

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Béke Gabriella

Témavezető: Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM
Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2020

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

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

Írta: Béke Gabriella
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea, 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, Klinikai Központ, Belgyógyászati Klinika C Épület Tárgyaló

Dátum: 2017. 06. 26.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bata Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Tóth István Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bata Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Tóth István Balázs, PhD

Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora

Dr. Benkő Szilvia, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2020. október. 19., 14:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a buzas@med.unideb.hu email címen a vitát megelőző nap (2020. október 18.) 12 óráig. A határidő lejárátát követően technikai okok miatt nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

BEVEZETÉS

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

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

CÉLKITŰZÉSEK

Kérdésselvetés No. 1: Homogén-e a bőr immunrendszere a topográfiaailag eltérő bőrterületeken?

Az utóbbi évek kutatásai bebizonyították, hogy a mikrobióta a topográfiaailag eltérő bőrterületeken jellegzetes diverzitást mutat, azaz nem egységes az egyes bőrrégiókban. Így például a zsíros (faggyúmirigyben gazdag bőr, pl. arc) bőrterületeken a *Propionibacterium* és a *Staphylococci* fajok, a nedves (apokrin mirigyben gazdag bőr pl. lágyékhajlat) területeken a *Corynebacteria* és a *Staphylococci* specíesek vannak jelen, a száraz (mirigyben szegény bőr, pl. lábszár) bőrrégiókra pedig az *Actinobacteria*, *Proteobacteria* és *Bacteroides* egyes fajainak jelenléte jellemző. Viszont arra vonatkozó vizsgálatok mindezidáig még nem zajlottak, hogy a

mikrobióta és a környezete által mutatott bőr regionális eltéréseket követi-e a bőr immuntopográfiai változékonysága.

Ezért munkacsoportunk több évvel ezelőtt egy olyan széleskörű vizsgálsorozatot kezdett el, melynek célja a bőr immunrendszer (Skin Immune System, SIS) tanulmányozása különféle bőrrégiókban egészséges körülmények között, valamint egyes bőrbetegségekben (pl. atópiás dermatitisz [AD], rosacea, hidradenitis suppurativa). Ezen kísérletek részeként PhD munkám során a faggyúmirigyben szegény („száraz” – sebaceous gland poor, SGP) és faggyúmirigyben gazdag („zsíros” – sebaceous gland rich, SGR) egészséges bőrrégiók immunmiliójének összehasonlító elemzését végeztem el.

Kérdésvetés No. 2: Mik a vérben keringő DC-k jellemzői AD-ben?

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

Korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy az AD-s és az egészséges kontroll vér pre-DC-inek T-sejt-polarizáló citokin termelése között különbség van. Ezen kísérletsorozatot folytatva, PhD munkám második felében, a sejtek részletes fenotípusos jellemzését végeztük el, különös tekintettel aktiválódási és érési szakaszaikra, valamint kemokin termelésükre. Ezen túlmenően megvizsgáltuk azt is, hogy az AD-s vér pre-DC-i különböznek-e az egészséges egyének *de novo* mieloid pre-DC-itől, illetve a *Staphylococcus* enterotoxin B-vel (SEB) és TSLP-vel stimulált (így egy AD-s mikrokörnyezetet imitáló) pre-DC-iktől.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati anyagok gyűjtése és mintaelőkészítés

Bőrbiopsziák

A teljes vastagságú bőrbiopsziákat (0.5-1 cm²) 20 plasztikai műtéten átesett donorok normál bőrterületeiről vettük (10-et SGP, 10-et pedig SGR bőrterületekről). A műtéti beavatkozások előtt a donorok a Helsinki Deklaráció irányelveinek megfelelően, írásbeli hozzájárulásukat adták mintáiknak kutatási célból történő felhasználásához. A tanulmányt a Debreceni Egyetem Helyi Etikai Bizottsága hagyta jóvá. Az összes biopsziát 2 részre vágtuk. A minták egyik felét immunhisztokémiai vizsgálatok végzése céljából formalinos fixálást követően paraffinba ágyztuk, másik felét RNAlater nevű reagensbe helyeztük és az RNS izolálás megkezdéséig - 70°C-on tároltuk. A Hematoxylin-Eosin festést követően a mintákat a faggyúmirigyek száma alapján 2 csoportba soroltuk. A szövettani metszeteket a fénymikroszkóp 10x-es nagyításán vizsgáltuk, és a mintát SGP-ként definiáltuk, ha az egységnyi területre eső faggyúmirigyek száma $n \leq 1$, és SGR-ként, ha $n \geq 3$ volt.

Vérminták

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

RNS izolálás, Reverz Transzkripció és QRT-PCR

Az összes mintát a bőr alatti zsírszövet eltávolítását követően totál RNS-t izoláltunk a humán bőrmintákból Tissue Lyser készülékkel. Az RNS-ek koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg. Az RNS minták minőségét Dr. Póliska Szilárd, a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának kutatási munkatársa ellenőrizte Agilent 2100 BioAnalyser használatával. A reverz transzkripció kísérletek kivitelezéséhez minden esetben 1 µg totál RNS-t írtunk át komplementer DNS-sé (cDNS) High Capacity cDNA Archive Kit-et használva. Ezt megelőzően a mintákat DNáz I enzim (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kezelésnek vetettük alá, kiküszöbölendő az esetleges genomiális DNS szennyeződést. A QRT-PCR mérések során a reakciókat triplikátumokban végeztük, és a gyártó által tervezett FAM-MGB assay-eket, valamint TaqMan® Gene Expression Master Mix-et alkalmaztunk. Az összes reakciót egy LightCycler® 480 System berendezésen futtattuk le. A célgének relatív mRNS szintjeit az összehasonlító $\Delta\Delta CT$ módszerrel határoztuk meg, a normalizálás minden esetben a PPIA mRNS expressziójára történt.

RNS szekvenálás és analízis

A szekvenáláshoz használt cDNS könyvtár előállítására 1 µg teljes RNS-ből TruSeq RNA Sample Preparation Kit segítségével történt a gyártó által meghatározott protokoll szerint. A cDNS fragment méret eloszlások és a molaritás ellenőrzése Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip műszerrel történt. A szekvenálás előtt az RNS-szekvencia könyvtárakat 10 nM-os koncentrációra hígítottuk, majd az 5 könyvtárból egy mix készült. A szekvenálás egy Illumina HiScan SQ készüléken zajlott, egyirányú 50bp-os szekvencia leolvasással (ez mintánként 16-18 millió olvasat létrejöttét eredményezte). A minőségellenőrzést és az ún. de-multiplexelést CASAVA szoftverrel végeztük. Ezután a TopHat és Cufflinks algoritmusok alkalmazásával a szekvenált adatok ráillesztése a Human Genom v19-re, valamint a bam fájlok legenerálása is megtörtént. A további statisztikai analízisekhez a StrandNGS szoftvert használtuk, míg a bam fájlok importálása és normalizálása a DESeq szoftver használatával valósult meg. A statisztikailag szignifikáns génexpressziós mintázatok azonosítása a felállított kondíciók között nem-paraméteres Wilcoxon Mann-Whitney teszttel történt. A könyvtárkészítés, a szekvenálás és az azt követő adatanalízis a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában Dr. Póliska Szilárd közreműködésével valósult meg. Az RNS szekvencia adatokat a Sequence Read Archive (SRA) adatbázisba

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) töltöttük; az adatok az SRP126212 referencia szám alatt érhetők el.

Útvonalanalízis

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

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

Immunhisztokémia (IHC) és rutin festések

Az immunhisztokémiai vizsgálatokra a paraffinba ágyazott szövetekből metszeteket készítettünk, majd azokat deparaffináltuk. A deparaffinálási lépést követően a metszeteket rehidráltuk, majd hőindukált antigénfeltárást végeztünk, és az endogén peroxidázok gátlására 10 perces 3%-os H₂O₂-dal történő előkezelést alkalmaztunk. A festések során használt elsődleges anti-humán antitesteket, majd HRP-konjugált anti-egér/anti-nyúl másodlagos antitesteket alkalmaztunk. Az immunjelek előhívására Vector® VIP és ImmPACT™ NovaRED™ Kit-et használtunk. Az adott fehérje detektálása minden metszeten párhuzamosan, egy időben zajlott, hogy a fehérjeszintek összehasonlíthatóak legyenek. Minden festés esetében

használtunk pozitív, negatív és izotípus kontrollokat a megfelelő normalizálás érdekében. A mintákon Hematoxylin-Eosin festéseket is végeztünk. A faggyúmirigyek számának meghatározása pathológus által történt.

Whole-slide imaging

A szövettani metszetek digitalizálását egy Zeiss sima-apokromatikus objektívvel és Hitachi 3CCD progresszív scan color kamerával felszerelt Panoramic SCAN digitális metszet szkennelővel végeztük el. Az immunfestések kiértékelésére a Panoramic Viewer 1.15.2 szoftver (3DHistech) HistoQuant és NuclearQuant applikációját használtuk. Ezt követően kiválasztottuk a vizsgálni kívánt területeket (Regions of interest (ROI)) (n=20/metszet), majd a szoftver segítségével lemértük az összerületet (Field area [FA (mm²)]) és a maszkolt területet (Mask area [MA (mm²)]). Az MA/FA értékeket minden ROI esetében kiszámoltuk. Az egyes fehérjék mennyiségének meghatározása két független vizsgáló által történt a Panoramic Viewer szoftverrel.

Sejtizolálás és sejtenyésztés

A Perifériális Vér Mononukleáris Sejtek (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) kinyerése az egészséges kontrollok és az AD-s betegek perifériás véréből Ficoll-Paque Plus gradiens centrifugálással történt. A PBMC-kből ezt követően CD1c⁺ (BDCA1⁺) Dendritic Cell Isolation Kit segítségével a gyártó által előírt utasításokat követve CD1c⁺ mieloid DC-eket izoláltunk. A kiszeparált DC-eket megfelelő médiumban tenyésztettük 48 órán keresztül, azok stimulálását 30 ng/ml TSLP és 100 ng/ml SEB jelenlétében végeztük. A DC-eket 96-lyukú sejtenyésztő edényekben tartottuk fent, felülszójukat kemokin vizsgálatokra használtuk fel.

A DC-k fenotípusának karakterizálása

Az inkubációt követően a dendritikus sejteket összegyűjtöttük, FACS pufferben [1% marha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS] vettük fel, majd szétosztottuk egy 96-lyukú plate 4 lyukába (1-et negatív kontrollként, 1-et izotípus kontrollként, 2-őt pedig a festésre felhasználva). A sejteket a következő festékekkel-jelölt sejtfelszíni marker specifikus antitestekkel festettük meg: APC-Cy7 anti-humán CD1c és PerCP-Cy5.5 anti-humán CD11c (a CD1c⁺/CD11c⁺ azonosítására), APC anti-humán CD1a és APC anti-humán CD207 (az LC kizárására), PE anti-humán FcεRI, APC-Cy7 anti-humán CD206, PerCP-Cy5.5 anti-humán CD83 and PE anti-humán CD86 (a sejtek jellegzetességeinek, érési és aktivációs állapotának vizsgálatára). A festések során alkalmazott izotípus kontrollok a következők voltak: PE egér

IgG2b, κ izotípus kontroll, APC egér IgG1, κ izotípus kontroll, PerCP/Cy5.5 egér IgG1, κ izotípus kontroll, APC/Cy7 egér IgG1, κ izotípus kontroll.

Áramlási citometria

Az áramlási citometriás vizsgálatokat 96-lyukú sejttenyésztő edényben, fixált sejteken végeztük egy BD FACS Array készüléken. A sejtek detektálásához, valamint a szennyeződések és az összezsapzódott sejtek kizárásához Forward (FSC) és Side Light Scatter (SSC) alkalmaztunk. Az adott fluoreszcens jeleket megfelelő hullámhosszú gerjesztés és szűrést követően detektáltuk. Az exportált adatok kiértékelése FCS Express 4 Flow Cytometry szoftver segítségével történt.

Kemokin Array vizsgálatok

A kemokin termelést a Proteome Profiler Human Chemokine Array (R&D Systems, Abingdon, UK) segítségével határoztuk meg a gyártó által előírt protokollt követve az előzőleg frissen izolált stimulálatlan sejtek felülűszójából.

ELISArray és konvencionális ELISA vizsgálatok

A CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, CCL17, CCL22 kemokinek felszabadulását 5 AD-s és 5 egészséges kontroll mintából vizsgáltuk a Human Common Chemokines Multi-Analyte ELISArray kit segítségével a gyártói utasításokat követve. Az AD pathogenezisében fontos szerepet játszó CCL17, CCL18 és CCL22 kemokinek mennyiségének pontos meghatározását a CCL17/TARC, a CCL18/PARC és a CCL22/MDC Quantikine ELISA kitekkel végeztük el a gyártó által előírt módon. A konvencionális ELISA kísérletek esetében a stimulálatlan és stimulált sejtek felülűszóit egyaránt vizsgáltuk.

Statisztikai analízis

Bőrbiopsziákkal végzett kísérletek esetében

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

Vérmintákkal végzett kísérletek esetében

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

EREDMÉNYEK

I. Különböző egészséges bőrterületek immuntopográfiai jellemzése

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

I.1.1. RNS szekvenálás

Ahhoz, hogy mélyrehatóan analizáljuk az SGR és SGP bőrrégiók közötti eltéréseket, RNS szekvenálást hajtottunk végre 6 SGR és 7 SGP donor teljes vastagságú bőrbiopsziáinak lizátumából izolált RNS-ekből. Ezt követően ún. hőterképet (heatmap) és Principal Component Analysis (PCA) ábrákat készítettünk a StrandNGS szoftvert alkalmazva. A szoftver által generált hőterkép és PCA alapján a két régió génexpressziós mintázata egyértelműen elkülöníthető volt egymástól. Fontos emellett hangsúlyozni, hogy a hőterkép és PCA ábrák azt is jelezték, hogy egy adott csoporton (SGP vagy SGR) belül a csoporthoz tartozó minták eredetüktől (azaz a test pontos bőrrégiójától) függetlenül hasonló génexpressziós profilt mutatnak.

Az SGR és SGP minták génextpressziós profiljának eltéréseit a Mann-Whitney nem-paraméteres statisztikai teszttel ($p < 0.05$) határoztuk meg. Ezzel az elemzéssel 1083 gént azonosítottunk, melyek statisztikailag szignifikánsan eltérő kifejeződést mutattak az SGR bőrterületen az SGP bőrterülethez viszonyítva. Ezekből 672 gén magasabb, míg 411 gén alacsonyabb expressziót mutatott az SGR szövetben.

1.1.2. Ingenuity Pathway Analízis

A fent említett 1083 gént az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftvert használva 2 különböző típusú funkcionális, standard, nem-restriktív útvonal analízisnek vetettük. Először a nem-restriktív kanonikus útvonal analízist (***canonical pathway analysis***) végeztük el, amely 40, statisztikailag szignifikáns mértékben „feldúsult” (azaz az SGR mintákban az SGP régiókhöz képest különböző mértékben megjelenő) útvonalat azonosított. A 40 kanonikus útvonalból a szignifikancia sorrendben megjelenő első 14 a lipid metabolizmushoz volt köthető (például LXR/RXR aktiváció, FXR/RXR aktiváció, Sztearát bioszintézis I., stb.), mely eredmény, a 2 bőrterület definíciószerű anatómiai különbségei (a faggyúmirigyek jelenléte vagy hiánya) miatt, nem volt meglepő. Az első szignifikáns, kifejezetten a bőr immunrendszeréhez tartozó útvonal az IL-17-kapcsolt jelpálya volt; emellett egyetlen, a bőr immunműködéséhez részben kapcsolódó útvonal az „LPS/IL-1 által mediált RXR funkciógátlás” volt.

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

1.1.3. További analízis és validációs stratégiák

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

(validálás) – egy megnövelt mintaszámot (SGP: n=10, SGR: n=10) felhasználva. Mivel szerettük volna megtudni, hogy a 2 mRNS-alapú módszer (RNS szekvenálás és QRT-PCR) eredményei mutatnak-e hasonlóságot a kiválasztott gének expressziós szintjeinek változását és annak irányultságát illetően, ezért a QRT-PCR technikával detektált mRNS transzkript szinteket összehasonlítottuk az RNS szekvenálás által szolgáltatott adatokkal. Végezetül, hogy további bizonyítékokat szolgáltatassunk a két bőrrégió kifejeződésbeli eltéréseiről, bizonyos molekulákat IHC módszerrel fehérjeszinten is megvizsgáltunk, egy képalkotó elemzéssel összekötve.

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

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

Elsőként az antibakteriális hatású és alarmin molekulaként funkcionáló antimikrobiális peptidek (AMP) expresszióját vizsgáltuk. QRT-PCR módszerrel az S100A7 (psoriasin), S100A8, S100A9, humán β -defenzin-2 [hBD-2 (DEFB4B)] és lipocalin (LCN2) gének expressziója magas és szignifikánsan emelkedettnek adódott az SGR bőrben, miközben ezen molekulák gyenge kifejeződést mutattak az SGP szövetben. Az RNS szekvenálást alkalmazva az összes AMP szintje emelkedett volt az SGR bőrben, viszont szignifikáns különbséget csak az S100A8 és S100A9 esetében mértünk. A CAMP expressziója nagyon alacsony volt mindkét bőrterület mintáit tekintve, bár egy enyhén emelkedett tendencia mutatkozott az SGR bőrben.

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

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

Ezt követően az immunsejtek (KC-k, DC-k, Mf-ek) által termelt bizonyos kemokinek kifejeződését határoztuk meg. QRT-PCR módszerrel a CCL2, CCL19 és CCL20 molekulák expressziója jól detektálható, míg a CCL3, a CCL23 és a CCL24 szintje nagyon alacsony volt az SGP bőrben. Fontos eredményünk volt, hogy, ezt a módszert alkalmazva, az összes vizsgált

kemokin szintjét szignifikánsan nagyobb mennyiség mértük az SGR bőrterületen. Ehhez hasonlóan ezen kemokinek jelentős – és a CCL2, CCL3, CCL19 és a CCL23 esetében statisztikailag szignifikánsan magasabb – expresszióját tudtuk igazolni az RNS szekvenálási vizsgálattal is SGR bőrben. A CCL2 és CCL20 molekulákat fehérjeszinten is vizsgáltuk IHC-val. Az SGR bőrterületen a CCL2 nagy mennyiségben fejeződött ki a faggyúmirigyekben; megállapítottuk emellett, hogy habár az epidermális CCL2 pozitivitás mindkét bőrrégióban nagyon gyenge volt, a képalkotó elemzést elvégezve szignifikánsan nagyobb expressziót mértünk az SGR bőrben.

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

Az RNS szekvenálás a vizsgált receptorok (TLR2, TLR3, TLR4 és NLRP3) esetén hasonló génexpressziós szinteket azonosított a két mintacsoportban. Az egyetlen kivétel a TLR3 volt, amely szignifikánsan emelkedett expressziót mutatott az SGR bőrben. QRT-PCR mérések is hasonló adatokat szolgáltatottak; azaz a fent említett receptorok expressziójában nem volt szignifikáns különbség a 2 bőrterület között.

A következő lépésben a pro-inflammatorikus citokinek, nevezetesen az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-33 és TNF- α mRNS szintjét vizsgáltuk. A szekvenálási adatok szerint hasonló mértékű génkifejeződéssel volt jellemezhető a két bőrrégió. Ehhez hasonlóan a QRT-PCR módszerrel sem mutatott ki szignifikáns különbségeket ezen molekulák mRNS szintjében az IL-1 β kivételével, ami szignifikánsan nagyobb expressziót mutatott az SGR mintákban.

1.3. A barrier molekulák kifejeződése különbözik az SGR és SGP bőrben

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

epidermisz granuláris rétegeiben és a SC alatt. A KRT17 szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen az SGR bőrben az SGP-hez viszonyítva. Az SGP mintákban az epidermisz felső sejtsejtjeiben, míg az SGR bőrmintákban a felső sejtsejtjeiben erősebb pozitívítással, de az egész epidermiszben detektáltuk a KRT17-specifikus immunreaktivitást.

I.4. Az SGR bőrterület T_h17 /IL-17 dominanciával jellemezhető

I.4.1. A T_h1 , T_h2 és T_h22 sejtekhez köthető molekulák expressziója igen alacsony mindkét bőrrégióban

Következő lépésként az egyes T sejt alpopulációk érési és jelátviteli citokinjeinek, valamint TF-ainak kifejeződését hasonlítottuk össze az SGR és SGP bőrmintákban. A T_h1 (IL-12B, TBX21, IFN- γ , TNF- α), a T_h2 (IL-13, GATA3) és a T_h22 (AHR, IL-22) sejtekre jellemző molekulák génexpressziós szintjében nem volt különbség a 2 bőrrégióban. QRT-PCR-rel az IL-12B és az IL-22 egyik bőrterületről származó minták esetében sem volt detektálható, miközben az aryl hydrocarbon receptor (AHR) expressziója szignifikánsan nagyobb volt az SGR bőrben. Az immunfestéssel emellett szignifikánsan nagyobb mennyiségű AHR fehérjét tudtunk kimutatni az SGR mintákban; az AHR-t főként a KC-k expresszálták (azok sejtmagjai festődtek), de citoplazmatikus festődést is detektáltunk az epidermiszben. Emellett az dermisz néhány sejtje is mutatott AHR-specifikus immunpozitivitást.

I.4.2. A T_h17 sejt-specifikus funkciót jelző molekulák nagyobb expressziót mutattak az SGR bőrben

Habár az RNS szekvenálási adatok önmagukban nem tártak fel szignifikáns különbségeket a T_h17 sejtek specifikus funkcióihoz köthető molekulák [IL-1 β , IL-6, RORC, IL-23A, IL-17A, CCL20 és Transforming Growth Factor béta (TGF- β)] kifejeződésében, a fentebb bemutatott mélyreható bioinformatikai analízisek (IPA) statisztikailag szignifikáns mértékben „feldúsult” biológiai mechanizmusként azonosították a T_h17 útvonalat. Ezért a T_h17 sejtekhez köthető molekulák kifejeződését tovább vizsgáltuk QRT-PCR-rel. Korábbi eredményeinkkel tökéletes összhangban az IL-17A szignifikánsan nagyobb expresszióját detektáltuk az SGR bőrben (az expressziós különbség a RORC és az IL-10 esetében nem volt szignifikáns). Emellett megállapítottuk, hogy az IL-1 β , IL-23A és CCL20 specifikus mRNS-ek szintjei ugyancsak jelentősen és szignifikánsan ($p < 0.05$) megemelkedtek az SGR bőrterületeken az SGP-hez képest (az IL-6 esetében csak tendenciaszerűen magasabb expressziót tudtunk kimutatni).

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

Végső lépésként a jelen és előző munkánk során azonosított, szignifikánsan eltérő gén (RNS szekvenálás, QRT-PCR) és fehérje (IHC) szintű kifejeződést mutató, az immunrendszerhez kapcsolódó molekulák további mélyreható bioinformatikai útvonal analízisét végeztük el. A fókuszált útvonal elemzés alkalmazásával meg tudtuk erősíteni az IPA analízis eredményét, miszerint az IL-17 útvonal volt az egyik legszignifikánsabban „feldúsult” biológiai útvonal. Emellett a gének nagy többsége olyan folyamatokban jelent meg, melyeket szintén sikerült a szignifikánsan „feldúsult” útvonalak között azonosítani (citokin aktivitás, citokin-citokin receptor aktivitás, külső stimulusra adott válasz pozitív regulációja, leukocita kemotaxis, stb.). Ezek az adatok együttesen azt sugallják, hogy az emberi szervezet elsődleges védelmi vonalát képező bőr immunrendszer aktivitásában jellegzetes különbségek azonosíthatók az SGR és SGP régiók között.

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

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

Kísérleteink során 12 súlyos krónikus AD-ben szenvedő beteg és 10 egészséges kontroll perifériás vérmintáját használtuk fel. A PBMC-k kinyerését követően CD1c⁺ DC-eket szeparáltunk, majd ezeken hajtottuk végre a kísérleteket. A vérből izolált CD1c⁺ pre-DC-k fenotípusának meghatározásához, valamint a FACS elemzés során detektált nem-releváns események kiküszöböléséhez a CD1c⁺/CD11c⁺ pre-DC-k szoftveres kikapuzását végeztük el. A kikapuzott sejtek több mint 90%-a pozitivitást mutatott mind CD1c, mind CD11c markerekre; ezek a sejtek ugyanakkor nem expresszáltak sem CD207-et (Langerin, LC marker), sem CD1a-t.

Az FcεRI jelenlétének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a receptor expressziója szignifikánsan nagyobb volt az AD-s pre-DC-k felszínén, mint egészséges pre-DC-ken; megállapítottuk továbbá, hogy a különbség szintén szignifikáns a SEB/TSLP kombinációval stimulált sejtek esetén is. A DC-k aktivációs és érési állapotát jelző sejt felszíni markerek vizsgálata azt mutatta, hogy ezeknek a molekuláknak a megjelenése is változott az AD-s betegekből származó DC-ken. A CD206 mannóz receptor, ami az irodalmi adatok alapján

éretlen sejteken nagyobb számban expresszálódik, ritkábban jelent meg a stimulált vagy simulálatlan AD-s pre-DC-k felszínén, mint az egészséges sejteken. A CD83 és CD86 markerek egy ellentétes expressziós mintázatot mutattak, mivel az AD-s betegekben származó (akár stimulált, akár simulálatlan) sejteken gyakrabban fejeződtek ki, mint a kontroll sejteken. Habár az AD-s DC-ken a 3 vizsgált sejt felszíni marker egyike sem mutatott szignifikánsan megváltozott expressziót, a változás minden esetben következetes és egy irányba mutató volt; ez arra utal, hogy az AD-s pre-DC-k korai érési stádiumban vannak.

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

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

Az AD-s betegekben származó DC-k kemokintermelő képességének meghatározását Proteome Profiler Chemokine Array végeztük el, ami egyszerre képes mérni 31 különböző humán kemokin felszabadulását. Ezen vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az AD-s DC-k által termelt kemokinek 2 csoportba rendeződnek. Az első csoportba azok a kemokinek sorolhatók (CXCL4, CXCL7, CXCL8 és CXCL16), melyeket hasonló mennyiségben detektáltunk mind az AD-s betegek, mind pedig az egészséges kontroll DC-k felülűszóiban. A második csoportot azon kemokinek alkotják (CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL5 és CXCL10), melyeket szignifikánsan nagyobb mennyiségben vagy kizárólagosan az AD-s pre-DC-k termeltek. A CCL5, CCL18, CCL19, CCL20 és CXCL5 esetében nem szignifikáns ($p > 0.05$), míg a CCL3, CCL4, CCL17, CCL22, CXCL1 és CXCL10 esetén statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget tudtunk kimutatni. Kiemelendő, hogy a második csoport kemokinjei között 3 jól ismert, az AD pathogenezisében fontos szerepet játszó molekulát (CCL17, CCL18, CCL22), valamint az érő/érett DC-kre jellemző markereket (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10) sikerült azonosítanunk.

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

A második csoport legfontosabb kemokinjeinek termelődését a Multi-Analyte ELISArray módszer segítségével is meghatároztuk a simulálatlan sejtek felülűszóiból. Hasonlóan a Proteome Profiler Chemokine Array-jel kapott eredményekhez, a CCL3-at és a CCL4-et szignifikánsan nagyobb mennyiségben tudtuk detektálni az AD-s pre-DC mintákban, mint az egészséges kontroll pre-DC-k felülűszóiban. Érdekes módon a CCL17, a CCL22 és a CCL5 esetében nem mutatkozott szignifikáns különbség a 2 mintacsoport között, ami a 2 technika eltérő érzékenységéből, illetve a minták közötti szórásból adódhatott. A CXCL10-et az AD-s

mintákban nagyon alacsony szinten, míg a kontroll sejtek felülúszóiban egyáltalán nem tudtuk kimutatni (ezen eredményeket nem ábrázoltuk).

Az AD immunpathológiájában fontos szerepet betöltő CCL17, CCL18 és CCL22 kemokinek mennyiségét egy még precízebb és megbízhatóbb technikával, a konvencionális szendvics ELISA módszerrel is meghatároztuk a stimulálatlan és stimulált pre-DC-k felülúszóiból. A stimulálatlan AD-s DC-kből nagyobb mennyiségű CCL17 és CCL22 szabadult fel, mint a kontroll sejtekből; kiemelendő, hogy az AD-specifikus stimulálást követően a különbség statisztikailag is szignifikáns lett a 2 mintacsoport között. Megállapítottuk továbbá, hogy a CCL18 termelés mennyisége szignifikánsan nagyobb mind a stimulálatlan, mind a stimulált AD-s DC-k felülúszóiban az egészséges kontroll sejtekéhez képest. Mindezen adatok arra utalnak, hogy AD-betegek perifériás véréből izolált CD1c⁺ DC-ek a korai érés jegeit hordozzák, valamint fokozódik bennük számos, részben a betegségre jellemző kemokin termelése és felszabadulása.

MEGBESZÉLÉS

Immuntopográfiai különbségek az emberi bőrben

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

Az AMP-k expressziójának tanulmányozása során az SGR és SGP bőrminták között figyelemre méltó különbségeket azonosítottunk. Az AMP-k a veleszületett immunrendszer jelentős effektor mediátorai, melyek antimikrobiális aktivitásukon túlmenően számos egyéb feladatot látnak el. Szerepet játszanak az angiogenezis szabályozásában, a sebgyógyulásban, a sejtek proliferációs és differenciálódási folyamataiban, továbbá immunmoduláns hatással is rendelkeznek, például citokin- és kemokintermelést stimulálnak. Korábbi publikációk arról számoltak be, hogy a hBD-1, hBD-2, hBD-3 és a humán CAMP az egészséges bőr differenciált epidermális rétegeiben alacsony szinten detektálható, miközben az RNáz7 fehérjét az egészséges KC-k nagy mennyiségben expresszálják. Azt is megfigyelték, hogy az S100A7 a normál bőr egyik legfontosabb AMP-je. Azonban meg kell jegyezni, hogy ezekben a kutatásokban nem határozták meg az egészséges bőrminták eredetét. Mindezidáig egyetlen kutatócsoport vizsgálta néhány AMP (S100A7, hBD-3 és RNáz7) regionális jelenlétét a különböző egészséges bőrterületeken. Ők IHC vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy ezek a fehérjék nagyobb mennyiségben expresszálódnak a homlokon (jellegzetesen SGR régió), mint a lábszáron (jellegzetesen SGP régió). Ezek az adatok nagyfokú egyezést mutatnak a mi

jelenlegi eredményeinkkel. Más kutatócsoportok az S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2, CAMP és LCN2 molekulákat gén- és fehérjeszinten sem tudták detektálni, vagy jelenlétüket az egészséges bőrben egyáltalán nem (is) vizsgálták. Jelenlegi munkánk során sikerült detektálni ezen AMP-k (S100A7, S100A8, S100A9, hBD-2, CAMP és LCN2) alacsony szintű génkifejeződését az SGP bőrben is, ugyanakkor a CAMP kivételével az összes AMP expressziója szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrterületen. Továbbá, az S100A8 és LCN2 fehérjéket IHC-val mindkét régióban ki tudtuk mutatni; ezek a fehérjék az SGR bőrmintákban szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen.

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

A legfontosabb KC szenzorok (TLR2, TLR3, TLR4, NLRP3) és a veleszületett immunsejtek által termelt pro-inflammatorikus citokinek (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-33, TNF- α) esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a 2 bőrrégió között. Ezek az eredmények nem voltak meglepőek, hiszen az összes vizsgált minta egészséges, gyulladásmentes bőrterületről származott. Az egyetlen kivételt az IL-1 β jelentette, mely szignifikánsan nagyobb génexpressziót mutatott az SGR bőrterületen. Ez a molekula szerepet játszhat a későbbiekben tárgyalt T_H17/IL-17 citokinmillió kialakításában ezen bőrrégióban.

A késői terminális epidermális differenciálódási markerek (LOR, LCE1F, FLG), valamint a CLDN16 tight junction molekula kifejeződése többnyire alacsonyabb volt az SGR bőrterületen,

mint az SGP bőrterületen (habár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns). Ez arra utalhat, hogy az epidermális barrier gyengébb lehet az SGR régióban. Ezt korábbi publikációk is alátámasztják, melyek bemutatták, hogy a transzepidermális vízvesztés mértéke, melynek növekedése jól korrelál a károsodott barrier funkcióval, magasabb a jellemzően SGR bőrterületeken (az arc különböző területei), mint a jellemzően SGP bőrrégióban (alkar, kar). Ezzel ellentétben a KRT17 és KRT79 mRNS expressziója, melyek inkább a proliferáló sejtekre jellemzőek, szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrben. Továbbá a KRT17, amit általában az epithélium bazális sejtjei expresszálnak (mint például az SGP bőrben), az SGR bőrben az epidermisz összes sejtrétege fokozottan expresszálja. Ennek további jelentősége, hogy korábbi publikációkban az találták, hogy a T_h17/T_h22 útvonalhoz köthető citokinek (IL-17, IL-22) gén- és fehérjeszinten is fokozták az epidermális KRT17 kifejeződést, valamint mRNS szinten csökkentették a LOR expresszióját. Ezért a KC-k barrier molekuláit érintő ezen változások a később tárgyalt, az SGR bőrt jellemző $T_h17/IL-17$ citokinmillió következményei lehetnek.

A legfontosabb, hogy a T_h17 szignálút vonal komponenseinek (T_h17 érési citokinek és T_h17 effektor kemokin) expressziója jelentős, és több esetben (IL-17, IL-1 β , IL-23A, CCL20) szignifikánsan magasabb volt az SGR bőrterületen (az SGP bőrterülettel összehasonlítva). Ezek az adatok jól korrelálnak előző eredményeinkkel, ahol szintén szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-17A mRNS-t és fehérjét tudtunk detektálni QRT-PCR és IHC technikák segítségével. Ebben a tanulmányban amellet, hogy újra meg tudtuk erősíteni a T_h17 sejtek jelenlétét az SGR bőrrégióban, ezen túlmenően az IL-17 központi jelentőségét is megfigyeltük az SGR bőrben, mivel a fentebb részletezett különbségek a 2 bőrterület között az AMP-k, a kemokinek és a barrier molekulák kifejeződésében jól magyarázhatók az IL-17 hatásával. Korábban az is bebizonyosodott, hogy az IL-17 képes fokozni az IL-1 β , hBD-2, CAMP, S100A7, S100A8, S100A9, LCN2, CCL2, CCL20 és KRT17 kután mRNS és fehérje expresszióját, miközben csökkentik a LOR kifejeződést a KC-kban. A fókuszált útvonal analízisünk, mely funkcionális csoportokba rendezte a 2 bőrterület között szignifikánsan eltérően expresszálódott immunrendszerhez köthető molekulákat, szintén megerősítheti ezen molekulák fontos szerepét az SGR bőr régió-specifikus immunmilliójának fenntartásában. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az SGR bőrben detektált IL-17 hatás nem gyulladásozó válasz, hanem homeosztatis jelenségnek tűnik, mivel a neutrofil kemoattraktánsok (mint például az ebben a tanulmányban RNS szekvenálással meghatározott CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8) expressziója, a pro-inflammatorikus citokintermelés, valamint a neutrofil infiltráció mértéke nem volt szignifikáns az SGR bőrben. Érdekes módon a pro-

inflammatorikus molekulák közül csak az IL-1 β mutatott szignifikánsan emelkedettebb expressziót az SGR bőrben. Úgy véljük, hogy ez a magasabb IL-1 β szint segítheti elő a T_h17 sejtek fejlődését és IL-17 milliő kialakulását, amit az előzőekben már részletesen tárgyaltunk.

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

A bőr immunrendszernek kulcsszerepe van az immun-mediált gyulladással és autoimmun betegségek pathogenezisében. Ezeknek a betegségeknek egy része speciális bőrterületekre lokalizálódik, mint például az akne, rosacea és a bőrre lokalizált lupusz, melyek leginkább az arcon, a fejen és a mellkason jelennek meg, melyek SGR területek. A bőr immunrendszer összetételét és aktivációját mindeztáig az egész testen egységesnek tekintették, és ezen betegségek régió-specifikus megjelenésének hátterében más okokat feltételeztek (szébum, mikrobióta, hormonális változások, napfény). Jelenlegi adataink lehetővé teszik e kérdés új aspektusból történő vizsgálatát, és felvetik annak a lehetőségét, hogy a bőr immunrendszer régió-specifikus jellege is hozzájárulhat a régió-specifikus immun-mediált bőrbetegségek kialakulásához. Az SGR bőr nem-gyulladással T_h17/IL-17 által vezérelt immun- és barrierkörnyezete valószínűleg hajlamosíthatja ezt a bőrterületet a gyulladással T_h17 típusú immunmediált bőrbetegségek kialakulására, a nyugalmi homeosztatisz körülmények felborulása (a szébumban, mikrobiótában, hormonális állapotban bekövetkező változások vagy napsugárzás miatt) után. A szakirodalomban közölt adatok alátámasztják ezt a hipotézist, mivel az akne, a rosacea és a lupusz összes formájában (DLE, SCLE, SLE) a bőrt főként a gyulladással típusú T_h17 sejtpopuláció infiltrálják, ezek felelősek elsősorban a bőrgyulladás kialakulásáért e

fenti betegségekben. Korábbi saját adataink szintén felvetik annak lehetőségét, hogy az immunológiai toleranciában keletkező zavaroknak, a nem gyulladós T_h17 (β) sejtekről gyulladós típusú $T_h17(23)$ sejtekre történő váltásnak speciális szerepe lehet a SGR bőrterületre lokalizálódó gyulladós bőrbetegségek kialakulásában. Vizsgálataink szerint az SGR bőrben nyugalmi állapotban egy homeosztatis, tolerogén epidermális TSLP expresszió detektálható, miközben a rosacea kialakulása során szignifikáns TSLP csökkenés figyelhető meg egy jelentős gyulladós DC és IL-17/IFN- γ citokin környezettel jellemezhető $T_h17(23)/T_h1$ sejt bevándorlással.

A perifériás vérben keringő DC-k szerepe AD-ben

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

A DC-k Fc ϵ RI kifejeződését az AD-s bőrben már több mint 20 éve tanulmányozzák. Ezen marker magas expressziót mutat mind az LC-k, mind pedig az IDEC sejtek felszínén, és valószínűleg gyulladós folyamatok szabályozásában vesz részt. Saját eredményeinkkel meg tudtuk erősíteni ennek a receptornak szignifikánsan emelkedett kifejeződését a vérben keringő pre-DC-k felszínén. A vér $CD1c^+$ prekursor sejtek felszínén sok Fc ϵ RI receptor található, mely az AD-s betegek emelkedett szérum IgE szintjének eredménye lehet. A vér DC-k ezt a receptort az IgE-mediált allergén prezentációra használják. Továbbá a specifikus IgE, valamint a receptor sejt felszíni jelenléte az antigénfelvétel- és prezentáció hatékonyságát növeli a bőrbe érkezés után.

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

Mivel a DC-k fontos kemokin források, valamint mivel az AD-s betegek vérében lévő sejtek kemokin termeléséről kevés információ áll rendelkezésre, kísérleteink során az AD pre-DC-k kemokintermelését vizsgáltuk. Az AD-s pre-DC-k által ex vivo termelt legfontosabb kemokinek azonosítására Proteome Profile Chemokine Array-t alkalmaztunk, aminek eredményét ELISArray módszerrel kívántuk megerősíteni. Ezenkívül egy precízebb módszer, a hagyományos szendvics ELISA segítségével felmértük egy szövetspecifikus mikrokörnyezet stimuláló hatását is, melynek során összehasonlítottuk a nem stimulált sejtek, valamint a TSLP-vel és a SEB-vel stimulált DC-k kemokintermelő képességét.

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

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

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

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

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink első részében teljes transzkriptóm és útvonalelemzést végeztünk az SGR és SGP bőrrégiók között fennálló lehetséges immunotopografikus különbségek feltárása végett. Megállapítottuk, hogy a különböző bőrterületek karakterisztikus veleszületett és szerzett immun-, valamint barriermilióval rendelkeznek, hiszen szignifikánsan magasabb kemokin (CCL2, 3, 19, 20, 23, 24) és antimikrobiális peptid (S100A7, A8, A9, lipokalin, β -defenzin-2) szinteket, megváltozott barrierfunkciót (keratin 17, 79), valamint egy nem-gyulladásos $T_h17/IL-17$ dominanciát azonosítottunk az SGR régiókban (az SGP területekhez viszonyítva). A pro-inflammatórikus molekulák (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-33, TNF- α) esetében alacsony szinteket mértünk mindkét régióban. Adataink magyarázatot nyújthatnak egyes immun-mediált és autóimmun bőrbetegségek jellegzetes topografikus megjelenésére. Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a kísérletes bőrgyógyászati gyakorlatban gyakran használt „egészséges kontroll bőrminta” kifejezés csak abban az esetben legyen elfogadható, ha a kutatók gondosan megnevezik az adott bőrrégió lokalizációját.

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



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/148/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Béke, G.**, Dajnoki, Z., Kapitány, A., Gáspár, K., Medgyesi, B., Pólliska, S., Hendrik, Z., Péter, Z., Töröcsik, D., Bíró, T., Szegedi, A.: Immunotopographical Differences of Human Skin. *Front. Immunol.* 9, 1-15, 2018.
IF: 4.716
2. Kapitány, A., **Béke, G.**, Nagy, G., Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., Gáspár, K., Boros, G., Dajnoki, Z., Bíró, T., Rajnavölgyi, É., Szegedi, A.: CD1c+ Blood Dendritic Cells in Atopic Dermatitis are Premature and Can Produce Disease-specific Chemokines. *Acta Derm.-Venereol.* 97 (3), 325-331, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2540>
IF: 3.127

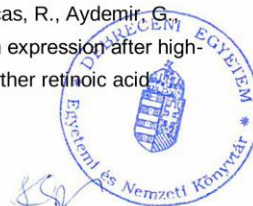
További közlemények

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





5. Jenei, A., Dajnoki, Z., Medgyesi, B., Gáspár, K., **Béke, G.**, Kinyó, Á., Méhes, G., Hendrik, Z., Dinya, T., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Prens, E. P., Bíró, T., Szegedi, A., Kapitány, A.: Apocrine Gland-Rich Skin Has a Non-Inflammatory IL-17-Related Immune Milieu, that Turns to Inflammatory IL-17-Mediated Disease in Hidradenitis Suppurativa. *J. Invest. Dermatol.* 139 (4), 964-968, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.020>
IF: 6.29 (2018)
6. Szöllősi, A. G., Vasas, N., Angyal, Á., Kistamás, K., Nánási, P. P., Mihály, J., **Béke, G.**, Lisztes, E., Szegedi, A., Kawada, N., Yanagida, T., Mori, T., Kemény, L., Bíró, T.: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 138 (2), 365-374, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>
IF: 6.29
7. Bohn, T., Planchon, S., Leclercq, C. C., Renaut, J., Mihály, J., **Béke, G.**, Rühl, R.: Proteomic responses of carotenoid and retinol administration to Mongolian gerbils. *Food Funct.* 9 (7), 3835-3844, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8FO00278A>
IF: 3.241
8. Dajnoki, Z., Kapitány, A., **Béke, G.**, Szegedi, A.: A thymic stromal lymphopoietin szerepe a bőrben és egyéb barriereken. *Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (3), 119-125, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.3.6>
9. Khasawneh, A., Baráth, S., Medgyesi, B., **Béke, G.**, Dajnoki, Z., Gáspár, K., Jenei, A., Pogácsás, L., Pázmándi, K. L., Gaál, J., Bácsi, A., Szegedi, A., Kapitány, A.: Myeloid but not plasmacytoid blood DCs possess Th1 polarizing and Th1/Th17 recruiting capacity in psoriasis. *Immunol. Lett.* 189, 109-113, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.005>
IF: 2.436
10. Landrier, J. F., Kasiri, E., Karkeni, E., Mihály, J., **Béke, G.**, Weiss, K., Lucas, R., Aydemir, G., Salles, J., Walrand, S., de Lera, Á. R., Rühl, R.: Reduced adiponectin expression after high-fat diet is associated with selective up-regulation of ALDH1A1 and further retinoic acid receptor signaling in adipose tissue. *Faseb J.* 31 (1), 203-211, 2017.
IF: 5.595





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 61,171

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

7,843

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



Debrecen, 2020.05.25.