

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Keratinocita aktivációs folyamatok szerepe az acne vulgaris patogenezisében

Bolla Beáta Szilvia
Biológus Msc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem
Szegedi Tudományegyetem ÁOK Bőrgyógyászati és
Allergológiai Klinika

Témavezető: Dr. Szabó Kornélia
Belső konzulens: Dr. Blastyák András

2012.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
1.1. A bőr	2
1.1.1. A bőr anatómiai felépítése	2
1.1.2. A bőr funkciója	4
1.1.3. A bőr mikroflórája	5
1.2. Az acne patogenezise	5
1.3. A tünetek kialakulásának hátterében álló molekuláris folyamatok	8
1.3.1. A <i>P. acnes</i> által indított jelátviteli folyamatok keratinocitában	8
1.3.2. Keratinocita aktivációs hipotézis	9
2. Célkitűzések	11
3. Anyagok és módszerek	12
3.1 Humán immortalizált HPV-KER keratinocita sejtvonal tenyésztése	12
3.2 A felhasznált <i>P. acnes</i> törzs és tenyésztése	12
3.3 A HPV-KER sejtek kezelése <i>P. acnes</i> 889 baktériummal	13
3.4 Totál RNS izolálás	13
3.5 Reverz transzkripció és valós idejű RT-PCR	14
3.6 A <i>P. acnes</i> által indított sejtbiológiai folyamatok valós idejű vizsgálata (xCELLigence) HPV-KER sejtekben	15
4. Eredmények és megvitatásuk	16
4.1 <i>P. acnes</i> által indított sejtbiológiai folyamatok valós idejű vizsgálata (xCELLigence) HPV-KER sejtekben	16
4.2 A különböző dózisú <i>P. acnes</i> 889-es kezelések hatása a HPV-KER sejtek sejtbiológiai folyamataira	17
4.3 A <i>P. acnes</i> 889 kezelés hatása a keratinocita aktivációs útvonalra	18
4.4 Különböző dózisú <i>P. acnes</i> 889 kezelés hatása a keratinocita aktiváció mértékére	20
5. Összegzés	21
6. A felhasznált irodalmak jegyzéke	25
7. Az általam elsajátított és alkalmazott kísérleti módszerek listája	27
8. Köszönetnyilvánítás	28
9. Nyilatkozat	29

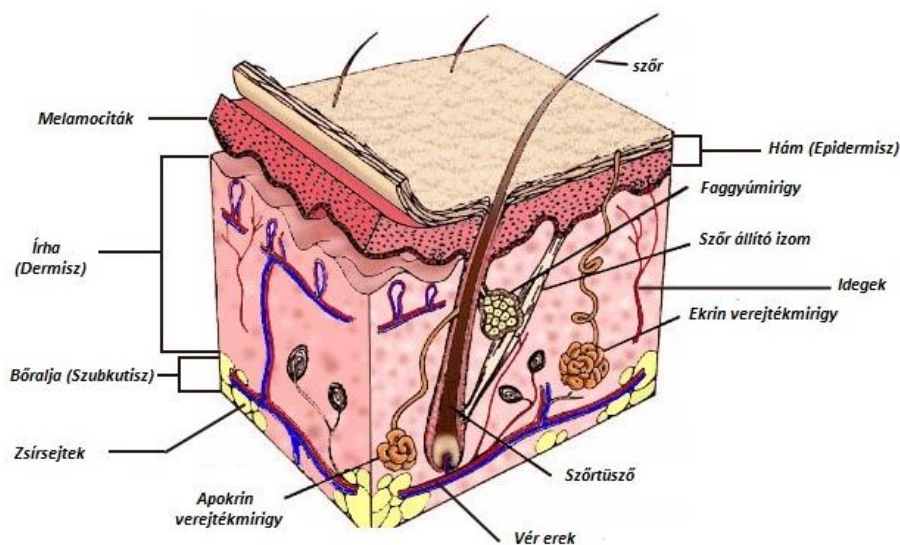
1. Bevezetés

1.1. A bőr

A bőr a szervezet legnagyobb szerve, melynek teljes mérete körülbelül 20 m². Feladata rendkívül összetett. Védelmet biztosít a mikrobákkal szemben és a különféle környezeti hatásoktól, segít a testhőmérséklet szabályozásában és lehetővé teszi a fájdalom, a meleg és a hideg érzékelését.

1.1.1. A bőr anatómiai felépítése

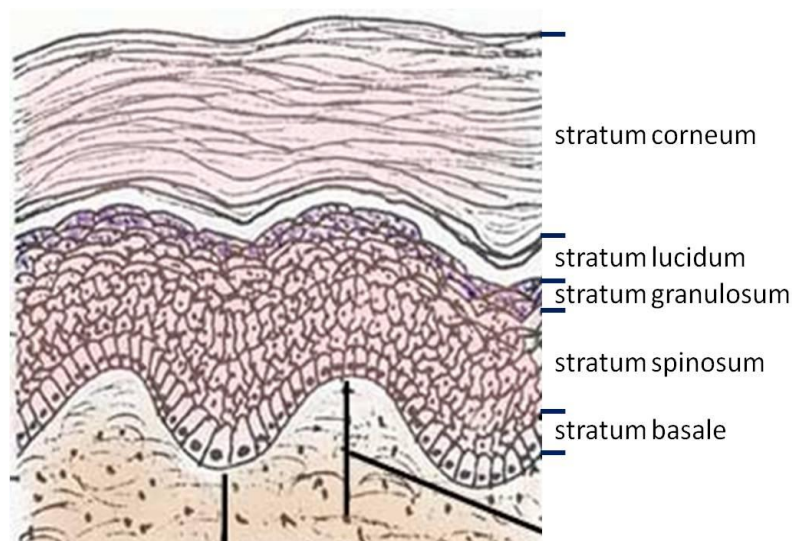
A bőr anatómiailag három rétegre osztható, a **hámra** (*epidermis*), az **irharétegre** (*dermis*) és a **bőraljára** (*subcutis*) (1. ábra).



1. ábra A humán bőr keresztmetszete.

A hám a legfelső réteg, mely a testfelszínt borítja és elválasztja a belső részeket a külvilágtól. Vastagsága átlagosan 0,2 mm, melynek túlnyomó részét a hámsejtek (keratinociták) adják, emellett melanociták, Langerhans-sejtek és Merkel-sejtek is találhatóak itt. A hámot a keratinociták differenciálódása alapján 5 részre lehet osztani (2. ábra). Az alsó rétege a *stratum basale*, melynek sejtjei folyamatosan osztódnak és ezáltal kialakítják a többi réteget. Ezt követi a *stratum spinosum* (tüskéses réteg), ahol a keratinociták strukturális változásokon mennek keresztül, laposabbá és poligonálissá válnak. Itt kezdődik meg a differenciálódás is, és a felső sejtjeiben már

megjelennek a keratinosomák, azaz a granulumok. A következő réteg a *stratum granulosum*, amely általában 2-3 sejtsorból áll, a sejtek nagy számban tartalmaznak keratinohialin granulumokat, melyek hisztidinben gazdag fehérjékből, tonofibrillumokból és lipidekből állnak. A *stratum granulosum*-ot követi a *stratum lucidum*, mely egy sejtrétegű. A sejtek laposak, de tartalmaznak még sejtorganellumokat. A legfelső réteg a *stratum corneum*, amely már csak elhalt, elszarusodott sejteket tartalmaz, melyek már nincsenek sejtorganellumok, azonban nagy mennyiségben találhatóak bennük hidrolitikus és katabolikus enzimek.[Dobozy, 2004; Braun-Falco, 2000]



2. ábra Az epidermisz mikroszkópos felépítése. A keratinociták differenciálódása során alakul ki az 5 réteg.

A hám alatt található az irharéteg, más néven a dermisz. Ez képezi a bőr legjelentősebb részét, vastagsága változó, általában 3 mm. Az itt található sejtek a fibrociták, hisztiociták, és a masztociták, valamint a vérpályából kilépő limfociták, granulociták és plazmasejtek. Az irhában a sejt elemek mellett egy kiterjedt rostrendszer is található, melyet kollagén-, elasztikus-, és retikulum- vagy rácsrostok alkotnak. A mátrix és a rostok közötti területeket az alapállomány tölti ki, mely neutrális és savanyú mukopoliszacharidákat, hialuronsavat, kondroitin-kénsavat, valamint nagy mennyiségű elektrolitot és vizet tartalmaz. Az irha fő feladata a mechanikai védelem, a bőrfüggelékek hordozása, továbbá vér-, elektrolit-, és vízraktárként is funkcionál.

A bőr legalsó rétegét a bőrálja (*subcutis*) alkotja, melynek túlnyomó részét a zsírszövet teszi ki. Ezeket kötőszöveti gerendák osztják lebenyekékre, melyek között erek és idegek futnak. A bőr alatti zsírszövet és az irha közötti határ általában élesen

elkülönül. A bőr alja fő feladata az energiatermelés, hőszigetelés és a mechanikai ingerek tompítása.

A bőr számos egyéb függeléssel is rendelkezik. Ilyenek például a haj, a szőrzet, a verejték- és faggyúmirigyek. [Dobozy, 2004; Braun-Falco, 2000]

1.1.2. A bőr funkciója

A bőr határfelületként funkcionál testünk és a környezet között, ezáltal biztosítva az onnan érkező káros hatások kiszűrését (UV, hőingadozás, vegyi ártalmak)[Jensen, 2009]. A mechanikai, kémiai és immunológiai védelem mellett fontos érzékszervként is viselkedik, részt vesz a külvilág ingereinek észlelésében, mely egy összetett feladat. Ezt a bőrben található idegek és a nagy variációt mutató specializálódott receptorok végzik, ezáltal a bőr képes a tapintás, a nyomás, a fájdalom és a hőmérséklet érzékelésére. Idegi szabályozás alatt áll még a bőr vérellátása, valamint a verejtékmirigyek működésének szabályozása is, melyek az állandó testhőmérséklet kialakításában játszanak fontos szerepet.

A vegyi anyagokkal szembeni védelmet a bőr barrier funkciója biztosítja, amely részben a víz és az elektrolitok elvesztésének akadályozását, részben pedig különféle anyagoknak a felszívódás-gátlását jelenti. Ezen funkciók kialakításáért főként a szaruréteg és a hámsejtek aktivitása felelős, melynek hatására a vegyi anyagok és korpuszkuláris részek a fiziológiás hámlás révén eliminálódnak [Dobozy, 2004; Braun-Falco, 2000].

A bőr azonban képes különféle anyagok felszívására is, tehát a barrierhatás részleges és szelektív. Különböző anyagok oldott formában háromféle útvonalon keresztül juthatnak be:

- szőrtüszőkön és a hozzá kapcsolódó faggyúmirigyeken keresztül,
- a verejtékmirigyeken át,
- a szarurétegen keresztül történő penetrációval.

A szervezetre a napfény UV sugarai közül legnagyobb biológiai hatást az UV-B (280-320 nm hullámhosszú) sugárzás gyakorol. Ezek a sugarak a hámba érve szétszóródnak és elnyelődnek, ezáltal csak nagyon kis mennyiségük éri el az irha rétegét. A sugárzás hatására kémiailag aktív gyökök keletkeznek a hámban, melyek az irhába diffundálnak és ott gyulladást keltenek. A bőr anyagcseréje során azonban

fényvédő anyagok is keletkeznek, amelyek közül a legfontosabb a melanin és a hisztidin dekarboxilációja során keletkező urokánsav.

Egészséges körülmények között a bőrfelszín nem alkalmas arra, hogy kórokozó baktériumok telepedjenek meg rajta. Ez az antimikrobiális aktivitás a bőrfelszín több tulajdonságán alapul. A patogén baktériumok túlnyomó többsége lúgos közegben él és szaporodik. A bőrfelszín azonban savas kémhatású (pH 4,0-6,0), melynek kialakításában például a verejték tejsav-, valamint a faggyú- és az elhaló hámsejtek zsírsavtartalma játszik fontos szerepet. Emellett a száraz szarurétegben a patogén kórokozók kiszáradnak, elpusztulnak, és a fiziológiás hámlás során leöklődnek a bőrfelszínről. Azokat a kórokozókat, melyek még is átjutnak a hámon, a kötőszövet granulocitái és makrofágjai eliminálják. Speciális anatómiai helyeken, mint például a follikulusokban azonban megfelelőek az életkörülmények különböző mikroorganizmusok megtelepedéséhez [Dobozy, 2004; Braun-Falco, 2000].

1.1.3. A bőr mikroflórája

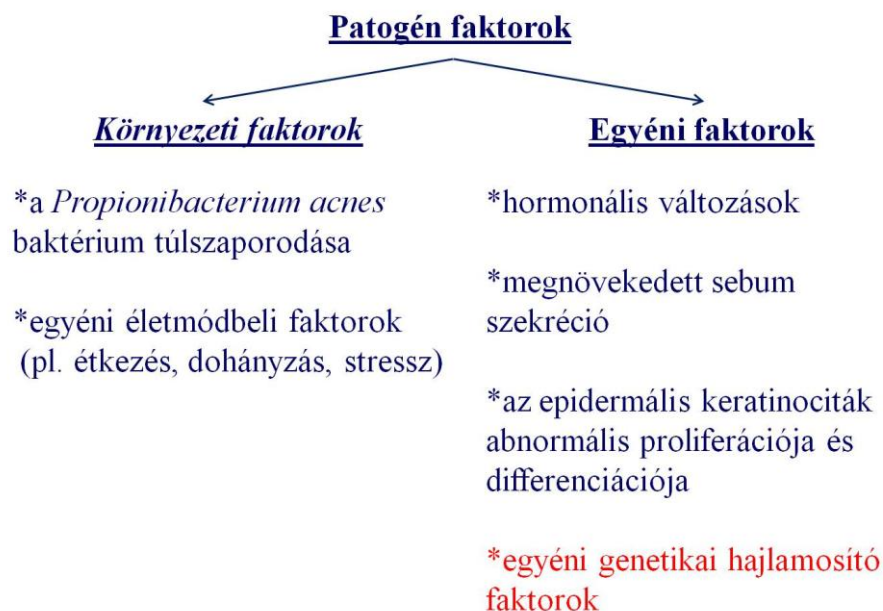
A bőr természetes mikroflórával úgynevezett normál flórával rendelkezik, melyet elsősorban *Staphylococcus*-, *Micrococcus*-, és *Propionibacterium* törzsek alkotnak. Ezek úgynevezett **kommenzális baktériumok**, melyekről azt feltételezzük, hogy a gazdaszervezetre gyakorolt hatásuk nem jelentős, a kommenzalista populáció számára pedig a gazda jelenléte pozitív hatású. Ez utóbbi ugyanis megfelelő étletteret, és tápanyagokat biztosít a mikróbák számára. Ezen fajok jelentősége azonban igen nagy, hiszen azzal, hogy például megtelepsznek a follikulusokban ökológiai kölcsönhatásuk révén kiszorítják az esetlegesen odakerülő egyéb patogén fajokat [Rioux, 2006]. Emellett egyes fajaik anyagcseretermékeik, és aktívan szekretált, más fajokra antimikrobiális hatású anyagok termelésével aktívan is képesek a patogén kórokozókat elpusztítani.[Gallo, 2011]

1.2. Az acne patogenezeise

Az acne vulgaris (pattanásos betegség) egyike a leggyakoribb bőrbetegségeknek, mely a pubertásban kezdődik és általában a 20-30. életév között spontán megszűnik. A betegség mindkét nemet egyformán érinti, de a férfiaknál sokkal gyakrabban fordulnak

elő a súlyosabb formák, valószínűleg a hormonális hatások, különös tekintettel az androgének magasabb szintje miatt. [Zouboulis, 2007]

Az acne a faggyúmirigyekben gazdag területeket érinti, a fokozott faggyú (szébum) termelés (szeporrea) eredményeképpen, **komedók**, gyulladásos **pusztulák** és **papulák**, valamint súlyosabb esetekben akár **nodulusok** és **ciszták** kialakulása jellemzi (4. ábra). Az acne kialakulásában különböző faktorok játszanak szerepet, ilyenek a hormonális hatások, abnormális keratinocita funkciók, és mikrobiális tényezők, mint például a *P. acnes* hiperkolonizációja a bőr follikulusaiban (3. ábra). Emellett az acnéra való hajlam öröklhető, de a betegség poligén multifaktoriális jellege miatt ennek pontos mechanizmusa jelenleg még nem ismert. [Szabó és Kemény, 2011]



3. ábra Az acne kialakulásában szerepet játszó patogén faktorok.

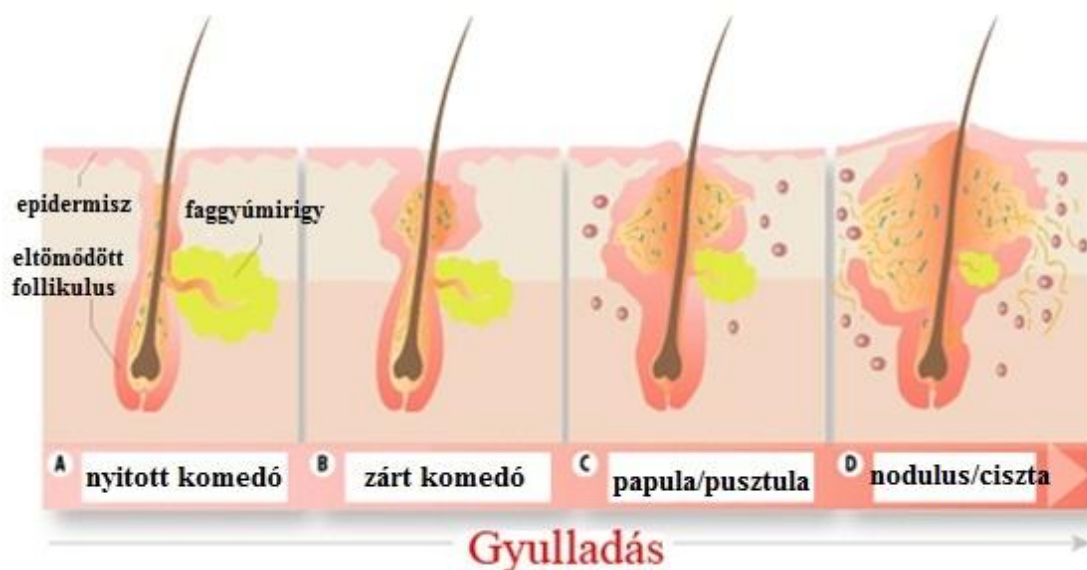
A tünetek kialakulása a serdülőkori hormonális változásokhoz köthető, amikor a kialakuló androgén túlsúly eredményeképpen a faggyútermelés fokozódik. A humán bőrben az arcon, a fülek mögött, a mellkas és a hát felső részén és bizonyos mértékig a felkar külső részén (ahol általában az acnés léziók is előfordulnak) speciális szerkezetű faggyúmirigyek találhatóak (faggyúszórtüszők), melyekben a szórtüsző mellé egy nagyméretű faggyúmirigy is kapcsolódik. Így épül fel az úgynevezett pilosebáceus egység. [Dobozy, 2004; Braun-Falco, 2000]



4. ábra *Acne vulgaris* klinikai képe. Piros nyilak jelölik a komedókat (nyitott és zárt), a kék nyilak pedig a jellegzetes gyulladásos papulákat és pustulákat mutatják). A felvételek az SZTE, ÁOK Bőrgyógyészati és Allergológiai Klinika gyűjteményéből származnak.

A faggyústüsző négy részből épül fel, a keratinizált infundibulum tüszőből, a szőrből, a faggyúmirigyből és a faggyúvezetékéből, amely összeköti a mirigyet az infundibulummal. A nagy, karfiolszerű, kürtösen csavart faggyúmirigy választja ki a faggyút, ami a kivezető csövön keresztül jut a tüszőbe, majd a bőr felszínére. A faggyú világos sárgaszínű viszkózus folyadék, ami glicerineket és szabad zsírsavakat, szkvaléneket, viaszt és szterolésztereket, valamint szabad szterolokat tartalmaz és mennyisége egyénenként változó. A faggyú termelése holokrin, ami azt jelenti, hogy a faggyúmirigy sejtszövetjei a mirigy közepe felé haladva fokozatosan szétesnek, és így módon bocsájtják ki a faggyút.

A faggyú a faggyústüszőben és a kivezető csőben steril és nem tartalmaz szabad zsírsavakat, az infundibulumba érve azonban jó közeget biztosít a *P. acnes* és a *Staphylococcus epidermidis* növekedésének. Ugyan mindkét baktérium része a természetes, kommenzális mikroflórának, de speciális körülmények között hozzájárulhatnak az acnés léziók kialakulásához is (5. ábra).



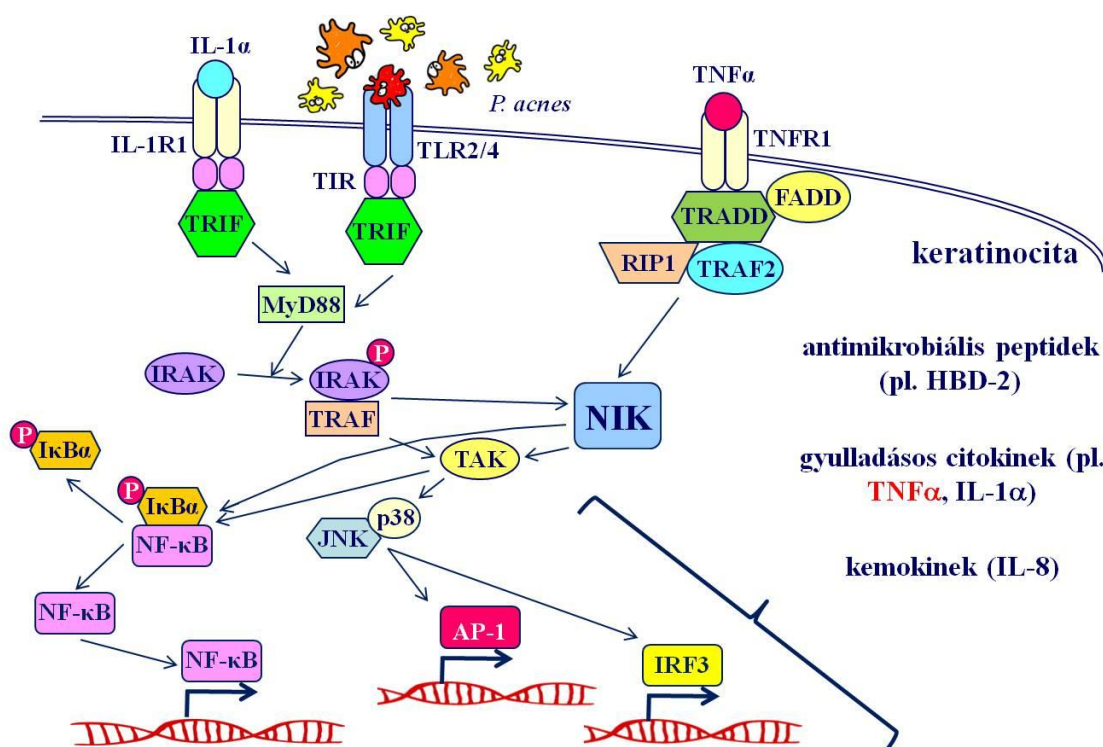
5. ábra Az acne vulgaris kialakulása. A komedók kialakulásánál az elhalt epiteliális sejtek és a keratin elkezd felhalmozódni. Az így kialakuló sűrű dugó elzárja a szébum áramlásának útját, mely kedvező feltételt nyújt a *P. acnes* baktérium növekedéséhez. A fokozódó nyomás miatt a follikulus fala megsérül, így a *P. acnes*, a képződő irritatív szabad zsírsavak és a sejtörmelék kapcsolatba kerülhet a mélyebb szövetrétegekkel. A környező szövetek gyulladása miatt papulák, pusztulák, súlyosabb esetekben nodulusok és a ciszták alakulnak ki.

1.3. A tünetek kialakulásának hátterében álló molekuláris folyamatok

A professzionális immunsejtekhez hasonlóan az epidermális keratinociták is képesek a környezetükben található patogének felismerésére, ellenük aktív védőfolyamatok indítására, amely folyamatokban a patogénfelismerő Toll-like receptor (TLR) család tagjai is részt vesznek. [Pivarcsi 2003; Takeuchi 1999; Miller, 2008; Terhorst, 2010].

1.3.1. A *P. acnes* által indított jelátviteli folyamatok keratinocitában

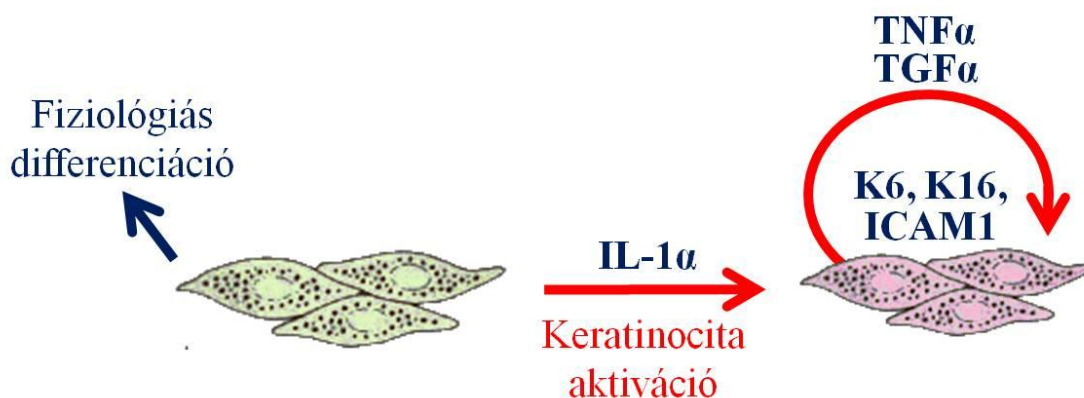
A *P. acnes* felismerésében a TLR2 és 4 receptorok vesznek részt, melyek aktivációjának hatására jelátviteli folyamatok indulnak a bőrsejtek citoplazmájában. [Nagy, 2005] Ezen folyamatok központi lépése az NF- κ B transzkripciós faktor aktivációja, melynek eredményeképpen számos, a veleszületett immun-, és a vele párhuzamosan induló gyulladásos folyamat kialakításában és szabályozásában fontos szerepet játszó gén kifejeződése megváltozik. Ezek között találunk például gyulladásos citokineket (TNF α és IL-1 α), kemokineket (CXCL-8), valamint antimikrobiális hatású fehérjéket kódoló géneket (6. ábra). [Pivarcsi, 2003; Nagy, 2005]



6. ábra A *P. acnes* által indított jelátviteli utak keratinocitákban. (A részletes leírást ld. a szövegben.)

1.3.2. Keratinocita aktivációs hipotézis

Az egészséges bőrben a keratinociták folyamatosan differenciálódnak a bazális rétegtől egészen a legfelső szarurétegig. A különböző környezeti hatásoknál vagy patológiás eseteknél ezek a természetes folyamatok azonban felborulhatnak, a keratinocita sejtek aktiválódhatnak, és ennek hatására olyan alternatív folyamatok indulhatnak el, melyek igazoltan fontos szerepet töltenek be számos bőrbetegség kialakulása során (sebgyógyulás folyamata, pikkelysömör) [Freedberg, 2001]. Erre az aktivált állapotra jellemző, hogy a keratinocitákban számos növekedési faktor, citokin kifejeződése fokozódik, melyek közül a legfontosabbak a TNF α (tumor necrosis faktor α), az IL-1 α és β (interleukin-1 α és β), a TGF α és β (transforming growth factor α , β), és az INF γ (interferon γ). Az aktivációs szignál hatására gyakran megfigyelhető a citoszkeleton átrendeződése, ezáltal a sejthalak valamint a sejtek vakuolarizáltságának megváltozása is. A korábban már említett növekedési faktorok valamint citokinek hatására számos további adhéziós molekula, sejtfelszíni receptor és keratin kifejeződése is fokozódhat. Jellemző még a sejtek hiperproliferációja, megnövekedett migrációs képessége valamint, hogy a bazális membrán komponenseit állítják elő. [Barker, 1991; Freedberg, 2001; Nickoloff, 1993]



7. ábra A keratinocita aktivációs hipotézis. Az egészséges bőrben jellegzetes fiziológias differenciációs folyamatok zajlanak. Külső környezeti hatások eredményeképpen a sejtek aktivált állapotba kerülhetnek, melynek során alternatív folyamatok zajlanak. Ennek az átmeneti állapotnak fontos szerepe lehet különféle bőrbetegségek (pl. pikkelysömör, vagy a sebgyógyulás) kialakulása során.

Az epidermális keratinociták differenciálódása tehát két eltérő útvonalon haladhat (7. ábra). Ezek elkülönítésére gyakran alkalmazzák a specifikus keratin gének kifejeződésének vizsgálatát. A K5 (keratin 5), K14 (keratin 14) a bazális rétegben fejeződik ki, míg a K1 (keratin 1), K2 (keratin 2) és a K10 (keratin 10) a differenciálódó sejtekben jelenik meg. Az aktivációs útvonal markereként a K6 (keratin 6, KRT6), K16 (keratin 16, KRT16) és K17 (keratin 17) szolgál. [Freedberg, 2001]

A keratinocita aktivációs ciklus kezdő lépése, amikor a sejtek aktiválódnak az IL-1 citokin hatására. Az aktivált állapot fenntartását proinflammatorikus és proliferatív szignálok autokrin termelésével érik el. Az aktivált keratinociták parakrin szignálokat is termelnek, melyekkel a szomszédos keratinociták mellett a fibroblasztokat, endotheliális sejteket, melanocitákat valamint limfocitákat riasztják. A limfocitáktól érkező jel az $\text{INF}\gamma$, mely indukálja a K17 kifejeződését és emellett a keratinociták kontraktilitását is fokozza. Az aktivált állapot megszűnésekor a fibroblasztokból érkező $\text{TGF}\beta$ jel indukálja a keratinocitákban a K5 és K14 kifejeződését, ezáltal a keratinociták visszaalakulnak az egészséges bazális/ differenciációs fenotípusra.

2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki annak megismerését:

-hogyan a bőrön megtalálható kommenzális *P.acnes* baktérium milyen sejtbioológiai változásokat idéz elő *in vitro* tenyésztett immortalizált keratinocita sejtekben (HPV-KER),

-hogyan a *P. acnes* baktérium képes-e a keratinociták aktivációjára,

-függ-e az aktiváció mértéke a keratinociták környezetében található baktériumok mennyiségétől,

-ezeknek a folyamatoknak szerepe lehet-e az acne molekuláris patogenezisében?

3. Anyagok és módszerek

3.1 Humán immortalizált HPV-KER keratinocita sejtvonal tenyésztése

A HPV-KER immortalizált keratinocita sejtvonal előállításához az SZTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán plasztikai műtéten átesett egészséges donor bőrmintájából származó második passzázsban levő normál humán keratinocita sejteket (NHEK) humán papillóma vírus E6/16 fehérjét kifejező plazmid segítségével transzformálták, majd stabil sejtvonalat hoztak létre (az elkészült sejtvonal Tubak Vilmos ajándéka). Laboratóriumunkban a HPV-KER keratinocita sejtvonalat szérumentes, 1% antibiotikum/antimikotikum-ot (AB/AM, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) és szupplementet tartalmazó keratinocita tápoldatban (KCSFM, Life Technologies, Carlsbad, USA) standard laboratóriumi körülmények között (5% (v/v) CO₂-t tartalmazó légkörben, 37 °C-on) tartottuk.

3.2 A felhasznált *P. acnes* törzs és tenyésztése

A *P. acnes* baktériumtörzseket standard mikrobiológiai eljárások alkalmazásával tenyésztettük és tároltuk [Nagy, 2005]. Röviden, a baktériumokat 5% (v/v) borjúvérrel, K1 vitaminnal és haeminnel kiegészített pre-redukált Columbia agar (Oxoid, UK) táptalajon növesztettük. A baktériumok anaerob körülmények (anaerobic chamber; Bactron Sheldon Man, Oregon, USA) között, 37 °C-on nőttek. A *P. acnes* izolátumokból származó egysejt kolóniákat BHI (pH 7.4, Oxoid) tápoldatba oltottuk, majd 37 °C-on inkubáltuk 48 órán keresztül. A baktériumszuszpenziók centrifugálása (2600 × g-n 10 perc) után a felülúszót eltávolítottuk. Három 10 perces PBS-EDTA-s mosás után a sejteket 5 ml PBS-EDTA-ban felfuszpendáltuk, ezután a sejtszámot spektrofotométerrel mért optikai denzitás értékek alapján (OD = 600 nm) becsültük. A baktérium sejtszám 1x10⁹ cfu/ml-re állítottuk PBS-EDTA-oldatban, és felhasználásig-80°C-on tároltuk.

Három különböző baktérium törzset használtunk, ezek a *P.acnes* 889, 6609 és az ATCC11828 jelűek voltak. Ezek jellegzetességeit az 1. táblázat foglalja össze.

Név	Eredet	Filogenetikai csoport	Patogenicitás
889	endokarditises betegmintából	IA.	patogén
6609	egészséges bőrfelszínről készült törésből	IB.	nem patogén
ATCC11828	tályogból	II.	patogén

1. táblázat A munkák során felhasznált *P. acnes* törzsek jellegzetességei.

A baktériumtörzsek fenntartása valamint tenyésztése az SZTE, ÁOK, Klinikai Mikrobiológiai Intézetében, Dr. Urbán Edit vezetésével történt.

3.3 A HPV-KER sejtek kezelése *P. acnes* 889 baktériummal

A HPV-KER sejtek *P. acnes* kezeléséhez 300.000 sejtet tettünk 6-os szövettenyésztő edénybe, majd ezeket 24 órán keresztül antibiotikum/antimikotikum mentes (AB/AM-) KCSFM tápoldatban inkubáltuk. A sejteket élő *P. acnes* baktériummal kezeltük előzetes kísérleteinkben meghatározott keratinocita sejt: baktérium arányt használva (multiplicity of infection = MOI: 25, 50, 100, 200, 300). A ko-kultúrákat normál tenyésztési körülmények között 0, 6, 24 óráig inkubáltuk, ezekből mintát vettünk, melyeket további felhasználásig -80°C-on tartottunk.

3.4 Totál RNS izolálás

A kezeletlen kontroll és baktérium kezelt mintákból TRI-Reagens (Molekular Research Inc. Cincinatti, USA) felhasználásával RNS-t izoláltunk a gyártó utasításai szerint. Röviden, a minták kiolvasztását követően kloroformos extrakciót végeztünk. A fázisok centrifugálásos szétválasztása után a vizes fázist új Eppendorf csőbe helyeztük át, majd az RNS tartalmat izopropanol hozzáadásával lecsaptuk. Centrifugálást követően (13.000 rpm, 10 perc, 4°C) a felülúszót eltávolítottuk, majd nukleáz mentes DEPC-es 70% (v/v) etanolos oldattal mostuk a csapadékot. Az RNS pellet szárítását

követően RN-áz mentes vízben feloldottuk, és további felhasználásig azokat -80°C-on tároltuk.

3.5 Reverz transzkripció és valós idejű RT-PCR

Az RNS minták koncentrációját (OD_{260} mérés) és tisztaságát (OD_{260}/OD_{280} mérés) spektrofotométerrel elemeztük. A mintákat 0,2 µg/µl koncentrációra hígítottuk, majd cDNS-t állítottunk elő reverz transzkripció során. Ehhez az iScript™ cDNS Synthesis kitet (Bio-Rad, Hercules, USA) használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően, melynek során összesen 1 µg totál RNS mintát írtunk át 20 µl végtérfogatban.

Komponens	Mennyiség (1 reakcióra)
dH ₂ O	2,4 µl
Mastermix	10 µl
Forward primer (10 pmol / µl)	1,8 µl
Reverse primer (10 pmol / µl)	1,8 µl
Próba (10 pmol / µl)	2 µl

2. táblázat A valós idejű RT-PCR reakciók összetétele.

A kapott cDNS minták felhasználásával valós idejű RT-PCR vizsgálatokat végeztünk, melyhez az Universal Probe Library rendszert (Roche, Indiana, USA) és FastStart TaqMan Probe Master (Roche; Indiana, USA) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciókat 20 µl végtérfogatban, a 2. táblázatban jelzett összetételben végeztük. A felhasznált primer szekvenciákat és az alkalmazott reakciókörülményeket a 3. táblázat tartalmazza.

Gén	Primer szekvenciák f- <i>forward</i> primer, r- <i>reverse</i> primer	UPL próba száma
18S rRNS	f: 5'CGCTCCACCAACTAAGAACG3' r: 5'CTCAACACGGGAAACCTCAC3'	77
TNF α	f: 5'CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT3' r: 5'GCCAGAGGGCTGATTAGAGA3'	29
IL-1 α	f: 5'AACCAGTGCTGCTGAAGGA3' r: 5'TTCTTAGTGCCGTGAGTTTCC3'	35

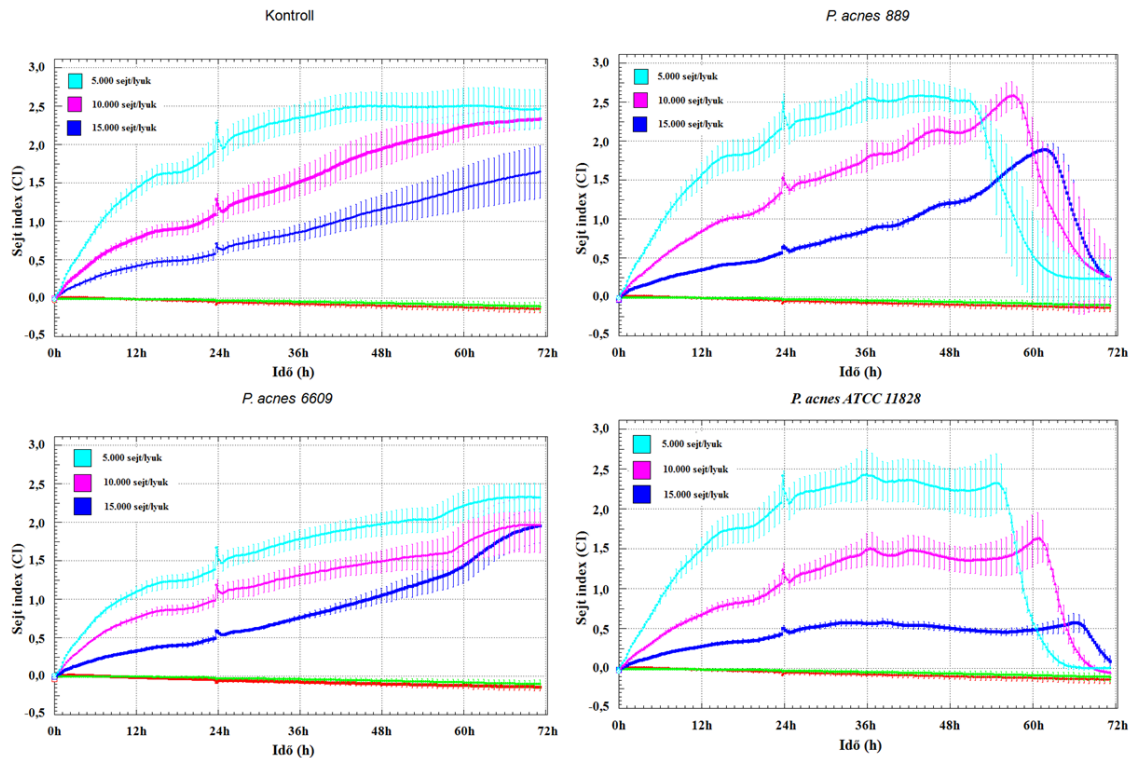
3. táblázat A valós idejű RT-PCR reakciók során felhasznált primerek és UPL próbák.

3.6 A *P. acnes* által indított sejtbioológiai folyamatok valós idejű vizsgálata (xCELLigence) HPV-KER sejtekben

In vitro tenyésztett sejtek sejtbioológiai folyamataiban bekövetkező változások valós idejű követése az xCELLigence (Roche) rendszer alkalmazásával történt. Az eljárás valós idejű ellenállás, impedancia (Z) mérésen alapul. Speciális, arany elektródákkal ellátott 96-lyukú tenyésztő edények alját 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronektinnel (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) vontuk be. 50 μl tápoldatot adtunk a lyukakhoz, majd lemértük az E-plate hátterét. Ezt követően 10.000 HPV-KER sejtet helyeztünk ki lyukanként 100 μl AB/AM mentes KC-SFM tápfolyadékban, melyeket különböző mennyiségű *P. acnes* 889, 6609 és ATCC11828 baktériumokkal kezeltünk eltérő sejt – baktérium arányok alkalmazása mellett (MOI = 25, 50, 100, 200, 300). Az impedancia értékeket 15 percenként mérte a rendszer 90 órán át, melyekből a szoftver egy dimenzió nélküli Ci értéket határozott meg. A Ci függ a tenyésztőedény felszínének fedettségétől, így ennek megváltozását a sejtek számának, alakjának, méretének, és a felszínhez való adhéziójának módosulása eredményezi.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1 *P. acnes* által indított sejtbilógiai folyamatok valós idejű vizsgálata (xCELLigence) HPV-KER sejtekben



8. ábra A *P. acnes* hatására induló sejtbilógiai folyamatok valós idejű vizsgálata. a Különböző *P. acnes* törzsek eltérő hatással vannak a HPV-KER sejtek sejtbilógiai folyamataira (a részletes leírást ld. a szövegben.) (A kísérletek Tax Gábor doktorandusz hallgató eredményei.)

A sejtbilógiai folyamatok valós idejű követéséhez az xCELLigence rendszert alkalmaztuk, mely váltóáramú ellenállás, vagyis az impedancia (Z) mérésén alapul. Ebből a rendszer egy dimenzió nélküli értéket, az úgynevezett sejt indexet (Ci) számol. Előzetes kísérleteinkben 5.000, 10.000, 15.000 sejtet tettünk a speciális tenyésztőedénybe lyukanként, majd 15 percnként a Ci értékek változását követtük összesen 72 órán keresztül.

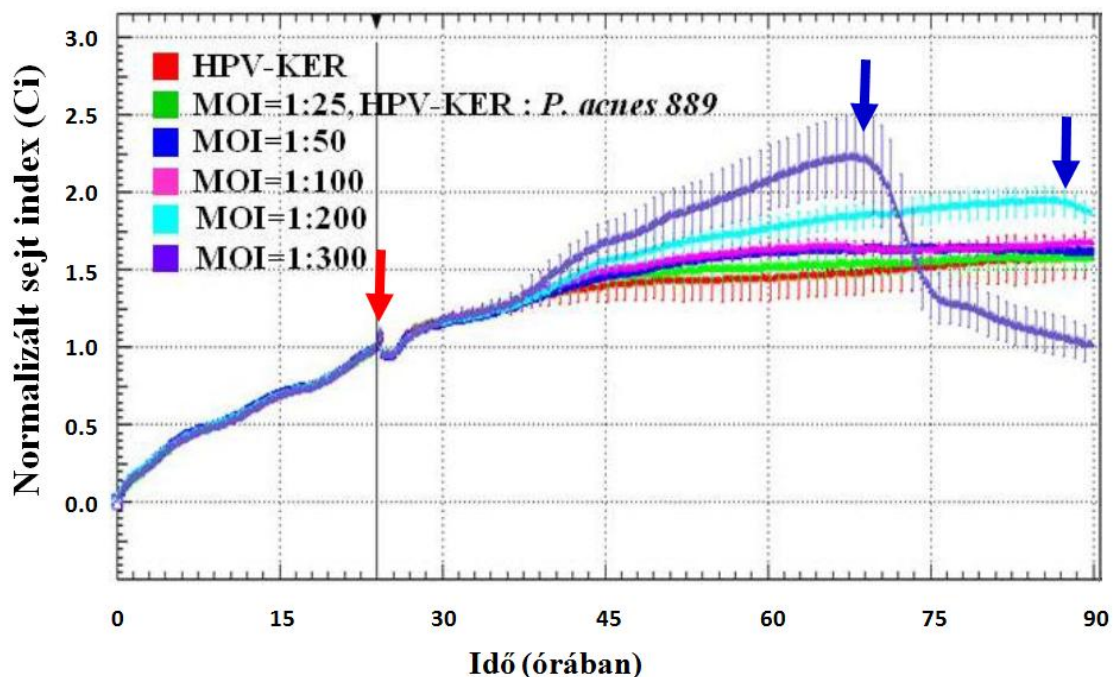
A legkisebb kiindulási sejtszámnál (5.000 sejt/lyuk) a mérés ideje alatt a Ci értékek folyamatosan nőttek, míg az ennél több sejtet tartalmazó mintákban (10.000 sejt/lyuk, 15.000 sejt/lyuk) a mért Ci értékek a mérés ideje alatt elérték egy plató értéket, ahonnan tovább már nem változtak (8.ábra). Ezen eredményekből arra lehet következtetni, hogy az 5.000 sejt/ lyuk arányánál a kultúrák a kísérlet teljes időtartama

alatt végig növekedtek, míg az ennél több kiindulási sejtet tartalmazó lyukakban (10.000 és 15.000) egy idő után konfluens állapot alakult ki.

Ezt követően a HPV-KER sejteket különböző *P.acnes* törzsekkel (889, 6609, ATCC11828) kezeltük (8. ábra). A *P.acnes* 6609-es nem patogén törzs esetében a görbék lefutása nagyon hasonló volt a kontroll sejtek görbééhez. A *P.acnes* 889 és az ATCC11828 patogén törzseknél már eltérés volt tapasztalható, a kísérlet 48-60 órái között egy gyors Ci érték csökkenést detektáltunk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ezeknek a törzseknek hatása van a keratinociták sejtbiológiai folyamataira.

Az itt kapott eredmények alapján a további kísérletek során a 10.000 sejt/lyuk kiindulási sejtszámot alkalmaztuk, valamint a *P.acnes* 889-es baktérium törzs hatását a HPV-KER sejtekre részletesen vizsgáltuk. (Tax Gábor doktorandusz hallgató kísérleti eredményei).

4.2 A különböző dózisú *P.acnes* 889-es kezelések hatása a HPV-KER sejtek sejtbiológiai folyamataira



9. ábra A különböző dózisú *P.acnes* 889-es kezelések hatása a HPV-KER sejtek sejtbiológiai folyamataira A diagramon piros nyíl jelzi azt az időpontot, mikor a *P. acnes* 889 baktériumot hozzáadtuk a sejtekhez. A kék nyíl jelzi azt az időpontot, ahol a sejtek Ci értéke gyors csökkenésnek indulnak (részletes leírást ld. a szövegben). (A kísérletek Tax Gábor doktorandusz hallgató eredményei.)

A kísérletek során 10.000 sejtet indítottunk 96-os E-szövettenyésztő edénybe lyukanként AB/AM mentes KC-SFM tápoldatban. 24 óra elteltével a sejtekhez különböző arányokban *P.acnes* 889 baktériumot (MOI 1:25, 50, 100, 200, 300) adtunk, majd 90 órán keresztül 15 percenként mértük az impedancia értékeket. A kiszámított Ci értékeket az idő függvényében ábrázoltuk (9. ábra).

A kapott görbék első szakaszában kezeletlen és a baktérium kezelt minták impedancia mértéke folyamatosan nőtt, ami arra utal, hogy a sejtek ez idő alatt folyamatosan osztódtak. 24 óra elteltével a HPV-KER sejtekhez hozzáadtuk a *P. acnes* 889 baktériumokat (9. ábra piros nyíl). A kezelés után a kontroll minták Ci értéke ~46 óráig folyamatosan nőtt, itt elérte a plató fázist. A kisebb dózissal kezelt sejteknél (MOI 25, 50, 100) a kontrollhoz hasonló lefutást tapasztaltunk. Magasabb MOI-k esetében (200, 300) azonban a kezelést követően fokozott Ci növekedést tapasztaltunk, majd 48-60 órával a kezelést követően egy hirtelen csökkenést láttunk (9. ábra kék nyíl).

Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy alacsony MOI-k esetében (25, 50, 100) a *P. acnes* 889 törzsnek nem volt detektálható hatása a HPV-KER sejtek sejtbioológiai folyamataira a kísérlet időtartama alatt. Ezzel szemben, magas MOI-k esetében (200, 300) a baktérium hatására a kontrolltól eltérő impedancia-változások történtek. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy a különböző dózisú baktérium kezelések eltérő módon befolyásolják a HPV-KER sejtek sejtbioológiai folyamatait. **(Tax Gábor doktorandusz hallgató kísérleti eredményei).**

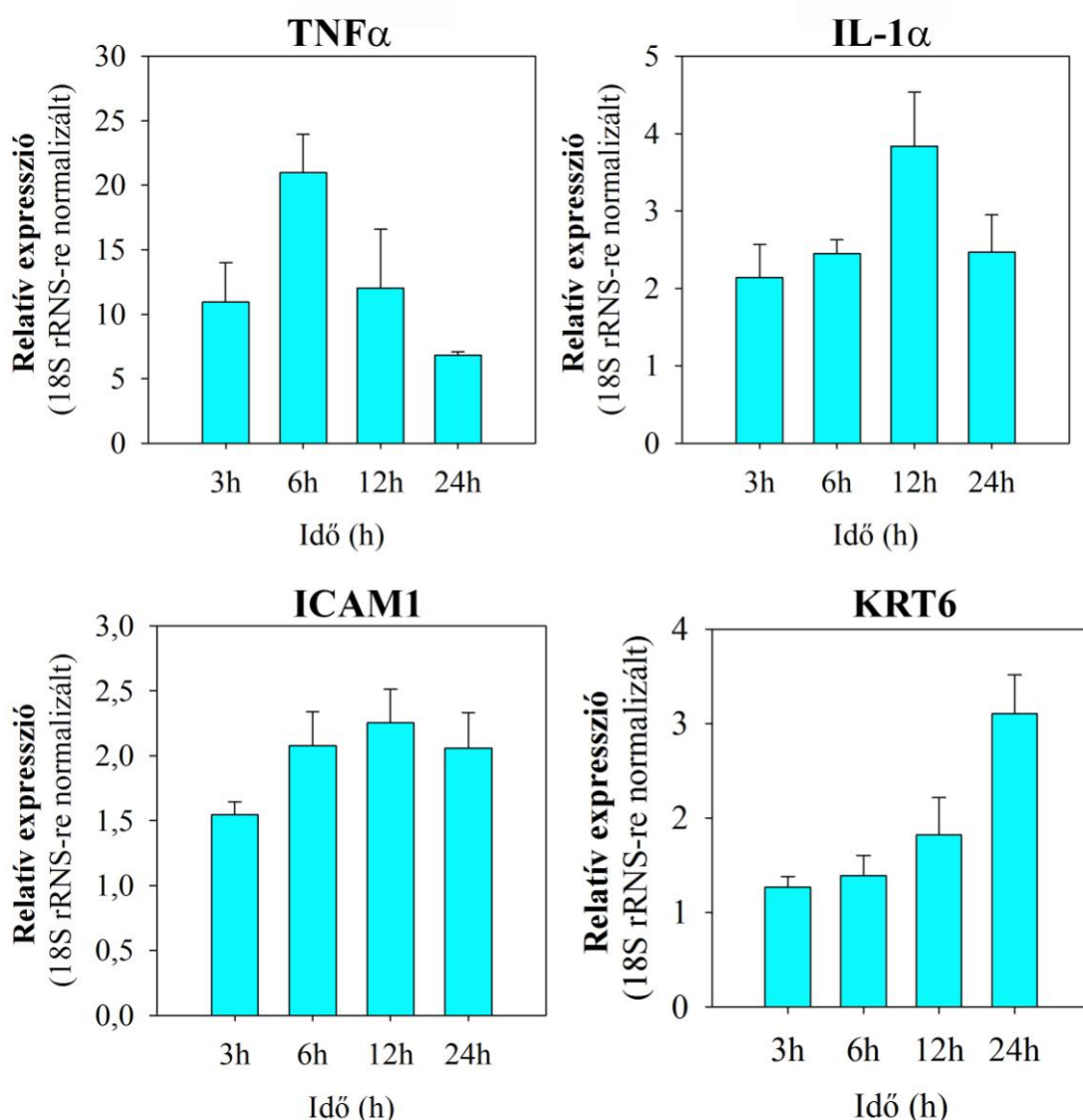
4.3 A *P. acnes* 889 kezelés hatása a keratinocita aktivációs útvonalra

Ezt követően arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon a keratinocita aktiváció szerepet játszhat-e az előzőekben megfigyelt jelenségek során. Ahhoz, hogy erre a kérdésre válaszolni tudjunk az aktivált állapotra jellemző marker gének mRNS szintű kifejeződésének változását vizsgáltuk a *P.acnes* kezelés hatására valós idejű RT-PCR módszerrel. Ezek az aktivált állapot kialakításában szükséges IL-1 α , a fenntartásáért felelős TNF α , valamint az ICAM1 és a KRT6 marker gének voltak.

Vizsgálataink során 300.000 HPV-KER sejtet kezeltünk 6 lyukú szövettenyésztő edényben a *P. acnes* 889 baktérium törzsszel (MOI = 100). A kezeléstől számított 3, 6, 12 és 24 óra múlva mintát vettünk, melyekből totál RNS-t izoláltunk, és cDNS átírást végeztünk.

Eredményeink alapján a TNF α mRNS szintje a kezelést követő harmadik órában emelkedni kezdett, majd utána 6-12 óránál érte el a maximum értéket. Ezt követően fokozatosan újra csökkenni kezdett. Az IL-1 α mRNS szintek a TNF α mRNS-hez hasonló változást mutattak. Az ICAM1 mRNS szintű kifejeződése enyhén emelkedett értéket mutatott a baktérium kezelt mintákban minden vizsgált időpontban, míg a KRT6 szintje fokozatosan emelkedett az idő előrehaladtával (10. ábra).

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a *P. acnes* szerepet játszhat a keratinocita aktiváció kialakításában és fenntartásában.



10. ábra A TNF α , az IL-1 α gyulladásos citokinek valamint a ICAM1 és KRT6 markergének mRNS szintű kifejeződésének változása *P. acnes* 889 kezelés hatására. Mindkét gyulladásos citokin mRNS kifejeződése gyors, tranziens változást mutat a baktériumkezelés hatására. Az ICAM1 markergén mRNS kifejeződése minden vizsgált időpontban emelkedett, míg a KRT6 mRNS szintjének kifejeződése folyamatosan emelkedik a *P. acnes* 889 kezelés hatására. (Minden érték a saját idejű kezeletlen kontrollhoz lett viszonyítva. Az ábrák 3 párhuzamos kísérlet eredményeinek átlagát mutatja (+/- standard error), ahol kondícióként 3-3 párhuzamos minta értékét átlagoltuk.)

4.4 Különböző dózisu *P. acnes* 889 kezelés hatása a keratinocita aktiváció mértékére

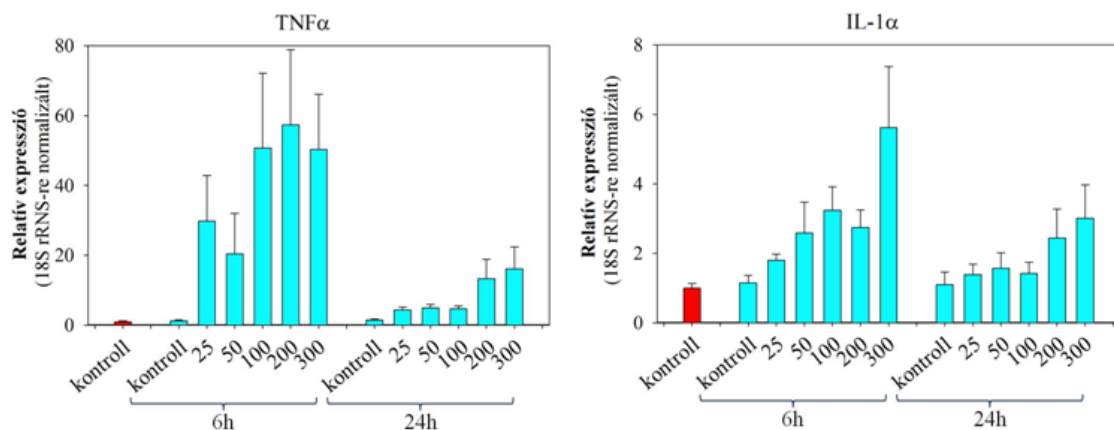
Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a *P. acnes* 889 törzs különböző dózisokban adva a HPV-KER sejtekhez milyen hatással van azok aktivációjának mértékére. Ehhez az aktivált állapot kialakításában és fenntartásában fontos két gyulladásos citokin (TNF α és IL-1 α) mRNS kifejeződésének változását vizsgáltuk az eltérő dózisu *P. acnes* 889 kezelés hatására.

Ehhez a HPV-KER sejteket különböző sejt : baktérium arányban élő *P. acnes* 889 baktériummal kezeltük (MOI 25, 50, 100, 200, 300), majd 6 és 24 óra elteltével mintákat vettünk, melyeket valós idejű RT-PCR módszerrel elemeztük.

Azt tapasztaltuk, hogy a 6 órás mintákban a TNF α mRNS szintű kifejeződésének mértéke dózisfüggést mutatott. A 24 órás mintákban alacsony MOI alkalmazása esetén (25, 50, 100) az mRNS szintek már újra a kezeletlen kontroll értékekhez közelítettek, míg magas MOI-k esetében még ebben az időpontban is enyhén emelkedettek voltak (11. ábra).

Az IL-1 α esetében a TNF α mRNS kifejeződésének változásához hasonló változást tapasztaltunk (11. ábra).

Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a keratinociták környezetében található *P. acnes* mennyiségének növekedésével a keratinociták aktivációjának mértéke fokozódik.



11. ábra TNF α és az IL-1 α mRNS szintű kifejeződése különböző dózisu *P. acnes* 889 baktérium jelenlétében. A TNF α és az IL-1 α mRNS szintű kifejeződése gyors, dózisfüggő, tranzienst változást mutat baktérium kezelés hatására. (Minden érték a 0h kezeletlen kontrollhoz (pirossal jelölve) lett viszonyítva. Az ábra 2-2 kísérlet eredményeinek átlagait mutatja, (+/- standard error) ahol a *P. acnes* kezelt mintákat a kezeletlen 0 órás kontroll mintákhoz viszonyítottuk)

5. Összegzés

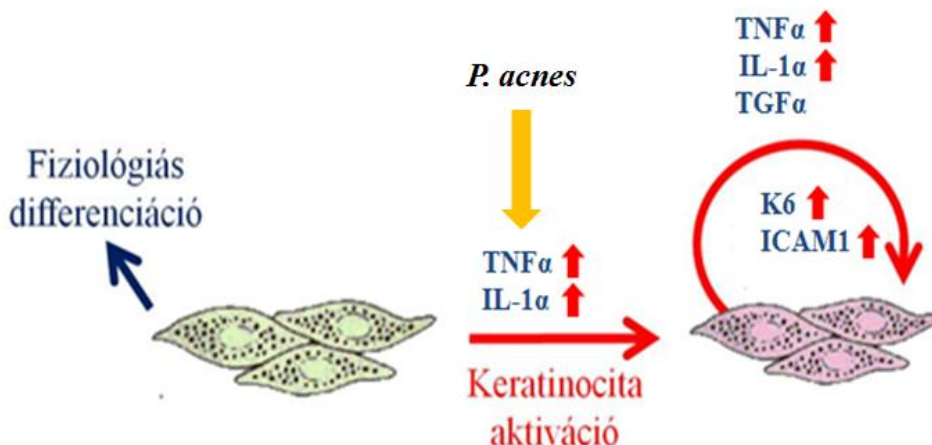
Az egészséges bőrben a keratinociták lassú differenciálódáson mennek keresztül, míg a bazális epidermális rétegtől eljutnak a szarurétegig. A Freedberg és mts. által felállított keratinocita aktivációs hipotézisnek megfelelően ezek a differenciálódási események megváltozhatnak, ha valamilyen külső zavaró tényező lép fel, melynek hatására az epidermális sejtek aktiválódhatnak. Ebben az aktivált állapotban egy alternatív útvonal nyílik meg a sejtek előtt, ami ezek után azok sejtbiológiai folyamatainak zavarához, többek között fokozott sejtproliferációhoz és abnormális differenciálódáshoz vezethet. Ezt az állapotot jellemzi még a megváltozott citoskeletális szerkezet, és számos gén eltérő kifejeződése melyek között találunk pl. citokineket, kemokineket, növekedési faktorokat, sejtfelszíni receptorokat, adhéziós molekulákat. [Freedberg et al., 2001] A fenti folyamatok elindításáért az IL-1 felel, míg a fenntartásában a TNF α játszik fontos szerepet. [Barker et al., 1991; Freedberg et al., 2000; Nickoloff and Turka, 1993; Freedberg et al., 2001].

Kísérleteinkben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy szerepe lehet-e a keratinocita aktivációs folyamatoknak az acne patogenezise során, van-e, és ha igen, akkor milyen hatása van a *P. acnes* baktériumnak az aktivációs folyamatokra? Befolyásolja-e a sejtek környezetében található baktériumok száma, és az alkalmazott *P. acnes* törzsek filogenetikai és mikrobiológiai sajátosságai az aktiváció mértékét?

Munkánk során megmutattuk, hogy a patogén *P. acnes* 889 és ATCC 11828 baktérium törzsek sejtbiológiai folyamatokat indítanak el *in vitro* tenyésztett HPV-KER sejtekben magas sejt : baktérium arány alkalmazása mellett (MOI 200, 300). Alacsony MOI-k, valamint az egészséges bőrfelszínről származó *P. acnes* 6609 törzs esetében hasonló hatás nem volt megfigyelhető kísérleteink időtartama alatt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kezelés során alkalmazott *P. acnes* törzsek filogenetikai és mikrobiológiai sajátosságai, illetve a kezeléseket során alkalmazott baktérium dózisok nagyban befolyásolják a HPV-KER sejtekre gyakorolt hatásukat. Munkacsoportunk további eredményei azt is igazolják, hogy a patogén törzsek fokozott sejtproliferációt, majd ezt követően a HPV-KER sejtek pusztulását okozhatják [Tax Gábor személyes közlése alapján].

Annak vizsgálatára, hogy milyen molekuláris biológiai folyamatok és különbségek állhatnak ezeknek a megfigyeléseknek a hátterében vizsgáltuk a *P. acnes*

889 törzs hatását a keratinocita aktivációs folyamatok szabályozásában szerepet játszó gének kifejeződésére (TNF α , IL-1 α), illetve a folyamatok markergénjeinek (ICAM1, és KRT6) expressziójára. A *P. acnes* 889 törzs az általunk megvizsgált összes gén kifejeződését fokozta. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a baktérium szerepet játszhat a keratinocita aktivációs folyamatok kialakításában, valamint ezáltal feltételezhetően az acne molekuláris patogenezise során.



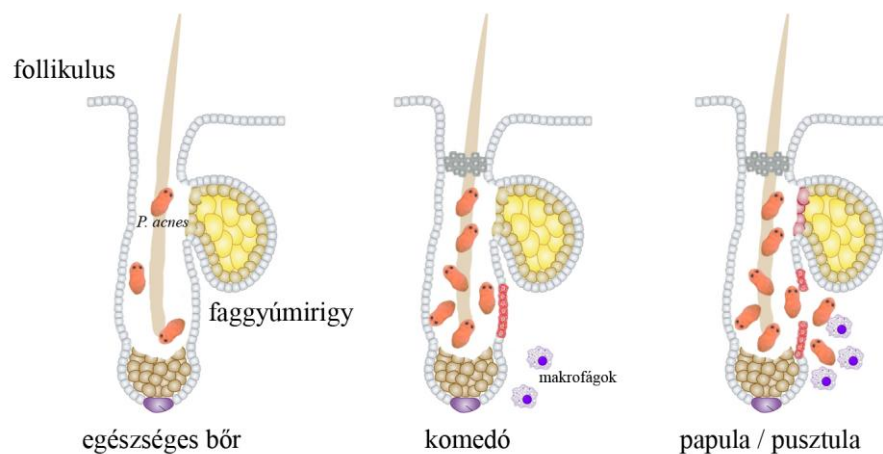
13. ábra A *P. acnes* baktérium feltételezett szerepe a keratinocita aktivációs útvonalban.

Freedberg és munkatársai szerint a keratinocita aktiváció első lépésekor valamilyen külső, zavaró hatásra a sejtekből felszabadul az IL-1 α citokin [Freedberg, 2001], mely az interleukin-1 receptoron (IL-1R) keresztül parakrin módon aktiválhatja a környező sejteket. Ennek az állapotnak a fenntartásában később az IL-1 α mellett a TNF α és TGF α játszanak fontos szerepet. Saját megfigyeléseink azonban azt mutatják, hogy *P. acnes* kezelés hatására mind az IL-1 α mind pedig a TNF α citokin mRNS kifejeződése egy gyors, tranzienst változást mutat, így felveti annak a lehetőségét, hogy az aktiváció kialakításában ez utóbbi citokin is fontos szerepet játszik (13. ábra).

A későbbiekben a TNF α és az IL-1 α számos egyéb gén kifejeződését szabályozza. Ez magyarázhatja azon eredményünket is, mely azt mutatja, hogy a KRT6 mRNS szintű kifejeződése időben eltoltnan jelentkezik az IL-1 mRNS expressziójához képest. Az IL-1 α szerepét a KRT6 kifejeződésének szabályozásában irodalmi adatok is alátámasztják [Komie; 2001; Freedberg, 2001].

A *P. acnes* dózisfüggő aktivációt okoz a HPV-KER sejtekben, hiszen mindkét általunk vizsgált, az aktivációs folyamatok kialakításában kulcsfontosságú gyulladásos citokin mRNS kifejeződése párhuzamosan emelkedett az alkalmazott *P. acnes* 889

baktérium dózis növekedésével a korai 6 órás mintákban. A HPV-KER sejtek valószínűleg sejtbioológiai folyamatainak vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az alacsony MOI-k (25, 50, 100) esetében nem tapasztaltunk a kezeletlen kontrollhoz viszonyított eltérést az xCELLigence kísérleteinkben. Magas MOI-ban (200, 300) alkalmazva a patogén *P. acnes* törzset a HPV-KER sejtek fokozott proliferációját, majd a sejtek pusztulását tapasztaltuk. Érdekes, hogy ugyanezen kísérleti kondíciók (MOI 200, 300) mellett mindkét citokin mRNS szintje még emelkedett értékeket mutatott a kontroll mintákhoz képest a kezelést követően 24 óra elteltével. Ebben az időpontban alacsony MOI-k alkalmazása mellett a TNF α és IL-1 α mRNS-ek szintje már újra a kezeletlen kontroll értékekhez közelítettek.



14. ábra A *P. acnes* baktérium feltételezett szerepe az acne patogenezisében. (A részletes leírást ld. a szövegben.)

A bemutatott eredmények alapján a következő modellt állítottuk fel.

A szébum a follikulusokból folyamatosan, meghatározott sebességgel áramlik a bőrfelszín felé. Ez az áramló szébum magával sodorja a szabadon található *P. acnes* baktériumok egy részét, ezáltal fenntartva egy állandó, alacsony baktérium szintet. Ez az állapot felborul, ha valamilyen külső hatásra megváltozik a keratinociták differenciációja. Az abnormális differenciáció eredményeként felhalmozódnak az elhalt epiteliális sejtek, és egy dugó alakul ki a follikulus kivezető nyílásában. Ez fizikailag akadályozza a folyamatosan termelődő szébum, és a *P. acnes* baktériumok kiürülését. A dugó kialakulásának következtében emellett fokozottan anaerob környezet alakul ki, mely kedvező feltételeket biztosít a baktérium növekedése számára. Mindez ahhoz vezet, hogy az eldugult follikulusban megemelkedik a *P. acnes* lokális mennyisége. Később a felhalmozódó elhalt sejtek, a termelődő faggyú által kifejtett nyomás,

valamint a baktérium által kiválasztott anyagok és enzimek hatására a follikulus fala megsérülhet és felszakadhat. A sérülés eredményeként a baktérium és az egyéb anyagok (szabad zsírsavak, elhalt sejtek) kapcsolatba léphetnek a mélyebb szöveti rétegekkel, melyek hatására lokális gyulladás alakulhat ki.

Eredményeink arra utalnak, hogy a bőrsejtek és a kommenzális flóra között egy rendkívül komplex, dinamikus egyensúly áll fenn, melynek egyensúlya elengedhetetlen az bőr homeosztázisának fenntartásához. Az eddig összegyűjtött kísérleti eredményeink, és a rendelkezésre álló irodalmi adatok felhasználásával felállított modell pedig magyarázatul szolgálhat annak megértésére, hogy hogyan válhat egy egyébként veszélytelen, kommenzális baktérium speciális körülmények között patogénné.

Összességében alapkutatás jellegű vizsgálataink sok hasznos információt szolgáltathatnak a humán sejtek és a körülöttük élő kommenzális flóra kölcsönhatásának jobb megismeréséhez. Emellett klinikai jelentőségük is óriási, hiszen lehetővé tehetik a serdülőkori populáció nagy százalékát érintő gyulladásos bőrbetegség patogenezisének jobb megértését.

6. A felhasznált irodalmak jegyzéke

Barker J. N., Mitra R. S., Griffiths C. E., Dixit V. M., and Nickoloff B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*, 337: (8735)211-214. 1-26-1991

Dobozy, Farkas, Horváth, Hunyadi, Schneider: *Bőrgyógyászat*. (3., jav. kiadás) Eklektikon Kiadó és Nyomdai Szolgáltató Kft., Budapest, 2004. ISBN 963-86661-3-7

Freedberg I. M., Tomic-Canic M., Komie M., and Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J. Invest. Dermatol.*, 116:(5)

Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol*. 2011 Oct;131(10):1974-80.

Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol*. 2009 Dec;144(6):689-700.

Komie, M., Rao, L. S., Freedberg, I. M., Simon, M., Milisavljevic, V. and Blumenberg, M. Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J. Invest Dermatol*. 2001; 116:330-338

Miller LS. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol*. 2008;24:71-87.

Nagy I, Pivarsci A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol*. 2005 May;124(5):931-8.

Nickoloff, B. J. and Turka, L. A. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am. J. Pathol.*, 143:(2)325-331. 1993

O. Braun-Falco, G. Plewig, H. H. Wolff, W. H. C. Burgdorf *Dermatology*. Springer. 2000 ISBN: 3-540-59452-3

Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgő Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*. 2003 Jun;15(6):721-30.

Rioux KP, Fedorak RN. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Mar;40(3):260-3.

Szabó K, Kemény L. Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of acne vulgaris. *Hum Immunol*. 2011 Sep;72(9):766-73. Epub 2011 May 24.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999 Oct;11(4):443-51.

Terhorst D, Kalali BN, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol*. 2010;11(1):1-10.

Zouboulis CC, Chen W, Thornton MJ et al, Sexual hormones in human skin, *Horm Metab Res* 39 (2007) 85.

7. Az általam elsajátított és alkalmazott kísérleti módszerek listája

Munkám során a következő módszereket sajátítottam el, illetve ezeket önállóan alkalmaztam a dolgozatban bemutatott kísérletek elvégzése során:

- emlős sejtek tenyésztése, általános steril laboratóriumi munkák
- a HPV-KER sejtek *P. acnes* baktériummal való kezelése
- mintavételi eljárások, RNS, fehérje kifejeződés-vizsgálatokhoz
- cDNS átírás
- valós idejű RT-PCR

A dolgozatban bemutatott adatok részét képezik több, a munkacsoportunk által hazai és nemzetközi konferenciákon bemutatásra kerülő anyagnak:

1. Szabó K, Tax G, **Bolla B Sz**, Erdei L, Urbán E, Kemény L. *Propionibacterium acnes* induces a dose-dependent activation of cultured human keratinocytes. 42nd ESDR, Venice, Italy, 2012. (poszter, az összefoglaló a Journal of Investigative Dermatology folyóirat, **132:S2 p. S116, 2012** számában jelent meg) (Megjegyzés: Erdei Lilla és Bolla Beáta Szilvia szerzők az absztraktban még nem szerepelnek, de mivel a végső poszter elkészítésekor az általuk végzett kísérletek eredményei is bemutatásra kerültek, a poszteren a nevük a szerzők között került feltüntetésre.)
2. Tax Gábor, **Bolla Beáta Szilvia**, Erdei Lilla, Urbán Edit, Kemény Lajos, Szabó Kornélia. A keratinociták és a *Propionibacterium acnes* baktérium kölcsönhatásának szerepe az acne patogenezisében. Magyar Immunológiai Társaság XXXXI. Vándorgyűlése. Debrecen, 2012. (szóbeli előadás)
3. Szabó Kornélia, Tax Gábor, Bolla Beáta Szilvia, Erdei Lilla, Tábori Bettina, Urbán Edit, Kemény Lajos. *Propionibacterium acnes* indukált dóziszfüggő keratinocita aktiváció. Magyar Dermatológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest, 2012.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szabó Kornéliának a sok segítségével és tanácsért, amelyekkel ellátott munkám során. Hálás vagyok Prof. Dr. Kemény Lajosnak, az SZTE, ÁOK, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika vezetőjének a lehetőségért, hogy részt vehettem a Klinikán folyó tudományos munkában, és hogy itt készíthettem el a TDK dolgozatomat.

Szeretnék köszönetet mondani Tax Gábornak a velem töltött időért és a sok segítségért, melyet tőle kaptam, illetve Takácsné Bajkán Andreának segítségével a munkám során alkalmazott módszerek elsajátításában.

Köszönöm Dr. Urbán Editnek, az SZTE ÁOK, Klinikai Mikrobiológiai Intézet vezetőjének a *P. acnes* törzsek fenntartásában és tenyésztésében történő segítségét .

9. Nyilatkozat

Alulírott Biológus Msc szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- emlős sejtek tenyésztése, általános steril laboratóriumi munkák
- a HPV-KER sejtek *P. acnes* baktériummal való kezelése
- mintavételi eljárások, RNS, fehérje kifejeződés-vizsgálatokhoz
- cDNS átírás
- valós idejű RT-PCR

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2012. november 5.