

***A Cutibacterium acnes* baktérium hatása *in vitro* tenyésztett keratinociták barrier tulajdonságaira**

Bolla Beáta Szilvia

PhD értekezés tézisei

Témavezető:

Szabó Kornélia Ágnes, PhD



Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Szeged

2020.

Közlemények jegyzéke:

I. Bolla, Beáta Szilvia; Erdei, Lilla; Urbán, Edit; Burián, Katalin; Kemény, Lajos; Szabó, Kornélia: *Cutibacterium acnes* regulates the epidermal barrier properties of HPV-KER human immortalized keratinocyte cultures SCIENTIFIC REPORTS 10 : 1 Paper: 12815, 13 p. (2020) **IF: 3.998**

(Független idézetek:0 Függő idézetek:0 Összesen: 0)

(Folyóirat szakterülete: Scopus – Multidisciplinary Helyzete: D1)

II. Szabó, K; Bolla, B Sz; 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) **IF:0.000**

(Független idézetek:0 Függő idézetek:0 Összesen: 0)

(Folyóirat szakterülete: Scopus – General Medicine)

Egyéb közlemények

III. 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; 9: 2155. **IF: 4.534**

(Független idézetek:3 Függő idézetek:2 Összesen: 5)

(Folyóirat szakterülete: Scopus – Immunology, Helyzete: Q1)

IV. Manczinger, M; Bodnar, V; Papp, BT; Bolla, BS; Szabo, K; Balazs, B; Csanyi, E; Szel, E; Eros, G; Kemeny, L.: Drug repurposing by simulating flow through protein-protein interaction networks. CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS 103 : 3 pp. 511-520. , 10 p. (2018) **IF: 6.336**

(Független idézetek:1 Függő idézetek:0 Összesen: 1)

(Folyóirat szakterülete: Scopus – Pharmacology, Helyzete: Q1)

V. Megyeri, K; Orosz, L; Bolla, S; Erdei, L; Razga, Z; Seprenyi, G; Urban, E; Szabo, K; Kemeny, L.: *Propionibacterium acnes* induces autophagy in keratinocytes: involvement of multiple mechanisms JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 138:4 pp. 750-759., 10 p. (2018) **IF: 6.290**

(Független idézetek:5 Függő idézetek:2 Összesen: 7)

(Folyóirat szakterülete: Scopus – Dermatology, Helyzete: Q1)

VI. Szabo, K; Erdei, L; Bolla, B S; Tax, G; Biro, T; Kemeny, L.: Factors shaping the composition of the cutaneous microbiota BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY 176:2 pp. 344-351., 8 p. (2017) **IF: 6.129**

(Független idézetek:16 Függő idézetek:5 Összesen: 21)

(Folyóirat szakterülete: Scopus – Dermatology, Helyzete: Q1)

1. Bevezetés

Az emberi bőr nem csak fizikai vagy mechanikai, hanem immunológiai és mikrobiológiai védelmet is biztosít szervezetünk számára. A bőr mikrobióta fontos részét képezi ennek a védelemi rendszernek. Segít meggátolni a patogén mikrobák megtelepedését a bőr felszínén, hozzájárul a differenciációs folyamatokhoz, és a funkcionálisan érett szövet kialakulásához, valamint fontos szerepet játszik a bőr homeosztázisának fenntartásában is.

A bőr külső rétege az epidermisz, melyet keratinociták alkotnak. A sejtek differenciáltsági állapotától függően különböző rétegekbe rendeződnek. Ezek a *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, és a *stratum corneum*. Az epidermiszben a keratinociták szorosan egymás mellett helyezkednek el annak ellenére, hogy a differenciációjuk során alakjuk folyamatosan változik. Ennek a szoros kapcsolatnak a kialakításában sajátos komplexek vesznek részt, melyeket tight junction-nek (TJ) nevezünk.

A TJ-ok multiprotein komplexek, melyek két egymás mellett elhelyezkedő szomszédos sejt között alakulnak ki. Ezek a struktúrák mintegy lezárják a sejtek között lévő teret (paracelluláris tér), emellett a különböző kémiai anyagoknak az epidermiszen keresztüli átjutását is szabályozzák. Bár egyes TJ komponensek az epidermisz kevésbé differenciált rétegeiben is előfordulnak, érett, működőképes komplexként csak a *stratum granulosum* második sejtrétegében helyezkednek el. A TJ-öket legalább 40 különböző fehérje építi fel. A legismertebbek ezek közül a claudin (CLDN) fehérjecsalád tagjai, az occludin (OCLN), és a junkcionális adhéziós molekulák (JAMs). További fontos alkotó elem még a zonula occludens 1, 2, és 3 (ZO-1, 2, és 3), a cingulin és az afadin is.

Szerkezetükből adódóan a TJ-k szoros barriert alakítanak ki, ami megakadályozza különböző szabad molekulák és ionok áthaladását az epidermiszen keresztül. Ezt a szabályozott mozgást nevezzük paracelluláris transzportnak, melynek két formája van: a pórus, és a 'szivárgó' útvonal (leak pathway). A pórus útvonal a kisméretű, töltéssel rendelkező molekulák és ionok áthaladását teszi lehetővé a membrán két oldala között. Ennek a transzport útvonalnak a tulajdonságait a TJ-ök fehérje összetételük révén, többek között a bennük található CLDN molekulák szabályozásával képesek befolyásolni. Ezzel szemben a 'szivárgó' útvonal a nagyméretű, és a makromolekulák transzportjáért felelős. Ez egy alacsony hatékonyságú út, mely töltéssel nem rendelkező molekulák epidermiszen átjutását is lehetővé teszi, ami a TJ-ök két sejtet összekapcsoló fibrilláris hálózatában kialakuló tranziens töréseken keresztül megy végbe. Ezek a transzport folyamatok fontos szerepet játszanak a barrier állapotának

szabályozásában, különböző jelátviteli folyamatokban hozzájárulnak az apikális bazolaterális sejtpolarizáció kialakításához, valamint hatással vannak a differenciációs folyamatokra.

Az egészséges bőrben a *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) baktérium a bőr mikrobióta fontos tagja. Metabolizmusa során rövid láncú szabad zsírsavakat (short-chain fatty acids, SCFAs) hoz létre, melyek fontos szerepet játszanak immunregulációs folyamatokban, segítenek fenntartani a bőr savas pH értékét, valamint meggátolják a potenciális patogének, mint például a *Staphylococcus aureus* növekedését. Emellett bakteriocinhoz hasonló anyagot termelve is képesek szabályozni más fajok növekedését. A baktérium a mikroorganizmusok mellett azonban hatással van a bőr sejteire is. Serkenti a keratinociták osztódását, befolyásolja a differenciációs folyamataikban szerepet játszó gének kifejeződését, és ezen keresztül hozzájárulhat az anatómiailag és funkcionálisan érett epidermisz kialakulásához. A *C. acnes* baktérium veleszületett immun- és gyulladásos folyamatokat is indít keratinocitákban a Toll-like receptor 2 és 4 (TLR2 és 4) aktivációján keresztül. Ezen folyamatok túlzott mértékű aktivációja hozzájárul az *acne vulgaris* betegség kialakulásához.

Az akne az egyik leggyakoribb, multifaktoriális, gyulladásos bőrbetegség, mely a serdülőkori populáció nagy százalékát (körülbelül 85%-át) érinti. Kialakulásakor a serdülőkori hormonális változások, és az ezzel párhuzamosan megfigyelhető emelkedett androgén hormon szintek megjelenésével kezdődnek azok a patogén folyamatok, melyek fokozott faggyú termeléshez, és a pilosebáceus egységek (PSU-k) vagy follikulusok rendellenes *C. acnes* kolonizációjához vezetnek. Jellemző még a keratinociták túlzott sejtosztódása és rendellenes differenciációja is. Összességében ezek a folyamatok hozzájárulnak a bőrsejtek, többek között a keratinociták és a sebociták, valamint a *C. acnes* baktérium rendellenes kapcsolatához, melyet bakteriális diszbiózisnak nevezünk. Ez végső soron az aknéra jellemző jellegzetes léziók kialakulásához vezet.

2. Célkitűzések

Jelenleg nem ismerjük, hogy az epidermális barrier vajon érintett-e, illetve hogyan befolyásolja az aknés léziók kialakulását. Vizsgálataink során ezért arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a *C. acnes* baktérium, ami a kután mikrobióta fontos tagja, milyen hatással van az epidermális keratinociták barrier tulajdonságaira. Az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

- Hogyan befolyásolja a *C. acnes* baktérium a különböző differenciáltsági szintű, konfluens keratinocita tenyészetek barrier sajátságait?
- Milyen sejt- és molekuláris változások állnak a barrier változások hátterében?
- Van-e hatása a *C. acnes* baktériumnak az *ex vivo* tenyésztett, organotipikus bőrmodell barrier tulajdonságaira?

3. Alkalmazott anyagok és módszerek

- *C. acnes* 889 (IA), 6609 (IB) és ATCC11828 (II) törzsek tenyésztése és tárolása a korábbiakban használt, irodalomban leírt körülmények alkalmazásával történt.
- Kísérleteink során konfluens, kontakt gátolt (Ca-alacsony) és kalcium hozzáadásával differenciáltatott (Ca-magas) keratinocita kultúrákat alkalmaztunk. Az utóbbi kialakítását 1,7 mM CaCl_2 hozzáadásával végeztük. Kísérleteinkben humán immortalizált keratinocita sejtvonalat (HPV-KER), és normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket használtunk.
- A teljes vastag bőrmintákon végzett vizsgálatainkhoz a biopsziákból *ex vivo* körülmények között organotipikus bőr (OS) modelleket hoztunk létre.
- A Ca-alacsony és Ca-magas HPV-KER és NHEK kultúrák barrier tulajdonságainak vizsgálatához valós idejű impedancia mérésen alapuló módszert (xCELLigence rendszer) alkalmaztunk, eltérő dózisú (multiplicity of infection, MOI) élő vagy hővel előlt *C. acnes* törzsekkel (889, 6609, ATCC11828) történő kezelést követően.
- A különböző koncentrációjú propionsav (PA) kezelés hatásának vizsgálatát Ca-alacsony HPV-KER kultúrákon végeztük.
- A TJ fehérjék vizsgálata western blot módszerrel történt. A fehérjék kimutatására actin, ZO-1, OCLN, CLDN1 és 4 elsődleges ellenanyagot használtunk. HRP-kapcsolt másodlagos ellenanyag hozzáadását követően az eredmények vizualizálásához C-Digit Blot Scanner-t, és az Omega Lum G Chemidoc Imaging rendszert alkalmaztuk.
- A különféle mintákból RNS minták izolálása TRI-reagens segítségével történt. EvoScript cDNS átíróval cDNS-t szintetizáltunk, majd a TJ gének (CLDN1, CLDN4, OCLN és ZO-1) mRNS szintű kifejeződés változásainak vizsgálatát az Universal Probe Library rendszer segítségével végeztük.
- Immunhisztokémiai festési eljárással (IHC) vizsgáltuk a TJ fehérjék kifejeződésének változását *C. acnes* 889 kezelést követően paraffinba ágyazott OS mintákon Bond-Max automatizált IHC/ISN festő rendszer segítségével. Ehhez a TJ fehérjék elsődleges ellenanyagát (CLDN1, CLDN4, OCLN és ZO-1), valamint a hozzájuk tartozó megfelelő izotípus kontroll ellenanyagokat használtunk. A mintákat DAB-kromogénnel előhívtuk, majd hematoxin festést végeztünk. Fedőlappal történő fedést követően mikroszkóppal elemeztük a mintákat.

- Transzepidermális elektromos ellenállás mérést (TEER) Ca-alacsony és Ca-magas HPV-KER kultúrákon Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter EVOM2 műszer segítségével végeztünk.
- Ca-alacsony és Ca-magas HPV-KER kultúrák sejtszámbeli változásainak nyomon követésére tripánkék kizárásos vizsgálatot végeztünk *C. acnes* kezelést követően.
- Lucifer yellow (LY) penetrációs vizsgálatok HPV-KER sejtkultúrák, és OS modell alkalmazásával történt. A minták fluoreszcens intenzitásának mérésére BGM FLUOstar OPTIMA műszert használtunk. Az OS modellek esetében a LY festék penetrációjának követése fagyasztott metszeteken történt fluoreszcens mikroszkópiával.
- *AC. acnes* baktériummal ko-kultúrában tartott HPV-KER sejteken történő antibiotikum kezelés hatásának vizsgálatához az xCELLigence rendszert alkalmaztuk.
- Az adatok statisztikai elemzését Student t-teszttel, és one-way ANOVA post-hoc Tuckey teszttel végeztük. Szignifikáns értéknek a 0,05 vagy annál kisebb értéket vettük

4. Eredmények

4.1. A Ca^{2+} ion hatására bekövetkező sejt differenciációs folyamatok jelentős nCi növekedést, és ezzel párhuzamosan barrier változásokat okoztak *in vitro* tenyésztett keratinocita kultúrákban

Különféle impedancia mérésen alapuló módszereket elterjedten alkalmazunk *in vitro* sejt kultúrák barrier állapotának tanulmányozására. Munkánk során ezen az elven alapuló eljárások alkalmazásával azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolják az eltérő tenyésztési körülmények a mért impedancia értékeket, és az ebből származtatott sejt indexet (Ci-t) Ca-alacsony NHEK és HPV-KER kultúrákban. Ehhez a sejteket konfluens állapotig növesztettük KSFM tápoldatban, majd megemeltük az extracelluláris Ca^{2+} -mennyiségét, melyről ismert, hogy fokozza a keratinociták differenciációs folyamatait. Azt tapasztaltuk, hogy a kezdeti növekedési fázis után a Ci értékek plató fázisba értek, ahogy a kultúrák elérték a konfluens, kontakt gátolt állapotot. Új, magas Ca^{2+} -koncentrációjú tápoldat hozzáadása a kultúrákhoz jelentős, azonnali Ci érték növekedést eredményezett a Ca-alacsony tápoldatban tartott mintákhoz viszonyítva. Az NHEK és a HPV-KER tenyészetek hasonlóan viselkedtek, ami arra engedett következtetni, hogy az immortalizált HPV-KER kultúrák is alkalmas modellek lehetnek a keratinociták barrier sajátosságainak *in vitro* modellezésére.

4.2. A *C. acnes* hatásának vizsgálata *in vitro* tenyésztett keratinocita kultúrák barrier tulajdonságaira

Valós idejű impedancia méréses módszer alkalmazásával elemeztük a *C. acnes* baktérium hatását Ca-alacsony és Ca-magas NHEK és HPV-KER kultúrák barrier tulajdonságaira. A Ca-alacsony kultúrák esetében először egy gyors, tranziens nCi emelkedést tapasztaltunk, ami az epidermális barrier tulajdonságok javulására utalt. A maximum elérését követően a Ca-alacsony kultúrákban az nCi értékek csökkenése volt megfigyelhető, mely arra engedett következtetni, hogy egy határértéket elérve a folyamatosan növvő baktérium jelenléte már káros hatással van a keratinociták barrier sajátosságaira.

Vizsgálatainkat megismételtük differenciáltatott, Ca-magas NHEK és HPV-KER kultúrákon. Ezek esetében csak a dózisfüggő nCi csökkenését figyeltük meg, függetlenül az alkalmazott sejtípustól, és a *C. acnes* dózistól.

Lehetséges törzs specifikus hatások kimutatásához kísérleteinket eltérő *C. acnes* törzseket (6609 és ATCC11828) alkalmazva is megismételtük. Azt tapasztaltuk, hogy a mért nCi értékek hasonló módon változtak a *C. acnes* 889 baktériummal történő kezelés során

tapasztaltakhoz a Ca-alacsony HPV-KER és NHEK kultúrákban. Eredményeink azt is megmutatták, hogy a tapasztalt változások pontos lefutása függött az alkalmazott *C. acnes* törzstől, és a sejtípustól.

Hövel előtt *C. acnes* 889, 6609 és ATCC11828 baktérium törzsszel történő kezelést követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy hasonló hatást tapasztalunk-e mint az élő baktériumok esetében? Eredményeink azonban nem mutattak szignifikáns nCi eltérést, ami arra utalt, hogy a korábbi vizsgálataink során megfigyelt változások csak élő baktériumok esetében tapasztalhatóak.

Mivel a valós idejű sejt analízis során a Ci értékek változása a kultúrákban megfigyelhető sejtszámbeli változásokból is adódhat, ezért nyomon követtük a *C. acnes* 889 törzsszel történő kezelés hatására bekövetkező sejtszám változásokat a Ca-alacsony és Ca-magas kultúrák esetében. Tripán kék festéses kísérleteinkben nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kultúrákban található sejtek számában a baktérium jelenlétében, ami arra utalt, hogy a Ci értékek változásának hátterében nem a keratinociták osztódásának és életképességének megváltozása áll.

Végül azt vizsgáltuk, hogy az nCi változások hátterében a különféle keratinocita kultúrák barrier tulajdonságainak megváltozása állhat-e? Ennek megválaszolásához TEER vizsgálatokat végeztünk, és azt tapasztaltuk, hogy a TEER értékek először emelkedtek a Ca-alacsony kultúrákban, melyet csökkenés követett mind a két modell esetében baktérium kezelés hatására. Ezek az eredmények jó egyezést mutattak az xCELLigence vizsgálatok során kapott eredményekkel, ami arra utalt, hogy a *C. acnes* baktérium képes befolyásolni az *in vitro* tenyésztett keratinociták barrier tulajdonságait.

4.3 A propionsav (PA) kezelés hatásának vizsgálata az *in vitro* tenyésztett keratinociták barrier tulajdonságaira

A fentiekhez hasonló valós idejű impedancia mérési eljárással a PA hatását is vizsgáltuk a HPV-KER sejt kultúrákban, ami a baktérium anaerob fermentációjakor keletkező fontos anyagcseretermék. Eredményeink azt mutatták, hogy a PA kezelést követően mért nCi értékek hasonlóan változtak, mint azt az élő *C. acnes* baktérium kezelése során tapasztaltuk. Magas koncentrációjú PA kezelés eredményeként a mért nCi értékek tranziens emelkedése, majd jelentős csökkenése volt megfigyelhető. Ez arra utalt, hogy a *C. acnes* által termelt metabolikus termék hatással van az *in vitro* tenyésztett keratinociták barrier sajátosságaira.

4.4 TJ fehérjék kifejeződés változásának vizsgálata HPV-KER sejtkultúrákban és OS modellben *C. acnes* 889 baktériummal történő kezelést követően

A *C. acnes* hatására bekövetkező barrier változások elemzéséhez Ca-alacsony és Ca-magas HPV-KER kultúrákat *C. acnes* 889 baktériummal (MOI=100, 300) kezeltük, és néhány kiválasztott TJ komponens (claudin 1 és 4 (CLDN1 és 4), az occludin (OCLN) és a zonula occludens 1-nek (ZO-1) kifejeződését elemeztük mRNS és fehérje szinten egyaránt.

Eredményeink azt mutatják, hogy míg a ZO-1 mRNS szintje nem változott jelentősen, addig az OCLN mRNS szintje emelkedett baktérium kezelés hatására mind a két modell rendszerben. A vizsgált két claudin kifejeződése ellentétesen változott: a CLDN1 mRNS szintje csökkent mind a két modellben, míg a CLDN4 mRNS szintje emelkedett a Ca-alacsony kultúrákban. Azt is megfigyeltük, hogy baktérium kezelés hatására a ZO-1 fehérje szintű kifejeződése jelentősen megemelkedett a Ca-magas kultúrákban, míg a Ca-alacsony kultúrákban egy állandó enyhe emelkedés volt megfigyelhető. Az OCLN fehérje szintje enyhén változott, míg a CLDN1 szintje csökkent mindkét rendszerben. A CLDN4 fehérje szintje szintén emelkedést mutatott, de csak a 72 órás Ca-alacsony mintákban. Összességében eredményeink arra utaltak, hogy a *C. acnes* baktérium hatására a kiválasztott TJ szerkezeti fehérjék kifejeződése megváltozott.

A kiválasztott TJ fehérjék kifejeződését *ex vivo* OS modellben is vizsgáltuk, *C. acnes* kezelést követően. Azt tapasztaltuk, hogy a ZO-1 és az OCLN kifejeződése emelkedett az epidermisz minden rétegében a *C. acnes* 889 baktérium jelenlétében. A CLDN1 kifejeződése, mely erőteljesen kifejeződött minden rétegben a kezeletlen kontroll mintákban, lecsökkent, kivéve az epidermisz legalsó, *stratum basale* rétegét. Ezzel szemben a CLDN4 kifejeződése, mely a kezeletlen kontroll mintákban csak a *stratum granulosum* területére korlátozódott, megjelent az epidermisz alacsonyabb rétegeiben is a baktérium hatására. Eredményeink arra utalnak, hogy a kiválasztott TJ fehérjék mennyisége és lokalizációja változik a baktérium jelenlétében.

4.5. A megfigyelt sejtbioológiai változások funkcionális következményeinek vizsgálata különböző modell rendszerekben

A vizsgálataink során megfigyelt barrier változások funkcionális következményének vizsgálatához LY penetrációs vizsgálatot végeztünk a Ca-magas HPV-KER sejtkultúrák, és OS modellek alkalmazásával. Azt tapasztaltuk, hogy az *in vitro* keratinocita tenyészetben végzett

kísérlet során a fluoreszcens intenzitás értékek emelkedtek a 72 órás kezelt mintákban a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, ami a LY festék fokozott penetrációjára utalt.

Vizsgálatainkat megismételtük *ex vivo* OS modellek alkalmazásával is. Azt tapasztaltuk, hogy az OS modellben is fokozódott a LY festék penetrációja a magas dózisú *C. acnes* kezelés hatására, melyet a szubepidermális régiókban megemelkedett, diffúz fluoreszcens jel mutatott.

4.6. A *C. acnes* 889 baktériummal együtt tenyésztett HPV-KER sejtkultúrák antibiotikum kezelése a baktérium által kiváltott barrier romlás részleges helyreállítását eredményezi

A legtöbb jelenleg elérhető, az akne terápiájában alkalmazott terápiás modalitás bakteriosztatikus, és/vagy antibakteriális tulajdonságokkal rendelkezik. Ezért megvizsgáltuk, hogy ha AB/AM hozzáadásával csökkentjük a *C. acnes* aktivitását és/vagy életképességét Ca-alacsony ko-kultúrákban, akkor visszafordítható-e a korábbi vizsgálataink során megfigyelt nCi csökkenés, és barrier romlás. Eredményeink azt mutatták, hogy az AB/AM kezelés hatására lecsökkent a mintákban az élő baktériumok mennyisége. Ez hozzájárult a *C. acnes* 889 baktérium káros hatásainak részleges visszafordításához. Ez a mért nCi értékek jelentős emelkedéséhez vezetett, ami az *in vitro* keratinocita kultúrák barrier tulajdonságainak javulására utalt.

5. Összefoglalás

- Megmutattuk, hogy a Ca^{2+} hozzáadása a keratinocita kultúrákhoz elősegítette a keratinocita barrier funkciók kialakulását és stabilizálódását, és az xCELLigence rendszer alkalmas ezen változások mérésére.
- Az alacsony differenciáltsági szinttel rendelkező Ca-alacsony HPV-KER és NHEK kultúrák élő *C. acnes* baktériummal történő kezelésének hatására egy gyors, tranziens növekedés volt megfigyelhető a mért nCi értékekben, ami a barrier állapot javulásának jellegzetessége. Ezen változások törzs- és dózisfüggést mutattak.
- A folyamatosan növvő baktérium káros hatást gyakorolt a keratinociták barrier sajátságaira, melyet a mért nCi értékek jelentős csökkenése mutatott. Ez a hatás függött az élő baktérium kezelés dózisától, de független volt az alkalmazott sejtek differenciáltsági szintjétől.
- TEER vizsgálatok segítségével igazoltuk, hogy a mért nCi értékek változásának hátterében a sejt kultúrák barrier tulajdonságainak megváltozása állt.
- A *C. acnes* baktériumnak csak élő állapotban volt hatása a keratinocita barrierre.
- Elemeztük a PA hatását is, mely a baktérium növekedésével és metabolizmusával kapcsolatos fontos anyagcseretermék. A Ca-low kultúrák esetében a magas dózisú PA kezelés hatására tranziens Ci érték növekedést tapasztaltunk, mely összehasonlítható volt az élő *C. acnes* törzsek hatásával.
- A *C. acnes* kezelés hatására megváltozott a TJ fehérjék (CLDN1, 4; OCLN; ZO-1) kifejeződése és lokalizációja az *in vitro* keratinocita kultúrákban és az OS modellben egyaránt.
- A LY kezelés, mely egy nagy molekulású, fluoreszcensen jelölt vegyület, ami nem képes szabadon átmenni a lipofil barrierok között, azt mutatta, hogy a Ca-alacsony kultúrákban mért nCi csökkenések hátterében a baktérium által kiváltott barrier károsodás lehet. Hasonló eredményeket kaptunk az OS modellen megismételt kísérleteinkben is, ami összességében igazolta, hogy a *C. acnes* baktérium képes szabályozni az epidermis barrier pillanatnyi állapotát, szorosságát, és az epidermiszen keresztül történő paracelluláris transzport folyamatok tulajdonságait szöveti környezetben is.
- Megvizsgáltuk azt is, hogy *C. acnes* baktériummal ko-kultúrában tartott HPV-KER sejtek barrier romlása visszafordítható-e antibiotikum kezelés hatására? Azt tapasztaltuk,

hogy a baktériumszám csökkenésével párhuzamosan a mért nCi értékek újra jelentősen emelkedtek.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a *C. acnes* baktérium többek között a TJ fehérjék kifejeződésének és lokalizációjának befolyásolása révén hatással van a keratinocita barrier állapotára, és ezáltal fontos szerepet játszhat az egészséges bőr homeosztázisának szabályozásában és fenntartásában.

6. Új eredmények

- A *C. acnes* baktérium, mely a bőr mikrobiota tagja, összetett, törzsspecifikus és dózisfüggő hatást fejt ki a keratinocita barrierre. Alacsony dózisban elősegíti az epidermális barrier kialakulását és fenntartását, azonban bakteriális diszbiózis során kialakuló kóros növekedése káros lehet. Ez utóbbi hatása fontos szerepet játszhat az akne patogenezise során, a léziók kialakításában.
- A keratinocita barrier változásokat a TJ-ök fontos szerkezeti komponenseinek (CLDN1, 4, OCLN és ZO-1) megváltozott kifejeződése és fehérje eloszlása kíséri, mely a paracelluláris transzport folyamatok módosulásához is vezet.
- A *C. acnes* baktérium barrier módosító hatásáért részben az anaerob fermentációkor keletkező rövid szénláncú zsírsav, a propionsav felel.
- Az antibiotikumokat széles körben alkalmazzák az *acne vulgaris* kezelésére, melyek a gyulladt szőrtüszőkben lévő élő baktériumok számának csökkentésével hozzájárulhatnak az epidermális barrier funkciók helyreállításához.
- Eredményeink kiemelik a *C. acnes* baktérium komplex hatását az egészséges bőr barrier funkcióira.
- Vizsgálataink felvetik, hogy az akne vulgaris patogenezise még komplexebb folyamat, mint azt korábban gondoltuk, a *C. acnes* által indított veleszületett immun- és gyulladásos folyamatokon kívül a baktérium az epidermális barrier sajátosságainak megváltozása révén is fontos szerepet játszhat a kóros folyamatokban.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni mély hálámat témavezetőmnek Dr. Szabó Kornéliának, hogy végig támogatott TDK és PhD munkám során, a rám szánt időért és támogatásért és a segítségéért, amit nyújtott nekem mikor a legnagyobb szükségem volt rá.

Szeretném kifejezni meleg hálámat Prof. Dr. Kemény Lajosnak a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy elvégezhessem TDK és PhD munkámat Klinikánkon.

Szeretnék köszönetet mondani együttműködő partnereinknek Dr. Burián Katalinnak és munkatársainak valamint Prof. Dr. Urbán Editnek, hogy biztosították számunkra a *C. acnes* törzseket.

Szeretném meghálálni Tanácsné Bajkán Andreának és a Szövettani labor munkatársainak a technikai támogatásukat.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Manczinger Máténak a statisztikai vizsgálatokban nyújtott segítségéért munkánk során.

Szeretnék köszönetet mondani munkatársaimnak Dr. Erdei Lillának, Dr. Danis Juditnak, Dr. Bozó Renátának és Dr. Tax Gábornak a kísérleteim során nyújtott segítségeikért és támogatásukért az évek folyamán.

Végül szeretném kifejezni legőszintébb hálámat szüleimnek és családomnak a folyamatos támogatásukért, bátorításukért és türelmükért, ami segített abban, hogy tovább folytassam tanulmányaimat az évek alatt.

Végül a munkám a GINOP-2.3.2-15-2016-00015, OTKA NK 105369 pályázatok támogatásával készült el. A kutatás az EU Horizon 2020 Kutatási és Innovációs Keretprogram (No. 739593) keretében a HCEMM-US Skin Research Group támogatásával valósult meg. K.Sz. a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatói ösztöndíjában részesül, valamint az Emberi Erőforrások Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Program UNKP-18-4 és az Innovációs és Technológiai Minisztérium UNKP-19-4 és UNKP-20-5 támogatja.

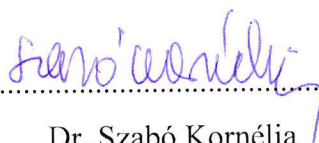
Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Szabó Kornélia (felelős első szerző) kijelentem, hogy Bolla Beáta Szilvia (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott – közösen publikált - tudományos eredményeket fokozatszerzés céljából felhasználhatja. Más ezeket a pontokat, a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemény:

II. Szabó, K; **Bolla, B Sz**; 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)

Szeged, 2020. december. 15



Dr. Szabó Kornélia

tudományos főmunkatárs, témavezető, felelős szerző