

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A bőr barrierfunkciójában szerepet játszó tényezők
vizsgálata humán keratinocitákon**

Dr. Páyer Edit

Témavezetők:

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



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

A bőr barrierfunkciójában szerepet játszó tényezők vizsgálata humán keratinocitákon

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

Írta: Dr. Páyer Edit
okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai
doktori iskolája
keretében

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora
Dr. Benkő Szilvia, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Klinikai Immunológia Tanszék
2017.06.26

Az értekezés bírálói:

Dr. Kemény Ágnes, PhD
Dr. Szamosi Szilvia, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
tagok: Dr. Kemény Ágnes, PhD
Dr. Szamosi Szilvia, PhD
Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora
Dr. Benkő Szilvia, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Bőrgyógyászati Klinika,
2022.06.29. 13 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy
jelezzze a payer.edit@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2022. június
28.) 14 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a
védéshez kapcsolódni.

Bevezetés

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

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

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

Célkitűzések

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

1. Kísérleteink egyik felében a PKC izoenzimek adhéziós molekulák (dsg-1, dsg-3, P-cad) kifejeződésére gyakorolt hatását elemeztük humán epidermális HaCaT keratinocitákon először a tenyésztési idő, azaz a proliferációs és differenciáltsági állapot függvényében, adott PKC izoenzimeket stabilan overexpresszáló HaCaT sejtekben, végezetül farmakológiai módszerekkel (szelektív PKC inhibitorok), valamint RNS interferencia (RNSi) technika alkalmazásával.

2. Kutatásaink második részében a barrier helyreállításában szerepet játszó anyagok (glicerol, xilitol) hatását vizsgáltuk a barrier kialakulásában szerepet játszó mechanizmusokra, úgymint a keratinocyták proliferációjára, a differenciálódási markerek kifejeződésére, valamint a sejtek intracelluláris kalciumszintjeire, és jelátviteli folyamatokra, ezen belül is a PKC izoenzimekre, illetve a MAPK útvonalra, valamint gyulladásos modellekben gyulladáscsökkentő hatásukra.

Anyagok és módszerek

Sejtenyésztése

HaCaT

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

NHEK

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

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

PKC-overexpresszor HaCaT sejtek létrehozása

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

RNS interferencia (RNSi)

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

Western blot

Western blot technikát alkalmaztunk az adhéziós molekulák kimutatására, a PKC izoformák RNS interferenciával történt lecsendítésének fehérje szintű ellenőrzésére, illetve a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal aktiválódásának igazolására. A sejteket jéghideg foszfát-pufferben (PBS) mostuk le, lízis pufferrel learattuk, majd jégen ultrahangos feltárást végeztünk. Ezt követően a fehérjetartalmat módosított BCA protein assay segítségével határoztuk meg. A lizátumokhoz nátrium-dodecil-szulfát mintapuffert (SDS-PAGE) adtunk, majd a fehérjék denaturálását 10 perces 100°C-on történő főzéssel végeztük. Az így elkészített mintákat SDS-PAGE gélelektroforézisnek vetettük alá (vályúnként 20-30 μ g fehérjét vittünk fel 8%-os gélre), majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán

szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben blokkoltuk, majd az adott fehérje elleni primer monoklonális antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Az alkalmazott primer antitesteket a soroltuk fel. Ezt követően a membránokat 30 percig PBST oldatban mostuk. Másodlagos antitestként torna peroxidáz konjugált kecskében termeltetett nyúl és egér ellenes IgG antitestet (1:1000 hígításban) használtunk, mellyel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat. Az immunreakciók eredményét ECL Western blot meghatározó kit, illetve SuperSignal® West Pico Chemiluminescens Substrate kit segítségével tettük láthatóvá. Az immunoblottok denzitometriás analízisét Intelligent Dark Box és Image Pro Plus 4.5.0 software segítségével végeztük. Ezt követően a több független kísérletből származó normalizált denzitometriás értékeket meghatároztuk és átlag $\pm$ SEM-ként fejeztük ki. Az egyenletes mintafelvétel igazolására membrán strippinget követően háztartási fehérjék elleni antitesttel végeztük el a folyamatot. Ennek során a membránokat 2% SDS-t és 0,1M β -merkaptotetanolt tartalmazó 200 ml 50mM Tris-HCl pufferrel (pH 7,5) kezeltük 65°C-on 1 órán át, majd háztartási fehérjék (β -aktin, citokróm-C) ellenes monoklonális antitestet alkalmaztunk. Az adhézios molekulák és az RNS interferencia ellenőrzésénél β -aktint és citokróm C-t, a MAPK útvonal aktiválásának igazolásánál β -aktint alkalmaztunk. Ezután a korábbi módszer szerint vizualizáltuk az eredményt. A specificitás igazolására, amennyiben rendelkezésre állt, specifikus neutralizáló peptidet alkalmaztunk, egyéb esetekben elsődleges antitest nélkül végeztük a kísérleteket, melyek során immunfestés nem jött létre.

Immuncitokémia

A NHEK-kon végzett immuncitokémiai vizsgálatok során a sejteket 24-well plate-re helyezett steril fedőlemezen szélesztettük és tenyésztettük, majd acetonnal fixáltuk. A membrán permeabilizálása 0,1% Triton-X-100 oldattal történt. PBS oldattal történő mosást követően az aspecifikus kötőhelyeket 5% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk (30 percig, szobahőmérsékleten). Ezt követően a sejteket nyúlban

termeltetett PKC α (1:200 hígításban) és PKC δ (1:200 hígításban) ellenes elsődleges antitesttel egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. PBS-sel történő mosást követően fluoreszcein-izotiocianát konjugált másodlagos antitesttel (1:200 hígításban) kezeltük a sejteket 60 percig szobahőmérsékleten. PBS-sel történő mosás után a sejtmagokat DAPI festés segítségével tettük láthatóvá. A negatív kontrollok esetében az elsődleges antitestet kihagytuk a kísérlet során vagy blokkoló peptidet alkalmaztunk.

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

Kvantitatív “real-time” PCR (Q-PCR)

A PKC izoformák RNS interferenciával történt lecsendesítésének ellenőrzésére, a keratinocita differenciációs markerek és gyulladásos útvonalak aktiválódásának mRNS szintű kimutatására Q-PCR technikát alkalmaztunk, melyet ABI PRISM 7000 Sequence Detection System géppel végeztük 5' nukleáz assay-t használva. A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagenssel izoláltuk, majd 2-3 μ g teljes RNS cDNS-sé történő reverz transzkripcióját végeztük el 15 U AMV reverz transzkriptáz és 0,025 μ g/ μ l random primer felhasználásával. Az így nyert cDNS-ek PCR amplifikációját TaqMan Gene Expression Assay-k segítségével végeztük a TaqMan Universal PCR Master Mix Protokollt követve. Belső kontrollként a β -aktint, illetve a ciklofilin A-t határoztuk meg.

Az életképesség és proliferáció vizsgálata MTT esszével

Az MTT-esszé alapja, hogy a sárga színű 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromidból (MTT) a tetrazólium gyűrű mitokondriális dehidrogenázok általi hasítása révén lila színű formazán kristály keletkezik. A sejteket 96 lyukú lemezekre szélesztettük 10.000 sejt/lyuk denzitásban, majd xilitol és glicerol különböző

koncentrációival, különböző ideig kezeltük őket. Ezt követően a tenyésztő oldat eltávolítása után minden lyukba 100 µl, 0,5 mg/ml végkoncentrációjú PBS-ben oldott MTT oldatot pipettáztunk, majd 37°C-on 2 órán át inkubáltuk a sejteket. Az MTT oldat eltávolítását követően minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” adtunk a formazán kristályok feloldására, majd tizenöt percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket közepesen intenzív ráztatás mellett. A formazán kristályok koncentrációját kolorimetriás úton határoztuk meg 565 nm-en FlexStation 3 készülék segítségével. A mért abszorbancia arányos az élő sejtek számával. Minden kezelést legalább négy ismétléssel végeztünk, az adatokat a kontroll százalékában, átlag±SEM formában adtuk meg.

Az apoptózis vizsgálata (MitoProbe™)

A mitokondriális membránpotenciál csökkenése az apoptózis egyik legkorábbi markere. Kísérleteink során a mitokondriális membránpotenciál vizsgálatát a MitoProbe™ DilC₁(5) Assay Kit segítségével végeztük el. A kísérlet során alkalmazott festék (1,1',3,3,3',3'-hexametil-indodikarbocianin-jodid; a továbbiakban „DilC₁ (5)”) a mitokondriális membránpotenciál függvényében halmozódik fel a sejtek mitokondriumaiban, ezért a korai apoptotikus jeleket mutató sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk. A NHEK-kat 20.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekre majd xilitol és glicerol MMT assay-nél alkalmazott koncentrációival kezeltük őket ugyanazon ideig. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 1:200 arányban hígított DilC₁(5) munkareagenssel (50 µl/lyuk) 30 percig 37°C-on inkubáltuk. PBS-sel történő mosást követően a fluoreszcencia intenzitást 630 nm-es hullámhosszon gerjesztve, 670 nm-en detektálva mértük FlexStation 3 Fluorescence Image MicroPlate Reader készülék (FLIPR) segítségével.

A nekrozis vizsgálata (Sytox Green)

A különféle anyagok sejtnekrozist okozó hatását fluoreszcens SYTOX Green jelöléssel végeztük. A festék csak a nagymértékben sérült plazma-, illetve magmembránon keresztül képes átjutni és a sejtmagban a duplaszálú DNS-hez kötődni. Az ép plazmamembránnal rendelkező, azaz élő sejtekbe nem képes bejutni. A festék zöld fluoreszcencia intenzitásából a tenyészetben lévő citotoxikus folyamatokra következtethetünk. A sejteket 96 lyukú „black well/clear bottom” lemezekre szélesztettük 20.000 sejt/lyuk denzitásban, majd a poliolokkal kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után 1 μM végkoncentrációjú SYTOX Green reagenssel (50 μl /lyuk) 30 percig, 37°C-on inkubáltuk a sejteket. PBS-sel történő mosást követően FlexStation 3 készülék segítségével 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett.

Az SYTOX Green, illetve a DilC₁(5) festékeket egyszerre adtuk a munkaldathoz, így a folyamatokat egyszerre tudtuk vizsgálni ugyanabban a mintában.

Ca²⁺-imaging

A NHEK-kban létrejövő, poliolok okozta esetleges [Ca²⁺]_i változást fluorimetriás Ca²⁺-imaging technikával vizsgáltuk. A kísérletek során Fluo-4 AM jelölést használtunk. A Fluo-4 egy Ca²⁺-érzékeny fluoreszcens festék, ami a hozzákapcsolt „AM” (acetoximetilészter) csoportnak köszönhetően képes bejutni a sejtekbe, ahol nem-specifikus észterázok lehasítják az „AM” részt, csapdába ejtve ezzel a Fluo-4-et a sejt belsejében. A Fluo-4-nek szabad kalcium ion jelenlétében jelentősen megnő a fluoreszcencia intenzitása, amit a mérés során detektálhatunk. A vizsgálat során a sejteket 10.000 sejt/lyuk sűrűségben 96-lyukú „black well/clear bottom” lemezekre szélesztettük. A mérés napján háromszori Hank oldatos mosást követően a sejteket tápoldatban oldott 2 μM Fluo-4 AM festékkel 40 percig 37°C-on inkubáltuk. Ismételt mosás után 1% borjú szérum albumin (BSA) és a nem-specifikus transzporterek gátlására 2,5 mM Probenicid tartalmú Hank oldatban tartottuk a

sejteket 30 percig, 37°C-on. A Fluo-4 AM-rel feltöltött sejtek $[Ca^{2+}]_i$ változását FLIPR készülékkel mértük 494 nm gerjesztési és 516 nm emissziós hullámhosszokon. A kinetikai mérések közben a műszerbe épített pipettorfej segítségével automatikusan adagoltuk a sejtekhez a kezelóanyagokat. Pozitív kontrollként 180 μ M ATP tartalmú oldatot, negatív kontrollként kalcium mentes Hank oldatot alkalmaztunk.

Statisztikai analízis

Az adatokat az IBM SPSS Statistics 19, illetve Origin Pro Plus 6.0 szoftver segítségével, kétoldalú, kétmintás *t*-próbával vizsgáltuk, és a $P < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények

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

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

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

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

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

*Str. granulosum*ban fejeződik ki. Ez alapján megállapítható, hogy a HaCaT keratinociták jól használhatóak az adhézións molekulák kifejeződésének *in vitro* vizsgálatára.

Az adhézións molekulák kifejeződése különféle PKC izoformákat stabilan túltermelő HaCaT keratinocitákban

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

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

Azt találtuk, hogy a *dsg-1* kifejeződése a differenciálódást indukáló PKC δ overexpressziójakor szignifikánsan növekedett, míg a hiperproliferatív PKC ϵ overexpressziója jelentősen csökkentette ezen adhézións molekula expresszióját (a hipoproliferatív PKC α és a hiperproliferatív PKC β nem változtatta meg a *dsg-1* kifejeződését). Az epidermisz alsóbb (proliferáló) rétegeiben *in vivo* elhelyezkedő *dsg-3* (a vártak megfelelően) a differenciálódást fokozó PKC α -t és δ -t overexpresszáló keratinocitákban szignifikánsan alacsony, míg a proliferációt serkentő PKC ϵ -t túltermelő sejtekben szignifikánsan magas expressziós szintet mutatott (a PKC β esetében nem volt különbség a kontrollhoz képest). A *dsg-3*-hoz hasonló *in vivo* eloszlást mutató P-cad szignifikánsan fokozottan fejeződött ki a hiperproliferatív PKC β -t túltermelő sejtekben, míg a

hipoprolifertatív PKC α és δ overexpressziója szignifikánsan csökkentette expresszióját (az ugyancsak hiperproliferatív PKC ϵ izoenzim túltermeltetése nem befolyásolta a P-cad kifejeződését).

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

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

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

A legdrámaibb változást a P-cad vizsgálatok tapasztaltuk. Megállapítottuk, hogy a keratinociták differenciálódását fokozó PKC α és δ kifejeződésének csökkentése szignifikáns mértékben megnövelte, míg a hiperproliferatív PKC β és ϵ down-regulációja szignifikáns mértékben lecsökkentette a P-cad expresszióját.

A szelektív PKC δ inhibitor rottlerin hatása az adhéziónak kifejeződésére HaCaT keratinocitákban

A fenti eredményeket más módszerekkel is megerősítendő farmakológiai módszerekkel folytattuk vizsgálatainkat. Mivel kereskedelmi forgalomban csak a PKC δ -nak van specifikus gátlószere (a többi izoforma specifikusnak vélt gátlószeréről ugyanis kiderült, hogy egyéb enzimeket is gátolnak, így farmakológiai kísérleteinkben a rottlerint alkalmaztuk, mely 5 μ M koncentráció alatt képes a PKC δ szelektív gátlására.

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

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

A poliolok nem befolyásolják az NHEK-k proliferációját és életképességét

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

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

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

Mivel ismert, hogy a NHEK-k differenciálódási programja a konfluencia elérését követően automatikusan beindul (nagy sejtdenzitás indukálta differenciálódás), ezért először prekonfluens NHEK sejtkultúrán Q-PCR technikával vizsgáltuk a poliolok hatását. A

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

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

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

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

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

Tekintettel arra, hogy a keratinociták proliferációs és differenciálódási folyamatainak szabályozásában igen jelentős szerepe van a kalciumnak, kísérleteink következő részében Ca^{2+} -imaging technika alkalmazásával vizsgáltuk, hogy a poliolo – van-e hatása az

intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra. Megállapítottuk, hogy egyik poliol sem befolyásolja a Ca^{2+} koncentrációt, vagyis hatásukat valamilyen más jelátviteli útvonalon fejtik ki.

A poliolok hatása különböző jelátviteli folyamatokra

Amint korábban részleteztük, a PKC izoenzimek központi szerepet játszanak a keratinociták életfolyamatainak szabályozásában. Laboratóriumunk korábban kimutatta, hogy a PKC α és δ izoformák aktivitásának megnövelése fokozza a humán keratinociták differenciálódását; ezért megvizsgáltuk azt is, hogy a poliolok hasonló hatásában részt vesznek-e ezen izoformák. Mivel (ahogy fent részleteztük) a PKC enzimek aktiválódásuk során megváltoztatják szubcelluláris lokalizációjukat (azaz pl. a citoplazmából a magmembránba transzlokálódnak), ezért konfokális mikroszkóp alkalmazásával tanulmányoztuk a poliolok hatását a PKC α és δ sejten belüli elhelyezkedésére.

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

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

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

A poliolok hatása a gyulladásos mediátorok termelődésére és kifejeződésére

A barrier és bőr integritás szempontjából szintén fontos tényező a gyulladásban szerepet játszó fehérjék aktivációja, termelődése. Ezért különböző gyulladás modellekben vizsgáltuk, hogy a xilitol és glicerol hogyan változtatja meg mRNS szinten az inflammatorikus citokinek (IL-ek, $\text{TNF}\alpha$, matrix metalloproteázok, MMP) expresszióját a keratinocitákban. A NHEK-kat a toll-like receptor (TLR) útvonal aktivátoraival kezeltük; az LTA a TLR-2 útvonalat aktiváló Gram pozitív bakteriális endotoxin; a poly-IC a TLR-3 irányában ható, vírusfertőzésnek megfelelő aktivációt indukál; míg a TLR-4 aktivációhoz LPS-t használtunk, ami egy Gram negatív bakteriális endotoxin. Vizsgáltuk ezen anyagok hatását különböző gyulladásos mediátorok (IL- 1α , IL- 1β , IL-6, IL-18, IL-8, $\text{TNF}\alpha$, MMP1 és MMP9) mRNS szintű expressziójára. Elemeztük továbbá, hogy változik-e HLA-DR expresszió, melyről leírták, hogy szerepet játszik a keratinociták immun aktivációjában, a gyulladásban és TLR jelátvitelben. A HLA-DR expresszió vizsgálatokor enyhe donorfüggést tapasztaltunk; látható volt ugyanakkor egy tendencia, hogy a poliolok képesek voltak meggátolni a TLR-indukált HLA-DR expresszió-fokozódást azon esetekben, amikor az útvonal aktiválható volt. A xilitol esetében ez a hatás szignifikánsnak bizonyult. Bár némi donor dependencia az IL- 1α és IL- 1β által közvetített TLR upreguláció esetében is megfigyelhető volt, összességében mind a xilitol, mind a glicerol szignifikánsan csökkentette ezen IL-k kifejeződését. Az IL-6 és IL-18 esetében a poliolok kevésbé bizonyultak hatékonynak, illetve az IL-8 TLR-mediált kifejeződését is csak kismértékben csökkentették. A xilitol azonban meglehetősen effektívnek bizonyult a poly-IC indukálta $\text{TNF}\alpha$ upreguláció kivédésében. MMP1 és MMP9 esetében azt tapasztaltuk, hogy TLR aktivációra adott válasz kevésbé volt kifejezett, de mindkét poliol (főként a xilitol) hatására szignifikáns módon csökkent a TLR-indukált MMP9 expresszió.

Megbeszélés

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

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

megismerése, hiszen célzott, oki kezelésre csak így van mód. Fontos továbbá, hogy amennyiben lehetséges, megelőzzük vagy minél korábbi stádiumban, még az enyhébb eltérések idejében megakadályozzuk, illetve visszafordítsuk a folyamatokat.

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

A PKC rendszer adhéziós molekulák szabályozásában betöltött szerepe

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

a PKC rendszer állt, melyről ismert a differenciálódást és proliferációt szabályozó hatása, illetve, hogy az egyes izoformák egymással ellentétes hatással rendelkeznek.

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

Munkahipotézisünk szerint, ha van a PKC rendszernek szabályozó szerepe a sejtkapcsoló fehérjékre, akkor azok fokozott vagy éppen csökkent expressziója/működésének gátlása megváltoztatja az adhézións molekulák kifejeződését is. Ezért következő kísérletsorozatunkban a PKC izoenzimek adhézións molekulákra gyakorolt szabályozó hatását kívántuk tanulmányozni overexpresszálo és RNS interferenciával lecsendesített PKC izoformákat tartalmazó HaCaT sejtek, illetve a PKC δ specifikus gátlószereként ismert rottlerin alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a differenciálódást elősegítő nPKC δ a

differentiálódási markernek tekinthető *dsg-1* expresszióját fokozta, míg a proliferáló sejteken inkább megtalálható *dsg-3* és *P-cad* szintézisét csökkentette az overexpresszáló sejteken, míg eredményeink mind a specifikus gátlószer és a géncsendesített sejt-kultúrák esetén ezzel ellentétesek voltak. Ezzel szemben *cPKCα* nem volt hatással a *dsg-1* kifejeződésére, mely alapján feltételezhető, hogy bár mindkét izoforma a differentiálódásban játszik szerepet, különböző módon befolyásolják az adhéziós molekulák kifejeződését. A keratinocita proliferációt szabályozó *nPKCε* és *cPKCβ* hatásáról elmondhatjuk, hogy az előbbi a *dsg-1* expresszióját csökkentette, a *dsg-3* és *P-cad*-ét növelte, míg az utóbbi izoenzim csak a *P-cad* kifejeződésére volt hatással, azaz fokozta azt. Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy érdekes módon a *dsg-1* expressziójának szabályozásában kalcium független PKC izoenzimek (*nPKCδ* és ϵ) vesznek részt. Emellett ismert, hogy a kalcium fokozza a *dsg-1* kifejeződését és a keratinocita differentiálódást, mely valószínűleg nem közvetlenül a kalcium dependens PKC-k aktivációján keresztül valósul meg. A *dsg-3* szabályozásában úgy tűnik szintén a kalcium independens *nPKC*-k vesznek részt, de emellett a *cPKCα*-nak is van hatása, melyet támogat Osada és mtsainak eredménye, mely szerint *pemphigus vulgaris*-ban szenvedő betegekből izolált *dsg-3* elleni autoantitest a *cPKCα* és *nPKCδ* aktivációját okozta. A *P-cad*-t mind a klasszikus és novel PKC párok (*cPKCα/nPKCδ* és *cPKCβ/nPKCε*) befolyásolhatják, egymással ellentétes módon.

Az irodalomban több adat található arról, hogy a PKC rendszernek szerepe van a dezmoszómák kialakulásában, azonban eddig nem volt ismert, hogy az egyes PKC izoenzimek külön-külön hogyan befolyásolják azt. Kimura és mtsai kimutatták, hogy az (izoforma függő) PKC aktiváció/gátlás megváltoztatja a kalcium-independens, hiper-adhézív dezmoszómák kialakulását, mely ezáltal mechanikai hatásra ellenállóbb epidermiszt tesz lehetővé. Irodalmi adatok alapján a *Pemphigus vulgaris*-IgG hatására több PKC izoforma (PKC α és δ) is aktiválódik. Emellett Sanchez-Carpintero és mtsai a PKC gátló

bisindolilmaleimid alkalmazásával meg tudták akadályozni a *pemphigus vulgaris* IgG okozta hólyagképződést újszülött egerekben. Leírták, hogy a PKC gátlása stabilizálja a dezmoszómában a *dsg-3*-at, illetve gátlószerek (Gö-6976- cPKC gátló, Safingol-PKC α gátló) hatására a PV-IgG *dsg-3* elimináló hatása kivédhető volt. Emellett az is ismert, hogy a dezmozoplakin foszforilációjában a PKC α -nak szerepe van, gátlása stabilizálja a dezmoszómát, gátolja annak szétbomlását. Saját eredményeink alapján a PKC izoenzimek attól függően, hogy melyik izoformáról beszélünk vannak hatással a *Dsg-3* kifejeződésére, olyan közleményt azonban nem találtam, mely izoforma függően vizsgálta volna hatásukat. Más jelátviteli útvonalak patofiziológiai szerepe is ismert *pemphigus vulgaris*ban, úgymint a p38, MAPK, GTPáz családba tartozó Rho, a c-myc és a foszfolipáz C szignalizációnak, azonban ezek pontos szerepe még tisztázásra vár. Egu és mtsai a *dsg-1* kifejeződését és a hólyagképződést vizsgálták PKC és Erk útvonal szabályozó hatásának tekintetében PV-IgG jelenlétében. A PKC nem szelektív gátlószerét (Bim-X) alkalmazva nem észleltek változást sem a hólyagképződés megakadályozásában, sem a *dsg-1* depléciójának csökkentésében, míg az Erk gátlásával sikerült ezeket az eltéréseket csökkenteni. A PKC útvonal aktiválásának sikertelensége háttérben felmerül, hogy a nem szelektív PKC inhibitor egymással ellentétes hatású PKC izoenzimet gátolt, melynek eredményeként “nettó” hatástalanságot tapasztaltak. Izoforma specifikus hatást csak a PKC α esetében vizsgáltak, a többi izoenzimiről nincs adat, mely a szabályozó folyamatok felderítése céljából elengedhetetlen lenne. Eredményeink jó alapot adhatnak további olyan kutatásoknak, melyek az *in vivo* talált összefüggések alapján klinikumban használható terápiás lehetőségek kifejlesztésére irányulnak.

Poliolok hatása keratinocita életfolyamatokat szabályozó jelátviteli útvonalakra

A poliolok olyan cukoralkohol molekulák, melyek több hidroxil csoportot tartalmaznak. A glicerol (glicerin) számos gyógyászatban használt készítményben

megtalálható. Ismert antimikrobiális hatása, melyet sebek kezelésénél használnak ki hidrogél tartalmú kötések formájában. Vízmegkötő tulajdonsága miatt hidratálóként kozmetikumokban, bőrgyógyászati externákban használt, édes íze miatt szirupok alkotóeleme, hiperozmotikus tulajdonsága révén végbélkúp formájában laxatívumként alkalmazható. Nem ennyire elterjedt még az alkalmazása a másik, érdeklődésünk középpontjában lévő poliolnak, a xilitolnak. Legtöbbünknek a xilitol hallatán cukorhelyettesítőként történő alkalmazása jut eszébe. Emellett azonban terjed bőrgyógyászati alkalmazása is elsősorban hidratáló krémek alkotóelemeként (pl. Aquaxyl, Xylinep). Számos kutatás történt a glicerol és xilitol keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Kimutatták, hogy fiziko-kémiai hatásuk révén a barrier diszfunkció helyreállításában játszanak szerepet. Egér modellben igazolták, hogy a nátrium-lauril-szulfát irritáns, gyulladáskeltő hatását ki tudták védeni, melyet a TEWL csökkenése, IL-1 β és TNF- α mRNS szintű csökkenése, fehérvérsejtek infiltrációjának csökkenése, valamint az epidermisz vastagságának megtartása igazolt. Más munkacsoportok AQP3 knock down egereken vizsgálták a glicerol hatását az epidermális barrierre. Az aquaporin 3 víz/glicerol transzporterként ismert az epidermiszben. Hara és mtsai az találták, hogy ezekben az egerekben a topikális, illetve orálisan alkalmazott glicerol javította a SC hidráltságát, a TEWL csökkent. Ugyanezen hatás nem volt kimutatható egyéb poliolok (xilitol, eritritol, propanediol) alkalmazása esetén. Mások ugyanilyen egér modellben a bél áteresztő képességének fokozódását, intesztinális epiteliális sejteken a klaudin-1 és okkludin expressziójának csökkenését találták, mely alapján feltételezték a glicerol barrier szabályozó szerepét. Humán kutatások is történtek a két poliol együttes alkalmazására. Két hét topikális alkalmazás után megvizsgálva a bőr különböző hidráltságai és morfológiai paramétereit (*Str corneum* vastagság, TEWL, érdesség, epidermisz vastagság, dermális papilla echogenitás), illetve a filaggrin jelenlétét az epidermiszben megállapították, hogy a fenti paraméterek a két

anyag együttes topikális alkalmazása esetén jelentős javulást mutattak. Ismert, hogy az irritatív kontakt dermatitis és száraz bőr szindrómákban patogenetikai szereppel bíró ozmotikus stressz hatására a keratinociták gyulladásos mediátorokat termelnek. Igazolódott, hogy mind a xilitol, mind glicerol ezt a gyulladásos választ képes csökkenteni. Kimutatták továbbá, hogy xilitol és farnesol tartalmú krém együttes alkalmazása atópiás dermatisben szendvedő betegekben csökkentette az AD-ben patogenetikai szereppel bíró *S. aureus* kolonizációt, emellett csökkentette a TEWL mértékét, illetve fokozta a SC hidráltságát mutató konduktanciát.

Kevésbé ismert azonban, hogy ezek a hatások milyen jelátviteli folyamatokon keresztül valósulnak meg. Kísérleteink során elsőként igazoltuk, hogy a két poliol nem befolyásolja a keratinocita életfolyamatokat az általunk alkalmazott dózisokban (0,27% glicerol, 0,45% xilitol). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a NHEK-on bizonyos differenciálódási markerek (filaggrin, lorikrin, okkludin) mRNS szintű kifejeződése fokozódik proliferáló és differenciálódó kultúrákban egyaránt. Ismert, hogy a kalcium differenciációt szabályozó szereppel bír, azonban a glicerol és xilitol ezt a hatást nem az intracelluláris kalcium koncentráció fokozásával érte el. Annak kiderítése érdekében, hogy a differenciálódási markerek expressziójának fokozódása hogyan jöhetett létre, egyéb jelátviteli útvonalakat vizsgáltunk meg, mint a MAPK/Erk és PKC útvonalakat, melyekről szintén kimutatták proliferáció-differenciálódást szabályozó szerepét. Azt tapasztaltuk, hogy hatásukra aktiválódik a MAPK/Erk útvonal, illetve a xilitol PKC δ aktivációt eredményez. Ezen eredményünk összefüggést mutat azzal, hogy a calcium-dependens PKC α -ra nem volt hatása az általunk vizsgált anyagoknak. Adataink emellett azt is sugallják, hogy a keratinocita differenciációban igazoltan szerepet játszó PKC δ szignalizáción keresztül alakulhat ki a hatás. Igazoltuk továbbá, hogy a xilitol és glicerol különböző anti-inflammatórikus hatással is rendelkezik. Mindkét anyag képes volt az immunaktivációban jelentős HLA-DR up-

regulációjának kivédésére a TLR2 és 3 útvonalak stimulációja során. Kimutattuk, hogy míg a glicerol főként a TLR3 útvonalat befolyásolja, addig a xilitolnak mindhárom (TLR2, 3, 4) gyulladás modellben volt hatása a citokinek kifejeződésére. Azt azonban szükséges megjegyeznünk, hogy a hatás jelentős donorfüggést mutatott, illetve, hogy az általunk tapasztalt a mRNS szintű változásokat további, fehérje szintű vizsgálatokkal kell kiegészíteni, illetve validálni.

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

Összefoglalás

Bőrünk integritása nélkülözhetetlen a környezetünkben lévő ágensek elleni védekezésben. Az integritás fenntartásának egyik fontos tényezőjét jelentik a sejtkapcsoló apparátusok, melyeket alkotó fehérjék *in vivo* különböző eloszlást mutatnak az epidermisz rétegeiben, vagyis a differenciáltsági állapottól függően. Az adhéziós molekulák közül a *pemphigus vulgaris* és *foliaceus* patogenezisében szerepet játszó *dsg-1*, *3* és *P-cad* expresszióját befolyásoló tényezőket vizsgáltuk. Annak fényében, hogy a PKC izoenzim család szabályozó funkciót lát el a sejtek proliferációjában és differenciálódásában és ezen szabályozó funkció jól vizsgálható a humán epidermális HaCaT keratinocita sejtvonalban, logikusnak tűnt az egyes PKC izoenzimek hatásának vizsgálata az adhéziós molekulák kifejeződésére, melyet overexpresszió, RNS interferencia és gátlószer, a rottlerin alkalmazásával végeztük. Kísérletes eredményeink arra utalnak, hogy a két Ca-independens ‘novel’ nPKC izoforma a differenciáltabb sejteken megtalálható *dsg1*-et egymással ellentétes módon szabályozza, azaz a differenciálódást segítő nPKC δ fokozta, míg a proliferációért felelős ϵ csökkentette a *dsg-1* expresszióját. A differenciálatlanabb sejteken kifejeződő *dsg-3* expresszióját ezzel szemben az nPKC δ csökkentette, míg az nPKC ϵ fokozta; a differenciálódást indukáló a Ca-dependens ‘konvenciális’ PKC α az nPKC δ -hoz hasonlóan viselkedett ebből a szempontból. A proliferáló keratinocitákon jelenlévő *P-cad* esetében valamennyi általunk vizsgált PKC izoforma szabályozó szerepe érvényesült, egymással ellenétes módon (cPKC α / nPKC δ gátolta, míg cPKC β / nPKC ϵ fokozta az expressziót). Kísérleteink során kimutattuk tehát, hogy a PKC izoenzimek részt vesznek a dezmoszómákat és adherens jukciókat felépítő adhéziós molekulák kifejeződésének szabályozásában.

Az integritás fenntartásának egy másik jelentős eleme a hidrálttság biztosítása, melyet két lokálisan is alkalmazható poliol, a glicerol és xilitol segíthet. Irodalmi adatok már

korábban felvetették, hogy a hidráltság biztosítása mellett ezen poliolok jelátviteli folyamatokat is befolyásolhatnak; így kísérleteink másik részében ezt vizsgáltuk. A poliolokat nem toxikus dózisban (xilitol: 0,0045%-0,45%; glicerol: 0,0027%-0,27%) alkalmazva vizsgáltuk a differenciálódási markerek kifejeződésére gyakorolt hatásukat. Azt találtuk, hogy a filaggrin, lorikrin, involucrin és okkludin expresszióját mindkét anyag fokozta. Ezen hatás mindkét poliol esetében a MAPK útvonalon, míg a xilitol esetében a nPKC δ addicionális aktivációján keresztül valósult meg. Gyulladás modellekben az is kimutatható volt, hogy mind a glicerol, mind a xilitol különféle citokinek expresszióját befolyásolva gyulladáscsökkentő hatást is kifejtett. Mindezen eredményeink azt sugallják, hogy a glicerol és a xilitol hidratáló hatásuk mellett i) befolyásolják a barrier helyreállítás szempontjából fontos fehérjék termelését és ii) a gyulladás csökkentését is elő tudják segíteni különböző jelátviteli útvonalak aktiválása révén. Mindezek mellett elméleti megfontolások alapján az is feltételezhető, hogy együttes alkalmazásuk még hatékonyabban javítja a bőr barrier funkcióját.

Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Páyer Edit

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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





14. Griger, Z., **Páyer, E.**, Kovács, I., Tóth, I. B., Kovács, L., Sipka, S., Bíró, T.: Protein kinase C-beta and -delta isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells.
J. Mol. Med. 85 (9), 1031-1042, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-007-0209-y>
IF: 4.82

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,259

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

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

Debrecen, 2021.08.30.

