

# **XXXI. OTDK Biológia Szekció**

## **A pattanásos betegség (acne) molekuláris patogenezisének vizsgálata**

**Készítette: Erdei Lilla**

Biológus MSc 2. évfolyam

**Szegedi Tudományegyetem, TTIK**

**és**

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Bőrgyógyászati és Allergológiai  
Klinika**

**Témavezető: Dr. Szabó Kornélia**

**Konzulens: Dr. Boros Imre Miklós**

**Szeged, 2012**



## Tartalomjegyzék

|       |                                                                                                                                                                     |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Bevezetés.....                                                                                                                                                      | 4  |
| 1.1   | Az emberi bőr .....                                                                                                                                                 | 4  |
| 1.1.1 | Anatómiai viszonyok.....                                                                                                                                            | 4  |
| 1.1.2 | A bőr speciális mikroflórája .....                                                                                                                                  | 6  |
| 1.2   | Az acne vulgaris (pattanásos bőrbetegség).....                                                                                                                      | 7  |
| 1.2.1 | Az acne kialakulása .....                                                                                                                                           | 7  |
| 1.2.2 | Epidemiológia .....                                                                                                                                                 | 8  |
| 1.2.3 | Klinikai kép .....                                                                                                                                                  | 8  |
| 1.2.4 | Patogén faktorok .....                                                                                                                                              | 9  |
| 1.3   | A tünetek kialakulásának hátterében játszódó molekuláris folyamatok.....                                                                                            | 10 |
| 2.    | Célkitűzés .....                                                                                                                                                    | 15 |
| 3.    | Anyagok és módszerek.....                                                                                                                                           | 16 |
| 3.1   | Humán immortalizált HPV-KER keratinocita sejtvonal tenyésztése .....                                                                                                | 16 |
| 3.2   | A felhasznált <i>P. acnes</i> törzs és tenyésztése .....                                                                                                            | 16 |
| 3.3   | HPV-KER sejtek kezelése <i>P. acnes</i> 889 baktériummal .....                                                                                                      | 16 |
| 3.4   | Totál RNS izolálás.....                                                                                                                                             | 17 |
| 3.5   | Reverz transzkripció és valós idejű RT-PCR .....                                                                                                                    | 17 |
| 3.6   | Western analízis.....                                                                                                                                               | 18 |
| 4.    | Eredmények.....                                                                                                                                                     | 20 |
| 4.1   | A <i>P. acnes</i> 889 törzs által kiváltott TLR aktiváció hatása a TNF $\alpha$ és IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésére.....              | 20 |
| 4.2   | A <i>P. acnes</i> 889 baktériumtörzs dózisfüggő módon befolyásolja a TNF $\alpha$ és IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésének mértékét ..... | 21 |
| 4.3   | A <i>P. acnes</i> 889 kezelés hatására induló negatív szabályozó folyamatok azonosítása... ..                                                                       | 21 |
| 4.3.1 | A SIGIRR, TOLLIP és a TNFAIP3 mRNS szintű kifejeződésnek vizsgálata HPV-KER sejtekben .....                                                                         | 22 |
| 4.3.2 | A <i>P. acnes</i> 889 baktériumtörzs dózisfüggő módon befolyásolja a TNF $\alpha$ és IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésének mértékét ..... | 23 |
| 4.4   | A <i>P. acnes</i> 889 kezelés hatására létrejövő NF-kB aktiváció vizsgálata HPV-KER sejtekben.....                                                                  | 23 |
| 4.5   | Dózisfüggő NF-kB aktiváció .....                                                                                                                                    | 24 |
| 5.    | Diszkusszió.....                                                                                                                                                    | 25 |
| 6.    | Felhasznált irodalom jegyzéke .....                                                                                                                                 | 29 |
| 7.    | Köszönetnyilvánítás .....                                                                                                                                           | 31 |
| 8.    | Általam elsajátított módszerek összessége.....                                                                                                                      | 32 |
| 9.    | Nyilatkozat .....                                                                                                                                                   | 33 |

# 1. Bevezetés

## 1.1 Az emberi bőr

A bőr az emberi test legnagyobb szerve, körülbelül 15%-a egy felnőtt ember teljes testtömegének. Fő funkciója a szervezet környezettől való elhatárolása, védelme a külső, behatásokkal szemben. Speciális szerkezetének és a felépítésében résztvevő sejtek funkciójának eredményeképpen fizikai, kémiai, biológiai és immunológiai értelemben egy komplex barriert hoz létre. Emellett érzékelő funkciója is jelentős, valamint szerepe van a vízháztartás és az állandó testhőmérséklet fenntartásában. Ezt a sokrétű funkciót a rendkívül kidolgozott komplex struktúrája és a különböző eredetű szövetek (epitéliális-, vaszkuláris-, izom, ideg-, kötőszövet) hálózatos összekapcsolódása teszi lehetővé (Kanitakis, 2002).

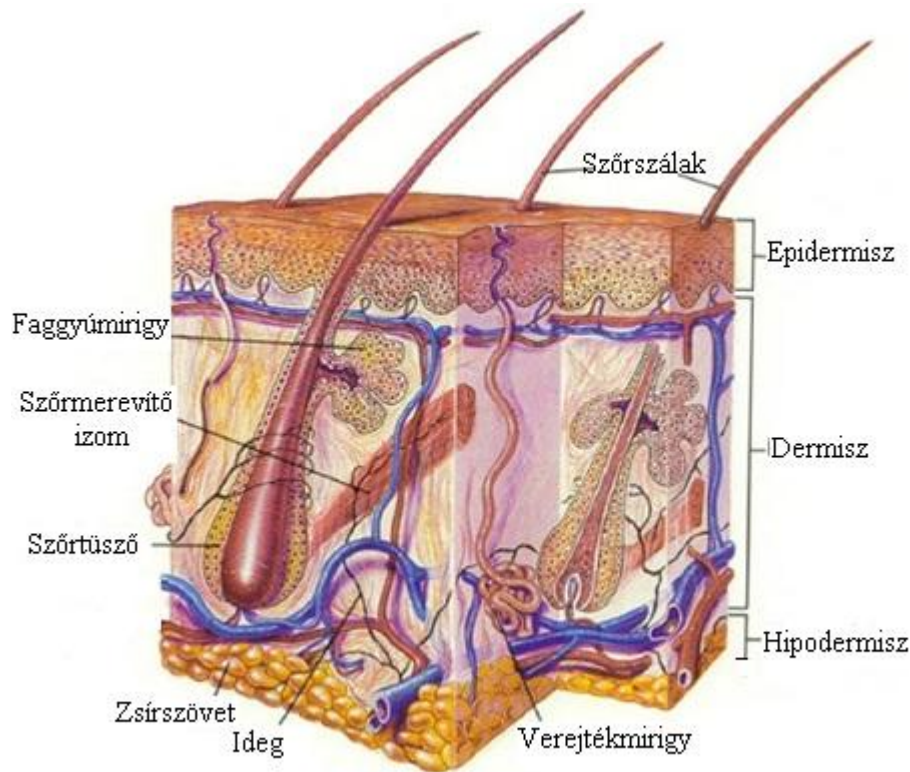
### 1.1.1 Anatómiai viszonyok

A bőrben a különböző ektodermális és mezodermális eredetű szövetek három rétegbe rendeződnek. Kívülről befelé haladva megkülönböztetjük az ektodermális eredetű **epidermiszt** (hám) a vele asszociált függelékekkel (szőr, köröm, mirigyek), a **dermiszt** (irha), valamint a **hipodermiszt** (bőralja) (1. kép).

Az epidermisz a bőr külső rétege, többrétegű elszarusodó laphám, mely főként keratinocitákból épül fel. Részei az alaprég (*stratum basale*), a sokszögletű sejtek rétege (*stratum spinosum*), a szemcsés réteg (*stratum granulosum*), a fénylő réteg (*stratum lucidum*) és a szaruréteg (*stratum corneum*). Az alaprég sejtei folyamatosan osztódnak, és az általuk termelt sejtek differenciálódásuk során egyre távolabb kerülnek a tápláló dermisz rétegétől. Ennek során fokozatosan ellaposodnak majd elhalnak, és szaruréteget képeznek, mely véd a külső behatásokkal szemben. Az epidermiszben festéktermelő sejtek, melanociták is találhatóak, melyeknek fontos szerepe van a bőr színét meghatározó pigmentszemcsék létrehozásában. Ezek fontos feladata a szervezet védelme a káros sugárzások ellen (Bressler, 1989; Elias, 2008).

A bőr középső rétege a dermisz, melynek alapja lazarusos kötőszövet. Két fő rétege van, a *stratum papillare* és a *stratum reticulare*. Itt találhatóak a hámot tápláló erek, valamint az érzékelő funkciót lehetővé tevő (hő-, fájdalom-, nyomás- és tapintás érzékelő) receptorok. A dermiszben számtalan ér is fut, melyeknek a tápanyagellátáson kívül az állandó testhőmérséklet fenntartásában is szerepe van.

A hipodermisz a bőr legmélyebb rétege, melyet zsíros kötőszövet alkot (Kanitakis, 2002).



**1. kép. A bőr szerkezete.** (Forrás: *Biology of Aging - Integumentary System / Structure of Human Skin Various Overheads* 2/20/2003)

A bőrünkön különféle függelékszervek is találhatóak, ezek:

- a szőr és a haj,
- a különféle mirigyek (faggyú- és verejtékmirigy, apokrin illat, és az emlőmirigy),
- a köröm.

A faggyúmirigy a bőrben található follikulusok, vagy más néven a pilosebáceus egység (PSU) egyik fontos része. A PSU részei a szőrtüsző, a proximális rész (‘‘hajhagyma’’), a disztális rész a faggyúmirigy csatlakozása alatti dudor (bulge) régióig a faggyúmirigy, és a szőrszálmerevítő izom (*erector pili muscle*) (1. kép).

A szőrtüszők a bőr felszínére kiemelkedő hajszálból, mátrix keratinocitákból és a fibroblasztokat tartalmazó dermális papillából, külső-, és belső gyökérhüvelyből, valamint kötőszövetes állományból épülnek fel (Alberts, 2008).

A faggyúmirigyek a bőr középső rétegében a dermiszben helyezkednek el, melynek speciális, váladékot termelő epidermális sejtjei, a sebaciták. Ezek egy vékony kivezető csövön keresztül vagy a bőr felszínére, vagy a szőrtüszőkbe ürítik váladékukat, mely védi azt a kiszáradástól (Harrison, 2007).

### 1.1.2 A bőr speciális mikroflórája

A hideg, savas, száraz, egészséges bőr nem kedvez a mikróbák megtelepedésének és növekedésének. A bőr felső rétege erős fizikai barriert teremt, mely megakadályozza a mikroorganizmusok szervezetbe jutását (Madison, 2003). Mindemellett a bőr folyamatosan megújul, így az elhalt hámsejtekkel együtt a mikróbák is lesodródnak a felszínéről (Elias, 2005). Ezzel szemben például a follikulusokban ideális környezetet találunk a különböző mikróbák megtelepedéséhez, hiszen itt kedvezőek a hőmérsékleti viszonyok és a nedvességtartalom, valamint a termelődő faggyú fontos tápanyagforrás lehet egyes mikróbák növekedéséhez. Grice és munkatársai becslései szerint 1 cm<sup>2</sup>-nyi bőrterületen 1 milliárd baktérium él (Grice, 2008).

Bőrünkben az itt élő baktériumok és gombák együttesen alakítják ki a bőr **mikrobiomját**. Ezeket a mikróbákat az irodalom több szempontból csoportosítja, például előfordulásuk szerint tranziens/ rezidens, vagy hatásuk szerint jótékony hatású/ patogén mikróbák csoportjaira. Ezen mikróbák tenyésztése és szekvenálása során bebizonyosodott, hogy a bőr különböző részein egyedi populációik vannak jelen.

A bőr rezidens mikróbáit az itt általában jelenlévő mikroorganizmusok meghatározott csoportja alkotja. Gyakran ezek a mikróbák **kommenzálisak**, tehát nem veszélyesek, hanem jelenlétük egyenesen hasznos a gazdaszervezet számára. Azzal, hogy megtelepednek a bőrünkben, felhasználják a rendelkezésre álló tápanyagforrásokat ökológiai kompetíció révén passzívan akadályozzák más, esetlegesen patogén fajok megtelepedését. Emellett új kutatási eredmények alapján az is napvilágot látott, hogy egyes fajok képesek olyan anyagok aktív szekréciójára is, melyek bakteriosztatikus, illetve antibakteriális hatásúak más fajokra nézve. Ezáltal aktívan is hozzájárulnak a bőr homeosztázisának fenntartásához (Schröder és Harder, 2006).

A rezidens, kommenzális fajokkal ellentétben a tranziens mikróbák nincsenek folyamatosan jelen a bőrön, néhány óráig/napig maradnak. Ilyenek például a patogén fajok.

Az egészséges bőrben a bőrsejtek és a kommenzális flóra egyensúlyban vannak. Ha azonban valamely körülmény nem megfelelő, vagy nem kielégítő a szervezet immunválasza, akkor mind a tranziens, mind a rezidens baktériumok képesek lehetnek a túlzott mértékű elszaporodásra, ami különböző betegségek kialakulásához vezethet (Otto, 2009).

A bőr rezidens flórájának legfontosabb tagjai: *Saccharomyces epidermis*, *Treponema pallidum*, kolonizációra hajlamos *Micrococcus* nemzetség és az *Actinobacteria* törzs, melyhez a *Corynebacterium* és a *Propionibacterium acnes*-t (*P. acnes*) magába foglaló

*Propionibacterium* genus tartozik. A leggyakrabban izolált gombafaj a *Malassezia spp* (Frederick, 2001).

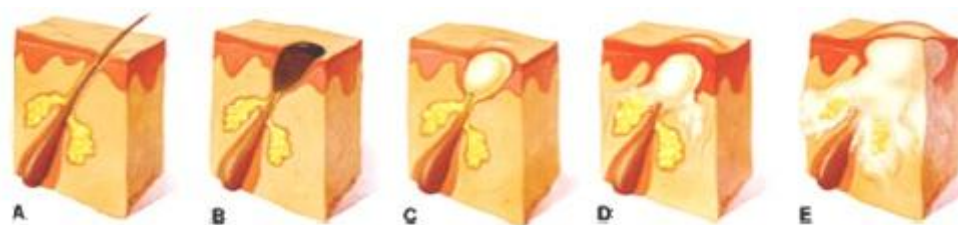
A mikrobiom pontos összetétele eltér a bőr egyes területein (Grice, 2009), melyet belső és külső faktorok is befolyásolnak. A belső faktorok közül a legfontosabbak a kor, az egyéni genetikai háttér, mely meghatározza például az immunrendszer sajátosságait. A külső környezeti tényezők közül ismert a klíma, és a személyes higiéné szerepe, melyek szintén hatnak az adott mikrobiális közösség összetételére. A bőr egyes részeit és függelékeit (verejtékmirigy, piloszebáceous egység) egyedi mikroba összetétel jellemzi. Ennek kialakításában például az is közrejátszik, hogy a faggyúmirigy lipid-gazdag szébumot szekretál, és a benne levő trigliceridek hidrolizálásával a kommenzális *P. acnes* baktérium szabad zsírsavakat szabadít fel, ami kedvez a baktérium adhéziójának, és a PSU-ban való kolonizációjának) (Marples, 1971).

## 1.2 Az acne vulgaris (pattanásos bőrbetegség)

Az acne az egyik leggyakrabban előforduló bőrbetegség, mely a serdülőkori népesség 80-90 százalékát érinti. Annak ellenére, hogy az elmúlt 30 évben nagy előrehaladás történt a betegség hátterében álló molekuláris folyamatok vizsgálatában, a részletes molekuláris patogenezisének nagy része a mai napig ismeretlen (Zouboulis, 2005).

### 1.2.1 Az acne kialakulása

Az acne kialakulása a serdülőkori hormonális változásokhoz, főként az androgén hormonok fokozott termelődése miatt induló megnövekedett szébum szekrécióhoz köthető. A bőrtünetek kialakulása során a follikulusok kivezető nyílását elhalt keratinociták, a szőr és a besűrűsödött szébum eltömítheti.



**2. kép. Az acnés léziók kialakulása.** A: egészséges bőr; B: fekete miteszer (nyitott komedó); C: fehér miteszer (zárt komedó); D: papulák és pusztulák; E: ciszták.

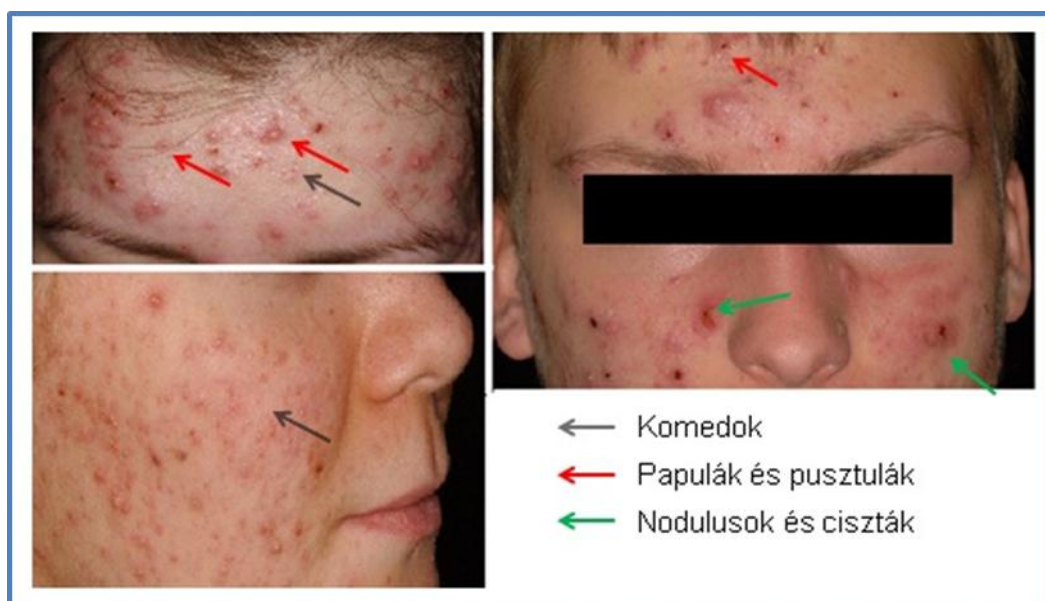
(Forrás: <http://www.hotelbenessere.it/dizionario-medico/lemmi/acne.htm>)

A kialakult dugó megakadályozza a szébum bőr felszínére való ürülését a pórusokon keresztül. Ezzel párhuzamosan a dugó alatti anaerob körülmények között a *P. acnes* baktérium kedvező körülmények közé kerül, és ennek eredményeképpen jelentős mértékben elszaporodhat. Így alakulnak ki a jól ismert **komedók** (miteszerek). A folyamatosan termelődő szébum fesztítő hatása miatt az eldugult PSU fala felszakadhat, és az ott jelen lévő baktériumok, a szébum, a sejttörmelékek, valamint a *P. acnes* baktérium által termelt enzimek, és a hatásukra létrejövő irritatív szabad zsírsavak a környező szövetekbe ömlenek, mely gyulladásos léziók, vagyis **papulák** és **pusztulák** (pattanások) kialakulásához vezetnek. Az acne lehet felszínes vagy mélyre terjedő, ez utóbbi esetben a bőr mélyebb rétegei felé hatol a gyulladás, melynek eredményeképpen tályogok és gyulladt csomók (**nodulusok**, **ciszták**) alakulhatnak ki (2. kép) (Stathakis, 1997).

### 1.2.2 Epidemiológia

Az acnés tünetek első kialakulása a serdülőkorban, 10-12 éves korban, a hormonális változásokkal együtt történik, majd 16-18 éves korig a tünetek fokozódnak. 12 éves kor körül a betegség gyakorisága nőkben magasabb, de ez az arány később megfordul. Sok esetben a betegség kontrollált, és a tünetek 20 éves kor körül maguktól elmúlnak, azonban a betegek kis százalékában azok felnőtt korban is megmaradnak (Szabó és Kemény, 2011).

### 1.2.3 Klinikai kép

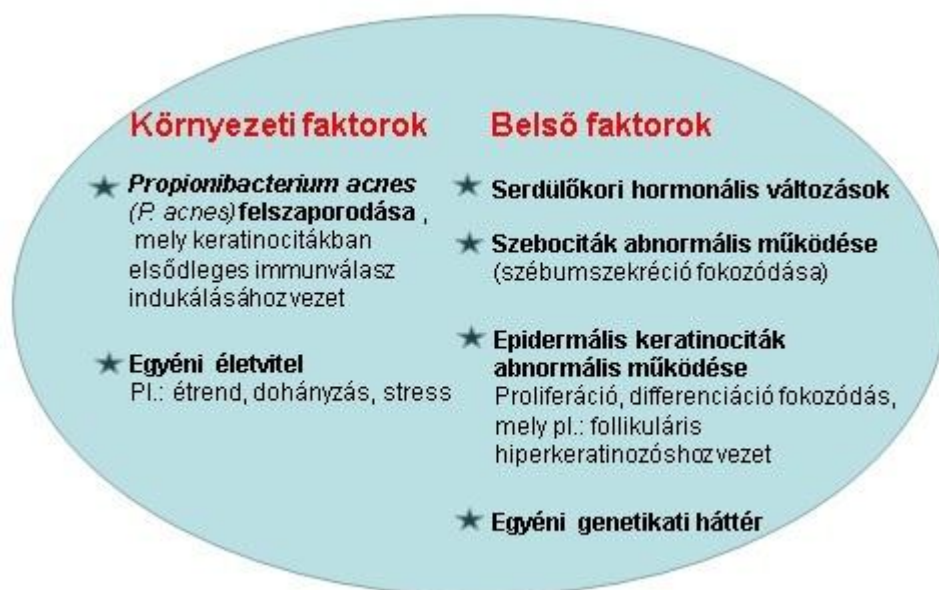


**3. kép. Az acne klinikai képe a karakterisztikus léziókkal.** (Komedók, papulák és pustulák, nodulusok és ciszták a gyulladásos folyamatok súlyosságának mértékétől függően). (SZTE ÁOK Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika gyűjteményéből).

Amennyiben az érintett egyén bőrén (leggyakrabban az arcon) főleg komedókat találunk, ***acne comedonica***-ról beszélünk. Súlyosabb esetben, ***acne papulo-pustulosa*** diagnózisakor a miteszerek mellett gyulladt, gennyes pattanások (papulák és pustulák) is megfigyelhetők. A legsúlyosabb esetekben fájdalmas csomók és ciszták is jelen vannak az arcon, a mellkason, vagy akár az egész törzsön. Ekkor ***acne nodulocystica***-ról beszélünk (3. kép) (Habif, 2009).

#### 1.2.4 Patogén faktorok

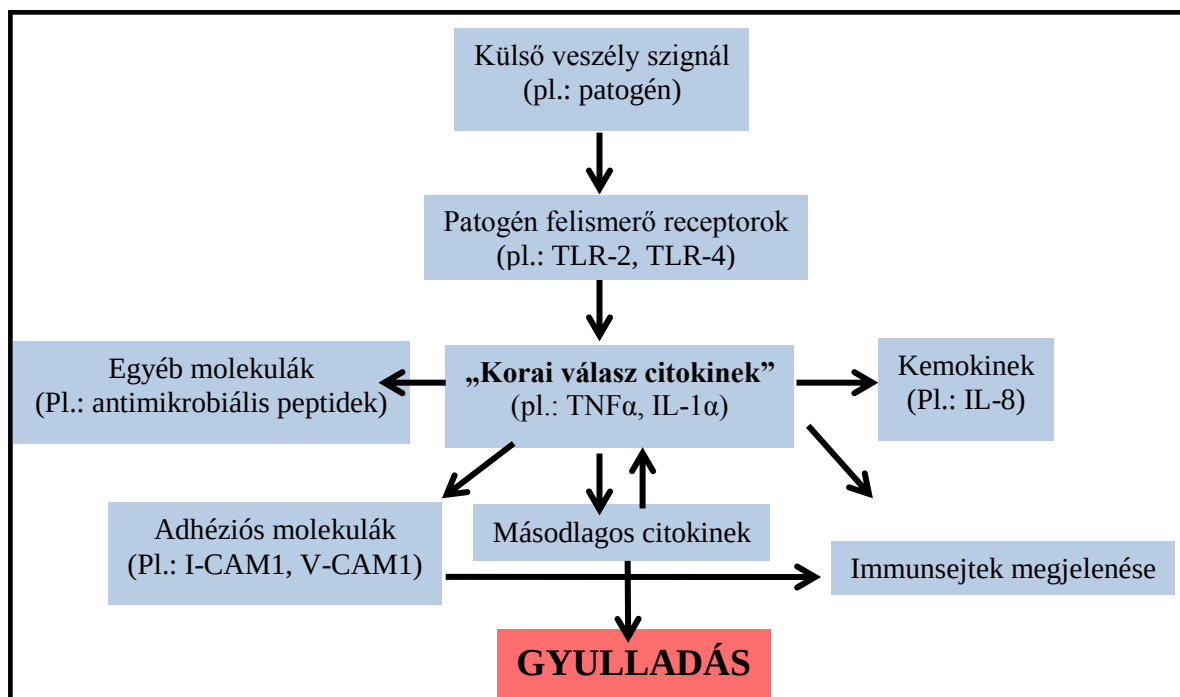
Az acne tehát a PSU gyulladásos betegsége, melynek kialakulásában, mind környezeti, mind belső faktorok szerepet játszanak (4. kép). A legismertebb endogén tényezők ezek közül a serdülőkori hormonális hatások, az ennek eredményeképpen kialakuló abnormális keratinocita és szebocita funkciók. Ismert, hogy a betegségben szenvedők egyéni genetikai háttere is fontos szerepet játszik a tünetek kialakulásában és súlyosságának meghatározásában, azonban ennek poligénikus karaktere miatt kevés ismeret áll rendelkezésre ezen faktorok pontos természetéről (Szabó és Kemény, 2011). A külső környezeti faktorok közül a mikrobiális komponens, vagyis például a bőrben kommenzáisan is jelen lévő *P. acnes* hiperkolonizációja a follikulusokban is fontos tényező, bár ennek jelentőségéről a mai napig megoszlanak a vélemények. Ezen faktorok összessége azonban még mindig nem ad választ arra, hogy a népességnek miért ilyen nagy százalékát érinti a betegség, főként a fejlett, „nyugatias” társadalomban. Egyre elfogadottabb azonban az a nézet, hogy a környezeti faktoroknak és az életvitelnek (dohányzás, étrend, stressz) is nagy szerepe van az acne patogenezisében (Melnik, 2009; Berra és Rizzo, 2009).



4. kép. Az acne patogenezisében szerepet játszó patogén faktorok.

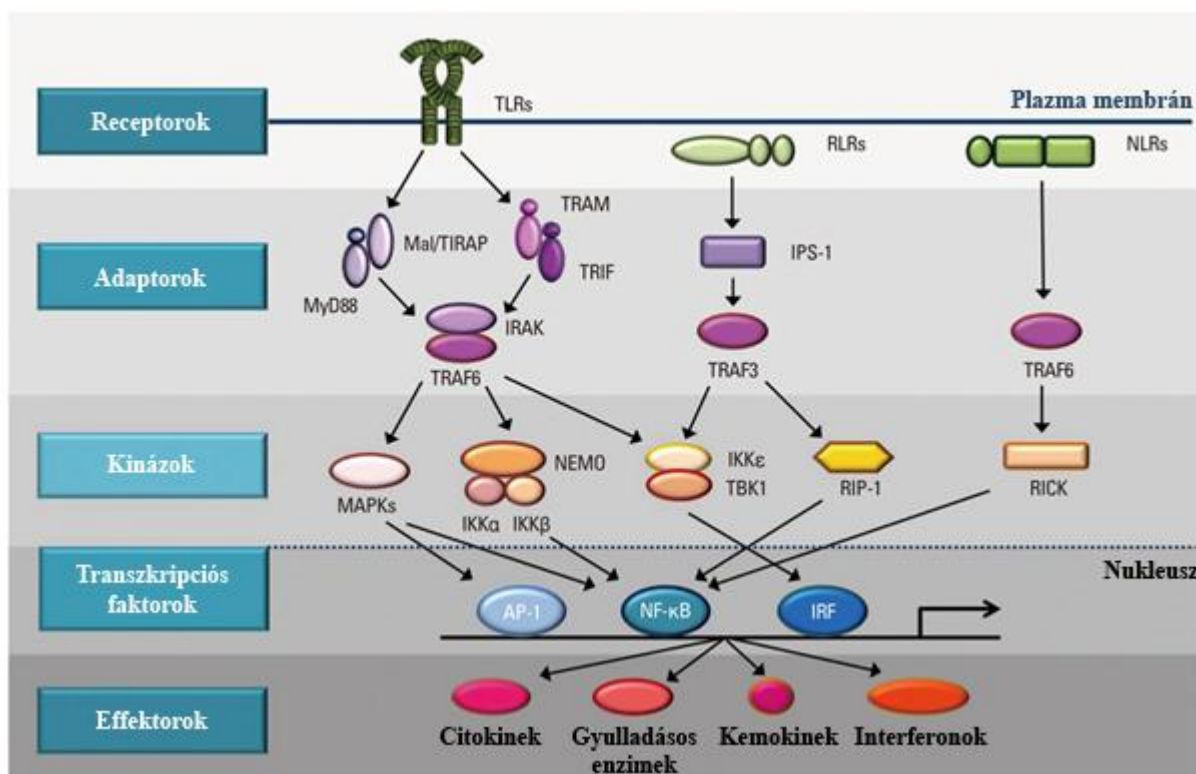
### 1.3 A tünetek kialakulásának hátterében játszó molekuláris folyamatok

Ismert, hogy az epidermális keratinociták képesek a környezetükben található mikroorganizmusok felismerésére, és ellenük aktív védőfolyamatok indítására, melynek során a mikroorganizmusok hatására veleszületett immunfolyamatok aktiválódnak (Nagy, 2005) (5. kép). Ez az elsődleges immunitás a szervezet első védelmi vonala, mely minden többsejtű élőlényben megtalálható. Feladata a patogének felismerése és gyors eliminációja, immunsejtek és kémiai mediátorok toborzása, gyulladásos válasz generálása és az adaptív immunválasz beindítása. Ezekben a folyamatokban a csíravonalban kódolt mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptors: PRRs), mint például a Toll-like receptorok (TLR) nélkülözhetetlen szerepet játszanak. Felismerik a veszélyt jelző molekulákat (danger associated molecular patterns; DAMPs) valamint a patogén konzervált molekuláit (pathogen associated molecular patterns; PAMPs).



**5. kép. Patogén hatására induló immun és gyulladásos folyamatok epidermális keratinocitákban.** (A részletes magyarázatot ld. a szövegben.)

A TLR-aktiváció hatására induló jelátviteli út komponensei között adapter molekulákat, kinázokat, transzkripciós faktorokat és effektor molekulákat találunk. A szignáltranszdukciós folyamat két főbb úton haladhat, a MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) függő, és független utakon. A szignalizációs út fő mediátora a NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) transzkripciós faktor, mely a citoplazmában inaktív formában van jelen, itt az I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B) nevű fehérjéhez kapcsolódik, mely komplexnek gátolt a nukleuszba való bejutása. A TLR-ek liganddal való stimulálásakor az I $\kappa$ B-t szerin oldalláncain egy IKK nevű komplex foszforilálja, ezzel kijelölve ubiquitinációra, majd 26S proteasómális lebontásra. Ezután az NF- $\kappa$ B már felszabadul a gátlás alól, bejut a nukleuszba, ahol különféle target gének transzkripcióját indító és represszáló fehérjékhez kapcsolódik. A TLR aktiválás végsősoron citokinek, gyulladásos folyamatban szerepet játszó enzimek, kemokinek, I. típusú interferonok szintéziséhez vezet (Jeong és Lee, 2011) (6. kép).



**6. kép. A TLR aktiváció hatására induló jelátviteli folyamatok.** A különféle TLR-ek liganddal való aktiválásának hatására egy több lépcsős jelátviteli út indul el különféle adapter molekulákon, kinázokon keresztül, mely a gyulladásos folyamatban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének aktivációját eredményezi. (Forrás: Jeong és Lee közleményéből).

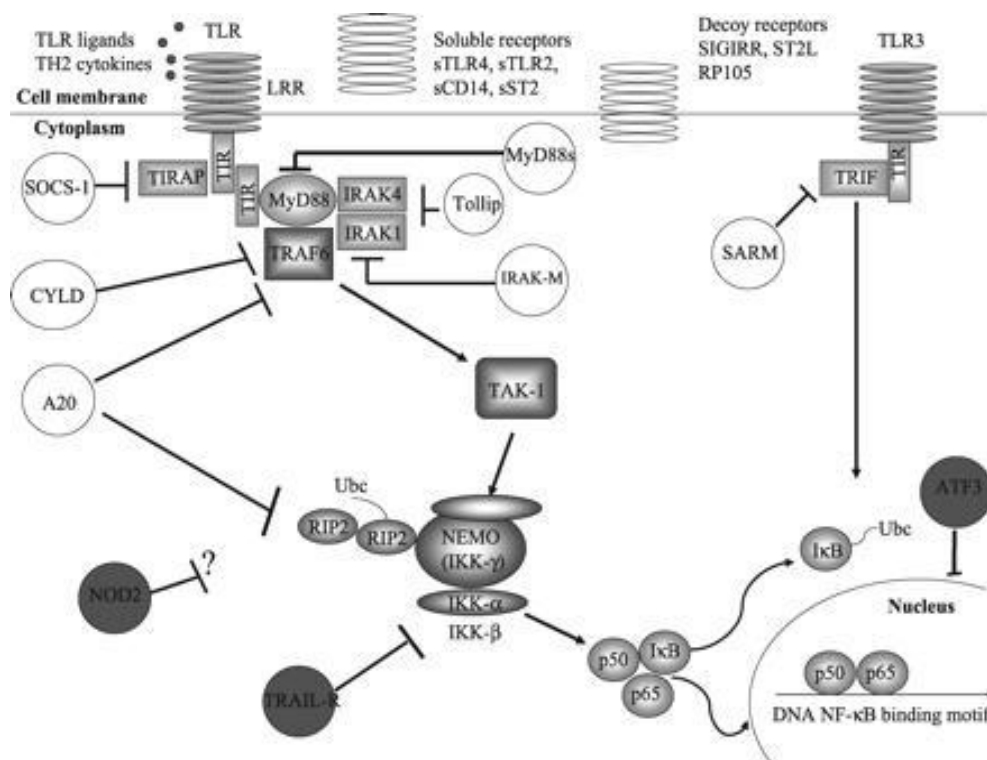
A TLR-ek aktivációjának hatására induló jelátviteli folyamatok erősen szabályozottak, hiszen ha ezek a gyulladásos folyamatok túlzott mértékűek, az destruktív jellegű kontrollálatlan, krónikus gyulladás kialakulásához vezethet. Az irodalomban már leírtak olyan molekulákat és mechanizmusokat, melyek a bemutatott folyamatok szabályozásában játszanak szerepet. Mindez több szinten, különféle gátló molekulákon keresztül valósulhat meg, mint például a SIGIRR, TOLLIP, IRAK-M, TNFAIP3 (A20), Nod2 és a PPAR $\gamma$  (7.kép) (Jeong és Lee, 2011). Munkám során ezek közül hárommal (SIGIRR, TOLLIP, TNFAIP3) foglalkoztunk részletesen.

A SIGIRR egy egyedi struktúrával rendelkező receptor, mely tartalmaz egy rövid, az interleukin 1 receptor (IL-1R) immunoglobulin (Ig) doménjához hasonló extracelluláris régiót, valamint egy intracelluláris domént. A SIGIRR mRNS-ének kifejeződését sokféle sejttípusban megfigyelték (Shibolet és Podolsky, 2007). Állatkísérletes modellben, SIGIRR-deficiens egérben endotoxin hatására hosszan elnyújtott, erőteljesebb gyulladásos válasz indukálódott, mely igazolja ezen receptor fontos szerepét a TLR indukció hatására induló jelátviteli folyamatok kontrolljában. Ezen kísérlet folyamán megvizsgálták különböző szövetek SIGIRR expressziós mintázatát endotoxin kezelés után. Azt tapasztalták, hogy

csontvelőből származó makrofágokban nem fejeződik ki, ami annak a lehetőségét veti fel, hogy a SIGIRR funkciója szövetspecifikus lehet (Wald, 2003).

A TNFAIP3 (korábbi nevén A20) a citoplazmában elhelyezkedő fehérje, mely kifejeződése gyulladásos folyamatok során fokozódik. Két ellentétes enzimaktivitással rendelkezik, az N-terminális részén elhelyezkedő OTU (ovarian tumor) domén által mediált de-ubiquitináz, és a C-terminális cink ujj által mediált ubiquitináz aktivitással (Heyninck és Beyaert, 2005). Gátolja a TLR receptor indukált NF- $\kappa$ B aktivációt a TRAF-6 molekula de-ubiquitinációja révén, mely fontos adapter molekulája a TLR-aktiválta jelátviteli folyamatoknak (Boone, 2004). Emellett hasonlóan negatívan szabályozza a TNF $\alpha$ - és IL-1 $\alpha$  mediálta NF- $\kappa$ B aktivációt is (Heyninck és Beyaert, 1999).

Egy másik negatív szabályozó molekula a TOLLIP, mely az IRAK autofoszforylációjának és kináz aktivitásának gátlásán keresztül gátolja az NF- $\kappa$ B aktivációt (Zhang és Ghosh, 2002).



**7. kép. Toll-like receptor szignalizációs útvonal és negatív szabályozói.** A TLR-indukálta szignálfolyamatok két útvonalon haladhatnak, a Myd 88-függő- és független úton. A jelátviteli út gátlása több szinten történhet ld. ábra és a szöveg (Forrás: Shilbert és K. Podolsky2007.).

Munkacsoportunk eredményei és irodalmi adatok alapján az már ismert, hogy milyen, TLR-aktiválta jelátviteli folyamatok indulnak az epidermális keratinocitákban a *P. acnes* baktérium hatására. Nem rendelkezünk azonban semmilyen adattal arról, hogy pontosan

milyen negatív szabályozó folyamatok működnek az egészséges bőr homeosztázisának fenntartása során, és pontosan melyek például azok a folyamatok, melyek meggátolják azt, hogy a bőrt kolonizáló kommenzális baktériumok hatására immun-aktiváció következzen be.

## 2. Célkitűzés

Munkánk során ezért célul tűztük ki:

- a *P. acnes* hatására induló szignálfolyamatok részleteinek megismerését, és annak felderítését, hogy pontosan milyen szerepet játszanak mindezek az események az acne patogenezise során,
- annak vizsgálatát, hogy milyen negatív szabályozó folyamatok működnek keratinocitákban, melyek képesek a *P. acnes* által indított TLR-indukálta szignálfolyamatok leállítására.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 Humán immortalizált HPV-KER keratinocita sejtvonal tenyésztése

A kísérletekben használt 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 sejtvonalat szérumentes, 1% antibiotikum/antimikotikum-ot (AB/AM; PAA, Pasching, Ausztria) és szupplementet tartalmazó keratinocita tápoldatban (KC-SFM; Life Technologies, Carlsbad, USA) standard laboratóriumi körülmények között (37 °C-on, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>-t tartalmazó légkörben ) tartottuk.

#### 3.2 A felhasznált *P. acnes* törzs és tenyésztése

A *P. acnes* 889 baktériumtörzset standard mikrobiológiai eljárások alkalmazásával tenyésztettük és tároltuk (Nagy, 2005). Röviden, a klinikailag izolált 889 jelű törzset 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 kolónkiákat 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 felszuszpendáltuk, ezután a sejtszámot spektrofotométerrel mért optikai denzitás értékek alapján (OD = 600 nm) becsültük. A baktérium sejtszám 1x10<sup>9</sup> cfu/ml-re állítottuk PBS-EDTA-oldatban, és a mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk. A baktériumok fenntartása valamint tenyésztése az SZTE, ÁOK, Klinikai Mikrobiológiai Intézetében, Dr. Urbán Edit vezetésével történt.

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

A HPV-KER sejtek *P. acnes* kezeléséhez 300.000 keratinocita sejtet tettünk 6-os szövettenyésztő edénybe, majd ezeket 24 órán keresztül antibiotikum/antimikotikum mentes (AB/AM-) KC-SFM tápoldatban inkubáltuk. A sejteket élő *P. acnes* baktériummal kezeltük

előzetes kísérleteinkben meghatározott baktérium : keratinocita sejt arányt használva (multiplicity of infection : MOI = 100).

A különböző *P. acnes* dózisok hatásának vizsgálatokor MOI = 25, 50, 100, 200, 300 arányokat alkalmaztunk. A ko-kultúrákat normál tenyésztési körülmények között 0, 6, 24 óráig inkubáltuk, ezekből TRI-Reagens alkalmazásával (Molecular Research Center; Cincinatti, USA) mintát vettünk, melyeket további felhasználásig -80°C-on tartottunk.

### 3.4 Totál RNS izolálás

A kezeletlen kontroll és baktérium kezelt mintákból TRI-Reagens (Molecular Research Center; 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 pelletet szárítást követően RN-áz mentes vízben feloldottuk, és további felhasználásig a mintákat -80°C-on tároltuk.

### 3.5 Reverz transzkripció és valós idejű RT-PCR

Az RNS minták koncentrációját (OD<sub>260</sub> mérés) és tisztaságát (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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.

A kapott cDNS minták felhasználásával valós idejű RT-PCR vizsgálatokat végeztünk,

melyhez a 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 az 1. táblázatban feltüntetett összetételben végeztük.

| Reagens                       | (µl / 1 minta) |
|-------------------------------|----------------|
| dH <sub>2</sub> O             | 2,4            |
| MasterMix (gyártó)            | 10             |
| Forward primer (10 pmol / µl) | 1,8            |
| Reverse primer (10 pmol / µl) | 1,8            |
| UPL Próba (10 pmol / µl)      | 2              |
| cDNS (0,2 ng / µl)            | 2              |

**1. táblázat: A valós idejű RT-PCR reakciók összetétele.**

A vizsgálatok során alkalmazott primer szekvenciákat és a UPL próbák számát a 2. táblázat tartalmazza

| Gén           | Primer szekvenciák<br>f- forward primer, r- reverse primer  | UPL<br>próba száma |
|---------------|-------------------------------------------------------------|--------------------|
| 18S rRNS      | f: 5'CGCTCCACCAACTAAGAACG3'<br>r: 5'CTCAACACGGGAAACCTCAC3'  | 77                 |
| TNF $\alpha$  | f: 5'CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT3'<br>r: 5'GCCAGAGGGCTGATTAGAGA3' | 29                 |
| IL-1 $\alpha$ | f: 5'AACCAGTGCTGCTGAAGGA3'<br>r: 5'TTCTTAGTGCCGTGAGTTTCC3'  | 35                 |
| TNFAIP3       | f: 5'TGCACACTGTGTTTCATCGAG3'<br>r: 5'ACGCTGTGGGACTGACTTTC3' | 74                 |
| SIGIRR        | f: 5'CTCAGAGCCATGCCAGGT3'<br>r: 5'CCTCAGCACCTGGTCTTCA3'     | 55                 |
| TOLLIP        | f: 5'TCCCCGCTGGAATAAGGT3'<br>r: 5'CGTCCATGGAGAAGGCTCT3'     | 86                 |

**2. táblázat: A valós idejű PCR-hez felhasznált primerek és Universal Probe Library (UPL) próbák.**

### 3.6 Western analízis

A Western vizsgálatokhoz 300.000 HPV-KER sejtet tettünk 6-os szövettényesztő edénybe, majd ezeket 24 órán keresztül antibiotikum/antimikotikum mentes (AB/AM-) KC-SFM tápoldatban inkubáltuk. A sejteket élő *P. acnes* baktériummal kezeltük különböző baktérium : keratinocita sejt arányt használva (multiplicity of infection : MOI = 25, 50, 100, 200, 300).

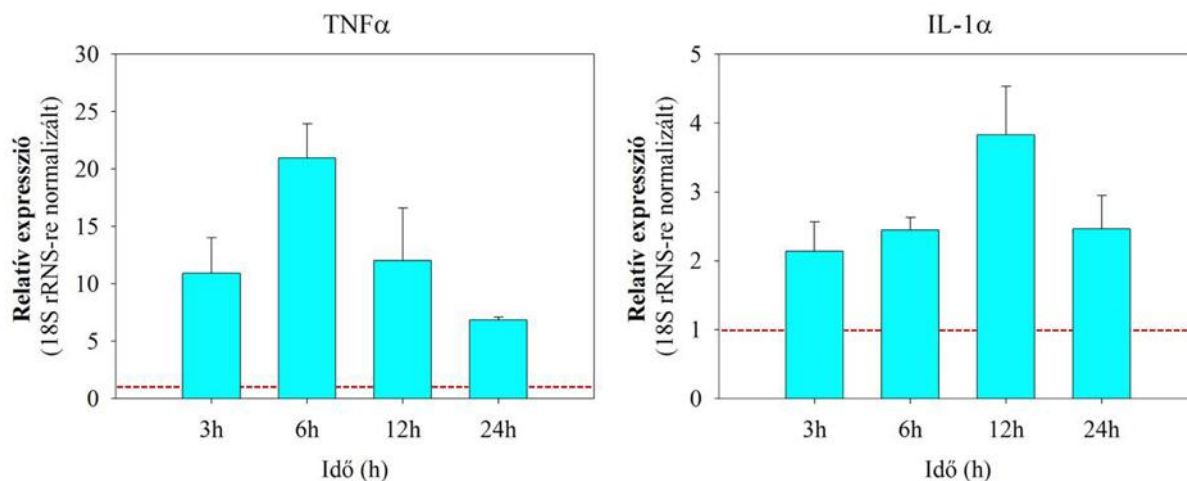
Egy, 3, 6 óra elteltével a kezeletlen kontroll és a *P. acnes* 889 baktériummal kezelt sejtekről eltávolítottuk a tenyésztő médiumot, majd PBS-es mosást és tripszines emésztést követően centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket (5 perc, 250g). A felülúszót eltávolítottuk, majd a ProteoJET<sup>TM</sup> Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas, Litvánia) alkalmazásával a nukleáris és citoplazmás fehérjéket szétválasztottuk, a gyártó utasításai szerint.

A lizátumok fehérje tartalmát BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) segítségével határoztuk meg. A gélekre 63-66,3-70  $\mu$ g összfehérjét vittünk fel mintánként, illetve a kontrollként használt aktin detektálása esetében mintánként 33  $\mu$ g összfehérjét. A fehérjéket méret szerint elválasztottuk nátrium dodecilszulfát- (SDS) poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel 7,5%-os gél alkalmazásával. A gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk transzfer pufferben 1,5 órán keresztül 4 °C-on, 115 V feszültséggel. A membránt 3%-os tejport tartalmazó Tris-pufferolt sóoldatban (TBS, 150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7.4) 1,5 órán át szobahőmérsékleten telítettük. Egér anti-humán

NF- $\kappa$ B p65 (C-20): sc-372 (1:200 hígítás, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA) és egér anti-humán  $\alpha$ -aktin (1:1000 hígítás, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) elsődleges ellenanyagokat használtunk a vizsgált fehérjék kimutatásához. Ennek során 3% tejport tartalmazó TBS-ben hígított elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk a membránokat egy éjszakán át szobahőmérsékleten, majd mosást követően egér IgG ellen termeltetett alkalikus foszfatáz konjugált másodlagos ellenanyagot (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) és SigmaFast 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát/nitroblue-tetrazólium (BCIP/NBT, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) előhívó oldatot használtunk a fehérje sávok megjelenítéséhez.

## 4. Eredmények

### 4.1 A *P. acnes* 889 törzs által kiváltott TLR aktiváció hatása a TNF $\alpha$ és IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésére



#### 8. ábra. A TNF $\alpha$ és az IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésének változása

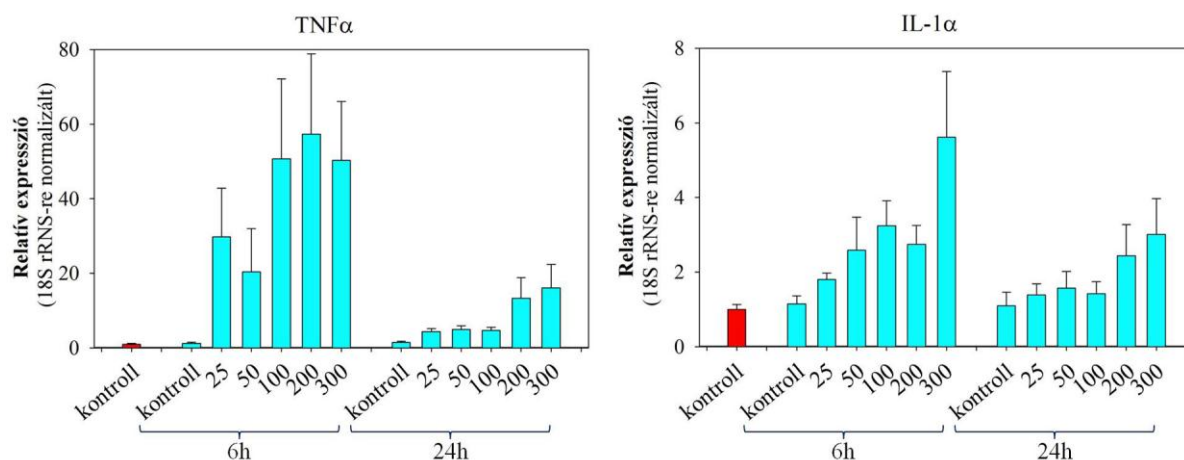
***P. acnes* 889 kezelés hatására.** Mindkét mRNS kifejeződése gyors, tranziensváltozást mutat a baktériumkezelés hatására. (Az ábrákon 2 párhuzamos kísérlet eredményeinek átlagát mutatja (+/- standard error), ahol kondícióként 3-3 párhuzamos minta értékét átlagoltuk. A *P. acnes* kezelt mintákat a saját idejű kezeletlen kontrollokhoz viszonyítottuk. (Tax Gábor doktorandusz, és Bolla Beáta Szilvia II. évf. MSc hallgató kísérleti eredményei.)

Ismert, hogy az epidermális keratinociták képesek a *P. acnes* baktérium felismerésére. Ennek során a TLR2 és 4 receptorok aktivációja hatására az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktiválódik, mely azután fontos szerepet játszik számos citokin gén kifejeződésének szabályozásában. Munkánk során ezért vizsgáltuk, hogy milyen hatása van a *P. acnes* 889 kezelésnek (MOI = 100) a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokinek mRNS szintű kifejeződésére *in vitro* tenyésztett HPV-KER sejtekben.

Ennek során kontroll és baktérium kezelt sejtekből 3, 6, 12 és 24 órával a kezelést követően mintavétel történt, majd mRNS izolálás és cDNS szintézist követően valós idejű RT-PCR módszerrel elemeztük ezen gének kifejeződésének mértékét.

Az eredmények azt mutatják, hogy mindkét citokin mRNS szintje a kezelést követő 3. órában emelkedni kezd, a 6-12 órás mintában maximuma van, majd a 24 órás mintákban újra a kezeletlen kontroll értékekhez közelít (8. ábra). További kísérleteinkben ezért 0, 6 és 24 órás mintákban vizsgáltuk a két citokin mRNS szintű kifejeződésének mértékét különféle kísérleti paraméterek mellett. (Tax Gábor doktorandusz, és Bolla Beáta Szilvia II. évf. MSc hallgató kísérleti eredményei.)

#### 4.2 A *P. acnes* 889 baktériumtörzs dóziszfüggő módon befolyásolja a TNF $\alpha$ és IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésének mértékét



**9. ábra.** A TNF $\alpha$  és az IL-1 $\alpha$  gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésének változása függ az alkalmazott *P. acnes* kezelés dózisától. Mindkét mRNS kifejeződése gyors, dóziszfüggő, tranzienst változást mutat a baktériumkezelés hatására. (Az ábrákon 2-2 párhuzamos kísérlet eredményeinek átlagát mutatja (+/- standard error), ahol kondícióként 3-3 párhuzamos minta értékét átlagoltuk. A *P. acnes* kezelt mintákat a 0h kezeletlen kontrollokhoz viszonyítottuk. (Tax Gábor doktorandusz, és Bolla Beáta Szilvia II. évf. MSc hallgató kísérleti eredményei.)

Ezt követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy emelkedő keratinocita : *P. acnes* 889 arálynak milyen hatása van a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokin mRNS-ek kifejeződésének változására. Ehhez a HPV-KER sejteket különböző keratinocita : baktérium arányban (MOI = 25, 50, 100, 200, 300) a *P. acnes* 889 törzsszel kezeltük, majd 0, 6 és 24 órával a kezelést követően mintát vettünk, és a korábbiakhoz hasonlóan valós idejű RT-PCR módszerrel vizsgáltuk az expressziós változásokat.

A baktériumkezelés hatására mind a TNF $\alpha$  mind az IL-1 $\alpha$  mRNS kifejeződése a 6 órás mintákban dóziszfüggő emelkedést mutatott. Ezzel szemben a kezelést követő 24 órás mintákban az mRNS expressziós szint alacsony MOI-k alkalmazása esetén újra a kezeletlen kontroll értékekhez közelített, míg magas MOI-k esetében (200, 300) még ebben az időpontban is enyhén emelkedett mértéket mutatott (9. ábra). (Tax Gábor doktorandusz, és Bolla Beáta Szilvia II. évf. MSc hallgató kísérleti eredményei.)

#### 4.3 A *P. acnes* 889 kezelés hatására induló negatív szabályozó folyamatok azonosítása

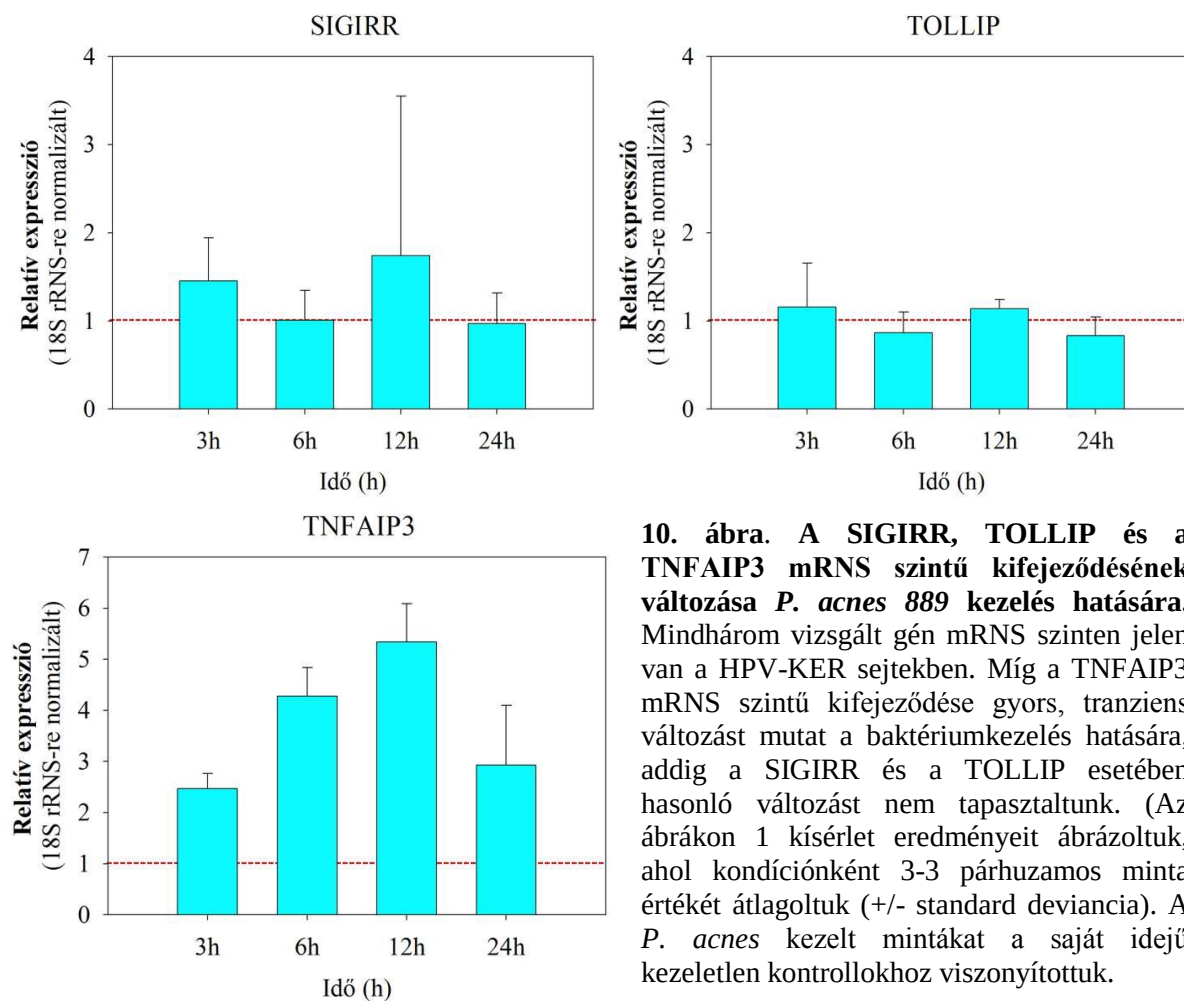
Annak vizsgálatára, hogy milyen mechanizmusok működnek a keratinocitákban melyek képesek lehetnek a *P. acnes* által kiváltott TLR-aktiváció, és az ennek következtében induló jelátviteli folyamatok gátlására megvizsgáltuk a SIGIRR, TOLLIP és a TNFAIP3 gének

mRNS szintű kifejeződését HPV-KER sejtekben, valamint elemeztük a kifejeződésük változását *P. acnes* 889 kezelés hatására valós idejű RT-PCR módszerrel.

#### 4.3.1 A SIGIRR, TOLLIP és a TNFAIP3 mRNS szintű kifejeződésnek vizsgálata HPV-KER sejtekben

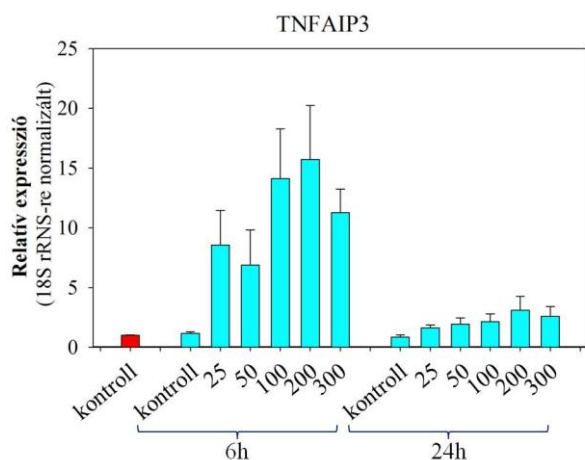
Munkánk során kontroll és *P. acnes* 889 (MOI = 100) baktérium kezelt sejtekből 3, 6, 12 és 24 órával a kezelést követően mintavétel történt, majd mRNS izolálás és cDNS szintézist követően valós idejű RT-PCR módszerrel elemeztük ezen gének kifejeződésének mértékét.

Az eredmények azt mutatják, hogy mindhárom, a TLR szignálfolyamatok negatív szabályozásában szerepet játszó gén mRNS szintű kifejeződése igazolható a HPV-KER sejtekben. Azonban míg a SIGIRR és a TOLLIP esetében nem tapasztaltunk jelentős változást a baktérium kezelés hatására, addig a TNFAIP3 mRNS jelentős mértékű gyors, tranzien্স expresszió növekedést mutatott, melynek mintázata hasonló volt a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokin mRNS-ek esetében tapasztaltakkal (10. ábra).



**10. ábra. A SIGIRR, TOLLIP és a TNFAIP3 mRNS szintű kifejeződésének változása *P. acnes* 889 kezelés hatására.** Mindhárom vizsgált gén mRNS szinten jelen van a HPV-KER sejtekben. Míg a TNFAIP3 mRNS szintű kifejeződése gyors, tranzien্স változást mutat a baktériumkezelés hatására, addig a SIGIRR és a TOLLIP esetében hasonló változást nem tapasztaltunk. (Az ábrákon 1 kísérlet eredményeit ábrázoltuk, ahol kondícióként 3-3 párhuzamos minta értékét átlagoltuk (+/- standard deviancia). A *P. acnes* kezelt mintákat a saját idejű kezeletlen kontrollokhoz viszonyítottuk.

#### 4.3.2 A *P. acnes* 889 baktériumtörzs dóziszfüggő módon befolyásolja a TNF $\alpha$ és IL-1 $\alpha$ gyulladásos citokinek mRNS szintű kifejeződésének mértékét



**11. ábra. A TNFAIP3 citokinek mRNS szintű kifejeződésének változása függ az alkalmazott *P. acnes* kezelés dózisától.**

A mRNS kifejeződése gyors, tranzienst, dóziszfüggő változást mutat a baktériumkezelés hatására. (Az ábrán 2 párhuzamos kísérlet eredményeinek átlagát mutatja (+/- standard error), ahol kondícióként 3-3 párhuzamos minta értékét átlagoltuk. A *P. acnes* kezelt mintákat a 0h kezeletlen kontrollokhoz viszonyítottuk.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy vajon a TNFAIP3 kifejeződése dóziszfüggő módon változik-e a *P. acnes* 889 kezelés hatására. Ehhez a 4.2 pontban bemutatott kísérleti rendszert alkalmaztuk.

A TNFAIP3 mRNS szintű kifejeződésének megváltozása hasonlóan a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokin mRNS-ekhez kifejezett dóziszfüggő emelkedést mutatott 6 órával a *P. acnes* 889 kezelést követően. A 24 órás mintákban a kifejeződés mértéke a kezeletlen kontroll értékekhez közelített, de a MOI növekedésével párhuzamosan egy enyhe emelkedés még itt is megfigyelhető volt (11. ábra).

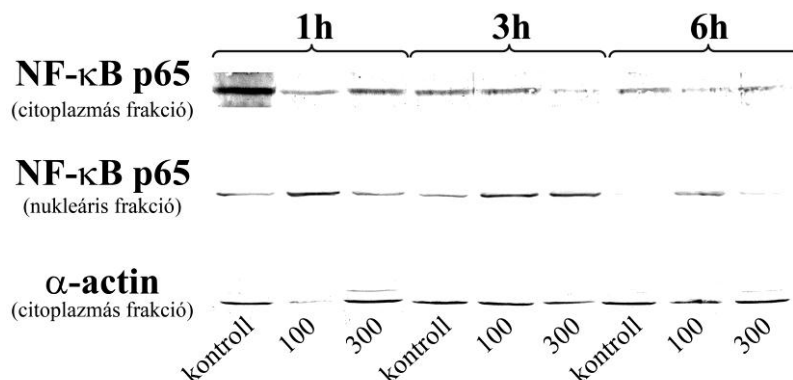
#### 4.4 A *P. acnes* 889 kezelés hatására létrejövő NF- $\kappa$ B aktiváció vizsgálata HPV-KER sejtekben

Annak igazolására, hogy a TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  és a TNFAIP3 kifejeződés változása háttérben a TLR aktiváció eredményeképpen kialakuló NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktiváció áll, Western-analízissel követtük az NF- $\kappa$ B p65 alegységének a citoplazmából a nukleuszba történő transzlokációját.

Ehhez HPV-KER sejteket kezeltünk a *P. acnes* 889-es törzsszel (MOI: 100, 300), majd 1, 3, és 6 órás kezelés után fehérje mintákat vettünk. Ezt követően elválasztottuk a citoplazmás és nukleáris fehérjéket, majd Western analízis során a p65 izoformát egér poliklonális ellenanyaggal detektáltuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy a citoplazmás frakcióban a *P. acnes* kezelést követően minden időpontban kisebb koncentrációban van jelen az NF- $\kappa$ B p65-ös alegysége a kezeletlen

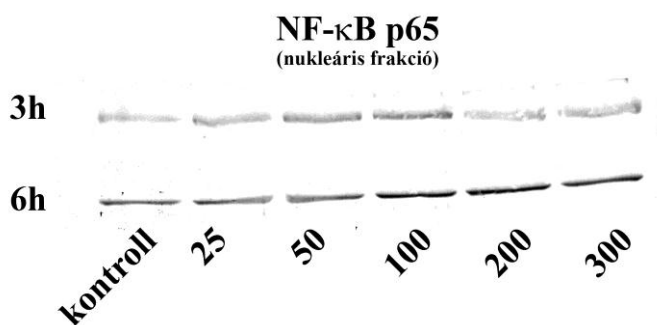
kontrollhoz képest. Ezzel párhuzamosan azonban a nukleuszban a baktériumkezelést követően emelkedett NF- $\kappa$ B p65 szinteket detektáltunk a kezeletlen kontroll mintákhoz képest (12. ábra).



**12. ábra *P. acnes* 889 kezelés hatása NF- $\kappa$ B p65-ös alegység celluláris lokalizációjának változása az idő és az alkalmazott baktérium dózis függvényében.** A *P. acnes* kezelés hatására az NF- $\kappa$ B citoplazmás frakciójának mennyisége csökken, míg ezzel párhuzamosan a nukleáris frakció mennyisége növekszik, ami az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor aktivációjára utal.

#### 4.5 Dózisfüggő NF- $\kappa$ B aktiváció

A következőkben arra kerestük a választ, hogy NF- $\kappa$ B aktivációja dózisfüggő-e, ezért különböző dózisé *P. acnes* 889 kezelést (MOI = 25, 50, 100, 200, 300) követően 3 és 6 órával fehérjemintákat vettünk, majd Western analízissel elemeztük a nukleáris NF- $\kappa$ B p65 frakció



**13. ábra. *P. acnes* 889 kezelés hatása az NF- $\kappa$ B p65-ös alegység nukleáris frakciójának mennyiségének meghatározása Western-analízissel.** Az alkalmazott baktérium dózis függvényében emelkedik a nukleáris frakció mennyisége, ami különösen kifejezett a 6-órás mintákban.

mennyiségét.

Azt tapasztaltuk, hogy az NF- $\kappa$ B p65 alegységének nukleáris frakciója az alkalmazott MOI növelésével párhuzamosan növekedett a kezeletlen kontroll mintákhoz képest. Különösen kifejezett volt mindez a kezelést követő 6 órás mintákban.

## 5. Diszkusszió

Ismert, hogy az epidermális keratinociták képesek a környezetükben található mikroorganizmusok felismerésére és ellenük aktív védőfolyamatok indítására, mely folyamatokban a sejtfelszínen kifejeződő TLR-2 és TLR-4 receptoroknak és az innen induló jelátviteli folyamatoknak központi szerepe van. Ezek aktivációjának eredményeképpen ugyanis olyan szignalizációs események indulnak, melyek végső soron az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktiválásához vezetnek, melynek fontos szerepe van különféle, az immun- és gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének (citokinek, kemokinek, antimikrobiális hatású fehérjéket kódoló gének) kifejeződésének szabályozásában (Pivarcsi, 2003; Nagy, 2005).

Munkacsoportunk más laboratóriumokkal együtt kimutatta, hogy az acne molekuláris patogenezisében szerepet játszó *P. acnes* baktérium felismerést követően a keratinociták és a szebociták is különböző faktorokat kezdenek termelni (pl. TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  gyulladásos citokineket, CXCL8 kemokint, DEFB4 antimikrobiális peptidet), mely események kulcsfontosságúak a patogén hatására induló elsődleges immunválasz, és gyulladásos folyamatok beindításában (Nagy, 2005; Nagy, 2006).

Mindez egy a mai napig fennálló ellentmondáshoz vezet, hiszen a jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján nem magyarázható, hogy hogyan is lehetséges az, hogy míg az egészséges bőrben a *P. acnes* baktérium része a kommenzális flórának, bizonyos körülmények között patogén faktorként is viselkedhet (pl. az acne kialakulása során).

Munkánk során ezért célul tűztük ki a *P. acnes* baktérium által indított szignálfolyamatok egyes elemeinek részletes megismerését, különös tekintettel az immunfolyamatokban központi szabályozó szerepet betöltő transzkripciós faktor, az NF- $\kappa$ B szerepének jellemzését, valamint a TLR aktiváció hatására induló folyamatok negatív szabályozásában szerepet játszó molekulák azonosítását és jellemzését keratinocitákban. Ez utóbbi folyamatoknak fontos szerepe lehet abban, hogy az egészséges bőrben a *P. acnes* a kommenzális flóra részét képezi, ellene immun aktiváció nem alakul ki.

Munkacsoportunk eredményei arra utalnak, hogy a *P. acnes* által indított immun- és gyulladásos folyamatok szabályozásában központi szerepet játszó citokinek (TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$ ) mRNS szintű kifejeződése már igen korán, 6 órával a kezelést követően növekszik, és az alkalmazott baktérium dózis növelésével párhuzamosan is fokozódik. Ez a változás gyors és tranziens, hiszen 24 óra elteltével már újra a kezeletlen kontroll szintekhez hasonló értékeket kaptunk alacsony MOI-k (25, 50, 100) alkalmazása esetében. Magas MOI-k (200, 300)

azonban ebben az időpontban is enyhén emelkedett szinteket detektáltunk. Ez arra utal, hogy a *P. acnes* baktérium hatására a MOI növelésével nő a gyulladásos citokinek szintézise, ezáltal valószínűsíthetően a kiváltott gyulladásos folyamatok mértéke is.

Ezután azt vizsgáltuk, hogy más rendszerekben leírt, a TLR aktivációs folyamatok negatív szabályozóiként funkcionáló molekulák (SIGIRR, TOLLIP, TNFAIP3) jelen vannak-e keratinocitákban, és ha igen, kifejeződésük mértéke függ-e a ko-kultúrában jelen levő baktériumok mennyiségétől.

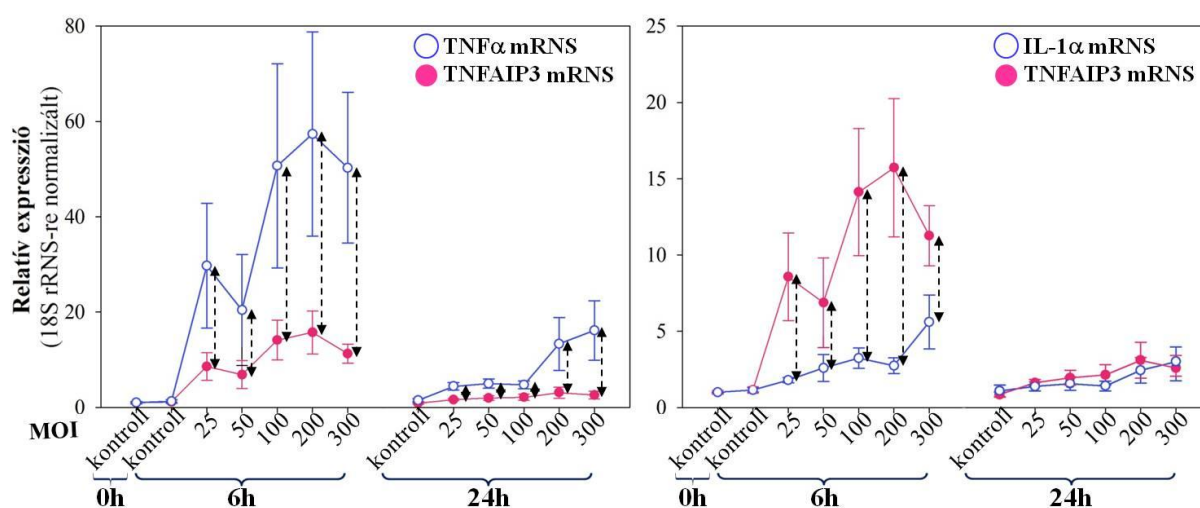
Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált negatív szabályozó mRNS szinten kifejeződik a HPV-KER sejtekben, és a TNFAIP3 expressziója fokozódott a *P. acnes* kezelés hatására. Ez utóbbi folyamatok időbeli változása jelentős hasonlóságot mutatott a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokin mRNS-ek esetében megfigyeltekkel, amiből arra következtettünk, hogy szabályozásukban hasonlóságok lehetnek. Ezt követően vizsgáltuk a TNFAIP3 mRNS kifejeződésének dózisfüggését, és ismét a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokin mRNS-ekhez hasonlóan az emelkedő MOI-kal arányosan fokozódó kifejeződésváltozást figyeltünk meg a 6 órás mintákban, ami tovább igazolta a TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  és TNFAIP3 közös szabályozó elemeinek lehetőségét.

Mindezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a keratinocitákban is működnek a TLR jelátviteli útvonalat negatívan szabályozó folyamatok, és egyes molekuláknak, mint például a TNFAIP3-nak kitüntetett szerepük lehet ezek szabályozásában.

A megfigyelt mRNS expressziós változások hátterében a TLR aktiváció hatására induló jelátviteli út fő transzkripció faktorának, az NF- $\kappa$ B-nek aktivációja állhat. Western vizsgálatainkban ugyanis azt tapasztaltuk, hogy az aktiváló p65 alegység a baktériumkezelés hatására az a citoplazmából a nukleuszba vándorolt. Ebből arra következtethetünk, hogy az NF- $\kappa$ B felszabadult a citoplazmás I $\kappa$ B fehérje gátlása alól, immáron a nukleuszban lehetővé vált olyan célgének kifejeződésének fokozása, melyek fő mediátorai a TLR aktiváció hatására kialakuló gyulladásos folyamatoknak (citokinek, kemokinek, gyulladásos enzimek).

Az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációjának MOI-függésének vizsgálata során azt is megfigyeltük, hogy a MOI emelkedésével párhuzamosan nőtt a nukleáris p65 frakció mennyisége. Ebből arra következtethetünk, hogy a gyulladást mediáló molekulák expressziósszint emelkedésének hátterében az NF- $\kappa$ B dózisfüggő aktivációja és nukleáris lokalizációja áll. Feltehetően minél nagyobb számban van jelen a *P. acnes* baktérium a keratinociták környezetében, annál nagyobb mértékű lesz a targetgének expressziójának fokozódása, és ezzel párhuzamosan a kiváltott gyulladás mértéke.

A keratinociták környezetében jelen levő mikróbák tehát az immun és a gyulladásos reakciók kialakulását elősegítő, de ezzel egyidőben azokat gátló folyamatokat is indítanak. Ezek alapján feltételezzük, hogy a pozitív és a negatív szabályozó folyamatok aránya fogja a sejtek választ végső soron meghatározni. Ha tehát vizsgáljuk a  $\text{TNF}\alpha$  és  $\text{IL-1}\alpha$  mRNS szintű kifejeződésének arányát a  $\text{TNFAIP3}$ -éhoz képest megfigyelhetjük, hogy az arányok a MOI növekedésével párhuzamosan változnak, mégpedig látszólag oly módon, hogy a gyulladást elősegítő molekulák mRNS szintű kifejeződése, és feltételezhetően ezzel párhuzamosan a gyulladás mértéke egyre kifejezettebbé válik (14. ábra). A fenti eredmények véleményünk szerint alátámasztják azt a feltételezést, hogy a pozitív és negatív szabályozó folyamatok aránya együttesen határozza meg a TLR aktivációra adott sejtválaszt, a mikróbák hatására bekövetkező gyulladásos folyamatok mértékét, és mindezek eredményeképpen feltehetően az egyéni acnés tünetek súlyosságát is.



**14. ábra.** A  $\text{TNF}\alpha$  és  $\text{IL-1}\alpha$  mRNS szintű kifejeződésének arányát a  $\text{TNFAIP3}$ -éhoz képest. Az arányok a MOI növekedésével párhuzamosan változnak oly módon, hogy a gyulladást elősegítő molekulák mRNS szintű kifejeződése fokozódik a keratinociták környezetében található mikróbák mennyiségének növekedésével.

Az acné patogenezisében szerepet játszó molekuláris folyamatok elemeinek megismerése és pontos jellemzése kulcsfontosságú lehet az acnés tünetek gyógyítása, és esetlegesen kialakulásuknak megakadályozása tekintetében. A jelenleg rendelkezésre álló terápiás modalitások a már meglevő tüneteket kezelik, és bár közöttük vannak hatékonyak, ezek komoly mellékhatások kialakulását is eredményezik.

Alap kutatás jellegű vizsgálataink lehetővé tehetik olyan új terápiás célpontok kijelölését, melyek a TLR indukálta jelátviteli folyamatok endogén szabályozó elemeinek kifejeződését

és/vagy aktivitását befolyásolhatják. Ezek reményeink szerint nemcsak szélesíthetik az egyik leggyakoribb bőrbetegség, az acne terápiás lehetőségeinek tárházát, de olyan új utakat nyithatnak meg, melyek eredményeképpen a tünetek kialakulásának megelőzésére alkalmas, vagy az eddigieknél jóval kedvezőbb mellékhatás-profillal rendelkező terápiás modalitások kifejlesztéséhez vezethetnek.

## 6. Felhasznált irodalom jegyzéke

- Alberts B et al (2008) Specialized tissues, stem Cells and Tissue Renewal – Epidermis and its renewal by stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 23:1417-1429. e5
- Berra B, Rizzo AM (2009) Glycemic index, glycemic load: new evidence for a link with acne. *J Am Coll Nutr* 28, suppl:450S-4S
- Boone, D.L. et al. (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat. Immunol.* 5:1052-160
- Bressler RS, Bressler CH (1989) Functional anatomy of the skin. *Clin Podiatr Med Surg* 6(2):229-246.
- Elias PM (2008) Stratum corneum defensive factions: an entegrated new. *J. Invest Dermatol.* 125:183-200.
- Fredericks DN (2001) Microbial ecology of human skin in health and disease. *J Investing Dermatol Symp Proc* 6:167-169.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S et al. (2009) Topographical and temporal diversity of human skin microbiota. *Science* 324:1190-2.
- Grice EA, Kong HH, Renaud G et al. (2008) A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res* 18:1043-50.
- Habif TP (2009) Acne, rosacea, and related disorders. *Saunders Elsevier Clinical Dermatology* e5 chap7. Harrison WJ, Bull JJ, Seltmann H, Zouboulis CC, Philpott MP (2007) Expression of lipogenic factors galectin-12, resistin, SREBP-1 and SCD in human sebaceous glands and cultured sebocytes. *J Invest Dermatol.* 127:1309–1317.
- Heyninck K, Beyaert R (1999) The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NFκB activation at level of TRAF6. *FEBS Letters* 442:147-150.
- Heyninck K, Beyaert R (2005) A20 inhibits NFκB activation by dual ubiquitin-editing function. *Trends Biochemical Sciences* 30(1):1.4.
- Jeong E and Lee YJ (2011) Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J* 52(3):379-392
- Kanitakis I. (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology* 4:390-401. vol12
- Madison KC (2003) Barrier function of the skin: „la rais d’etre” of the epidermis. *J. Invert Dermatol.* 121:231-241.
- Marples RR, Downing DT, Klingman AM (1971) Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *Jinvert Dermatol* 56:127-131.
- Melnik B (2009) Milk consumption: aggravating factor of acne and promoter of cronic diseases of Western societies. *J. DtschDermatol Ges* 7:364-370.

- Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemény L (2005) Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human  $\beta$ -Defensin-2 and Interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like Receptors. *The Society for Investigative Dermatology* 124:5:931-937.
- Otto M. (2009) *Staphylococcus epidermidis*- the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:555-67.
- Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, et al. (2003) Expression and function of Toll-like receptor 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunology* 15:721-730.
- Schibole O, Podolsky KD (2007) TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:1469-1473.
- Schröder JM and Harder (2006) Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:469-486
- Stathakis V, Kilkenny M, Marks R (1997) Descriptive epidemiology of acne vulgaris in the community. *Australasian Journal of Dermatology* 38:115-123.
- Szabó K, Kemény L (2011) Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of acne vulgaris. *Hum Immunol* 72(9):766-773
- Wald et al. (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor- Interleukin 1 receptor signalling. *Nature Immunology* 4: 920-927.
- Zouboulis CC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WC, et al. (2005) What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* 14:143-152
- Zhang G, Ghosh S (2002) Negative regulation of toll-like receptor-mediated signalling by Tollip. *J Biol Chem* 277:7059-7065.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szabó Kornéliának, aki szakmai irányításával, hasznos tanácsaival, valamint kísérleteim megtervezésében nyújtott segítségével lehetővé tette TDK dolgozatom elkészítését.

Köszönöm Tax Gábor PhD hallgatónak, valamint Tanácsné Bajkán Andrea kutatócsoportunkban dolgozó asszisztensnek a kísérleteim során alkalmazott módszerek bemutatását és a kivitelezésben nyújtott segítségét.

Hálás vagyok a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Mikrobiológiai Intézetében Dr. Urbán Editnek, aki a munkám során felhasznált *P. acnes* törzsek fenntartását és növesztését végezte.

Köszönetet nyilvánítanék még a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikának és az Intézet vezetőjének, Professzor Dr. Kemény Lajosnak, aki lehetővé tette, hogy itt készíthessem el a TDK dolgozatomat, valamint, hogy megteremtette a munkámhoz szükséges feltételeket, eszközöket és légkört.

## 8. Általam elsajátított módszerek összessége

Munkám során a következő módszereket sajátítottam el, illetve 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
- fehérje izolációs módszerek (totál fehérje, nukleáris és citoplazmás frakciók elválasztása)
- valós idejű PCR
- Western analízis.

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

1. Szabó K, Tax G, Bolla B, **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. *Propionibacterium acnes* indukált dózisfüggő keratinocita aktiváció. Szabó Kornélia, Tax Gábor, Bolla Beáta Szilvia, Erdei Lilla, Tábori Bettina, Urbán Edit, Kemény Lajos. Magyar Dermatológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest, 2012.

## **9. Nyilatkozat**

Alulírott, Erdei Lilla SZTE-TTIK biológus MSc 2. évfolyamos hallgató kijelentem, hogy TDK dolgozatomban leírtak saját munkám és kísérleti eredményeim és csak a megjelölt forrásokat használtam fel.

.....

2012. november. 5