

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS ALLERGOLÓGIAI KLINIKA

**A *CUTIBACTERIUM ACNES*-INDUKÁLT IMMUN
AKTIVÁCIÓS FOLYAMATOK NEGATÍV
SZABÁLYOZÓINAK VIZSGÁLATA**

Ph.D. értekezés tézisei

Erdei Lilla

Témavezető:

Dr. Szabó Kornélia Ágnes



Szeged

2020.

A dolgozat témakörébe tartozó közlemények

- I. **Lilla Erdei**, Beáta Szilvia Bolla, Renáta Bozó, Gábor Tax, Edit Urbán, Lajos Kemény, Kornélia Szabó. TNIP1 regulates *Cutibacterium acnes*-induced innate immune functions in epidermal keratinocytes. Front Immunol. 2018 Sep 24;9:2155. doi: 10.3389/fimmu.2018.02155.
IF: 4,716 (Q1) (Független idézetek: 1 Független idézetek: 0 Összesen: 1)
- II. K. Szabó, **L. Erdei**, B. Sz. Bolla, G. Tax, T. Bíró, L. Kemény. Factors shaping the composition of the cutaneous microbiota. Br J Dermatol. 2017 Feb;176(2):344-351
IF: 6,129 (D1) (Független idézetek: 12 Független idézetek: 4 Összesen: 16)
- III. **Lilla Erdei**, Beáta Szilvia Bolla, Renáta Bozó, Gábor Tax, Edit Urbán, Katalin Burián, Lajos Kemény, Kornélia Szabó. TNFAIP3 negatively regulates *Cutibacterium acnes*-induced innate immune events in epidermal keratinocytes. (kézirat közlésre elfogadva az Acta Dermato-Venereologica folyóiratba,
<https://www.medicaljournals.se/acta/content/abstract/10.2340/00015555-3707>).

Egyéb közlemények

- IV. Szabó, K; Bolla, BS; **Erdei, L**; Kemény, L. A bőrünkön élő mikrobák szerepe az egészséges bőrben és az acne vulgaris kialakulása során. ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 24 : 12 pp. 26-30. , 5 p. (2017)
- V. 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. 138(4) 750-759. (2018)
IF: 6,290 (D1) (Független idézetek: 1 Független idézetek: 1 Összesen: 2)
- VI. Bolla BS, **Erdei L**, Urbán E, Burián K, Kemény L, Szabó K. *Cutibacterium acnes* regulates the epidermal barrier properties of HPV-KER human immortalized keratinocyte cultures. Sci Rep (2020) 10: doi:10.1038/s41598-020-69677-6.

Bevezetés

A bőr speciális mikrobiális flórával rendelkezik, melynek tagjai főként az epidermiszben, valamint a bőr speciális anatómiai egységeiben, a piloszebáceus egységekben (PSU) találhatóak. A bőr mikrobióta szerepe kettős. Egyrészt fontos szerepe van az epidermális homeosztázis fenntartásában, másrészt, ha a mikrobióta és a bőr sejtejei közötti egyensúly felborul, hozzájárulhat különböző bőrbetegségek patogeneziséhez is. Ilyen például az acne vulgaris, vagy pattanásos bőrbetegség, melyben a *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) baktérium szerepét régóta vizsgálják.

Az epidermisz fő sejtjei a keratinociták, melyek folyamatos fizikai kapcsolatban vannak a bőr mikrobióta tagjaival. Képesek érzékelni a mikrobákat patogén felismerő receptoraik, például a Toll-like receptor (TLR) család egyes tagjainak aktivációja révén, melynek eredményeképpen a sejtekben veleszületett immun aktivációs folyamatok indulnak.

Serdülőkortól kezdődően a bőr mikrobióta egyik leggyakoribb és legjelentősebb tagja a *C. acnes* baktérium, különösképpen a faggyúban gazdag bőrterületeken. Az epidermális keratinociták ezt a baktériumot TLR2 és 4 receptoruk aktivációja révén ismerik fel, melynek eredményeképp veleszületett immun- és gyulladási folyamatok indulnak a sejtekben. Ezen folyamatok fontos mediátorai az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transzkripciós faktor, a JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 (p38 mitogen-activated protein kinase) és az ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 és 2) MAPK-ok (mitogen-activated protein kinase), melyek a sejtekben zajló szignálfolyamatok beindításában és végrehajtásában szerepet játszó gének kifejeződését szabályozzák. Ezek a gének különböző gyulladási citokineket, pl. tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL) 1 α , IL-1 β , és IL-6, kemokineket, pl. IL-8 és C-C motívum chemokine ligand 5 (CCL5), antibakteriális peptideket, pl. human beta-defensin 2 (hBD2), valamint egyéb gyulladási mediátorokat kódolnak. A keratinociták veleszületett immun aktivációja révén, végső soron egy jellegzetes gyulladási környezet alakul ki, melynek hatására más sejtek is aktiválódhatnak, többek között szebociták, dendritikus sejtek és makrofágok. A folyamatok eredményeképpen végső soron Th1/Th17 irányú adaptív

immun aktiváció is bekövetkezik. Összességében a bemutatott események hozzájárulhatnak a serdülőkori, karakterisztikus gyulladásos tünetek kialakulását eredményező gyakori bőrbetegség, az acene vulgaris patogeneziséhez.

Ismert, hogy a jellegzetes gyulladásos és aknés léziók tranzienst módon fordulnak elő az érintett egyének jelentős százalékában. A serdülőkori után a gyulladt folliculusok többnyire azonban maguktól meggyógyulnak, és a tünetek gyakran ezt az átmeneti időszakot követően már egyáltalán nem térnek vissza, annak ellenére, hogy a bőrben továbbra is jelentős a *C. acnes* baktérium dominanciája a faggyúban gazdag területeken. A baktérium a további életkorokban már nem okoz immun aktivációt, és gyulladásos folyamatok indulását keratinocitákban és/vagy más immun sejtekben. Ez arra utal, hogy léteznek olyan mechanizmusok, melyek a baktérium-indukálta immun folyamatokat képesek szabályozni. Ezeknek a pontos mechanizmusa, valamint a résztvevő molekulák azonban jelenleg nem ismertek.

Az immun aktivációs folyamatok kontrollálása elengedhetetlen a fokozott, gyakran szövetkárosító gyulladás kivédéséhez. Az elmúlt évtizedben számos olyan negatív szabályozót azonosítottak, melyek képesek a TLR szignálfolyamatok különböző lépéseit gátolni. Jelenleg nem tisztázott, hogy ezek a negatív szabályozók képesek-e kontrollálni a humán mikrobióta-indukálta folyamatokat is, és ha igen, miként. Munkánk során ezért a TLR szignálfolyamatok különböző szintjein ható negatív szabályozókat választottunk (SIGIRR - single Ig and TIR domain containing protein, TOLLIP - toll interacting protein, TNFAIP3 - TNF alpha induced protein 3 és TNIP1 - TNFAIP3 interacting protein 1), és ezek részletes vizsgálatát végeztük.

Irodalmi adatok alapján a SIGIRR, a TOLLIP, a TNFAIP3 és a TNIP1 gén számos sejttypusban kifejeződik, köztük olyan sejtekben is, melyek közvetlen kapcsolatban állnak a testünk különböző részein található mikrobiális közösségek tagjaival. Szerepüket korábban egyaránt leírták már patogén-fertőzéses modellekben, és különböző szövetek homeosztázisának fenntartásában.

Célkitűzés

Munkánk során fő célunk olyan faktorok és folyamatokat azonosítása volt, melyek szerepet játszhatnak a bőr mikrobióta, különös tekintettel a *C. acnes* baktérium által indukált immun aktivációs folyamatok szabályozásában humán epidermális keratinocitákban.

Ennek vizsgálatára az irodalomban leírt, a TLR szignálfolyamatokat negatívan szabályozó molekulákat (SIGIRR, TOLLIP, TNFAIP3 és TNIP1) választottunk, és az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

- változik-e kifejeződésük *C. acnes* baktérium hatására keratinocitákban,
- különböző filogenetikai csoportokba tartozó *C. acnes* törzsek (889: 1A, 6609: 1B, ATCC 11828: II) eltérően befolyásolják-e kifejeződésüket,
- kifejeződésük megváltoztatása hatással van-e, és ha igen miként a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun- és gyulladási folyamatok kimenetelére humán immortalizált keratinocita sejtekben (HPV-KER),
- valamint pontosan hogyan szabályozódik ezen faktorok kifejeződése keratinocitákban.

Alkalmazott anyagok és módszerek

- Kísérleteinkhez human immortalizált keratinocita sejtvonalat (HPV-KER), normal humán keratinocitákat és *ex vivo* organotipikus bőr modellt (OS) alkalmaztunk.
- Baktériumkezeléshez élő, fajon belül különböző filogenetikai csoportba tartozó *C. acnes* baktériumtörzset (889, I/A, ATCC 11828, II, 6609, I/B) használtunk, különböző sejt:baktérium arányt (MOI) alkalmazva.
- A retinsav aktív formája, az ATRA hatásának vizsgálatához az ATRA-t DMSO-ban oldottuk és 10^{-6} M koncentrációvan kezeltünk HPV-KER sejteket 48 óráig, míg OS kultúrákon $1,5 \times 10^{-6}$ M koncentrációban, 24 órás kezelést alkalmaztunk. Kontrollként DMSO kezelést használtunk.
- A negatív szabályozók kifejeződésének kontrollálásában szerepet játszó szignálfolyamatok azonosítására a sejteket 1 órás előkezelésnek vetettük alá JNK (sp 600125), NF- κ B (Bay 11-7085), p38 (sb 203580), ERK1/2 (PD 098059), STAT1 (Fludarabine) és STAT3 (Stattic) inhibitorokat, illetve kontrollként DMSO-t alkalmazva.
- A TNIP1 cDNS alapú túlexpresszáltatásához a sejteket X-tremeGENE 9 DNS Transzfekciós reagens segítségével üres pcDNA3.1 vektorral, illetve pcDNA3.1-TNIP1 konstrukttal transzfektáltuk, melybe előzetesen a TNIP1 cDNS szekvenciáját illesztettük.
- Tranziens siRNS-mediált csendesítéses vizsgálatainkhoz a sejteket ON-TARGETplus SMARTpool TNFAIP3-siRNA, TNIP1-siRNA, SIGIRR-siRNA, TOLLIP si-RNA és ON-TARGETplus Non-targeting Pool konstruktokat transzfektáltuk, Santa Cruz siRNA Transfekciós Reagens segítségével.
- NF- κ B promter aktivitását luciferáz reporter assay segítségével mértük.
- A szekretált citokinek és kemokinek mennyiségét ELISA módszerrel mértük.
- Totál RNS-t trizol felhasználásával, majd fenol-kloroformos kiválasztással izoláltunk. cDNS átírást követően valós idejű RT-PCR módszerrel detektáltuk az mRNS kifejezésekben bekövetkező változásokat.

- Fehérje szintű kifejeződés-változásokat western blot analízissel és immunfluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk.
- A TNFAIP3 gén szöveti kifejeződését nyilvánosan elérhető microarray adatok alapján analizáltuk, a GEO Profile Database (GDS2478 datasets, ID: 33444972) felhasználásával.
- Statisztikai analízis: amennyiben más nem került feltüntetésre, három független kísérlet eredményeit átlagoltuk \pm szórás (Standard Error/SE). Minden független kísérletben, a valós idejű RT-PCR és ELISA vizsgálatoknál három-három párhuzamos minta, míg a western blot és fluoreszcens mikroszkópiás mérésenként egy-egy került elkészítésre. A statisztikai eltérést, párosított t-próbával, Holm–Bonferroni és False Discovery Rate (FDR) korrekciót alkalmazva állapítottuk meg. A szignifikáns különbséget $p < 0,05$ állapítottuk meg.

Eredmények

1. A SIGIRR kifejeződésének és szerepének vizsgálata a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun aktivációs folyamatokban keratinocitákban

Megvizsgáltuk a SIGIRR mRNS és fehérje szintű kifejeződés-változását humán *in vitro* tenyésztett keratinocita (HPV-KER) sejtekben *C. acnes* 889 kezelést követően (multiplicity of infection, MOI=100). Eredményeink szerint a SIGIRR mRNS kifejeződik HPV-KER sejtekben, ami azonban nem változott *C. acnes* kezelés hatására.

Annak vizsgálatára, hogy a SIGIRR mRNS szintű kifejeződése függ-e az alkalmazott *C. acnes* törzsek mikrobiológiai sajátosságaitól vagy dózistól, eltérő filogenetikai csoportokba tartozó *C. acnes* törzsekkel (*C. acnes* 889 - IA, 6609 - IB, ATCC 11828 - II) kezeltük a sejteket, különböző MOI-t (25, 100, 300) alkalmazva. Egyik általunk vizsgált *C. acnes* törzs hatására sem tapasztaltunk azonban változást a SIGIRR mRNS szintű kifejeződésében, függetlenül az alkalmazott baktérium dózistól.

Fehérje szintű vizsgálataink is hasonló eredményt mutattak, a SIGIRR fehérje kifejeződése sem változott *C. acnes* 889 baktérium kezelés hatására.

Ezután azt is megvizsgáltuk, hogy a SIGIRR endogén szintjének módosítása hatással van-e a HPV-KER sejtek, *C. acnes*-indukálta veleszületett immun- és gyulladási folyamataira. Ehhez transziens, siRNS-mediálta csendesítést alkalmaztunk, majd *C. acnes* kezelést követően vizsgáltuk a TNF α gyulladási citokin mRNS szintű kifejeződését valós idejű RT-PCR módszerrel. Eredményeink alapján sem a bazális, sem a baktérium-indukált TNF α mRNS szintek nem mutattak különbséget a csendesített sejtekben a kontrollokkal összehasonlítva.

Ezek az eredményeink arra utalnak, hogy annak ellenére, hogy a SIGIRR kifejeződik HPV-KER sejtekben, feltehetően nem játszik jelentős szerepet a *C. acnes* baktérium-indukálta veleszületett immun- és gyulladási folyamatok szabályozásában keratinocitákban.

2. A TOLLIP kifejeződésének és szerepének vizsgálata a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun aktivációs folyamatokban keratinocitákban

Hasonló kísérleti paraméterek alkalmazása mellett vizsgáltuk a TOLLIP kifejeződését is HPV-KER sejtekben *C. acnes* 889, ATCC11828 és 6609 kezelés hatására. Eredményeink alapján a TOLLIP mRNS szintű kifejeződése nem változott, és hasonló eredményeket kaptunk a TOLLIP fehérje mennyiségének vizsgálatakor a *C. acnes* 889 baktérium törzssel való kezelést követően.

Ezt követően azt is elemeztük, hogy a TOLLIP szintjének megváltozása hatással van-e a baktérium-indukálta TNF α mRNS szintjére HPV-KER sejtekben. A TOLLIP csendesítése siRNS csendesítés módszerével azonban nem befolyásolta sem a bazális, sem a *C. acnes*-indukálta TNF α mRNS szinteket.

Eredményeink arra utalnak, hogy hasonlóan a SIGIRR-hez, a TOLLIP is kifejeződik ugyan HPV-KER sejtekben, azonban feltehetően nem bír fontos szabályozó szereppel a *C. acnes*-indukálta immun folyamatok szabályozásában keratinocitákban.

3. A TNFAIP3 kifejeződésének és szerepének vizsgálata a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun aktivációs folyamatokban keratinocitákban

Annak vizsgálatára, hogy a *C. acnes* hatással van-e a TNFAIP3 kifejeződésére keratinocitákban, a HPV-KER sejteket a *C. acnes* 889 baktérium törzssel kezeltük (MOI=100), majd vizsgáltuk a TNFAIP3 mRNS és fehérje szintű kifejeződését valós idejű RT-PCR és western blot módszerrel elemeztük. Eredményeink alapján a TNFAIP3 mRNS mennyisége gyors és tranziens módon emelkedett a baktérium kezelés hatására, mely a kezelést követő 12 óránál érte el a maximumát.

Nem tapasztaltunk törzs-specifikus különbségeket a különböző filogenetikai csoportokba tartozó *C. acnes* törzsek (889, ATCC 11828, 6609) alkalmazásakor, a TNFAIP3 mRNS szintje hasonló módon emelkedett mindhárom baktérium törzs hatására.

A TNFAIP3 fehérje mennyisége ugyancsak gyorsan emelkedést mutatott a baktériumkezelést (*C. acnes* 889, MOI=100) követően minden vizsgált időpontban.

Elemeztük, hogy a TNFAIP3 kifejeződés változása függ-e a sejtek környezetében található baktériumok dóziséjától. Ehhez a *C. acnes* 889 baktérium törzssel együtt tenyésztettük a HPV-KER sejteket különböző dóziséjú kezeléseket alkalmazva.

Eredményeink alapján a TNFAIP3 mRNS és fehérje szintű kifejeződése egyaránt függött az alkalmazott baktérium kezelés dózísától.

Annak vizsgálatára, hogy mely szignálfolyamatok szabályozzák a baktérium hatására induló TNFAIP3 kifejeződés változást, specifikus inhibitorokat alkalmazva gátoltuk a baktérium hatására induló fő jelátviteli utak mediátorait: az NF- κ B transzkripciósi faktort és a MAPK útvonalakat (JNK, p38 és ERK1/2), majd követtük a TNFAIP3 mRNS és fehérje szintű kifejeződését. A JNK inhibitor hatására a bazális TNFAIP3 mRNS mennyisége csökkent, míg a JNK és az NF- κ B inhibitorok baktérium-indukálta TNFAIP3 mRNS és fehérje mennyiségét csökkentették.

Ezt követően elemeztük azt is, hogy a TNFAIP3 szintjének megváltoztatása hatással van-e a gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszó mediátorok kifejeződésére. Ehhez tranziens, siRNS-mediálta csendesítéssel lecsökkentettük a TNFAIP3 mennyiségét, majd a TLR szignálfolyamatok aktivitását, és kiválasztott target génjeinek kifejeződését követtük. Eredményeink alapján a TNFAIP3 csendesítés hatására szignifikánsan emelkedett az NF- κ B transzkripciósi faktor promóter aktivitása, valamint a bazális, és a *C. acnes*-indukálta TNF α , IL-1 α , IL-6, IL-8, CCL5 mRNS szintű kifejeződése, és a sejtek által szekretált IL-6 és IL-8 mennyisége.

Annak igazolására, hogy a baktérium hatására bekövetkező TNFAIP3 szintjének emelkedése nem az általunk használt immortalizált HPV-KER sejtvonal sajátja, megismételtük kísérletünket organotipikus, *ex vivo* teljes vastag bőrmintákat tartalmazó OS kultúrákon. Eredményeink azt mutatták, hogy a keratinocita kultúrákhoz hasonlóan, a TNFAIP3 mRNS és fehérje mennyisége az OS kultúrák epidermisz rétegeiben a *C. acnes* kezelés hatására emelkedett.

Bemutatott eredményeink, valamint a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a *C. acnes* baktérium fontos szerepet játszhat az epidermális homeosztázis szabályozásában és fenntartásában, valamint opportunistá patogénként hozzájárulhat az acne vulgaris patogeneziséhez. Annak vizsgálatára, hogy a TNFAIP3 szintje mutat-e különbséget egészséges egyének és acne vulgaris betegek bőrében, nyilvánosan elérhető GEO Profile adatbázis alapján összehasonlítottuk egészséges kontroll egyének, és aknés betegek léziós és nem-léziós bőrmintáiban detektált TNFAIP3

mRNS szintjét. Eredményeink alapján az acne vulgaris betegek léziós bőrmintáiban a TNFAIP3 mRNS szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt detektálható ugyanazon betegek nem-léziós bőrmintáival összehasonlítva.

4. A TNIP1 kifejeződésének és szerepének vizsgálata a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun aktivációs folyamatokban keratinocitákban

Végül, de nem utolsó sorban vizsgáltuk a TNFAIP3 interakciós partnerének, a TNIP1-nek a kifejeződését *C. acnes* kezelés hatására HPV-KER sejtekben. Megmutattuk, hogy a TNIP1 mRNS is kifejeződik ezen sejtekben, és *C. acnes* 889 baktérium kezelés (MOI=100) hatására szintje gyors és szignifikáns emelkedést mutat, mely 12 és 24 óránál érte el maximumát.

A TNIP1 esetében is megvizsgáltuk, hogy kifejeződésének változása függ-e az alkalmazott baktérium törzsek (*C. acnes* 889, ATCC11828, 6609) sajátosságaitól, de hasonló változásokat figyeltünk meg mindhárom törzs esetében.

Ezzel szemben, jelentős dózis függést figyeltünk meg a *C. acnes* 889 jelű baktérium törzssel történő kezelés során.

Ezt követően a TNIP1 fehérje szintű változását is vizsgáltuk HPV-KER sejtekben western blot analízissel, valamint immunfluoreszcens mikroszkópiával. 6 órával a baktérium kezelést követően már magasabb TNIP1 fehérje szinteket detektáltunk, ami a kísérlet teljes időtartama alatt végig emelkedett maradt. Mikroszkópos vizsgálatainkkal is megerősítettük ezen megfigyelésünket, 24 órával a baktérium kezelést követően fokozott TNIP1 fehérje kifejeződést tapasztaltunk. Megmutattuk emellett azt is, hogy az mRNS szintű változásokhoz hasonlóan, a TNIP1 fehérje szintű kifejeződése is dóziszfüggő módon emelkedett, a baktérium kezelés paramétereinek változtatásával.

Annak vizsgálatára, hogy mely szignálfolyamatok játszanak szerepet a TNIP1 bazális és *C. acnes*-indukálta kifejeződésének szabályozásában keratinocitákban, specifikus JNK, NF- κ B, p38, ERK1/2, STAT1 és STAT3 inhibitorokkal kezeltük a HPV-KER sejteket, majd ezt követően ezeken *C. acnes* kezelést is alkalmaztunk. Eredményeink alapján a TNIP1 bazális mRNS szintű kifejeződése csökkent JNK és ERK1/2 inhibitorok hatására, míg a baktérium-indukálta TNIP1 mRNS szintű

kifejeződés változását a JNK és ERK1/2 szignálfolyamatok mellett az NF- κ B és p38 mediált folyamatok is szabályozzák. Ezzel ellentétben a STAT1 és STAT3 inhibitoroknak nem volt hatása a TNIP1 mRNS mennyiségére.

Annak igazolására, hogy a TNIP1 szerepet játszik-e a *C. acnes*-indukálta gyulladási folyamatok kontrollálásában, mennyiségét HPV-KER sejtekben transziensen megváltoztattuk cDNS alapú túlexpresszáltatással, illetve siRNS-mediálta csendesítéssel, majd követtük a TLR szignálfolyamatok targetjeinek kifejeződését.

A TNIP1 túlexpresszáltatás hatására szignifikánsan csökkent a bazális és *C. acnes*-indukált NF- κ B promóter aktivitása, valamint a TNF α , IL-8 és CCL5 gyulladási markerek mRNS szintű kifejeződése. Emellett csökkent a baktérium-indukálta IL-6 kifejeződése, míg az IL-1 α esetében nem tapasztaltunk változást. A túlexpresszáltatás hatására csökkent a sejtek által szekretált IL-6, IL8 és CCL5 mennyisége.

Ezzel szemben a TNIP1 siRNS-mediálta csendesítésének hatására szignifikánsan nőtt a bazális és *C. acnes*-indukált NF- κ B promóter aktivitás. Emelkedett a bazális és baktérium-indukált TNF α , IL-8 és CCL5 mRNS szintű kifejeződése, míg enyhe emelkedés volt megfigyelhető az IL-1 α és IL-6 citokin mRNS-ek esetében. A HPV-KER sejtek által szekretált bazális és *C. acnes*-indukált IL-8, IL-6 és CCL5 mennyisége szintén növekedett a sejtek felülűszójában.

A TNIP1 promóter régiója retinsav indukálható elemeket, és retinoid-receptor kötőhelyeket tartalmaz, melyek szerepet játszanak a TNIP1 szintjének retinsav hatására bekövetkező emelkedésében különböző sejtvonalakban.

Mivel az all trans retinoid acid (ATRA) egy hatékony gyógyszer az acne vulgaris terápiájában, megvizsgáltuk, hogy képes-e a TNIP1 kifejeződését, és ezáltal a TLR szignálfolyamatok target génjeit is szabályozni keratinocitákban.

ATRA kezelés hatására a TNIP1 mRNS mennyisége enyhén, míg fehérje szinten szignifikáns módon emelkedett, a bazális és *C. acnes*-indukált TLR2, és a gyulladási mediátor TNF α és CCL5 mRNS szintű kifejeződése csökkent. Ezzel ellentétben mind a bazális, mind a baktérium-indukálta TLR4 és IL-8 mRNS-ek szintje nőtt ATRA kezelés hatására, míg a TLR3 és IL-6 mennyisége nem változott.

Annak igazolására, hogy a *C. acnes*-indukálta TNIP1 kifejeződésének változása nem a HPV-KER sejtek specifikus sajátossága, megismételtük a baktérium kezelést normál humán epidermális keratinocita (NHEK) és OS kultúrákat alkalmazva. Hasonló eredményeket kaptunk, a TNIP1 mRNS és fehérje szintű kifejeződése egyaránt nőtt NHEK sejtekben, valamint emelkedett fehérje szinteket is detektáltunk az OS kultúrák epidermisz rétegeiben.

OS kultúrák ATRA kezelésekor azt is megfigyeltük, hogy a TNIP1 fehérje szintje szignifikáns módon nőtt az epidermisz minden rétegében 24 órával a kezelést követően, ami jelentős hasonlóságot mutat a HPV-KER immortalizált keratinocita sejtvonal esetében tapasztaltakkal.

Összefoglalás

- A SIGIRR és TOLLIP ugyan kifejeződik HPV-KER sejtekben, azonban eredményeink alapján feltételezhetően nem játszanak fontos szerepet a *C. acnes*-indukálta szignálfolyamatok kontrollálásában keratinocitákban. Kifejeződésük ugyanis nem változott baktérium kezelés hatására, és siRNS-mediálta csendesítésük sem volt hatással a baktérium-indukálta gyulladási mediátorok kifejeződésének szintjére.
- Megmutattuk, hogy a TNFAIP3 és TNIP1 kifejeződése gyorsan emelkedik *C. acnes* kezelés hatására HPV-KER és NHEK sejtekben, valamint OS kultúrákban.
- Kifejeződésük dóziszfüggő módon emelkedett *C. acnes* baktérium kezelés hatására, azonban törzs-specifikus különbségek nem voltak megfigyelhetők.
- A baktérium-indukálta TNIP1 kifejeződését JNK, NF- κ B, p38 és ERK1/2 - mediálta szignálfolyamatok szabályozzák keratinocitákban, míg a TNFAIP3 kifejeződésében JNK és NF- κ B függő jelátviteli utak vesznek részt.
- A TNIP1 és TNFAIP3 szintjének megváltoztatása hatással volt a sejtek NF- κ B promóter aktivitására, valamint a gyulladási citokinek és kemokinek mRNS és fehérje szintjeire.
- Megmutattuk, hogy az ATRA hatására nőtt a TNIP1 kifejeződése HPV-KER sejtekben és az OS kultúrák epidermisz rétegében.
- Az ATRA kezelés emellett csökkentette a bazális, és *C. acnes*-indukált TNF α , CCL5 és TLR2 mRNS szintű kifejeződéseket, míg ezzel párhuzamosan növelte az IL-8 and TLR4 mennyiségét.
- Nyilvánosan elérhető GEO Profile adatbázist felhasználva megállapítottuk, hogy az acne vulgaris betegek léziós bőrmintáiban szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt detektálható a TNFAIP3 mRNS, a betegek nem-léziós bőrmintáihoz viszonyítva.

Eredményeink alapján a TNIP1 és TNFAIP3 fontos szerepet játszhat a TLR szignálfolyamatok szabályozásában keratinocitákban, és ezáltal hozzájárulhat a *C. acnes*-indukálta veleszületett immun- és gyulladási folyamatok kontrollálásához.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szabó Kornéliának, hogy tudományos munkám során végig támogattott és biztatott. Hálás vagyok a tudományos útmutatásáért, nagy szakértelméért, tanácsaiért, segítségéért és türelméért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kemény Lajosnak a nagyszerű lehetőségért, hogy a Klinikán készíthettem el PhD munkám. Hálás vagyok a támogatásáért és az útmutatásért.

Köszönöm együttműködő partnereinknek, Dr. Urbán Editnek és Prof. Dr. Burián Katalinnak, hogy biztosították a kísérletek során felhasznált *C. acnes* baktérium törzseket.

Hálás vagyok kollégáimnak, Bolla Beáta Szilviának, Bozó Renátának, Dr. Tax Gábornak, Dr. Danis Juditnak és Dr. Göblös Anikónak a támogatásért, a kísérletekben nyújtott segítségért és azért, hogy jó környezet megteremtéséért a mindennapos laboratóriumi munka során.

További köszönettel tartozom Tanácsné Bajkán Andreának a kísérletekben nyújtott segítségért, Viharosné Dósa-Rácz Évának a statisztikai vizsgálatokkal kapcsolatos tanácsokért, valamint Földi Lilinek a tézis elkészülésében nyújtott segítségért.

Hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak a biztatást, a türelmüket, a feltétel nélküli támogatásukat és szeretetüket.

A munka a következő kutatási pályázatokkal valósult meg: GINOP-2.3.2-15-2016-00015 és OTKA NK105369. A munka az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-18-3 kódszámú, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium UNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült. A kutatást az EU Horizon 2020 Kutatási és Innovációs Keretprogram (No. 739593) támogatta, és a HCEMM-SZTE Skin Research Group keretében valósult meg.