálta struktúrák a KC-k körül a membránban szabályosan helyezkedtek el a GP epidermiszben.

A GP régióval szemben az SGR és AGR területeken a CDSN expressziójának kiszélesedését figyeltük meg a SS irányába, mind a SG-ban, mind a mélyebb rétegekben jelen volt ezeken a bőrrégiókban. Összességében elmondható, hogy a CDSN és a DSG1 kolokalizációja kevésbé volt jellemző és expressziójuk több sejtrétegre terjedt ki az SGR és AGR-régiókban, mint a GP területeken. Továbbá a korneodezmoszómák térbeli eloszlása, amit a DSG1-pozitív pontok reprezentáltak, kevésbé volt szervezett, szabálytalan eloszlást mutatott az SGR bőrben, az AGR régiókban pedig még inkább megfigyelhető volt ez. A TJ struktúrákat reprezentáló CLDN1 molekula IF festődése a GP régióban a SG-ban volt a legerősebb, emellett a CLDN1 pontok eloszlása rendkívül szabályos volt ebben a bőrrégióban. Ezzel szemben az SGR és az AGR régiókban a CLDN1 immunfestődési mintázata kiszélesedett a SS felé, ráadásul a CLDN1 pontok szabálytalanul oszlottak el az SGR mintákban, az AGR bőr granuláris rétegében pedig még szabálytalanabb elrendeződést mutattak.

## **II. A rosaceás bőr barrier vizsgálata**

### ***II.1. Heatmap, Principal Component Analysis (PCA)***

Az SGR és a ROS bőr közötti génexpressziós mintázatok különbségeinek azonosítása céljából 8 egészséges SGR és 8 ROS donor bőrmintáinak lizátumából RNS szekvencia analízist végeztünk. A szekvenálás során kapott eredményeinket felhasználva a StrandNGS nevezetű szoftverrel heatmapet, azaz egy hőterképet, és egy Principal Component Analysis (PCA) ábrát

hoztunk létre. Ezen ábrák segítséget nyújtanak a két csoport közötti eltérések megjelenítésében és leolvasásában. A ROS és SGR bőrminták génexpressziós profiljának a különbsége jól megfigyelhető a szoftver által generált hőtérképen. A PCA ábra is jól szemlélteti a két vizsgált csoport közötti különbséget. A PCA ábrán megjelenő pontok egy-egy donortól származó bőrmintát helyettesítenek, ahol a színek a ROS és az SGR bőrrégiókat jelentik (piros:papulopustulosus rosacea-PPR, kék: SGR). A pontok közötti távolságok a minták génexpressziós profilja közötti különbségek mértékét jelzik. Az ábrán jól látható, hogy a különböző színű pontok két csoportba rendeződnek, és a piros és kék csoport közötti távolság jelentősebb, mint az egyszínű csoporton belüli távolságok. A PCA ábrán az egy régióba tartozó pontoknál megfigyelhető az is, hogy általában relatív kicsi, míg máshol nagyobb távolságra vannak egymáshoz képest az egyszínű pontok. A vizsgálat során Mann-Whitney nem-paraméteres statisztikai teszttel ( $p < 0,05$ ) határoztuk meg a ROS és SGR minták génexpressziós mintázatának különbségeit. A statisztikai küszöbértéket úgy határoztuk meg, hogy legalább 1,5-szeres változás (fold change [FC]) legyen a 2 mintacsoport között az egyes gének átlagos expressziójában,  $p < 0,05$  statisztikai szignifikancia mellett.

Az elemzés során 5136 gént (DEG) azonosítottunk, melyek szignifikánsan eltérő expressziót mutattak a ROS és az SGR bőrminták között. A DEG-ek közül 3133 gén magasabban, míg 2003 gén pedig alacsonyabb szinten expresszáldott a ROS-ben az SGR bőrrégióhoz képest.

## ***II.2. Pathway analízis 1***

A DEG-ek működésének azonosításához több bioinformatikai elemzést is elvégeztünk a Cytoscape ClueGo bioinformatikai eszköz segítségével. Elsőként, hogy meghatározzuk a DEG-ek általános biológiai funkcióit, az összes olyan DEG-en útvonal analízist végeztünk, ahol az  $FC \geq 1,5$  volt. Ahhoz, hogy a globális biológiai funkciókkal rendelkező, szignifikánsan feldúsult ( $p \leq 0,05$ ) útvonalakat azonosítsuk, azt a kritériumot alkalmaztuk, hogy az összes útvonal legalább 50 gént tartalmazzon a bemenő génlistából. Ez alapján a ClueGO alkalmazás 1239 statisztikailag szignifikánsan „feldúsult” útvonalat azonosított. Nem meglepő módon, az azonosított útvonalak elsősorban a celluláris metabolizmushoz (pl. ion-transzport, lipid-bioszintézis, transzferáz aktivitás), a veleszületett (pl. külső stimulusra/stresszre adott válasz, citokin szekréció, baktériummal szembeni védekező mechanizmus, NOD-szerű receptor jelátviteli útvonal és komplement aktiválás) és adaptív (pl. T sejt aktiválás, leukocita migráció, TNF és IFN-gamma termelés, kemokin jelátviteli útvonal) immun mechanizmusokhoz kapcsolódtak. Emellett az idegrendszeri funkciókban (például az idegrendszer fejlődésében) és a vaszkularizációban (pl. az érrendszer fejlődésének szabályozásában, angiogenezisben)

résztevő gének is különbséget mutattak. Számunkra a legfontosabb információt az jelentette, hogy a bőr barrierrel kapcsolatos funkciókhoz is tartozott 24 útvonal (pl. epitélium fejlődése, hám morfogenezise, epiteliális sejtek differenciálódása és proliferációja)

### ***II.3. Pathway analízis 2***

Bioinformatikai vizsgálataink folytatásaként elvégeztünk egy újabb bioinformatikai analízist a DEG-ek specifikusabb funkcióinak meghatározásának céljából. Az előző analízishez képest egy szigorúbb analitikai megközelítést alkalmaztunk, ahol az up- és downregulált DEG-eket két különálló klaszterként kezeltünk a ClueGO applikációban. Ez az analitikai megközelítés 426 szignifikánsan feldúsult útvonalat eredményezett, és ezek többsége (291) a veleszületett és az adaptív immunmechanizmusokhoz tartozott (pl. Th17 sejtek differenciálódása, toll-like receptor kaszkádok, T-sejtek szelekciója, neutrofilek vándorlása). Ezen túlmenően számos azonosított útvonal vagy a celluláris metabolizmushoz kapcsolódott (63 útvonal, pl. a mikrotubulusok mentén történő transzport, a specifikus granulátum membránfehérjék exocitózisa, a cAMP-re adott válasz), vagy a vaszkularizációban vett részt (2 útvonal, az érrendszer fejlődés és az angiogenezis pozitív szabályozása), vagy az idegrendszerhez (21 útvonal, pl. axonogenezis, gliasejtek differenciálódása, axon vezetés) köthető. Ami számunkra igazán releváns volt, hogy analízisünk során 15 olyan útvonalat azonosítottunk, ami a bőr valamely barrier funkciójával áll kapcsolatban (például keratinizáció, kornifikáció, TJ). További vizsgálatainkban ezekre az útvonalakra fókuszáltunk.

### ***II.4. A QRT-PCR és IHC vizsgálataink megerősítették a ROS bőrben detektált szignifikáns eltéréseket a legfőbb permeabilitási barrier komponensekkel kapcsolatban***

Az RNS szekvenálás eredménye rávilágított arra, hogy a rosaceás bőr permeabilitási barrierje az egészséges zsíros bőrtől jelentősen eltér. Annak érdekében, hogy a ROS és az egészséges SGR bőr permeabilitási barrier különbségeit jobban megismerjük, a permeabilitási barrier fő csoportjaiba tartozó molekulák gén-expresszióját QRT-PCR módszerrel is validáltuk. Ezzel a módszerrel „visszaellenőrizhetjük” a szekvenálás során kapott génexpressziós mintázatok különbségeit. A korábban elvégzett analíziseink során kapott eredmények, valamint irodalmi adatok alapján kiválasztottuk a bőr permeabilitási barrier funkciójában résztvevő legfontosabb csoportokat és molekulákat: (1) a CE kialakításában (FLG, KRT1, KRT10, LCE1D, LCE1F, LOR, SPRR1A, SPRR2A, TGM1, TGM3 és TGM5); (2) az intercelluláris lipid lamellák képződésében (ABCA12); (3) a dezmoszóma organizációjában (CDH1, CDSN, DSG1, DSC1, PKP1); (4) a korneociták hámlási folyamatában (KLK5, KLK7 és KLK14); (5) a TJ

kialakításában (CLDN1, CLDN16, CLDN23 és OCLN; (6) a barrier alarmin funkciókban (KRT6, KRT16 és KRT17) szerepet játszó molekulákat, de ezen kívül (7) néhány fontosabb AMP-t is megvizsgáltunk (S100A7, S100A8, S100A9, DEFB4B, LCN2 és CAMP). A fent említett molekulacsoportok néhány képviselőjét IHC módszerrel is megvizsgáltunk, melyet egy képalkotó analízissel is összekötöttünk, ezáltal fehérje szintű kifejeződésükről is képet kaphattunk.

#### ***II.4.1. CE képzésben résztvevő molekulák vizsgálata***

Elsőként a CE felépítésében résztvevő molekulákat vizsgáltuk meg QRT-PCR módszerrel, amely során azt kaptuk, hogy a vizsgált gének hasonlóan expresszázódtak, mint az RNS szekvenálás során. Eredményeink szerint a vizsgált barrier struktúrmolekulák többsége (KRT1, KRT10, FLG, LOR, LCE1D és LCE1F) downregulálódott, az SPRR1A és SPRR2A molekulák pedig upregulálódtak a ROS mintákban az egészséges kontrollokhoz képest. A kapott különbségek minden esetben statisztikailag szignifikánsnak mutatkoztak, kivéve a két late cornified envelope (LCE1D, LCE1F) és a SPRR1A molekula esetében.

A peptid kereszt-kötésben szerepet játszó enzimek közé tartozó TGM1, TGM3 és TGM5 hasonló szinten fejeződött ki a ROS és az SGR bőrmintákban. A génszintű meghatározásokat követően további vizsgálatokat végeztünk néhány kiválasztott CE komponens esetében. Mivel fontosnak tartottuk, hogy fehérje szinten is megerősítsük a két bőrrégió közötti eltérő kifejeződést ezen molekuláknál, így IHC festéseket végeztünk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a LOR és a KRT1 fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a ROS-ban az SGR bőrhöz képest, míg az FLG fehérje hasonlóan expresszázódt mindkét mintacsoportban. Az enzimek közül TGM5 molekula festését végeztük el, viszont az fehérje szinten nem mutatott szignifikáns különbséget a ROS és az egészséges SGR bőrminták között.

#### ***II.4.2. Intercelluláris lipid lamellák képződésében résztvevő főbb molekulák vizsgálata***

Az intercelluláris lipid lamellák képződésében fontos szerepet játszó molekulák közül az ABCA12 génszintű kifejeződését vizsgáltuk meg QRT-PCR módszerrel a ROS és az egészséges SGR bőrmintákban. Eredményeink azt mutatták, hogy az ABCA12 molekula mRNS szinten szignifikánsan alacsonyabban expresszázódt a ROS mintákban az egészséges SGR bőrhöz képest.

#### ***II.4.3. Dezmoszóma organizációjában szerepet játszó molekulák vizsgálata***

A dezmoszóma komponensek (DSG1, DSC1, CDSN, PKP1 és CDH1) génexpressziós szintjét is megvizsgáltuk QRT-PCR módszerrel. Megállapítottuk, hogy a CDSN kivételével az összes vizsgált molekula szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszázódt a ROS mintákban az SGR-hez képest. A CDSN mRNS-szintjében nem detektáltunk szignifikáns különbséget a két vizsgált mintacsoport között. Ezt követően két kiválasztott junction komponenst (DSG1,

CDSN) fehérje szinten, IHC festéssel is vizsgáltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a DSG1 molekula, az mRNA szintű expressziójához hasonlóan, fehérje szinten is szignifikánsan alacsonyabb mértékben expresszáldott a ROS-ban az SGR mintákhoz képest.

A dezmoszóma organizációjában szerepet játszó másik fontos fehérje, a CDSN mindkét bőr mintában hasonlóan fejeződött ki, megerősítve az mRNA szintű vizsgálatainkat, ahol szintén nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a két mintacsoport között.

#### ***II.4.4. Korneociták hámlásában résztvevő főbb molekulák vizsgálata***

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

#### ***II.4.5. TJ molekulák vizsgálata***

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

#### ***II.4.6. Barrier alarmin molekulák vizsgálata***

A továbbiakban fontosnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk a KRT6, KRT16 és KRT17 molekulák kifejeződését is a két mintacsoportban, hisz ezen molekulák nagymértékben indukálódnak epidermális barrier károsodás során. Elsőként a kiválasztott barrier alarmin komponenseket mRNA szinten vizsgáltuk QRT-PCR módszer segítségével. Eredményeink azt mutatták, hogy a KRT6, KRT16 és KRT17 génszpressziós szintje szignifikánsan megnőtt ROS-ban az SGR bőrhöz viszonyítva. Következő lépésként a KRT6 IHC festését végeztük el, ami megerősítette az mRNA szintű eredményeinket, mivel míg a KRT6 molekulát fehérje szinten nem tudtuk detektálni a zsíros bőrben, addig ROS-ban erőteljes expressziót figyelhettünk meg.

#### ***II.4.7. AMP-k vizsgálata***

Fontosnak tartottuk, hogy a bőr immunológiai-barrier funkciójában szerepet játszó kulcsfontosságú komponensek, az AMP-k expressziós szintjét is megvizsgáljuk. Elsőként gén szinten néztük meg az S100A7, S100A8, S100A9, DEFB4B, LCN2 és CAMP expresszióját, QRT-PCR módszerrel. Eredményeink alapján elmondható, hogy az összes vizsgált AMP

expressziója szignifikánsan upregulálódott a ROS mintákban az egészséges SGR bőrrégióhoz képest.

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

## ***II.5. A ROS bőrre jellemző barrier változások hasonlóak az AD bőr barrier károsodásához***

### ***II.5.1. Irodalmi keresés***

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

### ***II.5.2. Fehérje szintű vizsgálatok (IF festés) megerősítették az AD és a ROS jellemző barrier károsodásainak hasonló jellegét***

Vizsgálataink folytatásaként a ROS és az AD bőrt jellemző barrier elváltozások hasonlóságainak megerősítésére fehérje szintű vizsgálatokat végeztünk IF módszer alkalmazásával. Az IF vizsgálat a megfelelő kontroll csoportokon (SGR és GP egészséges bőrminták) is megtörtént. Az immunfestés eredménye szerint a CE molekulák közül a LOR, valamint a dezmoszómák és a TJ kulcskomponensei (DSG1 és CLDN1) is erősen downreguláltak a ROS és az AD mintákban, a kontroll csoportokhoz képest. A KRT6 barrier alarmin molekula és az S100A8 AMP fehérje szinte teljesen hiányzott az egészséges bőrmintákban, míg a ROS és az AD bőrmintákban magasán expresszálódtak ezek a molekulák. Az IF vizsgálataink alapján elmondható, hogy a vizsgált fehérjék mintázata hasonló volt ROS-ben és AD-ben.

## MEGBESZÉLÉS

### Permeabilitási barrier különbségek egészséges humán bőrben

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

Mivel a KLK5 és a KLK7 fő hasítási célpontjai a DSG1, a DSC1 és a CDSN molekulák, ezért azt feltételezzük, hogy ezek az enzimek lehetnek közvetlenül felelősek a korneodezmoszómák degradációjáért az SGR és az AGR bőrrégiókban. Továbbá a KLK-k többféle, a TJ degradációjában szerepet játszó enzimet (pl. PAR2, mátrix metallo-proteázok) is képesek aktiválni, melyek legalább részben, szintén felelősek lehetnek a TJ gyengeségéért az SGR és az AGR régiókban. Ezenkívül a régióspecifikus baktériumok és gombák, a *Propionibaktérium* és *Malassezia* az SGR-ben; *Corynebaktérium*, *Proteobacteria* és *Staphylococcus aureus* az AGR bőrben is hatással lehetnek a permeabilitási barrierre, exogén szerin- és cisztein peptidázok termelésével. Az ABCA12 lipid transzporter egy olyan molekula, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a lipid lamellák képződésében. mRNS szintű vizsgálattal ez a molekula erős upregulációt mutatott az SGR és AGR régiókban, valamint fehérje szinten is jelentős növekedést mutatott az AGR régiókban a GP-hez képest. Az ABCA12 expressziójában megjelenő különbségek kiemelik bőrünk heterogén jellegét; azonban ennek pontos értelmezéséhez további vizsgálatokra van szükségünk. A molekuláris eredményeink megerősítésére, valamint a korneodezmoszómák és TJ-ök organizációjának és eloszlásának megértéséhez a különböző bőrrégiókat konfokális mikroszkóppal is vizsgáltuk. Eredményeink megerősítették a fentebb találtakat, miszerint a vizsgált molekulák szerveződése is eltérő a régiók között. A korneodezmoszómák és TJ molekulák a GP régióban szabályosan oszlanak el, ahogy az várható volt. Ezzel szemben az AGR és az SGR területeken a kapcsoló struktúrák rendezetlen módon voltak jelen. Összefoglalva elmondható, hogy az egészséges AGR és SGR bőrrégiókra magasabb TEWL és emelkedett KLK enzim szint jellemző, bizonyos korneodezmoszóma és TJ fehérjék pedig csökkent expressziót mutatnak, emellett szabálytalanul eloszló korneodezmoszómák és TJ-ök figyelhetők meg a két régióban, a GP területhez képest. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az AGR és az SGR régiók permeabilitási barrierje bőrünk gyenge pontjai, melynek klinikai következményei is felismerhetők.

Eredményeink magyarázatot adhatnak néhány akantolitikus bőrbetegség, köztük a pemphigus foliaceus (PF), a Darier-kór (DD) és a Hailey-Hailey betegség (HHD) esetében azon kérdésekre, hogy miért bizonyos életkorban és miért bizonyos bőrrégióban jelennek meg ezen kórképek.

Ezeknek a bőrbetegségeknek közös jellemzője a KC adhízió elvesztése károsodott dezmoszóma/korneodezmoszóma képződés következtében, melyet DD-ben és HHD-ben mutációk, PF-ban pedig autoantitestek okoznak. DD-ben és HHD-ban az ATP2A2 és az ATP2C1  $Ca^{2+}$  pumpa génjeinek mutációi okoznak károsodott dezmoszóma/korneodezmoszóma

képződést, és habár ezek a gének az egész élet során, és minden KC-ban jelen vannak, maga a klinikai tünetek mégis általában serdülőkor után jelentkeznek, és szinte mindig az SGR/AGR területeken. Úgy gondoljuk, hogy azért a pubertás után manifesztálódnak a DD és a HHD dezmoszómáinak genetikai változásai, és azért leginkább az SGR és AGR bőrrégiókban, mert ezekben a régiókban gyengébb permeabilitási barrier jellemző, ami a serdülőkor után jelenik meg, a serdülőkori mikrobióta változás, a megnövekedett KLK enzim szint, a kapcsoló fehérjék degradációja és a következményesen meggyengült dezmoszómák és TJ-k eredményeként. A két betegség jellegzetes SGR/AGR lokalizációja és pubertás utáni megjelenése is magyarázható tehát az eredményeink alapján. A PF-ben bár az egész bőrfelületen kötődnek az anti-desmoglein1 antitestek a dezmoszómákhoz, a hólyagok kialakulásának első és domináns klinikai jelei mégis az SGR területeken jelentkeznek, ahol a korneodezmoszómák/TJ-k gyengeségei eleve szenzitívebbé teszi ezeket a régiókat a betegség kialakulására. Ezekből az adatokból jelentős terápiás következtetések is levonhatóak. Azon enzimek szabályozása, melyek az extracelluláris kapcsoló molekulák fokozott degradációjáért és ennek következtében az SGR/AGR bőrterületek meggyengült sejtkapcsolataiért valószínűleg felelőssé tehetőek, a lokálisan alkalmazott inhibitorok vagy antibiotikumok-antimycotikumok használatával késleltetheti vagy akadályozhatja ezen betegségek megjelenését.

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

### **A rosaceás bőr barrier vizsgálata**

A rosaceás betegek érintett arcbőrének klinikai képe és a rajtuk elvégzett funkcionális vizsgálatok permeabilitás barrier eltérésekre utalnak. Ennek ellenére a rosaceás bőr barrier zavarát molekuláris szinten eddig senki nem vizsgálta. Jelen tanulmányban ROS bőrminták teljes transzkriptom analízisét (RNASeq) végeztük el, majd a beteg bőr génexpressziós profilját összehasonlítottuk az egészséges SGR bőr profiljával. Eredményeink a bőr permeabilitási barrier legfontosabb komponenseinek súlyos károsodását jelezték ROS-ban. Az intakt bőrbarrier elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásához, mivel védi szervezetünket a különböző mikrobáktól és külső hatásoktól. Az irodalom az epidermisz legkülső rétegét, a SC-ot és a TJ-t tekinti a permeabilitási barrier legfőbb alkotóelemeinek. A SC-ot alkotó molekulák

további négy csoportba oszthatók: a CE kialakításában és az intercelluláris lipid lamellák képződésében résztvevő molekulák, a korneodezmoszóma komponensek és a korneociták hámlásában résztvevő molekulák. A CE többféle intracelluláris fehérjéből épül fel, beleértve a FLG, LOR, LCE és SPRR fehérjéket, továbbá az envoplakint, periplakint, IVL-t és a keratohialin granulumból származó KRT filamentumokat. Ezen fehérjék keresztlinkését a TGM1, TGM3 és TGM5 enzimek katalizálják. Eredményeink alapján elmondható, hogy a FLG, LOR, KRT1, KRT10 és LCE1D molekulák szignifikánsan downregulálódtak, míg az SPRR2 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott ROS bőrben, az egészséges SGR bőrhöz viszonyítva. Fehérje szintű vizsgálatainkkal is megerősítettük a LOR és a KRT1 szignifikáns csökkenését a ROS bőrben. A TGM-ok expressziója sem mRNS, sem fehérje szinten nem mutatott szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között. A lipid lamellák képződése szintén fontos az intakt SC réteg kialakításában, ahol a lipoxigenázok (ALOX12B és ALOXB3) és a lipid transzporterek (ABCA12) nélkülözhetetlen szerepet játszanak a lipidek szintézisében és szállításában. Vizsgálatunkban az ABCA12 molekula szignifikánsan csökkent mRNS expressziót mutatott ROS-ban a kontroll bőrhöz képest. A SC másik alkotóeleme a dezmoszóma apparátus, mely a korneociták sejtadhéziójáért felelős. Eredményeink szerint a dezmoszóma komponensek erősen károsodtak ROS-ban, amit a CDH1, CDSN, DSC1, DSG1 és PKP1 szignifikánsan csökkent génexpressziós szintje bizonyít. IHC festéssel a DSG1 molekula szignifikáns csökkenését fehérje szinten is sikerült megerősítenünk. A SC-ban a korneociták leválását, azaz a hámlást elsősorban a KLK enzimek (KLK5, KLK7 és KLK14) szabályozzák egy pH-dependens proteolitikus kaszkádon keresztül.

Tanulmányunkban a KLK5, KLK7 és KLK14 esetében hasonló génexpressziós szintet detektáltunk a léziós ROS-ban mint az egészséges bőrben; az enzimek fehérje szintjét és aktivitását azonban nem vizsgáltuk.

A SC mellett a TJ is fontos szerepet játszik a bőr barrier integritásának fenntartásában, mivel a SG szomszédos KC-ait összekötve megakadályozzák a víz és az oldott anyagok szabad áramlását. A TJ-t transzmembrán fehérjék alkotják, főként CLDN-ok és OCLN-ok. Vizsgálatunkban a CLDN1, CLDN16, CLDN23 és OCLN mRNS szintje szignifikánsan csökkent a ROS-ban a kontroll csoporthoz képest. A CLDN1 szignifikáns csökkenését fehérje szinten, IHC módszerrel is bizonyítottuk. A SC és a TJ összetevőkkel párhuzamosan két további molekulacsoport vizsgálatára összpontosítottunk: a kulcsfontosságú barrier alarminokra és az AMP-kre, mivel ezeknek a molekuláknak az expressziós szintje szoros kapcsolatban áll a permeabilitás barrier struktúrkomponenseinek szintjével. Tanulmányunkban az összes vizsgált alarmin barrier molekula (KRT6A, KRT16 és KRT17) és AMP (CAMP, hBD-2, LCN2,

S100A7, S100A8 és S100A9) szignifikánsan upregulálódott a ROS bőrben a kontroll bőrhöz képest. Az LCN2, S100A8 és KRT6 szignifikánsan magasabb jelenlétét fehérje szintű vizsgálatokkal is megerősítettük ROS-ban. Ismereteink szerint eddig csak egy tanulmány végzett teljes transzkriptom analízist rosacea mintákon. Ebben a tanulmányban a szerzők különféle rosacea altípusok immunológiai tulajdonságainak vizsgálatára összpontosítottak, viszont barrier komponensekről nem közöltek adatokat. Egy másik tanulmányban Deng és munkatársai a CE komponenseit, közülük is a KRT10, FLG és LOR mRNS expresszióját vizsgálták különféle rosacea altípusokban. Megvizsgálták a CLDN1 TJ fehérje expresszióját is, és eredményeinkhez hasonlóan szignifikánsan alacsonyabb gén és fehérje szintet tudtak kimutatni rosacea-ban a kontroll mintákhoz képest. A KRT10 és LOR mRNS szintjének vizsgálatakor viszont a tanulmány szerzői nem találtak szignifikáns különbségeket a ROS és a kontroll minták között, fehérje szintű vizsgálatokat pedig nem végeztek. A KLK5 expressziójának mérését rosacea-ban egy másik munkacsoport is elvégezte, akik azt találták, hogy a molekula mRNS- és fehérje szintű expressziója jelentősen megnőtt rosacea-ban, valamint ezzel párhuzamosan megemelkedett enzimaktivitást is detektáltak; a szerzők azonban nem határozták meg, hogy melyik rosacea altípuson végezték el a vizsgálatokat.

Vizsgálatunkban mi nem detektáltunk szignifikánsan emelkedett KLK5 mRNS szintet ROS-ban, illetve sem fehérje szintű vizsgálatot, sem enzimaktivitás mérést nem végeztünk. Az AMP-k közül csak a cathelicidin expresszióját vizsgálták korábban ROS-ban, míg a hBD-2-re vonatkozó adatok csak okuláris rosacea-ban állnak rendelkezésre.

E korábbi eredményekkel összhangban kutatásunk során mi is azt találtuk, hogy a cathelicidin és a hBD-2 mRNS expressziója szignifikánsan upregulálódott ROS-ban, az SGR mintákkal összehasonlítva.

Összefoglalva tehát, a részletes molekuláris biológiai vizsgálatunk során, ideértve a teljes transzkriptom analízist és bioinformatikai elemzéseket, valamint QRT-PCR és kvantitatív IHC vizsgálatokat, azt találtuk, hogy ROS-ban a bőr permeabilitási barrierjének minden fő alkotóelemében súlyos károsodás mutatható ki, ami jelentősen hozzájárulhat a betegség patofiziológiájához. A barrier elváltozások vizsgálata nagy jelentőségűvé vált az elmúlt években. AD-ban bebizonyosodott, hogy a barrier változások képesek bőrgyulladást kiváltani, így iniciáló tényezőnek is tekinthetők a betegség patogenezisében. Ebből a szempontból érdekes, hogy nagyon hasonló barrier elváltozásokat figyeltünk meg ROS-ban és AD-ban. Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján elmondható, hogy a CE komponensek, a dezmoszóma és TJ molekulák, valamint az alarmin barrierok és AMP-k megváltozott expressziója valóban hasonlóságot mutat a két betegségben. Ezen hasonlóságokat fehérje

szinten is megerősítettük bizonyos molekulák IF festésével. Meglepő a ROS és az AD bőrben jelen levő barrier károsodás közötti hasonlóság, mivel ezidáig elsősorban ezen betegségek eltérő klinikai jellemzőit és immunológiai jellegzetességeik közötti különbségeket hangsúlyozták. Jól ismert, hogy az AD-ben megjelenő barrierkár iniciálója lehet a betegségre jellemző gyulladásnak, viszont eredményeink alapján jelenleg még nem tudtuk meghatározni, hogy a rosaceában megjelenő barrier károsodás a gyulladás elindítója vagy következménye. Rosaceában a barrier károsodását okozhatja a betegségre jellemző IL-17A és a Th1/Th17 típusú gyulladás, melyről az utóbbi időben bebizonyosodott, hogy a FLG, LOR és KRT10 mRNS szinteket szabályozza organotípusos 3D bőr ekvivalens modellben. Másrészt az is lehetséges, hogy a diszfunkcionális barrier a rosacea kialakulásának kiinduló tényezője. Amíg a barrier megváltozása AD-ben Th2 típusú gyulladást eredményez, az ehhez hasonló barrier zavar úgy tűnik rosaceában Th1/Th17 típusú gyulladást válthat ki. Ezen látszólagos ellentmondásra a magyarázatot az adja, hogy az AD a GP régióra, míg a rosacea kizárólag az SGR bőre lokalizálódik. Az SGR és a GP bőrfelületeken eltérő homeosztatis immun- és permeabilitás barrier milió van jelen, mely eltérő szöveti környezetben azonos barrier károsodás okozhat eltérő típusú immunaktivációt és következményesen eltérő klinikai gyulladást. Az SGR és GP régiók eltérő szöveti-immun miliójére számos bizonyíték látott napvilágot az elmúlt években. Míg az SGR bőrrégiók szignifikánsan magasabb AMP-szintet mutatnak, illetve a nem-gyulladásos Th17 ( $\beta$ ) és a szabályozó T sejtek száma, valamint a homeosztatis „short” vagy rövid formájú (sf) Thymic Stromal Lymphopietin (TSLP) konstitutív expressziója is magas ebben a régióban, addig ezzel ellentétben a GP bőrre egy alacsonyabb AMP-szint és T sejt szám jellemző, a TSLP pedig hiányzik steady-state állapotban.

A bőr ezen eltérő regionális tulajdonságai nagyon hasonlóak a bél barrierhez, ahol a regionális immunrendszerrel kapcsolatos különbségek már jól ismertek. A vékonybélben magas a Th17 ( $\beta$ ) sejtek száma és a sfTSLP is jelen van, míg a vastagbélben a Th17 ( $\beta$ ) sejtek hiányoznak, és a sfTSLP is csak a proximális szakaszban van jelen. Felvetették, hogy a különböző bélszakaszok ezen egyedi immun- és barrier jellemzői különféle típusú immun-mediált betegségekhez vezethetnek. A Crohn-betegségben a sfTSLP hiánya a vékonybélben elősegítheti a gyulladásos Th1/Th17 sejtek aktiválását, míg ezzel ellentétben a colitis ulcerosa esetében a gyulladásos, hosszú formájú (lf) TSLP szignifikánsan megnövekedett szintje indít el egy Th2 típusú gyulladást a vastagbélben. Ezen megállapítások alapján azt feltételezzük, hogy az SGR és a GP bőrrégiók hasonló barrier károsodásai, eltérő homeosztatis immun- és barrier környezetük miatt, különböző immun-mediált bőrbetegségeket indítanak el, melyek egyedi klinikai tulajdonságait a különböző Th alcsoportok adják (AD az SGP míg a ROS az

SGR területeken). De Benedetto és munkatársai már korábban szintén felvetették annak a lehetőségét, hogy a barrier károsodás által elindított KC aktiváció különböző eredetű mediátorok termelődéséhez vezethet a szöveti környezettől függően, beleértve a pro-Th2 és a pro-Th17 típusú KC citokineket is, melyek eltérően befolyásolják a Th válasz jellemzőit és a klinikai képet. Annak a meghatározásához, hogy a ROS barrier károsodása a betegség iniciálója, vagy pedig a gyulladás következménye, meg kell vizsgálni a barrier károsodás pontos idejét, és a jövőben részletesen elemezni kell a ROS betegek peri-lézionális és/vagy non-lézionális bőr területeit is. Ezen felül hasonló kísérletekre van szükség a rosacea más altípusaiban is. Összegezve, eredményeink egyértelműen bizonyítják a ROS-betegek barrierjének súlyos károsodását az arcbőrben, ezért javasoljuk a bőr barrier-helyreállító kezelések alkalmazását a rosacea kezelésének klinikai irányelveibe illeszteni, hasonlóan az AD-hez.

## **ÖSSZEFOGLALÁS**

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

A második kutatásunk során ROS betegek bőrmintáin vizsgáltuk a permeabilitási barrier jellegzetességeit molekuláris biológiai módszerekkel, SGR bőrhöz hasonlítva. A vizsgálatok során teljes transzkriptom analízist és bioinformatikai elemzéseket hajtottunk végre, melyek eredményeit QRT-PCR, IHC és IF módszerekkel erősítettünk meg. Eredményeink alapján elmondható, hogy ROS-ban a proliferációban szerepet játszó markerek (KRT6, 16, 17)

szignifikánsan emelkedett expressziót, míg a differenciációért felelős markerek (FLG, LCE1, LOR, KRT1, 10) és a sejtkapcsoló struktúrák felépítésében résztvevő (CLDN1, 16, 23, CDH1, CDSN, DSC1, DSG1, PKP1) molekulák pedig szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutattak az SGR bőrhöz viszonyítva. Összefoglalva elmondható, hogy ROS-ban a permeabilitási barrier minden fő alkotóeleme esetében súlyos károsodás mutatható ki, ami jelentősen hozzájárulhat a betegség patofiziológiájához. AD-ban ismert, hogy a barrier változások képesek bőrgyulladást kiváltani, és így a betegség patogenezisének iniciáló faktoraként is tekinthetőek, ezért érdekes, hogy nagyon hasonló barrier elváltozásokat figyeltünk meg a ROS-ban.



Nyilvántartási szám: DEENK/456/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

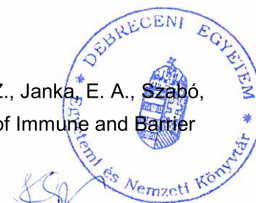
Jelölt: Retzlerné Medgyesi Barbara  
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10083376

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

### További közlemények

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





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

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 42,719**

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

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

Debrecen, 2022.10.20.

