

## **A bőr kommenzális mikroflórájának hatása a bőrsejtekre és az epidermális barrierre fiziológias és patológias körülmények között**

### **1. A *C. acnes* baktérium és tisztított mikrobiális anyagok hatására induló jelátviteli folyamatok, és ezek hatása a bőr barrier kialakításában szerepet játszó molekulák kifejeződésére**

Bőrünk jellegzetes mikrobiális flórával rendelkezik, mely közösséget kután mikrobiótának vagy mikroflórának is nevezünk: ez baktériumok, gombák és ma még kevésbé ismert és azonosított vírusok közössége (Ottman, 2012; Grice and Segre, 2011). Tagjai a humán sejtekkel szoros kapcsolatban egy komplex ökoszisztémát alkotnak, aminek pontos összetétele hosszú ko-evolúciós folyamatok eredményeképpen alakult ki (Blaser and Falkov, 2009). Ennek a közösségnek az egyik legismertebb tagja a *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*, korábbi nevén *Propionibacterium acnes*, *P. acnes*). Érdekes kettősség jellemző erre a baktériumra, mert bár fontos tagja a serdülőkortól kezdve az egészséges bőrflórának (Oh, 2012), szerepét régóta feltételezik az egyik leggyakoribb krónikus gyulladással járó betegség, az acne vulgaris kialakulásában is. Vizsgálataink során ennek a látszólagos ellentmondásnak a feltárására törekedtünk, elemeztük, hogy milyen hatása lehet a bőrflóra kommenzális tagjainak, így a *C. acnes* baktériumnak, a bőrsejtek működésére egészséges és patogén körülmények között. Mivel a kannabinoid rendszer számos pontos kapcsolódik a barrierfelszínen működő mikrobiótával, továbbá számos növényi kannabinoid jelentős mértékben képes a normál flóra bakteriális elemei biológiai folyamatainak szabályozására, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük kiválasztott endokannabinoidok hatásának vizsgálatával is.

#### **1.1 A bőr homeosztázisának fenntartásában szerepet játszó negatív szabályozó folyamatok azonosítása és jellemzése keratinocitákban**

Ismert, hogy különböző mikrobiális eredetű (pathogen associated molecular patterns – PAMPs), vagy veszélyt jelző molekulák (danger associated molecular patterns – DAMPs) hatására bőrsejtekben veleszületett immun-, és gyulladással járó folyamatok indulnak. Ezen molekulák felismerésekor különféle patogénfelismerő receptorok, többek között a Toll-like receptorok (TLR) aktivációja következik be, ami a sejtekben bonyolult jelátviteli folyamatok indulását eredményezi. Ezek egyik központi mediátora az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor. A humán bőr mikrobióta tagjai szintén képesek a TLR szignálfolyamatok aktiválására, hiszen kifejeznek konzervált PAMP molekulákat (Pivarcsi, 2004; Nagy, 2005a; Nagy, 2005b). Hatásukra azonban az egészséges bőrben mégsem alakul ki kontrollálatlan gyulladással járó reakció, ami feltételezi olyan negatív szabályozó faktorok és folyamatok jelenlétét, melyek képesek a TLR szignálfolyamatok szabályozására. Az egyik fő célkitűzésünk ilyen negatív szabályozó folyamatok illetve faktorok azonosítása és jellemzése volt, melyek a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun- és gyulladással járó folyamatokat gátolhatják.

##### **1.1.1 Negatív szabályozó molekulák azonosítása és kifejeződés-változásuknak vizsgálata *C. acnes* kezelés hatására keratinocitákban.**

Munkánk során ezért elemeztünk más rendszerekben már leírt TLR, illetve NF- $\kappa$ B szignálfolyamatokat gátló molekulák lehetséges szerepét a *C. acnes*- indukálta folyamatok szabályozásában. Irodalmi adatok alapján a TOLLIP, SIGIRR, TNFAIP3, és TNIP1 molekula jellemzését végeztük keratinocitákban.

Génexpressziós (valós idejű RT-PCR) és fehérje szintű (western blot analízis) vizsgálataink azt mutatták, hogy mind a 4 molekula jelen volt a modellként használt humán immortalizált keratinocita sejtvonalban (HPV-KER) mRNS és fehérje szinten egyaránt. Ezen felül a TNFAIP3 és TNIP1 mRNS és fehérje szintű kifejeződése szignifikáns módon nőtt *C. acnes* kezelés hatására. Ezek alapján feltételeztük, hogy a baktérium által indított folyamatok szabályozásában ez utóbbi két molekula játszhat jelentős szerepet.

A negatív szabályozók kifejeződés változása nem függött az alkalmazott *C. acnes* baktérium törzsek filogenetikai sajátosságaitól, a *C. acnes* 889 (IA), 6609 (IB) és ATCC 11828 (II) törzsek hasonló módon tranziens emelkedést indukáltak a TNFAIP3 és TNIP1 mRNS és fehérje szintű kifejeződésében).

Ezzel szemben a változások jelentős dóziszfüggést mutattak, a TNFAIP3 és TNIP1 mRNS és fehérje mennyisége a sejtekben az alkalmazott baktérium kezelés dóziséval párhuzamosan emelkedett (Erdei, 2018; Erdei, kézirat folyamatban).

*C. acnes* baktérium hatására keratinocitákban az NF- $\kappa$ B dóziszfüggő aktivációja és nukleáris transzlokációja következik be, és mind a TNFAIP3, mind pedig a TNIP1 promóter régiója tartalmaz NF- $\kappa$ B kötő helyeket. Luciferáz riporter vizsgálatokkal, és az NF- $\kappa$ B p65-ös alegységének nukleáris transzlokációját elemezve megállapítottuk, hogy a fenti folyamatok háttérben az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor dóziszfüggő aktivációja, és nukleáris transzlokációja állhat (Erdei, 2018; Erdei, kézirat folyamatban).

Farmakológiai gátlószerek alkalmazásával megmutattuk, hogy az NF- $\kappa$ B mellett a TLR szignál folyamatok főbb útvonalainak szabályozó molekulái (NF- $\kappa$ B, JNK, p38, ERK) közül a JNK molekula tölt be fontos szerepet a TNFAIP3 és TNIP1 mRNS és fehérje szintű kifejeződés változásának szabályozásában *C. acnes* kezelést követően (Erdei, 2018; Erdei, kézirat folyamatban).

Az irodalomból ismert, hogy a TNIP1 promóter régiójában retinsav- indukálható szabályozó elemek is (RARE) találhatóak, és ATRA (all trans retinoic acid) hatására megemelkedik a szintje Hela sejtekben kromatin módosító ágens (TSA) együttes adásával (Gurevich, 2013). Vizsgálataink során igazoltuk, hogy ATRA kezelés hatására nőtt a TNIP1 mRNS és fehérje szintű kifejeződése HPV-KER sejtekben, és *in vitro* kultúrákban tartott teljes vastag bőrminták (organotypic skin model – OS model) epidermisz rétegeiben. Keratinocitákban emellett csökkent a konstitutív és *C. acnes*-indukált TLR2, TNF $\alpha$  és CCL5 mRNS szintű kifejeződése, míg a TLR4 és CXCL8 mennyisége nőtt, a TLR3 és IL-6 kifejeződése pedig nem változott. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az acne vulgaris terápiájában használt retinoidok egyik lehetséges hatásmechanizmusa a TNIP1 szintjének szabályozásán keresztül valósulhat meg (Erdei, 2018).

### **1.1.2 A negatív szabályozók (SIGIRR, TOLLIP, TNFAIP3 és TNIP1) túlexpresszáltatásánk és csendesítésének hatása a TLR aktivációs folyamatokra**

Annak elemzésére, hogy a negatív szabályozók szintjének megváltozása keratinocitákban hogyan hat a TLR szignálfolyamatokra, siRNS-mediálta csendesítéses és cDNS-alapú túlexpresszáltatásos vizsgálatokat végeztünk. Luciferáz riporter kísérletekben elemeztük az NF- $\kappa$ B aktivációját, valamint a gyulladáshoz vezető citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  és IL-6) és kemokinek (CXCL8 és CCL5) kifejeződésének változását valós idejű RT-PCR és ELISA módszerrel.

Míg a TOLLIP és SIGIRR siRNS-mediálta csendesítése nem volt hatással sem a bazális, sem a *C. acnes*-indukált gyulladáshoz vezető mediátorok kifejeződésére, addig a TNFAIP3 és TNIP1 csendesítése jelentős mértékben befolyásolta a TLR szignálfolyamatok kimenetelét. A TNFAIP3 csendesítése szignifikáns módon emelte a bazális NF- $\kappa$ B promóter aktivitását, minden vizsgált molekula (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  és IL-6, CXCL8 és CCL5) bazális és *C. acnes*-indukált kifejeződését mRNS szinten, és a sejtek által szekretált CXCL8 és CCL5 mennyiségét. A TNIP1 csendesítésekor hasonló eredményeket kaptunk (Erdei, 2018; Erdei, kézirat folyamatban).

A TNIP1 molekula cDNS alapú túlexpresszáltatásának ellentétes hatását igazoltuk, csökkentette a bazális és *C. acnes*-indukált NF- $\kappa$ B promóter aktivitást, valamint a gyulladáshoz vezető mediátorok mRNS szintű kifejeződését. A HPV-KER sejtek által, *C. acnes* hatására szekretált CXCL8 és CCL5 mennyisége is szignifikánsan csökkent (Erdei, 2018).

Kereskedelmi forgalomból származó TNFAIP3 konstrukttal hasonló túlexpresszáltatási vizsgálatokat végezve nem sikerült a TNFAIP3 szintek növelése HPV-KER sejtekben, feltehetően a rendelkezésre álló konstruktt hibás működésének eredményeképpen.

**Eredményeink alapján az általunk vizsgált negatív szabályozók közül a TNFAIP3 és TNIP1 azon felül, hogy kifejeződnek keratinocitákban, fontos szerepük lehet a *C. acnes* által kiváltott szignálfolyamatok kontrollálásában, ezáltal az epidermális homeosztázis fenntartásában.**

## **1.2. TLR szignálfolyamatok vizsgálata szebocitákban**

Szebocitákon (SZ95 setvonal) is vizsgáltuk a TLR-kapcsolt szignalizációt. Megállapítottuk, hogy a vizsgált *C. acnes* törzsek (889, 6609, ATCC11828) törzsek mindegyike megnövelte a TNF $\alpha$ -specifikus mRNS szintjét (RT-PCR), míg csupán az II. csoportba sorolt ATC11828 jelzésű törzs volt képes a sejtekben az IL-6 és IL-8 expresszióját emelni. A többi vizsgált citokin (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) szintje nem mutatott jelentős eltérést. A veleszületett immunitásban fontos mintázatfelismerő receptorok közül a Toll-like receptor TLR2 expressziója mindhárom törzs hatására jelentősen növekedett, míg a TLR4 szintjében ugyanezen kezelés csökkenést váltott ki. Érdekes módon a korábban említett ATC11828 törzs és az IB. alcsoportba sorolt 6609-es számú törzs a virális fertőzés felismerésében fontos szereppel bíró TLR3 receptor szintjét is megemelte. A génszintű változásokat ELISA technikával ellenőrizve a TNF $\alpha$  szint emelkedését a 6609-es és az Ib. alcsoportba sorolt 889-es törzs fokozta..

**Eredményeink megmutatják, hogy az alkalmazott *C. acnes* törzsek számos fontos, filogenetikailag differenciált hatást váltanak ki a humán szebocitákban.**

## **1.3 A RAGE szerepének vizsgálata az acne molekuláris patogenezisében**

A RAGE molekula irodalmi adatok, és korábbi, az acne kialakulására hajlamosító molekuláris genetikai vizsgálataink alapján került érdeklődésünk középpontjába. Ezen receptor-fehérje szerepét különböző krónikus gyulladási betegségek patogenezisében írták le, melyek során PAPM-ok hatására aktiválódik. A RAGE molekula mRNS szintű kifejeződése enyhén fokozódott *C. acnes* kezelés hatására, így felmerült annak a lehetősége, hogy a RAGE egy pozitív visszacsatolású szabályozó kört alkot az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktoral, mely így annak további aktiválásához és az általa transzkripcionálisan szabályozott gyulladási citokinek és kemokinek expressziós változásához vezethet.

Ennek az igazolására a RAGE endogén kifejeződését siRNS-mediálta csendesítéssel illetve cDNS alapú túlexpresszáttal próbáltuk befolyásolni. Az AGER siRNS-mediálta csendesítése nehézkesnek bizonyult. Több forgalmazótól származó AGER-siRNS konstrukciót is kipróbáltunk, különböző kísérleti paraméterek alkalmazása mellett, azonban csendesítése sikertelennek bizonyult. Különböző kísérleti paramétereket kipróbálva az AGER erőltetett kifejeztetése pedig nem volt hatással az NF- $\kappa$ B bazális promóter aktivitására HPV-KER sejtekben. Ez alapján az AGER-rel végzett vizsgálatokat befejeztük.

## **1.4 A *C. acnes* kezelés hatásának vizsgálata az epidermális barrier kialakításában fontos szerepet játszó molekulák kifejeződésében**

A gazdaszervezet védelmének egyik előfeltétele az intakt bőr barrier jelenléte és ennek hatékony működése. Célunk ezért annak a vizsgálata volt, hogy a keratinociták *C. acnes* baktériummal történő kezelése hatással van-e a bőr barrier kialakításában szerepet játszó szoros sejt-sejt közötti kapcsolatok (tight junction – TJ) strukturális molekuláinak (pl.: claudinok, occludinok, ZO-1) kifejeződésére.

### **1.4.1 A Claudin 1, 4, az Occludin és a Zonula occludens 1 molekulák mRNS szintű kifejeződés vizsgálata kontroll és *C. acnes* kezelt mintákban**

Vizsgálataink során a HPV-KER sejtekből konfluens kultúrákat készítettünk standard Ker-SFM tápoldatban történő növesztéssel (Ca-alacsony), majd kalcium-klorid hozzáadásával további differenciációs folyamatokat indukáltunk (Ca-magas). A kétféle kultúrát párhuzamosan elemeztük. Az

irodalmi adatok alapján kiválasztott CLDN1, CLDN4, OCLN, és ZO-1 molekulák kifejeződése csak kismértékű változást mutatott *C. acnes* kezelést követően. Hasonló eredményeket kaptunk normál humán keratinocita (NHEK) sejteken is, ami összességében arra enged következtetni, hogy a vizsgált gének mRNS szintű szabályozása nem jelentős a baktérium hatására (Bolla, kézirat folyamatban).

#### 1.4.2 A Claudin 1, 4, az Occludin és a Zonula occludens 1 molekulák fehérje szintű kifejeződésének vizsgálata kontroll és *C. acnes* kezelt mintákban

Western analízissel elemeztük a TJ-strukturális fehérjék kifejeződés változását is *C. acnes* kezelést követően. Ca-alacsony kultúrákban a ZO-1 fehérje szintje minden általunk vizsgált időpontban enyhén emelkedett volt. Az OCLN fehérje szintje folyamatosan nőtt az idő függvényében. A CLDN1 fehérje szintje csökkent, míg a CLDN4 szintje növekedést mutatott. A Ca-magas kultúrában 24 órával a kezelést követően a ZO-1 fehérje szintje növekedett, az OCLN szintje pedig minden általunk vizsgált időpontban enyhén emelkedett volt. A CLDN1 fehérje szintje csökkent, a CLDN4 pedig nem mutatott jelentős változást a kezelés következtében (Bolla, kézirat folyamatban).

**Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a baktérium hatással van a TJ struktúrák fehérje összetételére. Az itt található claudinok típusának befolyásolásával (claudin switch jelensége) befolyásolhatja a keratinocita barrier aktuális állapotát.**

#### 1.5 Kezeletlen és *C. acnes* kezelt HPV-KER keratinociták miRNS profiljának összehasonlítása

A veleszületett immun- és gyulladási folyamatok szabályozásában egyre több olyan nem transzlálódó, kis RNS molekulát (pl. miRNS) írunk le, melyek bizonyos gének génexpressziós szabályozása révén fontos szerepet játszanak a folyamatok kimenetelének meghatározásában. Új generációs szekvenálásos eljárással vizsgáltuk, hogy a keratinocitákban *C. acnes* hatására milyen miRNS-kifejeződés változások következnek be és ezeknek szerepük lehet-e a gyulladási folyamatok kontrolljában.

Bioinformatikai analízist követően 11 microRNS-t találtunk, mely eltérő expressziót mutatott 24 órával *C. acnes* kezelését követően. Ezek között több olyan is szerepel, melyeket veleszületett immun- és gyulladási folyamatok szabályozásában írtak le. Kiválasztottunk két miRNS-t, melyek mennyisége szignifikáns különbséget mutatott kontroll és *C. acnes* kezelt mintákban. Független mintákon valós idejű RT-PCR módszerrel igazoltuk, hogy a miR-107 molekula mennyisége csökkent a baktérium hatására. Ennek hátterében feltételezhetően a TLR4 receptor aktivációja állhat, hiszen hasonló változásokat tapasztaltak LPS indukció hatására egér makrofágokban (Hennessy, 2011). A miR-147 molekula emelkedett mennyiségben volt jelen a *C. acnes* kezelt mintákban. Emelkedett szintjét TLR2,3,4 indukció hatására is leírták, és gyulladási folyamatok negatív szabályozójaként is funkcionál (Liu, 2009).

**Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgálataink során azonosított miR-107 és miR-147 szerepet játszhatnak a *C. acnes* által kiváltott TLR-szignálfolyamatok szabályozásában.**

## 2. A *C. acnes* hatására bekövetkező sejtbiológiai változások vizsgálata *in vitro* keratinocita és szebocita kultúrában

### 2.1 A *C. acnes* hatásának vizsgálata tenyésztett keratinocita kultúrák barrier sajátosságaira

Irodalmi adatok és munkacsoportunk korábbi eredményei alapján felmerült, hogy különböző filogenetikai csoportokba tartozó *C. acnes* törzsek eltérő módon befolyásolhatják a keratinociták sejt- és molekuláris biológiai folyamatait, ezáltal meghatározhatják az acnés tünetek súlyosságát. Ennek igazolására vizsgálatainkhoz különböző filogenetikai csoportba tartozó, eltérő patogenicitással rendelkező

*C. acnes* törzsekkel (*C. acnes* 889, 6609 és ATCC11828) kezeltünk növekvő HPV-KER kultúrákat, és valós idejű impedancia mérésen alapuló módszerrel (xCELLigence) követtük a változásokat.

Különböző *C. acnes* törzsek keratinociták sejtbiológiai folyamataira (proliferáció, életképesség) gyakorolt hatása törzs- és dózis-specifikus volt. A patogén törzsek átmenetileg fokozták a sejtek növekedését, majd citotoxikus hatásukat is megfigyeltünk. Ezeket a hatások az egészséges bőrről izolált *C. acnes* 6609-es törzsnél nem figyeltük meg (Tax, 2016).

A *C. acnes* anaerob fermentációs folyamatok során rövid szénláncú zsírsavakat (short chain fatty acids – SCFA) termel, többek között ecetsavat (AA), propionsavat (PA) és vajsavat (BA). Tömegspektrometriás vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a különféle baktériumtörzsek által termelt PA mennyisége eltér, és függ a kultúrában található baktériumok mennyiségétől. Kísérleteinkben a fokozott patogenitást mutató törzsek (*C. acnes* 889 és ATCC 11828) több propionsavat termeltek, valamint gyorsabban is növekedtek az egészséges bőrről származó *C. acnes* 6609 törzsszel összehasonlítva (Tax, 2016).

Konfluens, Ca-alacsony és Ca-magas HPV-KER és NHEK kultúrák esetében is végeztünk xCELLigence vizsgálatokat. Igazoltuk, hogy kalcium-szupplementáció hatására a konfluens, kontakt gátolt keratinocita kultúrákban mért sejt index (Ci) értékek néhány óra alatt jelentősen megemelkedtek, ami a barrier állapotának javulására utal. A Ca-alacsony HPV-KER és NHEK kultúrák esetében *C. acnes* 889 kezelés hatására tranzienst nCi emelkedést figyeltünk meg. Ennek során a *C. acnes* átmenetileg javította a keratinocita barrier állapotát, feltételezhetően a sejtek differenciációjának fokozásával. Ezt követően a sejt index értékek csökkenést figyeltünk meg mind a Ca-alacsony és a Ca-magas kultúrákban. Sejtszámolásos és laktát-dehidrogenáz (LDH) mérésen alapuló citotoxicitás vizsgálataink arra utaltak, hogy az nCi értékek csökkenése hátterében nem a sejtek pusztulása, hanem a kultúrák barrier sajátságainak megváltozása állhat. Ezt kiválasztott időpontokban végzett transzsepidermális elektromos rezisztencia (TEER) méréssel is igazoltuk. Ezt a Ca-magas HPV-KER kultúrák esetében végzett lucifer yellow (LY) penetrációs kísérleteinkkel is igazoltuk, magas dózisu *C. acnes* kezelés hatására valóban romlott a keratinocita barrier állapota, és az alkalmazott festék penetrációja emelkedett a baktérium kezelt 72 órás mintákban a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva (Bolla, kézirat folyamatban).

A *C. acnes* baktérium hatását mesterségesen létrehozott sebek záródása során is vizsgáltuk, melynek során konfluens HPV-KER monolayer kultúrákon karcolással sebeket ejtettünk. A Ca-alacsony kultúrákban a *C. acnes* jelenlétében, míg a Ca-magas kultúrákban a baktériumnak nem volt hatásra a sebzáródási folyamatokra (Bolla, kézirat folyamatban).

**Eredményeink alapján bőr mikroflóra tagjai, azon belül a *C. acnes* baktérium kontrollált körülmények között fontos szerepet játszhat az egészséges bőr struktúrájának és sajátságainak kialakításában és fenntartásában. Túlnövekedése azonban bakteriális diszbiózist eredményezhet, ami a keratinocita barrier állapotának a romlását is eredményezheti.**

## 2.2 A *C. acnes* baktérium hatása a keratinociták autofág folyamataira és életképességére

Ismert, hogy bakteriális PAMP molekulák autofág folyamatokat indíthatnak humán sejtekben. Kísérleteinkben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy alacsony dózisu (MOI=100) *C. acnes* kezelés hatására aktiválódnak-e ezek a folyamatok keratinocitákban? Élő és hővel elölt baktériumok, valamint PA egyaránt képes volt mitokondriális sérülés kiváltására, és ezzel párhuzamosan AMPK-asszociált autofág folyamatok kiváltására. Ennek hatására a sérült és diszfunkcionális mitokondriumok eltávolításra kerültek, és a sejtek életben maradtak (Megyeri, 2017).

Nagy dózisu (MOI=300) *C. acnes* kezelés jelenlétében a *C. acnes* 889 és ATCC 11828 törzsek esetében a keratinociták citotoxicitását is megfigyeltük. Áramlásos citometriás mérések alapján azonban sem apoptotikus, sem pedig nekrotikus folyamatok jelenlétét nem sikerült egyértelműen igazolni. Ezt a hatást az élő baktériumok mellett propionsav kezelés is kiváltotta. Mikroszkópos vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a sejtpusztulás hátterében a sejtek exogén ágensek hatására történő membránkárosodása áll (Tax, 2016).

**A kommenzális *C. acnes* és az általa termelt PA kontrollált, alacsony dózisú jelenléte esetén autofág folyamatok kiváltásával hozzájárulhat az epidermális homeosztázis fenntartásához.**

### **2.3 A *C. acnes* baktérium hatása a szebociták életképességére**

MTT assay, valamint kiegészített fluorimetriás apoptózis és nekrozis assay-k (Dilc-Sytox) alkalmazásával kimutattuk emellett, hogy a 3 baktériumtörzs széles koncentrációtartományban alkalmazva sem befolyásolta a szebociták életképességét, valamint nem indukáltak sejthalált. Megállapítottuk azt is, hogy a szebociták esetében az intracelluláris kalciumkoncentráció növekedése – ellentétben a keratinociták esetében korábban saját munkacsoportunk és mások által leírt differenciálódást fokozó hatással szemben – lecsökkentette a sejtek differenciálódását jelző faggyútermelést. Bizonyosodott emellett, hogy a különféle *C. acnes* törzsek nem változtatták meg a szebociták intracelluláris kalciumhomeosztázisát; úgy tűnik tehát, a baktériumok sejtbíológiai hatásainak kifejedésében a kalcium nem (vagy csak kevésbé) játszik szerepet

**Eredményeink alapján megállapítható, hogy a *C. acnes* törzsek számos fontos, filogenetikailag differenciált hatást váltanak ki a humán szebociták biológiai folyamataira.**

### **2.4 Az endokannabinoid rendszer szerepe a szebociták és a keratinociták sejtbíológiai folyamataira**

Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy az endokannabinoid rendszer (ECS) – főként a CB2 metabotróp kannabinoid receptor konstitutív aktiválásán keresztül – központi szerepet játszik a szebociták homeosztatisz folyamatainak (pl. növekedés, faggyúlipidtermelés, immunmechanizmusok) élettani szabályozásában. Mivel a kannabinoid rendszer számos pontos kapcsolódik a barrierfelszíneken működő mikrobiótával; továbbá, mivel számos növényi kannabinoid jelentős mértékben képes a normál flóra bakteriális elemei biológiai folyamatainak szabályozására, először a legfontosabb nem-pszichoaktív (és a *C. acnes* esetében is bakteriosztatikus!) cannabidiol (CBD) hatását elemeztük szebocitákon. Kimutattuk, hogy a CBD – egy általunk újonnan feltárt hatásmechanizmus, azaz a TRPV4 ioncsatorna és az A2a adozin receptor együttes aktivációján keresztül – az *in vitro* akné modellben jelentős mértékben lecsökkentette a sejtek fokozott szebumtermelését, meggátolta a szebociták hiperproliferációját, valamint kivédte számos TLR (TLR2, TLR3, TLR4) aktiválása által kiváltott gyulladási folyamat kialakulását (Oláh, 2014).

A CBD mellett több egyéb növényi kannabinoid vegyület hatását is elemeztük szebocitákon. Érdekes módon azt tapasztaltuk, míg egyes vegyületek (CBC, CBDV és THCV) a CBD-hez hasonlóan jelentős szebosztatikus és gyulladáscsökkentő hatást fejtettek ki, addig más fitokannabinoidok (CBG és CBGV) fokozták a sejtek faggyúlipidtermelését. Mindezen adatok felvetik annak lehetőségét, hogy bizonyos növényi kannabinoidok potenciális aknéellenes, míg más anyagok a száraz bőr kezelésére alkalmas vegyületekként szerepelhetnek a jövőben (Oláh, 2016).

Egy másik „ionotróp” kannabinoid receptor, a TRPV3 ioncsatorna szerepét is elemeztük SZ95 szebocitákon. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a TRPV3 aktiválása – ellentétben a kannabinoid rendszer egyéb tagjainak fent bemutatott hatásával – fokozta a sejtek gyulladási mediátorainak termelését, ugyanakkor meggátolta a pro-akné ágensek által kiváltott faggyúlipidtermelést. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a TRPV3 szerepet játszhat a száraz bőrtünetekkel járó gyulladási betegségek kialakulásához; valamint, hogy a TRPV3 gátlószerei terpiás haszonnal kecsegtetnek ezen kórállapotok kezelésében (Szántó, 2018).

Ezzel ellentétben – de hasonlóan a szebocitákon tapasztaltakhoz – megállapítottuk, hogy a TRPV3 aktivációja keratinocitákban is pro-inflammatórikus hatást váltott ki, mely a sejtek növekedésének gátlásával és a pro-apoptotikus folyamatok beindulásával párosult (Szöllősi, 2017).

**Eredményeink arra utalnak, hogy az endokannabinoid rendszer hatékonyan befolyásolhatja a keratinociták és szebociták sejbiológiai folyamatait, fontos szerepet játszhat a veleszületett immun- és gyulladási folyamatok, valamint a szebociták faggyútermelésének kontrollálásában.**

## **2.5 Poliolok hatásának vizsgálata az epidermális barrierre**

Igazoltuk, hogy számos poliol (melyek az endokannabinoid prekursoraiként is működnek az epidermiszben) farmakológiai alkalmazása – egy általunk újonnan feltárt géneexpressziós aktivációs mintázat létrehozásán keresztül – fokozta az epidermális barrier képződésének folyamatát, valamint gyulladásgátló hatást fejtett ki (Páyer E, 2018).

**Eredményeink alapján a poliolok hatékonyan alkalmazhatóak barrier sérüléssel járó gyulladási kórképek kezelésére.**

## **2.6 További *in vitro* irritatív-gyulladási modellek kifejlesztése és tesztelése**

Tenyésztett epidermális keratinociták felhasználásával számos olyan sejtes irritatív-gyulladási modellt fejlesztettünk, melyekben egyrészt egyértelműen és egymással párhuzamosan vizsgálható különféle, a bőr barrierjének megváltozását, valamint a gyulladási folyamatokat jelző molekuláris rendszerek; másrészt, a fenti kórfolyamatokat különböző ágensekkel indítottuk be. A sejtes rendszerek az alábbiak:

- Nem-specifikus gyulladási (keratinociták, szebociták) – Ágens: SDS
- Kontakt irritáció (keratinociták) – Ágens: Nikkel
- Kémiai irritáció-gyulladási (keratinociták, szebociták) – Ágens: Karvakrol, mely a sejteken kifejeződő „pro-inflammatorikus” kalcium-permeabilis ioncsatorna, a TRPV3 aktivátora
- TLR-mediált irritáció-gyulladási (keratinociták, szebociták) – Ágens: a sejteken kifejeződő TLR2, 3 és 4 aktivátorai
- UV-indukált irritáció-gyulladási (keratinociták) – Ágens: UV-B besugárzás
- Proteáz-indukált irritáció-gyulladási (keratinociták, szebociták) – Ágens: a sejteken kifejeződő „pro-inflammatorikus” metabotrop receptor, a PAR-2 aktivátorai
- Atópiás ekcéma (AD) sejtes modellje (keratinociták) – Ágens: *Staphylococcus aureus* enterotoxin-B (SEB) és thymic stromal lymphopoietin (TSLP) kombinációja, mely az AD-re jellemző mikrokoznyezetet modellezi

Ezen modellekben számos, a bőrbarrier folyamatait és a mikrobióta működését befolyásoló mechanizmust és ágens hatását elemeztük. Kimutattuk, hogy az epidermális endokannabinoid tónus növelése a bőrben termelődő legfontosabb endokannabinoid (anandamid) lebontását gátló FAAH enzim inhibitoraival jelentős gyulladásgátló hatással bír, mely feltehetően a keratinocitákon kifejeződő CB1 és CB2 receptorok aktivációján keresztül valósul meg (Oláh, 2016).

**A kifejlesztett modell rendszerek alkalmasnak bizonyultak különféle ágensek hatásának vizsgálatára a bőrbarrier folyamataira.**

## **2.7 *C. acnes* kezelés hatásának vizsgálata keratinocita és szebocita sejtek intercelluláris kommunikációjára**

Az *acne vulgaris* patogenezise során a pilosebáceus egységben található keratinociták és szebociták egyaránt megváltozott működést mutatnak. *In vitro* kultúrában mindkét sejtípusban veleszületett immun- és gyulladási folyamatok indulnak, melyek hatására különféle gyulladási mediátorok mennyisége fokozódik. Intakt folliculusban azonban csak a keratinociták kerülhetnek közvetlen kapcsolatba a baktériumokkal, amit a szebocita sejtek esetében gátolhat, többek között, a faggyúmirigy holokrin működése, valamint egyes faggyú összetevők antibakteriális sajátságai. A szebociták *acne*

patogenezisében betöltött szerepe mégis igen jelentős, ezért felmerül annak a lehetősége, hogy keratinociták által termelt jelvivő molekulákon keresztül a szebociták is értesülhetnek a folliculusban, a keratinociták környezetében zajló folyamatokról, mely kommunikáció fontos szerepet tölthet be az acne patogenezisében.

Feltételezéseink igazolására HPV-KER sejteket kezeltünk *C. acnes* baktériummal, majd 24 óras inkubálást követően összegyűjtöttük kontroll és baktérium kezelt sejtek kondicionált felülűszóját (CM), amit 0,45 µm pórusméretű szűrőn keresztül sterilbe szűrtük, majd ezzel SZ95 sejteket kezeltük. Bár a szebocita sejtek nem találkoztak közvetlenül a baktériummal, mégis szignifikánsan nőtt a vizsgált gyulladási molekulák (TNFα, IL-1α, IL-6, IL-8) mRNS szintű kifejeződése, valamint az SZ95-sejtek faggyútermelése a baktériummal kezelt kultúrák CM-jei esetében.

Hogy ezeket a folyamatokat térben is időben összekapcsolva elemezhesük létrehoztunk *in vitro* folliculus modellt. Ez egy olyan ko-kultúra, amelyben a HPV-KER keratinocitákat és az SZ95 szebocitákat egy poliészter membránnal térben elválasztott transwell rendszerben együtt tenyésztjük. A rendszer apikális része a szőrtüszőt modellezi, ahol HPV-KER sejtek összefüggő, konfluens monolayer alkotnak, míg a kamra alsó részében a faggyúmirigyét modellező SZ95 sejteket tenyésztjük. A poliészter membrán pórusmérete 0,4 µm, ami lehetővé teszi oldott kismolekulák és mikrovezikulumok diffúzióját a kamrák között. Közvetlenül csak az apikális kamrában lévő keratinocita sejteket kezeltük *C. acnes* baktériummal. Ennek ellenére mind a HPV-KER, mind pedig az SZ95 sejtekben megnőtt a gyulladási mediátorok (TNFα, IL-1α és IL-6) mRNS szintű kifejeződése, valamint a szebociták által termelt faggyú mennyisége, amit Oil-red-O festéssel igazoltunk. Ez alapján feltételezzük, hogy a szebociták felé történő információ átvitelében keratinocita és/vagy *C. acnes* eredetű oldott molekulák, vagy mikrovezikulumok játszhatnak szerepet.

**Eredményeink arra utalnak, hogy a *C. acnes* baktérium, a keratinociták és a szebociták a folliculusokban egymással komplex kapcsolatban állhatnak, és az egyes sejtekben történő folyamatokról humán sejt és/vagy baktérium eredetű oldott molekulák vagy mikrovezikulumok útján történhet információ átadása.**

### **3. A *C. acnes* kezelés hatásának *in situ* vizsgálata a humán bőrsejtek funkciójára**

#### **3.1 A *C. acnes* kezelés humán bőrfunkciókra gyakorolt hatásának vizsgálata *ex vivo* teljes vastagságú organotipikus bőr modellen**

Az 1.-es és 2.-es pontokban bemutatott vizsgálatok sok adatot szolgáltatottak a *C. acnes* baktérium keratinocita és szebocita sejtekre kifejtett hatásáról *in vitro* sejt kultúrákban. Nem adnak azonban felvilágosítást arról, hogy szöveti környezetben is megfigyelhetőek-e ezek a folyamatok. Ehhez egészséges, plasztikai műtéten átesett páciensektől teljes vastag punch biopszia mintákat vettünk, melyeket organotipikus sejt kultúrában tartottuk (OS modell). A *C. acnes* kezelés során a baktériumokat az epidermisz felszínére pipettáztuk. Megmutattuk, hogy a baktérium az OS modellek keratinocitáiban is képes veleszületett immun- és gyulladási folyamatok indítására, melyet a TNFα és az IL-1α gyulladási citokin mRNS-ek emelkedett kifejeződése mutat. Ezzel párhuzamosan szöveti környezetben is elindulnak negatív szabályozó folyamatok, hiszen a TNFAIP3, TNIP1 szintje mRNS és fehérje szinten is emelkedett.

A TJ komponensek mRNS-ei csak kismértékű változást mutattak a baktériumkezelés hatására, ami alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, hogy a *C. acnes* által kiváltott barrier változások háttérben nem baktérium-indukálta transzkripciós folyamatok állnak. Fehérje szintű vizsgálatunkban a ZO-1 kifejeződése az epidermisz minden rétegében emelkedett a *C. acnes* baktérium kezelést követően. Az OCLN mennyisége az alacsonyabb differenciáltsági szintű epidermisz rétegekben nőtt. A CLDN4, mely főként a *stratum granulosum*-ban fejeződik ki a kontroll mintákban, a baktérium kezelést követően megjelent a kevésbé differenciált, szuprabazális epidermisz régiókban is. Ezzel szemben a CLDN1 szintje, mely az epidermisz minden rétegében kifejeződik, a felső differenciáltabb régiókban lecsökkent. Ez arra utal, hogy a *C. acnes* baktérium hatására a TJ kialakításában szerepet játszó molekulák összetétele



megváltozik (claudin switch), ami befolyásolhatja az epidermisz barrier sajátságait. Ennek funkcionális következménye a LY festék penetrációjának növekedése nagy dóziszú *C. acnes* 889 törzssel történő kezelés esetén, ami az epidermális barrier állapotának romlására utal.

Ezek alapján a *C. acnes* baktérium az OS modellben is a HPV-KER keratinocita monolayer kultúrákban megfigyelt folyamatokhoz hasonló változásokat indít; a veleszületett immun- és gyulladásos folyamatok mellett a tápcsatorna mikrobiótájához hasonlóan a keratinociták differenciációs folyamatait, valamint a keratinocita barrier sajátságait is befolyásolhatja.

Összességében az egészséges bőrben a *C. acnes* baktérium elősegíti a keratinociták differenciációs folyamatait, hozzájárul a bőr barrier kialakításához és fenntartásához, és autofág folyamatok révén a kután homeosztázis fenntartásához. Az acne vulgaris patogenezise során mikrobiális diszbiózis alakulhat ki a *C. acnes* baktérium fokozott növekedése következtében. Ez az epidermális barrier funkciók romlását okozhatja, ami bakteriális antigének és irritatív molekulák fokozott penetrációját eredményezheti a mélyebb szöveti rétegek irányába. Ez fokozhatja az immunaktiváció mértékét, és a gyulladásos folyamatok, ezáltal az acnés tünetek súlyosságát (Kemény, 2016; Szabó, 2018).

#### 4. Összegzés

-Munkacsoportunk eredményeit a pályázat futamideje alatt **13** közleményben foglalta össze, melyek nagy presztízsű (legalább Q1-es minősítésű) nemzetközi tudományos folyóiratban jelent meg. Ezek összesített impakt faktora: **61,104**.

Két közlemény írása jelenleg is folyamatban van.

-A két munkacsoport emellett több mint **100 előadást és posztert** is bemutatott rangos hazai és nemzetközi konferenciákon.

-A pályázati eredmények alapját képezték egy **PhD fokozat** megszerzésének (Tax Gábor) valamint két másik fokozatszerzési eljárás is elindult (Erdei Lilla, Bolla Beáta Szilvia) ezek felhasználásával.

#### Irodalomjegyzék

Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol.* 2009 Dec;7(12):887-94. doi: 10.1038/nrmicro2245. Epub 2009 Nov 9.

**Bolla BSz, Erdei L, Tax G, Urbán E, Bíró T, Kemény L and Szabó K. The effect of *Cutibacterium acnes* bacterium on the properties of the epidermal barrier. A kézirat elkészítése folyamatban.**

**Erdei L, Bolla BS, Bozó R, Tax G, Urbán E, Kemény L, Szabó K. TNIP1 Regulates *Cutibacterium acnes*-Induced Innate Immune Functions in Epidermal Keratinocytes. *Front Immunol.* 2018 Sep 24;9:2155. doi: 10.3389/fimmu.2018.02155. eCollection 2018. IF: 5,511**

**Erdei L, Bolla BS, Bozó R, Tax G, Urbán E, Bíró T, Kemény L and Szabó K. TNFAIP3 is an important regulator of *Cutibacterium acnes*-induced innate immune activation in keratinocytes. A kézirat elkészítése folyamatban.**

Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Apr;9(4):244-53. doi: 10.1038/nrmicro2537.

Gurevich I, Zhang C, Francis N, Struzynsky CP, Livings SE, Aneskievich BJ. Human TNF $\alpha$ -induced protein 3-interacting protein 1 (TNIP1) promoter activation is regulated by retinoic acid receptors. *Gene* (2013) 515:42–48. doi:10.1016/j.gene.2012.11.041

Hennessy EJ, Sheedy FJ, Santamaria D, Barbacid M, O'Neill LA. Toll-like receptor-4 (TLR4) down-regulates microRNA-107, increasing macrophage adhesion via cyclin-dependent kinase 6. *J Biol Chem.* 2011 Jul 22;286(29):25531-9. doi: 10.1074/jbc.M111.256206.

**Kemény L, Nagy N, Csoma Z, Szabó K, Eros G. Pharmacological Targeting of the Epidermal Barrier. *Curr Pharm Des.* 2016;22(35):5373-5381. IF: 2,611**

Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15819-24. doi: 10.1073/pnas.0901216106. Epub 2009 Aug 31.

**Megyeri K, Orosz L, Bolla S, Erdei L, Rázga Z, Seprényi G, Urbán E, Szabó K, Kemény L. Propionibacterium acnes Induces Autophagy in Keratinocytes: Involvement of Multiple Mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2018 Apr;138(4):750-759. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.018. Epub 2017 Nov 27. IF: 6,448**

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

Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Széll M, Dobozy A, Kemény L. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect.* 2005b Jul;7(9-10):1117-27. Epub 2005 Apr 19.

Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med.* 2012 Oct 10;4(10):77. doi: 10.1186/gm378. eCollection 2012.

**Oláh A., Tóth B.I., Borbíró I., Sugawara K., Szöllösi A.G., Czifra G., Pál B., Ambrus L., Klopper J., Camera E., Ludovici M., Picardo M., Voets T., Zouboulis C.C., Paus R., Bíró T (2014): Cannabidiol Exerts Sebostatic and Antiinflammatory Effects on Human Sebocytes. *J. Clin. Invest.* 124(9):3713-3724. IF: 13,215**

**Oláh A., Markovics A., Szabó-Papp J., Szabó P.T., Stott C., Zouboulis C.C., Bíró T. (2016): Differential Effectiveness of Selected Non-Psychotropic Phytocannabinoids on Human Sebocyte Functions Implicates Their Introduction in Dry/Seborrheic Skin and Acne Treatment. *Exp. Dermatol.* 25(9):701-707. IF: 2,679**

**Oláh A., Ambrus L., Nicolussi S., Gertsch J., Tubak V., Kemény L., Soeberdt M, Abels C., Bíró T. (2016) Inhibition of fatty acid amide hydrolase exerts cutaneous anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Exp. Dermatol.* 25(4):328-30. IF: 2,679**

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Aug 9;2:104. doi: 10.3389/fcimb.2012.00104. eCollection 2012.

**Páyer E., Szabó-Papp J., Ambrus L., Szöllösi A.G., András M., Dikstein S., Kemény L., Juhász I., Szegedi A., Bíró T., Oláh A. (2018): Beyond the Physico-Chemical Barrier: Glycerol and Xylitol Markedly yet Differentially Alter Gene Expression Profiles and Modify Signaling Pathways in Human Epidermal Keratinocytes. *Exp Dermatol.* 27(3):280-284. IF: 2,608**

Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, Széll M, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabó A, Bata-Csörgo Z, Dobozy A, Kemény L. Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2004 Aug;296(3):120-4. Epub 2004 May 18.

**Szabó K, Erdei L, Bolla BS, Tax G, Bíró T, Kemény L. Factors shaping the composition of the cutaneous microbiota. *Br J of Dermatol* 176:(2) pp. 344-351. IF: 6,129**

**Szántó M., Oláh A., Szöllösi A.G., Tóth K.F., Páyer E., Czakó N., Pór Á., Kovács I., Zouboulis C.C., Kemény L., Bíró T., Tóth B.I. (2018): Activation of TRPV3 Inhibits Lipogenesis and Stimulates Production of Inflammatory Mediators in Human Sebocytes - A Putative Contributor to Dry Skin Dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* (Epub ahead) doi: 10.1016/j.jid.2018.07.015. IF: 6,448**

---

**Szöllősi A.G., Gueniche A., Jammayrac O., Szabó-Papp J., Blanchard C., Vasas N., Andrási M., Juhász I., Breton L., Bíró T. (2017): Bifidobacterium Longum Extract Exerts pro-Differentiating Effects on human Epidermal Keratinocytes in vitro. *Exp. Dermatol.* 26(1):92-94. IF: 2,675**

**Szöllősi A.G., Vasas N., Angyal Á., Kistamás K., Nánási P.P., Mihály J., Béke G., Herczeg-Lisztes E., Szegedi A., Kawada N., Yanagida T., Mori T., Kemény L., Bíró T. (2017): Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes *J. Invest. Dermatol.* 138(2):365-374. IF: 6,448**

**Tax G, Urbán E, Palotás Z, Puskás R, Kónya Z, Bíró T, Kemény L, Szabó K. Propionic Acid Produced by Propionibacterium acnes Strains Contributes to Their Pathogenicity. *Acta Derm Venereol.* 2016 Jan;96(1):43-9. doi: 10.2340/00015555-2154. IF: 3,653**

**Tóth B.I., Szallasi A., Bíró T. (2015): Transient Receptor Potential Channels and Itch: How Deep Should We Scratch? *Handb. Exp. Pharmacol.* 226:89-133. IF: 0**