

A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A FAGGYÚSEJTEK AUTOFÁGIÁS FOLYAMATAIBAN

Kiss Anna

Biomérnök BSc. III. évfolyam

Témavezető:

Dr. Fedor-Lénárt Kinga

tudományos munkatárs

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Bőrgyógyászati
Tanszék

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A faggyúmirigy	5
2.2. A faggyúmirigyhez kapcsolódó leggyakoribb kórképek	6
2.3. A humán <i>in vitro</i> faggyúsejt modellek jelentősége	8
2.4. Az autofágia	9
2.5. Az autofágia és a faggyúmirigy kapcsolata	10
2.6. A szöveti transzglutamináz (TG2), mint potenciális target a faggyúsejtek működésében	10
3. Célkitűzés.....	13
4. Anyagok és módszerek.....	14
4.1. SZ95 faggyúsejtek tenyésztése	14
4.2. Immunhisztokémia	14
4.3. Immuncitokémia és high-content screening mérés.....	14
4.4. mRNS izolálás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív RT-qPCR.....	16
4.5. A TG2 KO klónok létrehozása CRISPR/Cas9 módszerrel	16
4.6. Kísérleti állatok	16
4.7. Víztaszítási vizsgálat.....	17
4.8. Western blot.....	17
4.9. Statisztikai analízis	18
5. Eredmények és értékelésük.....	19
5.1. A normál emberi bőr faggyúmirigyei és az SZ95 faggyúsejtek is expresszálnak szöveti transzglutaminázt	19
5.2. A TG2 hiánya fokozott lipid akkumulációt eredményez az SZ95 sebocitákban.....	20
5.3. Az autofágia marker ATG5 szintje alacsonyabb a TG2 hiányos faggyúsejtekben	21
5.4. A lipid felhalmozódás károsodott autofágiával jár együtt TG2 hiányában, amit az autofágia markerek fehérje expressziója is alátámaszt.....	22
5.5. A TG2 KO egerek csökkent víztaszító képességgel rendelkeznek	24
6. Összefoglalás.....	26
Köszönetnyilvánítás.....	28
Irodalomjegyzék.....	29
Függelék	35

Rövidítések jegyzéke

ATG5	autofágia asszociált fehérje 5
ATG7	autofágia asszociált fehérje 7
ATRA	all transz retinsav
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
HCS	high-content screening
KO	mutáns fenotípus
LC3	mikrotubulus-asszociált fehérje 1A/1B-könnyű lánc 3
MEF	embrionális egér fibroblaszt
MZ	érési zóna
NZ	nekrotikus zóna
PFA	paraformaldehid
PZ	proliferációs zóna
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RAR	retinsav receptor
SDS-PAGE	nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
SZ95	immortalizált humán faggyúmirigy sejtvonat
TG2	szöveti transzglutamináz
WT	vad típusú

1. Bevezetés

A bőr létfontosságú szerv, amely a test teljes külső felületét borítja, és védelmet nyújt a kórokozók és a környezetből származó sérülésekkel szemben. A faggyúmirigy szerves része a bőr szerkezetének és működésének, mivel a bőr felszíni lipidjeinek 90%-át biztosítja. Ezek a mirigyek olyan lipideket termelnek, amelyek részt vesznek a serdülőkor egyik legelterjedtebb betegségében, a pattanásos bőr vagy más néven az akné vulgaris patogenezisében. Bár a faggyúmirigy iránti érdeklődés az akné vulgarisban betöltött központi szerepéből ered, számos új funkcióra derült fény, amelyek rávilágítanak e sokoldalú sejtes egységnek a bőr homeosztázisában betöltött összetett funkciójára. A faggyúmirigy legalább két szempontból különleges. Először is, e mirigy terméke holokrin szekréció útján szintetizálódik, egy egyedülálló módszerrel, amelyet elsődleges sejtegységének, a szebocitának vagy faggyúsejteknek a degradációja jellemez. Másodszor, annak ellenére, hogy a szebociták hám eredetűek és számos hormonreceptorral rendelkeznek, lipidszintézisük révén a lipid anyagcserében töltenek be jelentős szerepet, ami általában a zsírsejtek számára fenntartott feladat. Így a faggyúmirigy egyszerre tekinthető hormonális célpontnak és endokrin szervnek is. A faggyútermelés és -leadás mellett a faggyúmirigyek feladata, hogy fenntartsa a test homeosztázisát a vízvesztés megakadályozása, a testhőmérséklet szabályozása, valamint a kórokozó mikroorganizmusok és toxikus anyagok elleni védelem révén. A kutatások kimutatták, hogy a faggyúmirigyek rendelkeznek az androgén-anyagcseréhez szükséges gének átírásának sejtes képességével is. A túlzott faggyútermelés az egyik leggyakoribb bőrbetegségben, az akné vulgarisban figyelhető meg, míg a deregulált faggyúsejt-differenciálódás néhány ritka jó- és rosszindulatú daganatot jellemez.

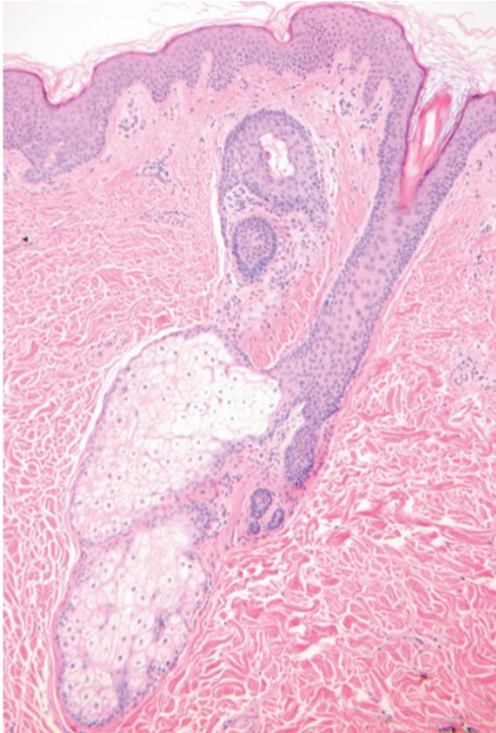
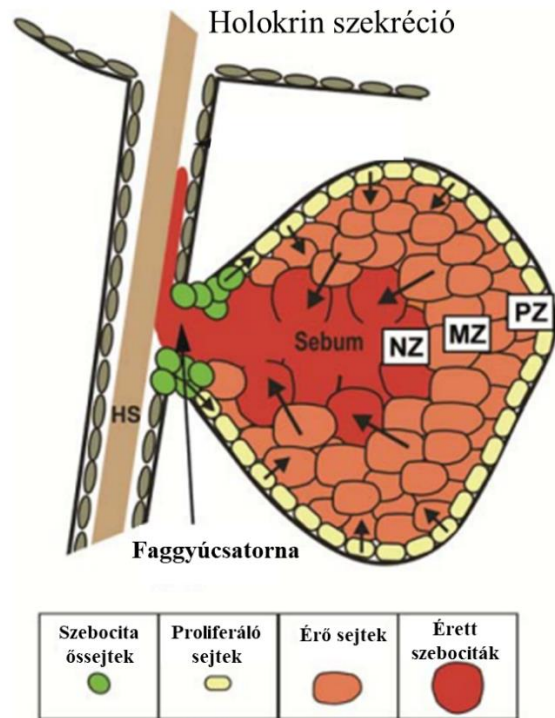
Irodalmi adatok alapján a faggyúmirigy holokrin szekréciója, egy autofágia által közvetített sejthalál forma, mely során a degradációs végtermékek felhasználódnak fehérjeszintézishez és egyéb energiatermelő folyamatokhoz, ami hozzájárul a faggyúmirigyek normál működéséhez. Kísérleteink során a szöveti transzglutamináz (TG2) szerepét vizsgáltuk a faggyúsejtek működésében, amely fehérje bőrben lévő jelenléte és a zsíryanycserében betöltött szerepe mellett, az autofágia folyamatában is részt vesz. A dolgozatomban bemutatásra kerülő vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy ez az enzim hozzájárulhat a faggyútermeléshez az autofágia folyamatán keresztül, így jövőbeli gyógyszeres aktiválása esetleg hatékony célpont lehetne az akné vulgaris és egyéb bőrgyógyászati betegségek hatékony terápiájának kidolgozásában és kezelésében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A faggyúmirigy

A faggyúmirigyek az epidermisz acináris, holokrin szekrécióval rendelkező függelékei, melyek a testfelszín legtöbb területén megtalálhatók. Általában a faggyúmirigyek az úgynevezett pilosebaceus egység fontos részét képezik, és szorosan kapcsolódnak szőrtüszőhöz. Míg a faggyúmirigyek külső, bazális rétege osztódó sejteket tartalmaz, a belső kompartmentet faggyúsejtek vagy más néven szebociták alkotják, amelyek jól meghatározott differenciálódási programon mennek keresztül, végül egy olajos és viaszos anyag keverékét, az úgynevezett faggyút vagy szébumot termelik [1,2]. A faggyúmirigy érési zónájában a sejtek tovább halmozzák a lipideket, érettebbé válnak, majd a mirigy közepe felé, a degenerációs zónába tolódnak (**1. ábra**). A faggyúsejtek differenciálódását és érését követően a lipidtartalmú faggyú, holokrin szekrécióval szabadul fel a mirigy egy speciális szekréciós csatornáján keresztül a tüszőcsatornába, hogy eljusson a bőr felszínére [3]. Ez a komplex lipidkeverék jelentősen hozzájárul az emlősök bőrének barrier funkciójához, mivel csökkenti a bőr felszínéről történő vízvesztést, valamint elősegíti a víz tasztását és a hőszabályozást [4]. Bár a faggyúmirigyek fiziológiai komplexitásának minden részlete nem teljesen ismert, a faggyú antimikrobiális hatással rendelkezik, antioxidánsokat tartalmaz és véd az UVB által kiváltott apoptózissal szemben [3-6].

A faggyúmirigyek diszfunkciója számos bőrbetegséggel jár együtt [2]. Az akné, a serdülőkor leggyakoribb bőrbetegsége, amely a faggyútermelés növekedésével és a faggyú összetételének megváltozásával jellemezhető [7]. A faggyúmirigyek hibás működését továbbá a faggyúmirigy-gyulladásával, pikkelysömörével, alopeciával, ekcémás betegségekkel és faggyúmirigy-daganatokkal is összefüggésbe hozták [8,9]. Mivel a faggyúmirigyek fontos szerepet játszanak a bőr homeosztázisában és a bőr normális működésében, ezen mirigyek kialakulásának, fenntartásának, fiziológiájának, immunológiájának és endokrinológiájának jobb megértésére nagy szükség van ahhoz, hogy a fent említett a kórképeket célzottan lehessen kezelni.

A**B**

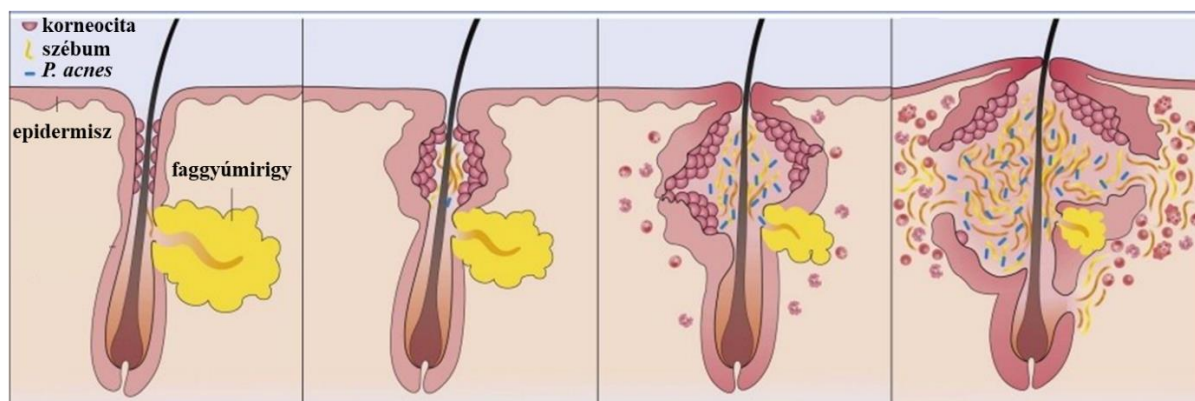
1. ábra: (A) Hematoxin-eozinnal festett pilosebaceous egység (faggyúmirigy és szőrtüsző) [10]. (B) A faggyúsejt differenciálódás különböző lépéseinek sematikus ábrázolása. Az ábra Schneider, M. R. és Paus, R. 2010. közleménye alapján készült [4]. A szebociták érési és differenciálódási szakaszában részt vevő sejttypusokat különböző színekkel jelöljük. A nyilak jelzik a sejt differenciálódás és érés útját, amíg a sejt tartalom fel nem szabadul a holokrin szekréció következtében. PZ: proliferációs zóna, MZ: érési zóna, NZ: nekrotikus zóna.

2.2. A faggyúmirigyhez kapcsolódó leggyakoribb kórképek

Acne vulgaris

Az acne vulgaris azon túl, hogy az egyik leggyakoribb bőrbetegség, a serdülőkor leggyakrabban előforduló dermatózisa. Bár nem életveszélyes, súlyos formái kiterjedt hegesedést okozhatnak az arcon ami jelentős érzelmi tüneteket okozhat, amelyek akár súlyos pszichológiai problémákhoz is vezethetnek. Az akné patogenezeise összetett, magában foglalja a follikuláris hiperkeratinizációt, a *Propionibacterium acnes* által kiváltott gyulladást és a túlzott faggyútermelést, amely a *P. acnes* számára tápanyagforrásként szolgál [11]. A faggyú csökkentésére szolgáló orális terápia hormonokon vagy izotretinoinon, egy szintetikus retinoidon alapul, amely gátolja a faggyúmirigyek differenciálódását. Az izotretinoin

mellékhatásai és a teratogenitással kapcsolatos aggályok azonban egyértelműen jelzik, hogy alternatívákra van szükség e betegség kezelésében [12].



2. ábra: Az akné kialakulásának sematikus ábrázolása. (Forrás: <https://plasticsurgerykey.com/acne-vulgaris/>). Az akné kialakulása számos tényező kölcsönhatásával jár, beleértve a follikuláris hiperkeratinizációt; a faggyútermelést és faggyúösszetételt befolyásoló hormonális hatásokat; és a gyulladást, amely részben a *P. acnes* által közvetített.

Seborrhoea

A túlzott lipidtermelés leggyakrabban azokon a bőrterületeken figyelhető meg, ahol a faggyúmirigyek sűrűsége nagyobb, mint például az arcon, a fejbőrön és a törzs felső részén. A szeborreás dermatitisz egy olyan betegség, amelyet vörös, hámló bőrfoltok jellemeznek. Ennek a betegségnek, amely különösen gyakori csecsemőknél, AIDS-betegeknél és neurológiai rendellenességben szenvedő betegeknél, összetett és meglehetősen kevésbé ismert etiológiája van [13].

Rosacea

Érdekes módon, annak ellenére, hogy a rosacea a test faggyúmirigyekben gazdag területein van jelen, a rosaceas betegek által szekretált faggyú mennyisége nem változik az egészséges kontrollcsoportéhoz képest. A faggyú általános relatív összetételében azonban változások tapasztalhatók [14,15]. Az érintetteknél megnövekedett a mirisztinsav (C14:0) és csökkent a hosszú láncú telített zsírsavak szintje [15]. Ezek a lipidek szerepet játszanak a bőrgát integritásának fenntartásában, ezért jogosan feltételezhető, hogy a megváltozott faggyúzsírsavprofil fontos szerepet játszik a bőrgát diszfunkciójában, ami rosaceához vezet [15].

Sebaceoma és faggyúmirigy karcinóma

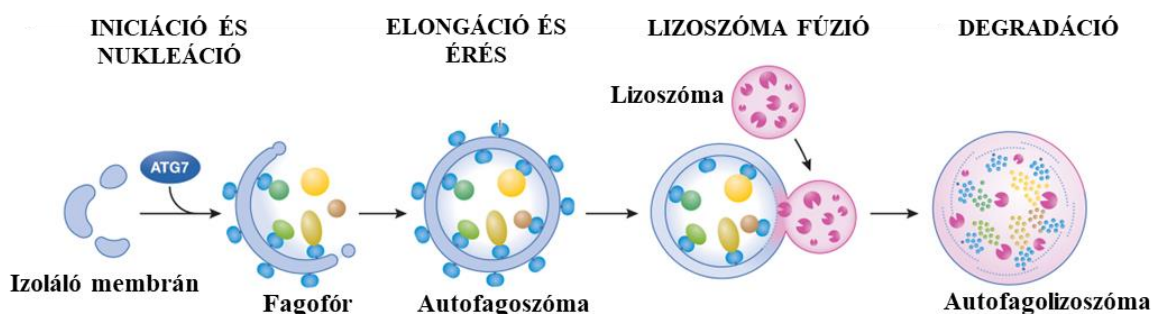
A sebaceoma jóindulatú daganat, amely hisztopatológiailag hasonlít a mellékhám más jóindulatú daganataihoz, mint a trichoepithelioma és a cylindromák [16]. A faggyúmirigy differenciálódáson áteső rosszindulatú, agresszív daganatokat faggyúmirigy karcinómának nevezzük [17]. Ezek a nagyon ritka tumorok leggyakrabban szemészeti (Meibom mirigyből származó) daganatok, de a test bármelyik faggyúmirigyéből kialakulhatnak. A leggyakoribb klinikai téves diagnózis a chalazion, a Meibom- vagy Zeis-mirigyek gyulladásos elváltozása, amely kemény, általában fájdalommentes szemhéjcsomó kialakulásához vezet [17]. A neoplasztikus faggyúelváltozások további entitások széles skáláját foglalják magukban, amelyek nomenklatúrája és kezelése még mindig ellentmondásos.

2.3. A humán *in vitro* faggyúsejt modellek jelentősége

Az akne és a seborrhoea a faggyúmirigyekkel kapcsolatos betegségek, amelyek kizárólag emberi betegségek. A humán faggyúsejtek működésének és szabályozásának alapvető kutatásához humán *in vitro* modellekre van szükség. A humán faggyúsejtkultúra-modellt először 1989-ben írták le. A tenyésztett humán faggyúsejtekről kimutatták, hogy megőrzik a fontos sebocita jellemzőket, bár *in vitro* nem mennek keresztül teljes terminális differenciálódáson. Az évek során a molekuláris biológiai technika módosításai javították a humán sebociták *in vitro* tenyésztését, de az elsődlegesen tenyésztett faggyúsejtek még mindig legfeljebb hat passzázsra tarthatók fenn *in vitro* [18]. Az elmúlt években létrehozták az immortalizált humán faggyúmirigy SZ95 [19], SEB-1 [20] és Seb-E6E7 [21] sejtvonalakat, amelyek lehetővé teszik, hogy ugyanabból a donorkultúrából nagyszámú faggyúsejtet nyerjünk. Az SZ95-nek nevezett immortalizált transzfektált sejtek alkalmazása az egyik legelterjedtebb a kísérletes kutatások során. A humán arcból származó faggyúmirigy sejteket transzfektálták speciális virális plazmával és az így kapott proliferáló sejtkultúrákat több mint 50 alkalommal passzázták, klónozták, tehát elmondható, hogy hosszú idő *in vitro* tenyésztés után sem mutatták az öregedés jeleit, míg ezzel szemben a normál humán faggyúsejtek csak három-hat passzázsra tenyészthetők [19]. Az *in vitro* tenyésztett humán sebociták hasznos eszközzé váltak a faggyúmirigy aktivitásának és szabályozásának tanulmányozásában, valamint az akné és más faggyúmirigyekkel kapcsolatos betegségek patofiziológiai mechanizmusainak megértésében és kezelésében.

2.4. Az autofágia

Az autofágia egy intracelluláris degradációs mechanizmus, melynek során a makromolekulák és organellek kettős membránnal körülvett struktúrákban bomlanak le, melyeket autolizoszómáknak nevezünk. Az autofágia egy evolúciósan konzervált biológiai folyamat, amelynek három fő formáját írták le az úgynevezett mikroautofágiát, makroautofágiát és a chaperon-mediált autofágiát [22]. Dolgozatomban a makro-autofágiára összpontosítok, amelyet általában „autofágiának” neveznek (3. ábra).



3. ábra: Az autofágia klasszikus útvonalának (makroautofágia) sematikus ábrázolása. A folyamat iniciációs lépésében az úgynevezett izoláló membrán, egy kettős membrán körbezárja az emésztendő anyagot. Következő lépésben, az elongáció során a kettős membrán bezárulásával létrejön az autofagoszóma, ami aztán fuzionál a lizoszómával. Az ezáltal létrejövő struktúrát autofagolizoszómának nevezzük, melynek belső közegének pH-ja savas, ami végül a degradáció során a beltartalom lebontását teszi lehetővé.

Az autofágia egy szigorúan szabályozott folyamat, amelyben legalább 32 különböző autofágiával kapcsolatos gén (Atg) vesz részt. Közülük az Atg5 szerepét az autofágia aktiválása során széles körben tanulmányozták. Az Atg5 kritikus szerepet játszik az autofagoszómák érésének szabályozásában [23]. Az autofágiát célzó molekulák és organellek olyan speciális hordozómolekulákkal társulnak, mint a p62/sequestosome-1 (SQSTM1), amely kölcsönhatásba lép az LC3 II-vel, egy lipidált fehérjével, amely a kialakulóban lévő autofagoszóma membránon található. Együtt autofagoszómákká alakulnak, amihez az autofágiával kapcsolatos gén, az Atg7 elengedhetetlen. Az autofagoszómák ezt követően egyesülnek a lizoszómákkal, ezáltal tartalmukat lebontó enzimek hatásának teszik ki [22]. Az autofágiát eredetileg a tápanyaghiányra adott nem specifikus válaszmechanizmusként írták le, [24] de ma már tudjuk,

hogy specifikusan a sérült fehérjéket és szubcelluláris organelleket is megcélozza, beleértve a mitokondriumokat (mitofágia), endoplazmatikus retikulumot (ERfágia), peroxisómákat (pexofágia) és a lipidcseppeket (lipofágia) [25].

2.5. Az autofágia és a faggyúmirigy kapcsolata

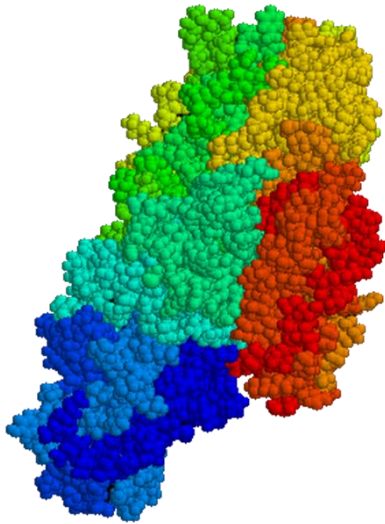
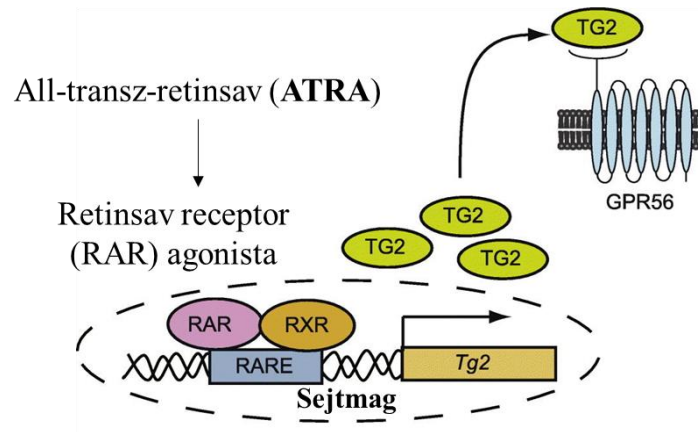
Irodalmi adatok alapján a faggyúmirigy holokrin szekréciója egy autofágia függő folyamat [26,27]. Leírták, hogy az autofágia inaktiválása a faggyúmirigyek morfológiájának és működésének megváltozásához vezet [25]. Az autofágia hiánya zsíros bőrt és megnagyobbodott faggyúmirigyeket eredményez, továbbá a bőrhámsejtekben befolyásolja a faggyúlipidek összetételének arányát és a viaszészterek leggyakoribb zsír-acil fajainak lánc hosszát [25]. Ezen kívül kimutatták, hogy az emberi bőr faggyúmirigy sejtjeiben konstitutív módon expresszálódnak az autofágiás fehérjék, ezzel szemben az aknés betegek faggyúmirigyében az autofágia markerek jelentősen le vannak szabályozva [28]. Az irodalomban megtalálható in vitro kísérletek alapján az autofágia gátlása növeli a lipidek felhalmozódását az SZ95 sebocitákban, továbbá az autofágia közvetíti a retinsav szeboszuppresszív hatását ezekben az SZ95 faggyúsejtekben [28]. Ez klinikai szempontból érdekes információ, mert a lokális retinoidok az akné kezelésének alappillérei. Az első generációs retinoid tretinoint (all-transz retinsav) és a szintetikus harmadik generációs poliaromatikumokat, az adapalént és a tazarotént az amerikai FDA engedélyezte akné kezelésére, míg a helyi alkalmazású tretinoin, az izotretinoin (13-cisz retinsav) és az adapalén Kanadában és Európában engedélyezett [29]. A faggyúsejtek holokrin szekréciójának és az autofágia kapcsolatának részletes feltárása, ezen folyamatokban szerepet játszó kulcsfehérjék azonosítása, tehát fontos szerepet játszhat az akné és más faggyúmirigy működéssel kapcsolódó bőrgyógyászati kórképek hatékony terápiájának kidolgozásában és kezelésében.

2.6. A szöveti transzglutamináz (TG2), mint potenciális target a faggyúsejtek működésében

A szöveti transzglutamináz (TG2) egy multifunkcionális enzim, amely számos érdekes tulajdonsággal rendelkezik, és sokoldalú szerepet játszik mind a fiziológiás, mind a patofiziológiás folyamatokban. A transzglutamináz családon belül a TG2 a leggyakrabban előforduló tag az eukariótákban, és szinte minden emlős sejtben jelen van. Egyedülálló enzim,

amelynek sejtszintű lokalizációja, konformációi, szabályozó faktori/mechanizmusai és biokémiai funkciói komplex kölcsönhatásban vannak [30]. Az enzim izopeptidkötések létrehozásával katalizálja a fehérjék Ca^{2+} és tiol-függő poszttranszlációs módosítását. Ezek a kötések egy aciltranszfer (transzamidációs) reakcióval jönnek létre, amelyben a fehérjéhez kötött glutamin-maradék γ -karboxamid csoportja acil-donorként és primer aminok széles spektruma acilakceptorként működik, különösen a fehérjéhez kötött lizin-maradékok és alacsony molekulatömegű poliaminok. A transzamidáláson kívül a transzglutaminázok a glutamin-maradékok észteresítési és hidrolízis reakcióit is katalizálhatják [30]. A transzamidációs reakciók Ca^{2+} -függő katalizátoraként betöltött szerepe mellett a TG2 képes GTP-t (és ATP-t is) kötni és hidrolizálni. Ezek a változatos katalitikus tevékenységek szerkezetileg egy négy különböző doménből álló multidomén fehérjében tükröződnek [30] **(4. ábra)**.

A TG2 szorosan részt vesz számos sejtfunkció szabályozásában, mint például a sejtadhézió, migráció, túlélés és sejthalál, sejtnövekedés és -differentiálódás, exocitózis és autofágia [31]. Gyulladásos betegségekkel, cöliákiával [31], neurodegeneratív betegségekkel [32], cukorbetegséggel [33], rákos megbetegedésekkel [34], sebgyógyulással [35] és bőrgyógyászati problémákkal [36, 37] is összefüggésbe hozható. A szöveti transzglutamináz expresszálódik az emberi bőrben [35], azonban faggyúmirigyben betöltött szerepe eddig tisztázatlan. Fontos kiemelni, hogy a fentebb már említett tretinoin, a retinsav metabolitja, a bőrgyógyászatban, az akné kezelésére széles körben alkalmazott terápiás szer. Az all transz retinsavról (ATRA) pedig ismert, hogy a retinsav receptort aktiválva, képes a TG2 génexpressziójának fokozására **(4. ábra)**. Tehát a retinsav vagy tretinoin a terápiás hatásán túl, potenciális TG2 indukálószer is tekinthető. A szöveti transzglutamináz faggyúsejtekben betöltött szerepének tisztázása azért is felmerül, mert a faggyúsejtekhez nagy mértékben hasonló beige zsírsejtekben a TG2 fontos szerepet játszik a lipid anyagcsere szabályozásában [38]. Mind a faggyúsejtek mind pedig a zsírsejtek nagy mennyiségű lipidet halmoznak fel, és hasonló receptorokkal rendelkeznek, valamint a lipidtermelésben részt vevő enzimek, például a diacilglicerin aciltranszferáz és a sztearoil-CoA deszaturáz részben átfedő sorát expresszálják [3]. A TG2 bőrben lévő jelenléte és a zsírszorongásban betöltött funkciója mellett, az autofágiában is szerepet játszik, ahol szükséges az autofagoszóma éréséhez és az autofágia befejezéséhez egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtekben [39]. Ezen ismeretek alapján feltételezhető, hogy potenciális fehérje lehet a faggyúsejtek működésében is, ezért szerepét részletesebben is szeretnénk volna megvizsgálni.

A**B**

4. ábra: (A) A szöveti transzglutamináz 3D struktúrájának ábrázolása [Wikipédia: https://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_transglutaminase#/media/File:Tissue_transglutaminase.png]. A különböző doméneket eltérő színek jelölnék. (B) Az all transz retinsav (ATRA) a retinsav receptort aktiválva, képes a TG2 génexpressziójának fokozására. Az ábra Kitakaze T. és munkatársai publikációján alapján készült [40].

3. Célkitűzés

A faggyúmirigyek (pato)fiziológiai szerepének további feltárása érdekében célul tűztük ki a TG2 szerepének vizsgálatát a faggyúsejtek működésében.

Célunk volt az SZ95 faggyúsejtek összehasonlító vizsgálata: A vad típusú és a korábban létrehozott állandó TG2 knock out (KO) SZ95 faggyúsejt vonal felhasználásával, amelyet csoportunk CRISPR/Cas9 módszerrel hozott létre.

Az alábbi kísérletek tűztük ki célul:

- A szöveti transzglutamináz expressziójának vizsgálatát hisztokémiai módszerrel a normál humán bőr faggyúmirigyeiben és immuncitokémiai, gén és fehérje expressziós módszerekkel az SZ95 faggyúsejtekben.
- A lipid cseppek vizsgálatát high-content screening (HCS) módszerrel.
- Az autofágia folyamatának tanulmányozására az LC3II és LC3I fehérjék arányát, illetve különböző autofágiás fehérjék (ATG5, ATG7) vizsgálatát terveztük HCS és Western blot módszerekkel.
- A sejtes kísérletek *in vivo* tanulmányozására a TG2 hiányos és vad típusú egerek szőrének víztaszító képességének vizsgálatát szeretnénk volna elvégezni.

4. Anyagok és módszerek

4.1. SZ95 faggyúsejtek tenyésztése

A humán immortalizált SZ95 faggyúsejteket [19] 37°C-os termosztátban, 5% (v/v) CO₂ és nedves páratartalom mellett tenyésztettük Sebomed Basal Médiumban® (Cat. No.: F8205, Biochrom, Cambridge, Egyesült Királyság). A tápfolyadékot 10% borjú szérummal (FBS, (BioSera, Nuaille, Franciaország), 1mM CaCl₂-dal, 1% penicillin/streptomycinnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) és 5 ng/ml epidermális növekedési faktorról (EGF, Sigma-Aldrich) egészítettük ki.

4.2. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai festéshez a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Bőrgyógyászati Klinika Szövettani Laboratóriumából származó anonim, fagyasztott illetve formalin fixált és paraffinba ágyazott mintáit használtuk. A fagyasztott metszeteket 10 percig fixáltuk jéghideg acetonban. A paraffinba ágyazott metszeteket deparaffináltuk majd rehidratáltuk és az endogén peroxidázok gátlására 3% H₂O₂ oldatot használtunk. Az antigén feltárást Tris-EDTA pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA oldat, 0,05% Tween 20, pH 9,0) végeztük 25 percig, a nem specifikus kötőhelyek blokkolása pedig 5% borjú szérum albumin (BSA) oldatban történt 30 percig szobahőmérsékleten [41]. Az immunhisztokémiai módszer során anti-TG2 (Zedira, Darmstadt, Németország) antitestet használtunk, melyet PBS-ben (1:100) hígítottuk, majd a metszeteket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A torna-peroxidáz konjugált másodlagos antitestek alkalmazása után (SuperSensitive One-step Polymer-HRP Detection Systems, BioGenex) az immunreakciót Vector VIP Kit (Vector Laboratories) segítségével tettük láthatóvá. A sejtmagok festéséhez metil zöld festéket alkalmaztunk, a minták analízisére pedig Leica DM2000 LED mikroszkópot használtunk (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország).

4.3. Immuncitokémia és high-content screening mérés

Az SZ95 faggyúsejteket Superfrost Ultra Plus tárgylemezeken (LabTek, Thermo Scientific, Rochester, NY) tenyésztettük. Ezt követően 4%-os paraformaldehiddel (PFA) 20 percig tartó fixálás után 0,1%-os Triton-X PBS-sel permeabilizáltuk 20 percen át, majd 0,5%-os BSA-val blokkoltuk 30 percen keresztül. A TG2 (Zedira, Darmstadt, Németország) elleni poliklonális

antitestet PBS-ben (1:100) hígítottuk, és a metszeteket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. PBS-es mosás után 1 órán át másodlagos antitesttel történő inkubáció következett. Végül a lemezeket Vectashield DAPI fedő médiummal (Vector Laboratories) fedtük le és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk [41].

A high-content screening (HCS) mérésekhez a sejteket 96 lyukú lemezekben, 70%-os konfluenciáig növesztettük. Ezt követően sejteket PBS-ben mostuk és 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig. A lipidcseppek festéséhez Nílus vörös festéket alkalmaztunk (1:1000 hígítás, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) majd a mintákat 1% Triton X-100 PBS oldatban 10 percig szobahőmérsékleten permeabilizáltuk. A sejteket 1% BSA-PBS oldatban 1 órán át blokkoltuk. A sejtmagokat DAPI (1:10 hígítás, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) festéssel vizualizáltuk, amit kétszer 10 perc PBS-es mosás követett [38]. A szeciták leképezése az Opera Phenix High Content Screening rendszerrel történt (PerkinElmer, Waltham, MA). A képalkotási folyamat három csatornában történt: DAPI, Nílus vörös és brightfield csatornákon. A sejtek szegmentálásához egy előre betanított VGG-UNet szemantikai szegmentációs modellt finomhangoltunk, hogy a teljes sejterületet szegmentálja a brightfield csatornában. A sejtmagokat hagyományos szegmentációval szegmentáltuk a CellProfiler 3.1.8-ban (Broad Institute, Cambridge, MA). A nagy sejtkompartmentek szegmentálása után a Nílusvörössel festett lipidcseppeket is szegmentáltuk hagyományos módszerrel a CellProfilerben. Az elemzés során megmértük a sejtek számát, a lipidcseppek számát és az egyes objektumok (sejtek, cseppek, sejtmagok) területét.

Létrehoztunk továbbá egy külön képi adatsort is, ahol az ATG5 fehérjét megfestettük (elsődleges antitest: 1:1000 hígítás, másodlagos antitest: 1:400 hígítás, Alexa Fluor 546), az aktin szálak festésére TexasRed-X Phalloidint használtunk (1:150 hígításban, Thermo Fisher, Waltham, MA), a sejtmagokat pedig DAPI (1:10 hígítás, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) festéssel tettük láthatóvá. A képalkotási lépés során a DAPI, a brightfield, a Nílusvörös, az Alexa488 és a TexasRed-phalloidin csatornák képei készültek. A brightfield csatornát a VGG-UNet modell szegmentálási teljesítményének ellenőrzésére alkalmaztuk. Összehasonlítást készítettünk a VGG-UNet modellel végzett brightfield sejtszegmentáció és a Cellprofiler segítségével TR-Phalloidin festett sejtszegmentáció között. Az adataim statisztikai elemzése során a hagyományos szegmentációs módszert alkalmaztuk, mivel ez a módszer precízebb volt ebben a kísérleti összeállításban. Az elemzés során megmértük a sejtek számát, az ATG5 jelek számát, valamint az egyes objektumok (sejtek, ATG5 jelek, sejtmagok) területét.

4.4. mRNS izolálás, reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív RT-qPCR

Az SZ95 faggyúsejtekből TRIzol reagens (MRC, Cincinnati, OH, Amerikai Egyesült Államok) felhasználásával teljes RNS-t izoláltunk a gyártó útmutatása szerint, melynek a mennyiségi és minőségi meghatározását NanoDrop 2000 (NanoDrop, Erlangen, Németország) segítségével végeztünk. A kvantitatív valós idejű PCR-hez (qRT-PCR) a teljes RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk, amit 37 °C-on 120 percig és 85 °C-on 5 percig végeztünk a High-Capacity cDNS reverz transzkripció kit (Thermo Scientific) segítségével [38]. A valós idejű kvantitatív PCR-t (QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR; Applied Biosystems) 40 ciklusban 95 °C-on 10 másodpercig és 60 °C-on 1 percig végeztük, melyhez specifikus primereket és TaqMan próbát (Applied Biosystems) használtunk. A transzkriptumok kvantifikálását az „összehasonlító Ct módszer” alapján készítettük el, és a kapott értékeket a ciklofillin A (PPIA) háztartási génre normalizáltuk [41].

4.5. A TG2 KO klónok létrehozása CRISPR/Cas9 módszerrel

Munkacsoportunk a TG2-höz *in silico* egy egyedi sgRNS-t tervezett a Zhang laboratórium CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>) segítségével. A TG2-t célzó sgRNS-szekvencia a következő volt: forward-5'-CACCGCTGATACTCACCTCTCGGCCCCA-3' és reverse- 5'-AAACTGGCCGAGGGTGAGTATCAGC-3'. Az SZ95 sebocitákat plazmida transzfektáltak. 5 órával később a tápfolyadékot visszaváltották normál tápfolyadékra. A transzfekció után 24 órával a sejteket 24 órán keresztül desztillált vízben oldott 2 µg/ml puromycinnel (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország), majd további 24 órán keresztül 0,5 µg/ml puromycinnel kezelték. Miután a túlélő sejteknek egy napot hagytak a regenerálódásra, az egyes sejteket BD FACS Aria™ III segítségével (BD Biosciences, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) 96 lyukú lemezekbe szortolták a klonális sejtvonalak létrehozásához. Minden alábbi elemzést három ellenőrzött TG2 knock-out klónon végeztünk, és ezek átlagát adtuk meg.

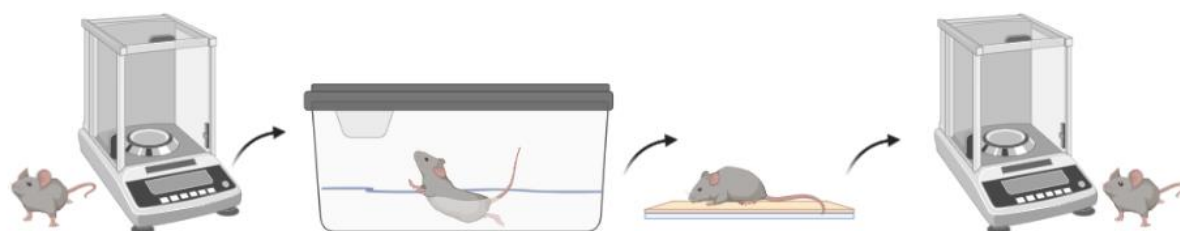
4.6. Kísérleti állatok

A C57BL/6J genetikai háttérrel rendelkező TG2 KO egereket és a TG2 vad típusú alomtársaikat heterozigóta szülők pároztatása után genotipizálással azonosították. Az egereket a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának Kísérleti Állatházában kontrollált körülmények között 12-12 óra sötét-világos ciklusokat váltva, egyenletes hőmérsékleten (22 ± 1 °C-on) az

ivóvízhez és táplálékhoz szabad hozzáférést biztosítva, normál diétán tartottuk [42]. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) által jóváhagyott engedélyek alapján (engedélyek száma: 14/2010/ DEMÁB és 1/2014/DEMÁB) végeztük. Az egerek elaltatását követően, a füleket és a borotvált hátbőrt begyűjtöttük és feldolgoztuk az epidermális lipidösszetétel elemzéséhez. A faggyúlipidek elemzéséhez mind a TG2 vad típusú és a TG2 KO egerek szőrét begyűjtöttünk [43].

4.7. Víztaszítási vizsgálat

A víztaszítási vizsgálat sematikus ábrázolása az **5-ös ábrán** látható, melyet a korábban leírtak szerint végeztünk [44, 45]. Röviden, két egércsoportot (csoportonként 6 egeret) 2 percre 30 °C-os vízbe merítettünk, majd a felesleges vizet papírtörülővel eltávolítottuk. A testtömeget szobahőmérsékleten történő vízbe merítés előtt és 2 percenként a vízbe merítés után rögzítettük. A szőrzet víztartalmát úgy számoltuk ki, hogy a vízbe merítés előtti testsúlyt kivontuk a vízbe merítés utáni testsúlyból.



5. ábra: Az egerek szőrének víztaszításának sematikus ábrázolása, amelyet a BioRender segítségével készítettünk. A kísérlet előtt lemértük az állatok testtömegét, majd az egereket 2 percre 31 °C-os vízbe merítettük. A felesleges vizet papírtörülővel itattuk le, ezt követően pedig az egerek testsúlyát a szobahőmérsékleten történő vízbe merítést követően 2 percenként rögzítettük. A mérések között az állatokat egyesével műanyag dobozokban tartottuk.

4.8. Western blot

A fagyasztott mintákat 2x Laemmli pufferben (125 mM TRIS/HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol) 5 percen keresztül, 100°C-on hőkezeltük, majd Branson Sonifier 450 készülékkel szonikáltuk (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, CT) 2 percig maximális intenzitáson, amit ismét 5 perces 100 °C-on történő hőkezelés és végül centrifugálás követett 15 percig, 14 000 g fordulatszámon. A fehérjéket 12%-os SDS-PAGE géleken választottuk szét és PVDF membránra blottoltuk. A blottolás után a membránokat 4%-os

sovány tejjel TTBS-ben (150mM NaCl, 25mM Tris/HCl pH=7,5, 0,01% Tween 20) blokkoltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Az elsődleges antitestet 4 °C-on egy éjszakán át hagytuk a membránokon. Következő lépésként a membránokat háromszor 20 percig TTBS-sel mostuk, majd torma peroxidáz (HRP)-konjugált egér, illetve nyúl-ellenes IgG másodlagos antitesttel (Bio-Rad) inkubáltuk szobahőmérsékleten egy órán át. Az inkubáció után ismét háromszor 20 perces TTBS-sel történő mosás következett. Végül a vizsgálni kívánt fehérjéket a kemilumineszcencia elvén alapuló Pierce™ ECL technikával, Western Blotting Substrate (Advansta, San Jose, CA) előhívó folyadékkal, röntgenfilmen (AGFA, Mortsel, Belgium) tettük láthatóvá. A filmeket automata Kodak Medical X-ray Processor készülékkel hívtuk elő (Carestream Health, Rochester, N.Y). A sávok denzitometrálását a nyílt forráskódú ImageJ szoftverrel (1.51k verzió, National Institutes of Health, Bethesda, MD) végeztük. Normalizáló fehérjeként β -AKTIN-t alkalmaztunk. Az általunk használt elsődleges és másodlagos antitestek listáját az 1. táblázat tartalmazza. A kísérleteket 3 biológiai paralellból származó mintákon végeztük el, az expressziós értékeket átlag $\pm$ SD-ben fejeztük ki [38].

Antitest	Alkalmazott hígítás	Forgalmazó
β -ACTIN	1:5000	Sigma Aldrich (#A2066)
TG2	1:1000	Invitrogen (# MA5-12739)
ATG5	1:1000	Novus Biologicals (NB110-53818)
LC3	1:2000	Novus Biologicals (NB100-2220)
ATG7	1:2000	Cell Signaling (2631S)
Anti-nyúl IgG, HRP konjugált másodlagos antitest	1:10000	Advansta (R-05072-500)
Anti-egér IgG, HRP konjugált másodlagos antitest	1:10000	Advansta (R-05071-500)

1. táblázat: A Western blot vizsgálatokhoz használt antitestek és azok hígításai.

2.

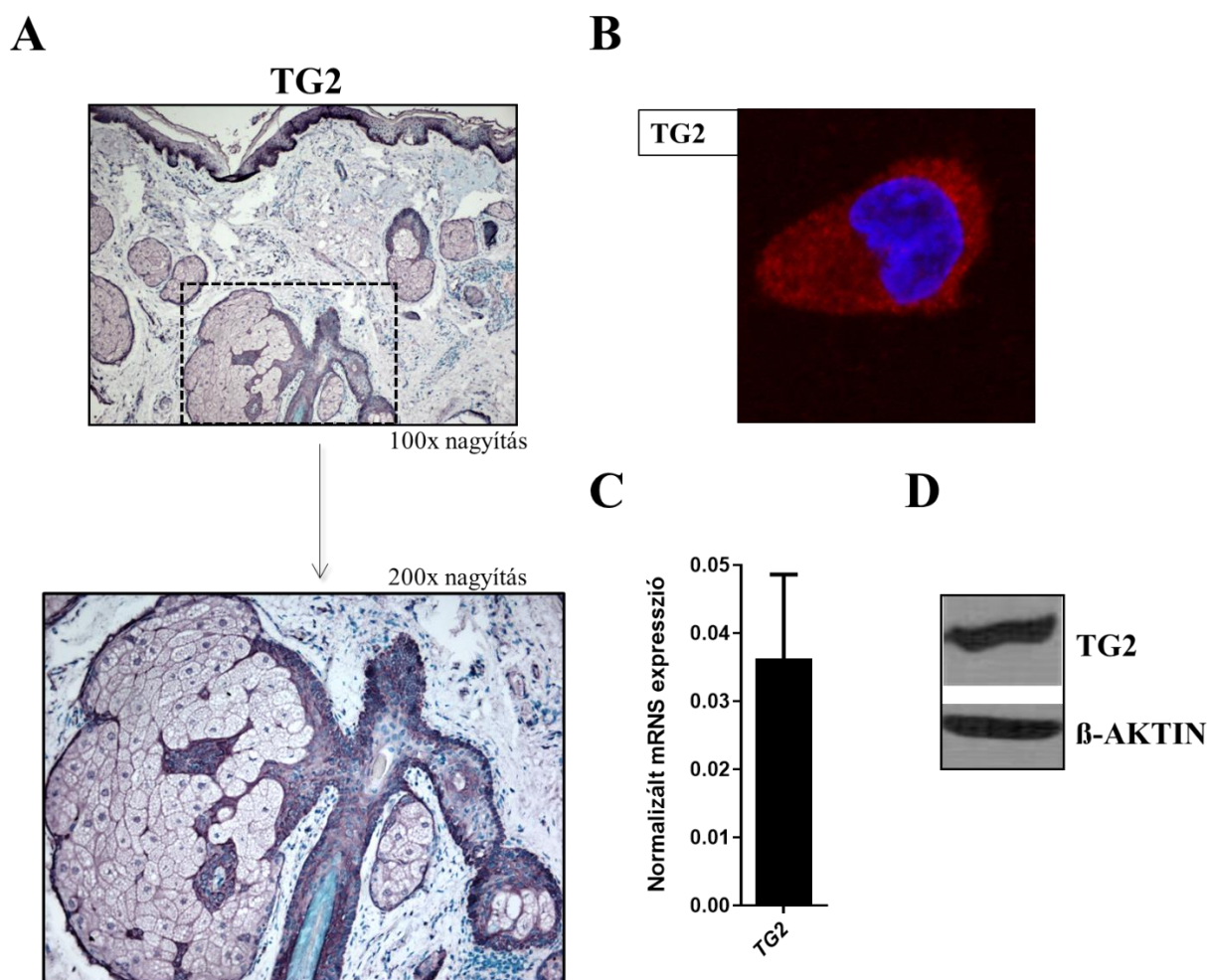
4.9. Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikanciák meghatározását GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Calofornia, Amerikai Egyesült Államok) és Microsoft Excel 14.0 programokkal végeztük. A statisztikai szignifikanciát két csoport között - párosítatlan kétszélű Student t-tesztel határoztuk meg. Az eredményeket átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. A szignifikáns eltérést *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001 értékeknél állapítottuk meg [38].

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A normál emberi bőr faggyúmirigyei és az SZ95 faggyúsejtek is expresszálnak szöveti transzglutaminázt

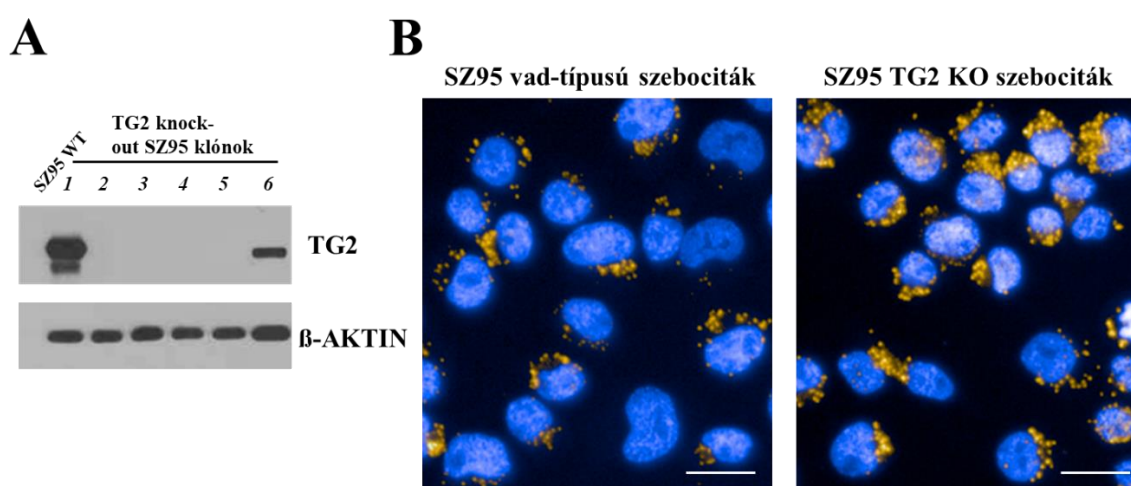
A szöveti transzglutamináz faggyúmirigyben betöltött biológiai szerepének tisztázására megvizsgáltuk expresszióját a normál emberi bőrben. Kimutattuk, hogy mind az epidermiszben, mind a faggyúmirigyekben megtalálható a TG2, melynek mintázata érdekes módon hasonló az epidermiszben és a faggyúmirigyben (**6/A ábra**). Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján erősen festődik az epidermisz bazális sejtrétegében és kevésbé festődik a felső sejtrétegekben. A faggyúmirigyben pedig a proliferációs és érési zónában található (**6/A ábra**). *In vitro* kísérleteink során az SZ95 faggyúsejtekben is megvizsgáltuk a TG2 expresszióját. Immuncitokémiai módszerrel, (**6/B ábra**) továbbá génexpressziós (**6/C ábra**) és fehérjeszinten (**6/D ábra**) is sikerült kimutatnunk a TG2 jelenlétét az SZ95 sebocitákban.

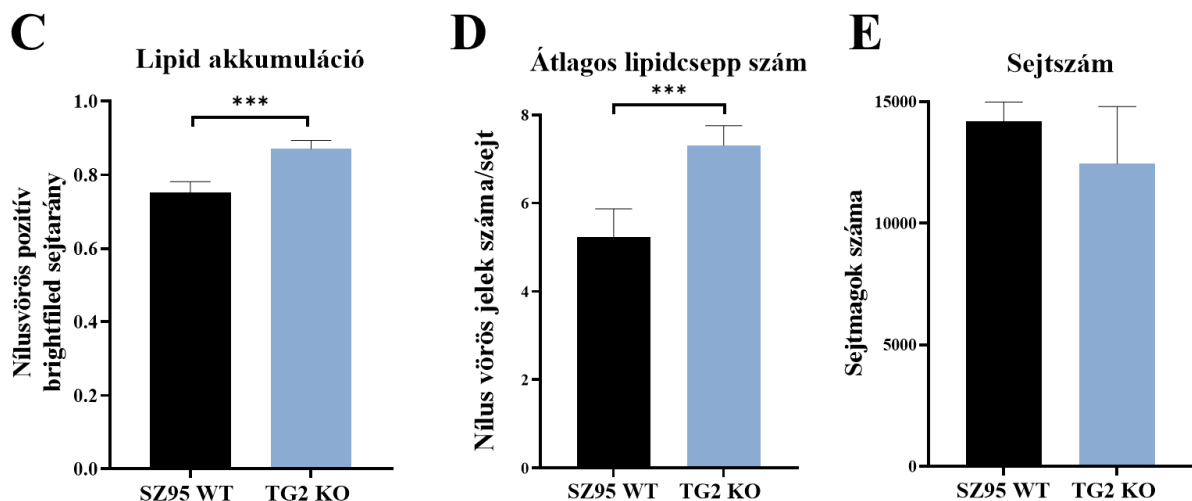


6. ábra: (A) A szöveti transzglutamináz reprezentatív immunhisztokémiai festése egészséges emberi bőrminta szövettani metszetén. (B) A TG2 specifikus immunfluoreszcens festése SZ95 faggyúsejtekben. Az immunfluoreszcens festés során a sejtmagokat DAPI festékkel tettük láthatóvá és a sejteket konfokális fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Kísérleteink során három egymástól független festést végeztünk. (C) A szöveti transzglutamináz mRNA szintjének valós idejű qPCR elemzése. (D) Az SZ95 faggyúsejtekben jelenlévő TG2 reprezentatív detektálása fehérje szinten Western blot technikával.

5.2. A TG2 hiánya fokozott lipid akkumulációt eredményez az SZ95 szebocitákban

A TG2 faggyúsejtekben betöltött szerepének tanulmányozásához, munkacsoportunk állandó TG2 knockout (KO) SZ95 szebocita sejtvonalat hozott létre CRISPR/Cas9 módszerrel, melynek sikerességét Western blot segítségével igazoltunk (**7/A ábra**). A faggyúsejtek lipidtermelésének összehasonlító vizsgálatát high-content screening módszerrel végeztük (**7/B ábra**). Kimutattuk, hogy a TG2-hiányos szebociták fokozott lipidfelhalmozódást mutatnak az SZ95 vad típusú sejtekhez képest (**7/C ábra**). Továbbá sikerült meghatározni azt is, hogy míg egy vad típusú faggyúsejtben átlagosan 5 lipidcsepp található, addig a TG2 hiányos sejtekben átlagosan 7 lipidcsepp van jelen (**7/D ábra**). Kísérleteinkben a sejtszám nem különbözött TG2 hiányában a vad típusú sejtekhez hasonlóan (**7/E ábra**).



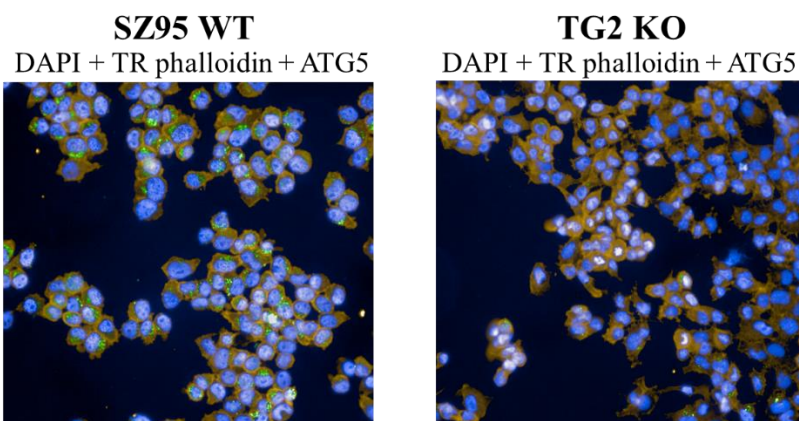


7. ábra: (A) Az állandó TG2 knock out (KO) SZ95 szebocita sejtvonal reprezentatív Western blotja. (B) Az SZ95 szebociták reprezentatív konfokális képei. A sejtmagokat DAPI-val a lipid cseppeket Nilus vörös festéssel tettük láthatóvá. (C) Az SZ95 szebociták lipid akkumulációjának high-content screening eredményei. (D) Az SZ95 szebocitákban kimutatott átlagos lipidcseppek száma egy sejtre vonatkoztatva. (E) A faggyúsejtek sejtszámai a kísérlet során. (n=3) ***p<0,001

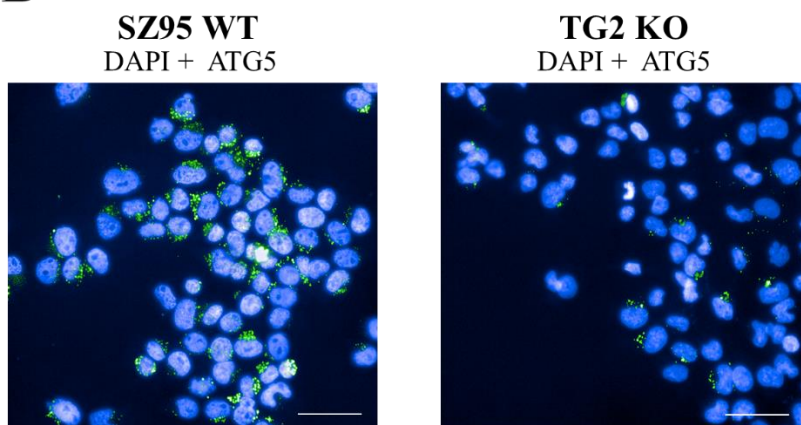
5.3. Az autofágia marker ATG5 szintje alacsonyabb a TG2 hiányos faggyúsejtekben

Az autofágia, szükséges a lipidek lebontáshoz [46] és az is ismert, hogy a TG2 szerepet játszik az autofágia szabályozásában [39], ezért immuncitokémiai és high-content screening módszerrel (**8/A ábra**) megvizsgáltuk az ATG5 fehérjét, amely egy széles körben vizsgált marker az autofágia tanulmányozására [46-49]. Az ATG5 kritikus szerepet játszik az autofágoszómák érésének szabályozásában. Azonos konfluencián lévő sejteket vizsgálva az SZ95 szebociták immunfluoreszcens festése az ATG5 citoplazmatikus festődését azonosította, ami autofágiára utal, vad típusú sejtekben, míg TG2 hiányában az immunfluoreszcens festődése egyértelműen azt jelzi, hogy az ATG5 szintje jelentősen lecsökken (**8/A és B ábra**). Ezt a megfigyelést alátámasztja a high-content screening elemzésünk, ahol az ATG5 átlagos pixelintenzitása szignifikánsan alacsonyabb a TG2 KO faggyúsejtekben (**8/C ábra**).

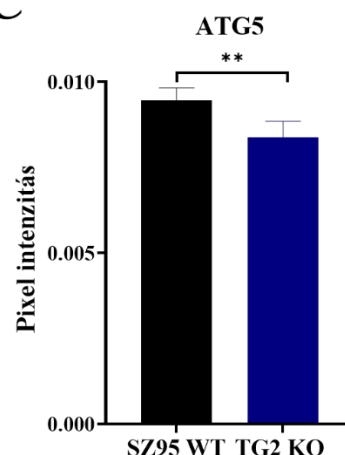
A



B



C

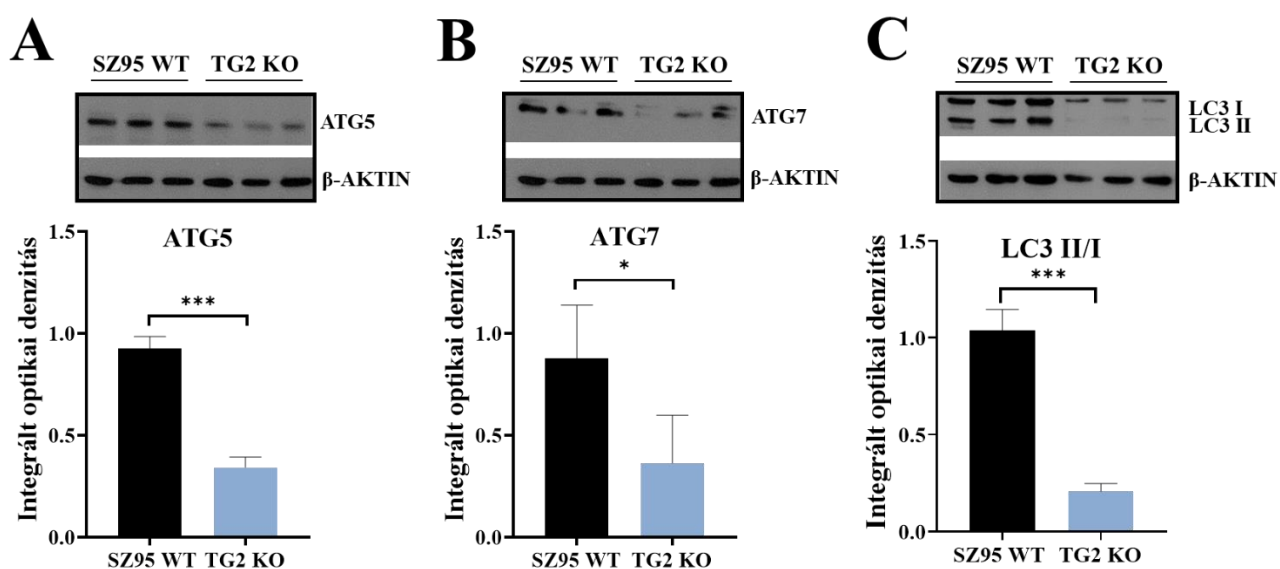


8. ábra: (A-B) Az ATG5 festődés reprezentatív konfokális képei SZ95 szebocitákban. A sejtmagokat DAPI festéssel vizualizáltuk, az ATG5 specifikus immunfluoreszcens festése zöld színnel látható. Az aktin szálak festésére TexasRed- Phalloidint használtunk, amit az ábra A részén mutatunk be. (C) Az ATG5 high-content screening elemzésének eredménye. (n=3) ** $p < 0,01$

5.4. A lipid felhalmozódás károsodott autofágiával jár együtt TG2 hiányában, amit az autofágia markerek fehérje expressziója is alátámaszt

Immuncitokémiai eredményeinknek alátámasztására tovább vizsgáltuk az autofágiát fehérje szinten a tipikus autofágia marker fehérjék expressziójának mérésével (9/A-C ábra). Az autofágia során a citoplazma egy része és számos fehérje beépül az autofagoszómába, amely az intracelluláris degradáció kulcsfontosságú kettős membrán vezikulája. Ezek közül az autofágiával kapcsolatos fehérjék: ATG5, ATG7 és az LC3B-II/I arány az autofágia jellegzetes markerei. Az ATG5-ről leírták, hogy nélkülözhetetlen mind a kanonikus, mind a nem

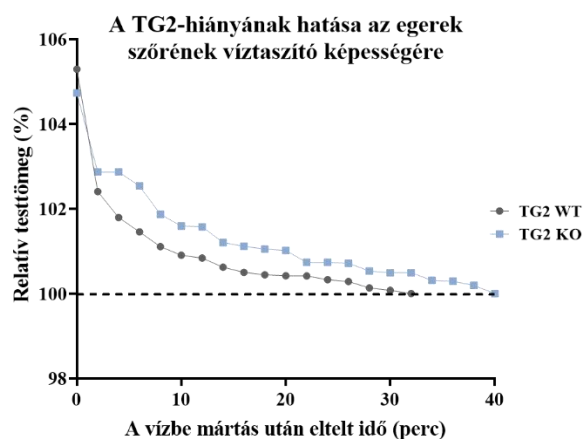
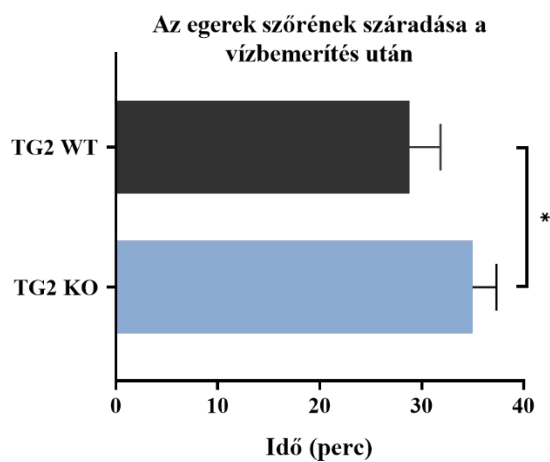
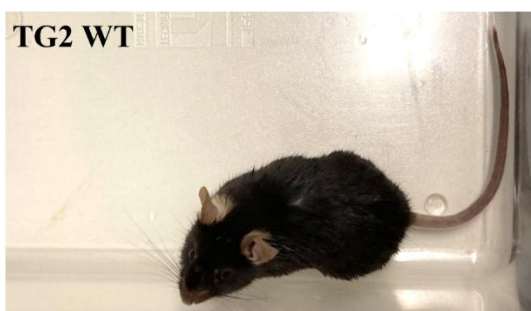
kanonikus autofágiában és kritikus szerepet játszik az autofagoszómák érésének szabályozásában. Az LC3 fehérje vizsgálatát azért tartottuk fontosnak, mert irodalomból ismert adat, hogy a TG2 közvetlenül katalizálhatja az LC3 térhálósodását foszfatidil-etanolaminnal (PE), egy lipidmolekulával, amely az autofagoszóma membrán megnyúlásához szükséges. Ez a lipidációként ismert módosulás szükséges ahhoz, hogy az LC3 autofagoszómális membránokhoz kapcsolódjon [50,51]. Úgy gondolják, hogy az LC3 TG2-közvetített lipidációja stabilizálja az autofagoszómákat és fokozza a lizoszómákkal való fúziójukat, elősegítve a sejtes tartalom lebomlását. A harmadik vizsgált fehérje pedig az ATG7, egy ligáz, amely központi szerepet játszik az autofagoszóma biogenezésében az ATG5 és ATG12 konjugálásával, továbbá részt vesz az LC3 lipidációjában is [52]. Minden kísérletünk során 3 TG2 KO klónt (biológiai párhuzamost) hasonlítottunk össze SZ95 WT mintákkal. Mind az ATG5 (**9/A ábra**), ATG7 (**9/B ábra**) és az LC3 II/I arányának (**9/C ábra**) szignifikánsan alacsonyabb expresszióját detektáltuk TG2 hiányában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TG2 KO faggyúsejtekben kimutatott lipidfelhalmozódás, károsodott autofágiával jár együtt.



9. ábra: (A) Az SZ95 faggyúsejtek ATG5 (B) ATG7 és (C) LC3 II/I arányának reprezentatív Western blot-analízise. A szignifikancia számításokhoz *t*-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. ($n=3$) * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$

5.5. A TG2 KO egerek csökkent víztaszító képességgel rendelkeznek

A TG2 faggyúmirigyben betöltött szerepének *in vivo* tanulmányozására kísérleteket végeztünk TG2 KO egereken és kontrollként a vad-típusú társaikon. Az *in vitro* kísérleteink során a TG2 hiányos faggyúsejtekben megfigyelt alacsonyabb szintű autofágia miatt, megváltozott faggyútermelésre vagy faggyúösszetételre következtetünk TG2 KO egerekben. Kimutatták, hogy az autofágia hiánya a faggyúlipidekben a szabad zsírsavak és a koleszterin csökkenéséhez, a zsírsav-metilésztetek növekedéséhez, valamint a leggyakoribb viaszészter-lipidekben a hosszabb lánchosszúság felé való eltolódáshoz vezet [25]. Irodalmi adatok alapján, különböző szintű faggyútermelés esetén a szőrzet víztaszító képessége csökkenhet, ami a szőrzet vízfelvevő képességének növekedését eredményezi. Annak érdekében, hogy egerekben vizsgáljuk a faggyúmirigy funkcióját, úgynevezett víztaszítási vizsgálatot végeztünk. A kísérlet előtt lemértük az egerek testtömegét, és ezt a kiindulási testsúlyt vettük 100%-nak, amit szaggatott vonallal jelölünk **(10/A ábra)**. A vízbe merítést követően az egerek testtömegének idő függvényében történő változását követtük nyomon **(10/A ábra)**. Eredményeink alapján a TG2 hiányos egerek esetén több időre volt szükség a szőrzetük megszáradásához, tehát a kezdeti testtömegük eléréséhez **(10/A ábra)**. Szignifikánsan több ideig, átlagosan közel 10 perccel tovább tartott a TG2 hiányos egerek szőrének száradása a vad típusú társaikhoz képest **(10/B ábra)**. A vad típusú egerek szőre **(10/C ábra)** jobban taszította a vizet és hamarabb megszáradt a bundájuk, mely különbség szemmel is látható, hiszen a TG2-hiányos egerek szőre **(10/D ábra)** lényegesen nedvesebb maradt a vízbe merítést követően még 20 perc elteltével is. A kísérlet alapján tehát elmondható, hogy a TG2 hiányában az egerek szőrének víztaszító képessége eltér a vad típusú egerekétől, amit a kiválasztott faggyú mennyisége és összetétele is befolyásolhat.

A**B****C****D**

10. ábra: (A) A TG2 vad típusú és TG2 KO egereket 2 percre 30 °C-os vízbe merítettük, és a testtömegüket lemertük a vízbe merítés előtt. Ezt az értéket vettük 100%-nak. Az ábrán az állatok testtömegének változása látható a vízbe merítést követően az idő függvényében. (B) Az egerek szőrének száradása a vízbemerítést követően idő függvényében. (C) Fotók az állatokról 20 perccel a vízbe merítés után. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. (n=6) * $p < 0,05$.

6. Összefoglalás

A faggyúmirigy számos homeosztatikus funkciója elengedhetetlen a bőr egészsége és integritása szempontjából, ezért több tudós a faggyúmirigyet a „bőr agyaként” tartja számon [53]. A faggyúmirigy fiziológiai és patofiziológiai működésének alaposabb megértéséhez új megközelítést jelent a lipidanyagcserében fontos szerepet játszó faggyúsejtek holokrin szekréciójának részét képező autofágia vizsgálata. Az autofágia során a degradációs végtermékek felhasználódnak fehérjeszintézishez és egyéb energiatermelő folyamatokhoz, ami hozzájárul a faggyúmirigyek normál működéséhez. Ezáltal döntő szerepet játszanak a rendkívül elterjedt betegségek kialakulásában [54]. A faggyú túlzott termelődése és a faggyú összetételében bekövetkező kóros változások [54] ugyanis jelentős tényezőt jelentenek az akné patogenezisében, míg a csökkent faggyútermelés hozzájárulhat a bőrszárazság bizonyos formáihoz, esetleg az atópiás dermatitisz kialakulásához. Ezért kritikus fontosságú az emberi faggyúmirigyek (pato)fiziológiájának jobb megértése és biológiai folyamataik jelenleg ismeretlen szabályozóinak azonosítása. Ilyen regulátor lehet a szöveti transzglutamináz, melyről ismert, hogy a faggyúsejtekhez nagy mértékben hasonló beige zsírsejtekben fontos szerepet játszik a lipid anyagcsere szabályozásában [38]. Ezenkívül részt vesz az autofagoszóma érésében, és szükséges az autofágia kiteljesedéséhez is [39]. Eredményeink alapján a TG2 megtalálható a normál emberi bőr faggyúmirigyjeiben, továbbá kimutattuk, hogy az SZ95 faggyúsejtek is expresszálják. A TG2 faggyúsejtekben betöltött lehetséges szerepének tisztázására munkacsoportunk TG2 KO sebocita sejtvonalat hozott létre CRISPR/Cas9 módszerrel. Immuncitokémiai vizsgálatokkal, Nílus vörös festéssel azonosítottuk a sejtek lipidtermelését, ami azt mutatta, hogy a TG2- hiányos faggyúsejtek szignifikánsan több zsírcseppet halmoznak fel. A lipidcseppek anyagcséréje szoros kapcsolatot mutat a faggyúsejtekben végbemenő autofágiával. Emellett a szöveti transzglutaminázról kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép az autofágia útvonalban részt vevő számos fehérjével, és módosítja azokat, ami arra utal, hogy potenciális szerepe van az autofágiás folyamatok szabályozásában. Az autofágia molekuláris mechanizmusainak tanulmányozása során számos autofágiával kapcsolatos gént azonosítottak, amelyek fontos szerepet játszanak az autofágia szabályozásának különböző lépései során. Közülük az Atg5 szerepét az autofágia aktiválása során széles körben tanulmányozták és leírták, hogy kritikus szerepet játszik az autofagoszóma érésének szabályozásában. Munkánk során immuncitokémiai módszerrel vizsgáltuk festődését a TG2-hiányos és vad típusú faggyúsejtekben. Kimutattuk, hogy TG2 hiányában az ATG5 fehérje immunfluoreszcens festődése szignifikánsan alacsonyabb a vad-típusú sejtekhez képest.

Annak alátámasztására, hogy TG2 hiányában a faggyúsejtek autofágiája károsodott, további autofágiás markereket vizsgáltunk. Mivel a TG2 és az autofágia közötti egyik kulcsfontosságú kapcsolat a mikrotubulusokhoz kapcsolódó fehérje 1 könnyű lánc 3 (LC3) módosulása [55], ezért megvizsgáltuk az LC3 fehérje expresszióját, ami szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott TG2 hiányában. A harmadik vizsgált fehérje az ATG7 volt, ami az autofagoszóma biogenezisben játszik szerepet és az LC3 lipidációjában is részt vesz [52]. Expressziója szintén szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2 KO sebocita klónokban, mely eredmények arra utalnak, hogy a lipidfelhalmozódás károsodott autofágiával jár ebben a sejttypusban.

Irodalmi adatok alapján, megfigyelték, hogy amikor az autofágiát elnyomták az állati faggyúsejtekben, a faggyú összetétele megváltozott, és ezek a változások összhangban voltak az aknés betegeknel megfigyelttel [56]. Emellett klinikai vizsgálatok eredményei szerint az autofágiát aktiváló peptidek alkalmazása után a bőrfelszíni lipidek (SSL) mennyiségének csökkenése, zárt komedonok és transz-epidermális vízvesztés (TEWL) volt kimutatható aknéra hajlamos bőrben [56].

A TG2 faggyúmirigyben betöltött szerepének *in vivo* tanulmányozására megvizsgáltuk a vad típusú és TG hiányos egerek szőrének víztaszító képességét. Eredményeink alapján a TG2 hiányos egerek szőrének víztaszító képessége eltér, hiszen száradásuk szignifikánsan több ideig tartott, amit a kiválasztott faggyú mennyisége és összetétele is befolyásolhat. A szakirodalom alapján a faggyú összetételében vagy az észterezett zsírsavak lánchosszában és telítettségében lehetnek különbségek, amelyek hozzájárulhatnak a szőr zsíros megjelenéséhez, és ami magyarázatot adhat a TG2 KO egerek víztaszító képességében mutatkozó különbségekre [25]. További vizsgálatok szükségesek a TG2 faggyúmirigyben betöltött funkciójának pontos felderítéséhez, eredményeink azonban arra utalnak, hogy a TG2 hozzájárulhat a faggyútermeléshez az autofágia folyamatán keresztül. Az akné kezelésére széles körben alkalmazott retinsav kezelés a TG2 retinsav receptorán keresztül indukálhatja ezt az enzimet, ezáltal a TG2 az akné terápia potenciális új célpontja lehet. Ezen kívül a TG2 és a faggyúsejtek autofágiás folyamata közötti összefüggés megértése támpontokat adhat egyéb bőrbetegségek új lehetséges terápiai megközelítéseinek megtalálásához.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Törőcsik Dánielnek a kutatáshoz nyújtott elméleti és anyagi támogatását és azt, hogy munkacsoportjában, a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Bőrgyógyászati Tanszékének "Faggyú immunbiológia" Kutatócsoportjában dolgozhatok.

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, Dr. Fedor-Lénárt Kingának tartozom. Köszönöm a türelmét és alázatát, valamint az útmutatását és segítségét, amellyel a tanulmányaim minden egyes lépése során kedvesen támogatott, a projekt megkezdésétől a pályamunkámbenyújtásáig.

Hálámat szeretném kifejezni Prof. Dr. Szegedi Andreának, a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Bőrgyógyászati Tanszékének vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy a kutatómunkát tanszékén végezhessem.

A kísérletek egy részét a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végeztük, ezért hálás köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Fésüs Lászlónak és Prof. Dr. Tőzsér Józsefnek.

Továbbá szeretném megköszönni a Debreceni Egyetem Tehetséggondozó Programjának (DETEP) támogatását.

Irodalomjegyzék

- [1]. Niemann, C., Horsley, V. (2012). Development and homeostasis of the sebaceous gland. *Semin Cell Dev Biol.* 23(8): 928- 936.
- [2]. Zouboulis, C.C., Stratakis, C.A. (2016). Chrousos GP, Koch CA. Metabolism and skin diseases. *Rev Endocr Metab Disord.* 17(3): 241- 246.
- [3]. Smith, K.R., Thiboutot, D.M. (2008). Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res.* 49(2): 271- 281.
- [4]. Schneider, M.R., Paus, R. (2010). Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(2): 181- 185.
- [5]. Dahlhoff, M., Camera, E., Schäfer, M., et al. (2016). Sebaceous lipids are essential for water repulsion, protection against UVB-induced apoptosis and ocular integrity in mice. *Development.* 143(10): 1823- 1831.
- [6]. Kobayashi, T., Voisin, B., Kim, D.Y., et al. (2019). Homeostatic control of sebaceous glands by innate lymphoid cells regulates commensal bacteria equilibrium. *Cell.* 176(5): 982- 997 e916.
- [7]. Williams, H.C., Dellavalle, R.P., Garner, S. (2012). Acne vulgaris. *Lancet.* 379(9813): 361- 372.
- [8]. Schmidt-Ullrich, R., Paus, R. (2005). Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays.* 27(3): 247-261.
- [9]. Lovaszi, M., Szegedi, A., Zouboulis, C.C., Torocsik, D. (2017). Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermatoendocrinol.* 9(1):e1375636.
- [10]. Barbieri, J. S., Wanat, K., & Seykora, J. (2014). Skin: Basic Structure and Function. *Pathobiology of Human Disease*, 1134–1144. doi:10.1016/b978-0-12-386456-7.03501-2
- [11]. Webster, G.F. (2002). Acne vulgaris. *BMJ*;325:475–9.
- [12]. Kurokawa, I., Danby, F.W., Ju, Q., Wang, X., Xiang, L.F., Xia, L., et al. (2009). New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol*;18:821–32.

- [13]. Gupta, A.K., Bluhm, R. (2004). Seborrheic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*;18:13–26.
- [14]. Burton, J.L., Pye, R.J., Meyrick, G., Shuster, S. (1975). The sebum excretion rate in rosacea. *Br J Dermatol*. 92:541–3. doi: 10.1111/j.1365-2133.1975.tb03122.x. PMID:126074.
- [15]. Ni, Raghallaigh. S., Bender, K., Lacey, N., Brennan, L., Powell, F.C. (2012). The fatty acid profile of the skin surface lipid layer in papulopustular rosacea. *Br J Dermatol*. 166:279–87. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10662.x. PMID:21967555.
- [16]. Troy, J.L., Ackerman, A.B. (1984). Sebaceoma. A distinctive benign neoplasm of adnexal epithelium differentiating toward sebaceous cells. *Am J Dermatopathol*. 6:7–13.
- [17]. Nelson, B.R., Hamlet, K.R., Gillard, M., Railan, D., Johnson, T.M. (1995). Sebaceous carcinoma. *J Am Acad Dermatol*.33:1–15.
- [18]. Xia, L., Zouboulis, Ch., Detmar, M., Mayer-da-Silva, A., Stadler, R., Orfanos, C.E. (1989). Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland-derived cells as an in vitro model. *J Invest Dermatol*. 93:315–321.
- [19]. Zouboulis, C. C., Seltmann, H., Orfanos, C. E., & Neitzel, H. (1999). Establishment and Characterization of an Immortalized Human Sebaceous Gland Cell Line (SZ95)1. *Journal of Investigative Dermatology*, 113(6), 1011–1020. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00771.x
- [20]. Thiboutot, D., Jabara, S., McAllister, J., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z. et al. (2003). Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1) *J Invest Dermatology*.120:905–914.
- [21]. Lo Celso, C., Berta, M., Braun, K., Frye, M., Lyle, S., Zouboulis, C.C. et al. (2008). Characterisation of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: Contrasting roles of c-Myc and β -catenin. *Stem Cells*. 26:1241–1252.
- [22]. Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* 147(4): 728-741.
- [23]. Codogno, P., Meijer, A.J. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nat Cell Biol*. 8(10):1045-7. doi: 10.1038/ncb1006-1045. PMID: 17013414.

- [24]. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2004). *Mol. Biol. Cell.* 15, 1101.
- [25]. Rossiter, H., Stübiger, G., Gröger, M., König, U., Gruber, F., Sukserree, S., Mlitz, V., Buchberger, M., Oskolkova, O., Bochkov, V., Eckhart, L., Tschachler, E. (2018). Inactivation of autophagy leads to changes in sebaceous gland morphology and function. *Exp Dermatol.* (10):1142-1151. doi: 10.1111/exd.13752. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30033522.
- [26]. Fischer, H., Fumicz, J., Rossiter, H., Napirei, M., Buchberger, M., Tschachler, E., Eckhart, L. (2017). Holocrine Secretion of Sebum Is a Unique DNase2-Dependent Mode of Programmed Cell Death. *J Invest Dermatol.* 137(3):587-594. doi: 10.1016/j.jid.2016.10.017. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27771328.
- [27]. Eckhart, L., Tschachler, E., Gruber, F. (2019). Autophagic Control of Skin Aging. *Front Cell Dev Biol.* 7:143. doi: 10.3389/fcell.2019.00143. PMID: 31417903; PMCID: PMC6682604.
- [28]. Seo, S.H., Jung, J.Y., Park, K., Hossini, A.M., Zouboulis, C.C., Lee, S.E. (2020). Autophagy regulates lipid production and contributes to the sebosuppressive effect of retinoic acid in human SZ95 sebocytes. *J Dermatol Sci.* 98(2):128-136. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.04.001. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32354609.
- [29]. Thielitz, A., Gollnick, H. (2008). Topical retinoids in acne vulgaris: update on efficacy and safety. *Am J Clin Dermatol.* 9(6):369-81. doi: 10.2165/0128071-200809060-00003. PMID: 18973403.
- [30]. Pietsch, M., Wodtke, R., Pietzsch, J., Löser, R. (2013). Tissue transglutaminase: an emerging target for therapy and imaging. *Bioorg Med Chem Lett.* 23(24):6528-43. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.09.060. PMID: 24432384.
- [31]. Chen, S., Ma, J., Chi, J., Zhang, B., Zheng, X., Chen, J., Liu, J. (2022). Roles and potential clinical implications of tissue transglutaminase in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res.* 177:106085. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106085. Epub 2022 Jan 13. PMID: 35033646.
- [32]. Dudek, S. M., & Johnson, G. V. W. (1994). Transglutaminase facilitates the formation of polymers of the β -amyloid peptide. *Brain Research,* 651 (1-2), 129–133.
- [33]. Mangala, L. S., Fok, J. Y., Zorrilla-Calancha, I. R., Verma, A., & Mehta, K. (2006). Tissue transglutaminase expression promotes cell attachment, invasion and survival in breast cancer cells. *Oncogene,* 26 (17), 2459–2470.

[34]. Mangala, L. S., & Mehta, K. (2005). Tissue Transglutaminase (TG2) in Cancer Biology. *Progress in Experimental Tumor Research*, 125–138.

[35]. Eckert, R.L., Sturniolo, M.T., Broome, A.M., Ruse, M., Rorke, E.A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol.* 124(3):481-92. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23627.x. PMID: 15737187.

[36]. Marietta, E. V., Camilleri, M. J., Castro, L. A., Krause, P. K., Pittelkow, M. R., & Murray, J. A. (2008). Transglutaminase Autoantibodies in Dermatitis Herpetiformis and Celiac Sprue. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(2), 332–335. doi:10.1038/sj.jid.5701041

[37]. Lee, S.-J., Lee, K. B., Son, Y. H., Shin, J., Lee, J.-H., Kim, H.-J., ... Kim, I.-G. (2017). Transglutaminase 2 mediates UV-induced skin inflammation by enhancing inflammatory cytokine production. *Cell Death and Disease*, 8(10), e3148. doi:10.1038/cddis.2017.550

[38]. Lénárt, K., Bankó, C., Ujlaki, G., Póliska, S., Kis, G., Csősz, É., Antal, M., Bacso, Z., Bai, P., Fésüs, L., Mádi, A. (2022). Tissue Transglutaminase Knock-Out Preadipocytes and Beige Cells of Epididymal Fat Origin Possess Decreased Mitochondrial Functions Required for Thermogenesis. *Int J Mol Sci.*23(9):5175. doi: 10.3390/ijms23095175. PMID: 35563567; PMCID: PMC9105016.

[39]. D'Eletto, M., Farrace, M.G., Falasca, L., Reali, V., Oliverio, S., Melino, G., Griffin, M., Fimia, G.M., Piacentini, M. (2009). Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation. *Autophagy*. 5:1145–1154. doi: 10.4161/auto.5.8.10040.

[40]. Kitakaze, T., Yoshikawa, M., Kobayashi, Y., Kimura, N., Goshima, N., Ishikawa, T., Ogata, Y., Yamashita, Y., Ashida, H., Harada, N., Yamaji, R. (2020). Extracellular transglutaminase 2 induces myotube hypertrophy through G protein-coupled receptor 56. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* (2):118563. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118563. Epub 2019 Oct 27. PMID: 31666191.

[41]. Kovács, D., Lovászi, M., Póliska, S., Oláh, A., Bíró, T., Veres, I., ... Törőcsik, D. (2016). Sebocytes differentially express and secrete adipokines. *Experimental Dermatology*, 25(3), 194–199. doi:10.1111/exd.12879

[42]. Lénárt, K., Pap, A., Pórszász, R., V, Oláh, A., Fésüs, L., Mádi, A. (2020). Transglutaminase 2 Has Metabolic and Vascular Regulatory Functions Revealed by In Vivo Activation of Alpha1-Adrenergic Receptor. *Int J Mol Sci.*;21(11):3865. doi: 10.3390/ijms21113865. PMID: 32485850; PMCID: PMC7312910.

- [43]. Martins, Cardoso. R., Absalah, S., Van Eck, M., Bouwstra, J.A. (2020). Barrier lipid composition and response to plasma lipids: A direct comparison of mouse dorsal back and ear skin. *Exp Dermatol.* (6):548-555. doi: 10.1111/exd.14106. Epub 2020 May 21. PMID: 32350936; PMCID: PMC7383511.
- [44]. Chen, H. C., Smith, S. J., Tow, B., Elias, P. M. and Farese, R. V., Jr (2002). Leptin modulates the effects of acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase deficiency on murine fur and sebaceous glands. *J. Clin. Invest.* 109, 175-181. <https://doi.org/10.1172/JCI0213880>
- [45]. Zhang, S., Shui, G., Wang, G., Wang, C., Sun, S., Zouboulis, C. C., Xiao, R., Ye, J., Li, W. and Li, P. (2014). Cidea control of lipid storage and secretion in mouse and human sebaceous glands. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1827-1838. <https://doi.org/10.1128/MCB.01723-13>
- [46]. Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 458(7242):1131-5. doi: 10.1038/nature07976. Epub 2009 Apr 1. PMID: 19339967; PMCID: PMC2676208.
- [47]. Byun, Y.S., Lee, H.J., Shin, S., Chung, S.H. (2017). Elevation of autophagy markers in Sjögren syndrome dry eye. *Sci Rep.* 7(1):17280. doi: 10.1038/s41598-017-17128-0. PMID: 29222450; PMCID: PMC5722946.
- [48]. Ye, X., Zhou, X.J., Zhang, H. (2018). Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol.* 9:2334. doi: 10.3389/fimmu.2018.02334. PMID: 30386331; PMCID: PMC6199349.
- [49]. Qiang, L., Yang, S., Cui, Y.H., He, Y.Y. (2021). Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing. *Autophagy.* 17(9):2128-2143. doi: 10.1080/15548627.2020.1816342. Epub 2020 Sep 18. PMID: 32866426; PMCID: PMC8496719.
- [50]. Nakatogawa, H. (2013). Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem.* 55:39-50. doi: 10.1042/bse0550039. PMID: 24070470.
- [51]. O'Grady, S. M. (2018). Oxidative stress, autophagy and airway ion transport. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* doi:10.1152/ajpcell.00341.2018
- [52]. Collier, J.J., Suomi, F., Oláhová, M., McWilliams, T.G., Taylor, R.W. (2021). Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Mol Med.* 13(12):e14824. doi: 10.15252/emmm.202114824. Epub 2021 Nov 2. PMID: 34725936; PMCID: PMC8649875.

- [53]. Zouboulis, C.C., Yoshida, G.J., Wu, Y., Xia, L., Schneider, M.R. (2020). Sebaceous gland: Milestones of 30-year modelling research dedicated to the "brain of the skin". *Exp Dermatol*. 29(11):1069-1079. doi: 10.1111/exd.14184. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32875660.
- [54]. Zouboulis, C.C. (2014). Acne as a chronic systemic disease. *Clin Dermatol*. 32(3):389-96. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.11.005. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24767186.
- [55]. Kang, J.H., Lee, S.H., Cheong, H., Lee, C.H., Kim, S.Y. (2019). Transglutaminase 2 Promotes Autophagy by LC3 Induction through p53 Depletion in Cancer Cell. *Biomol Ther (Seoul)*;27(1):34-40. doi: 10.4062/biomolther.2018.140. PMID: 30231606; PMCID: PMC6319544.
- [56]. Choi, M.S., Chae, Y.J., Choi, J.W., Chang, J.E. (2021). Potential Therapeutic Approaches through Modulating the Autophagy Process for Skin Barrier Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 22(15):7869. doi: 10.3390/ijms22157869. PMID: 34360634; PMCID: PMC8345957.

Függelék

Önállóan végzett munka:

- Sejtkultúrák fenntartása
- RNS izolálás
- SDS- poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot
- Western blot minták előhívása
- Irodalmi adatok feldolgozása

Témavezetővel közösen végzett munka:

- Immuncitokémiai vizsgálatok során a sejtek festése
- Egérkísérlet (víztaszítási vizsgálat)
- Az adatok elemzése és kiértékelése
- Prezentáció és ábrakészítés