

A periostin potenciális szerepe a pikkelysömörben

Flink Lili Borbála

PhD értekezés tézisei

Témavezetők:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna

Dr. Bozó Renáta

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Szeged

2023

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **Flink LB**, Ghaffarinia A, Papp BT, Varga Á, Vigh AI, Vidács DL, Kui R, Kemény L, Bata-Csörgő Z, Bozó R. Abnormal basement membrane results in increased keratinocyte-derived periostin expression in psoriasis similar to wound healing. *Sci Rep.* 2023 Sep 29;13(1):16386. doi: 10.1038/s41598-023-43396-0.
IF: 4.6* (Folyóirat szakterülete: Scopus – Multidisciplinary, Helyzete: D1)
- II. Bozó R, **Flink LB**, Belső N, Gubán B, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Could basement membrane alterations, resembling micro-wounds at the dermo-epidermal junction in psoriatic non-lesional skin, make the skin susceptible to lesion formation? *Exp Dermatol.* 2021 Jun;30(6):765-772. doi: 10.1111/exd.14267.
IF: 4.511 (Folyóirat szakterülete: Scopus – Dermatology, Helyzete: Q1)

Egyéb közlemények

- I. Vidács DL, Veréb Z, Bozó R, **Flink LB**, Polyánka H, Németh IB, Póliska S, Papp BT, Manczinger M, Gáspár R, Mirdamadi S, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Phenotypic plasticity of melanocytes derived from human adult skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2022 Jan;35(1):38-51. doi: 10.1111/pcmr.13012.
IF: 4.3 (Folyóirat szakterülete: Scopus – Dermatology, Helyzete: D1)
- II. Bozó R, Danis J, **Flink LB**, Vidács DL, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Stress-Related Regulation Is Abnormal in the Psoriatic Uninvolved Skin. *Life (Basel).* 2021 Jun 23;11(7):599. doi: 10.3390/life11070599.
IF: 3.253 (Folyóirat szakterülete: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous), Helyzete: Q2)
- III. Gémes N, Makra Z, Neuperger P, Szabó E, Balog JÁ, **Flink LB**, Kari B, Hackler L Jr, Puskás LG, Kanizsai I, Szebeni GJ. A cytotoxic survey on 2-amino-1H-imidazol based synthetic marine sponge alkaloid analogues. *Drug Dev Res.* 2022 Dec;83(8):1906-1922. doi: 10.1002/ddr.22006.
IF: 3.8 (Folyóirat szakterülete: Scopus – Drug Discovery, Helyzete: Q2)
- IV. Ghaffarinia A, Ayaydin F, Póliska S, Manczinger M, Bolla BS, **Flink LB**, Balogh F, Veréb Z, Bozó R, Szabó K, Bata-Csörgő Z, Kemény L. Psoriatic Resolved Skin Epidermal Keratinocytes Retain Disease-Residual Transcriptomic and Epigenomic Profiles. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 25;24(5):4556. doi: 10.3390/ijms24054556.
IF: 5.6* (Folyóirat szakterülete: Scopus – Medicine (miscellaneous), Helyzete: Q1)

1. Bevezetés

1.1. A pikkelysömör jellemzői

A krónikus plakkos típusú pikkelysömör (*Psoriasis vulgaris*) egy multifaktoriális, főleg Th1 és Th17 útvonal által közvetített gyulladáscsökkentő bőrbetegség, amely a pikkelysömör leggyakoribb típusa. A plakkos típusú pikkelysömörre jellemző a keratinociták hiperproliferációja, az immunsejtek fokozott beszűrődése és a bazális membrán (BM) megváltozott összetétele, melyek a bőrön száraz, vörös, pikkelyes foltokat eredményeznek. A pikkelysömör patomechanizmusa csak részben ismert, a betegség kialakulásában exogén- és endogén tényezők egyaránt szerepet játszanak. Ismert, hogy a pikkelysömör más betegségekkel is társulhat, leggyakrabban ízületi gyulladással, de az újonnan megjelent tanulmányok összefüggést mutatnak az elhízással, pszichés zavarokkal, szív- és érrendszeri, és anyagcsere-betegségekkel is. A gének és a környezeti tényezők egyaránt döntő szerepet játszanak a pikkelysömör kialakulásában, melyek együttesen járulnak hozzá a tünetek megjelenéséhez. A genom-szintű asszociációs vizsgálatok (genome-wide association study, GWAS) több pikkelysömörre hajlamosító lokuszt azonosítottak a humán genomban. A betegségben a dendritikus sejtek, a T-sejtek és a keratinociták, mint nem professzionális immunsejtek is szerepet játszanak, sőt, az NK-sejtek is részt vesznek a tünetek kialakulásában.

A legújabb terápiákkal, ugyan tartós tünetmentesség érhető el, azonban a kezelés felfüggesztése esetén a tünetek nagyon gyakran ismét megjelenhetnek ugyanazonokon a területeken, ahol korábban is volt tünet, ami arra utal, hogy a gyógyult területeken egy úgy nevezett „molekuláris heg” marad, továbbá olyan epigenetikai változásokat is azonosítottak a gyógyult bőrből származó keratinocitáiban, amelyek hozzájárulhatnak a tünetek visszatéréséhez.

1.2. A pikkelysömörös tünetmentes bőr bazális membránjának rendellenességei

Számos adat utal arra, hogy a fenotípusosan egészséges kinézetű, pikkelysömörös tünetmentes bőrben már jelen vannak a dermális-epidermális junkció és a BM elváltozásai, melyek hasonlóságot mutatnak sebgyógyulási folyamatokkal. A pikkelysömörös tünetmentes BM-ben a laminin-1 nem folytonos, továbbá, mind a tünetmentes, mind a tünetes bőrből hiányzik laminin- α 1 lánc, mely a normál BM szerkezet fenntartásához szükséges. Kutatócsoportunk korábbi munkái arra utalnak, hogy a porc oligomer mátrix fehérje (cartilage oligomer matrix protein, COMP) fokozottan fejeződik ki a dermális-epidermális junkcióterületén a tünetmentes bőrben. A COMP képes kölcsönhatásba lépni a bazális keratinocitákkal az α 5 β 1-integrinen keresztül, megakadályozva ezzel a proliferációt. A tünetmentes bőrben a bazális keratinociták fokozottan fejezik ki az α 5 β 1-integrint, mely a fő

fibronektin (FN) receptor. A normál bőrrel ellentétben, mind a plazma, mind a celluláris FN eltérést mutat a pikkelysömörös tünetmentes bőrben. Kimutatták, hogy a dermális-epidermális junkció területén plazma FN van jelen a bazális keratinociták körül, ami a kóros BM szerkezetből fakadhat. A tünetmentes keratinocitákról és fibroblasztokról ismert továbbá az is, hogy fokozottan képesek az extra A domént tartalmazó FN (extra domain-A FN, EDA⁺FN) termelésére a normál sejtekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben kompenzációs mechanizmusok működhetnek, melyek hatására a dermális-epidermális junkció régiójában fennálló rendellenességek ellenére a tünetmentes bőr egészségesnek tűnő fenotípust mutat.

1.3. A pikkelysömörös bőr és a sebgyógyulási mechanizmus közötti hasonlóságok

Több tanulmány kimutatta, hogy a pikkelysömör nagyfokú hasonlóságot mutat a gyógyuló sebekkel. A pikkelysömörös tünetes és tünetmentes bőr is lényegesen gyorsabban gyógyul, mint az egészséges egyének bőre. Mind a sebgyógyulásban, mind a pikkelysömörben jelen van a keratinociták hiperproliferációja, a gyulladáshoz vezető sejtek beszűrődése és a neovaszkularizáció is, valamint hasonlóság figyelhető meg a filaggrin, a transzglutamináz, az involucrin, a keratin-1, a keratin-10, a keratin-6 és a keratin-16 kifejeződésében is. Egyes antimikrobiális peptidok nemcsak sérülés esetén, hanem a pikkelysömörös bőrben is termelődnek. Mind az EDA⁺FN, mind a receptora, az $\alpha 5\beta 1$ integrin kulcsszerepet játszik a sebgyógyulásban, ahol fokozódik a termelődésük, és ez a tendencia a pikkelysömörben is jelen van. A normál sebgyógyulás során a COMP kifejeződése minimális a nem gyógyuló sebekkel ellentétben, ahol a COMP túlzott mértékben fejeződik ki, hasonlóan a pikkelysömörös tünetmentes bőrhöz. *Ex vivo* sebgyógyulás modellben pedig a COMP-kezelés csökkentette a keratinociták proliferációját, ami sebgyógyulás késleltetését eredményezte.

A bőr sérülése során a BM is sérül. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a sebágyban a BM károsodott, a pikkelysömörös tünetmentes bőrhöz hasonlóan, ahol egyes régiókban a laminin réteg egyenetlen, és az EDA⁺FN, az $\alpha 5\beta 1$ -integrin és COMP kifejeződése fokozott. Régóta ismert, hogy pikkelysömörben a BM szaggatottsága kulcsfontosságú a tünetek kialakulásában, és a szolubilis FN behatolhat az epidermiszbe, ezzel mikrosebket fejlesztve.

A mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) szintén fontos részvevői a sebgyógyulásnak. Kimutatták, hogy az MMP-2, az MMP-9 és a 2-es típusú szöveti mátrix metalloproteinázok inhibitora, a TIMP-2, szintje mind megemelkedik a pikkelysömörös tünetmentes bőrben. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a keratinocita növekedési faktor (KGF) és receptora, a KGFR egyaránt fokozottan fejeződik ki a pikkelysömörös tünetmentes bőrben, ami

a sebgyógyulás aktiválására utal. A pikkelysömörös tünetmentes keratinociták szintén szignifikánsan magasabb proinflammatorikus IL-1-et fejeznek ki az IL-17 jelenlétében.

1.4. A periostin jellemzése és annak szerepe a gyulladásos betegségekben

A periostin egy 90 kDa-os extracelluláris mátrix (ECM) fehérje, amely 3 fő doménből áll; EMI, Fas1 és C-terminális. A bőrben a periostin elsősorban a papilláris dermiszben és a dermális-epidermális junctionban található. Mind a keratinociták, mind a fibroblasztok termelik, képes kötődni más ECM-molekulákhoz, például az I-es típusú kollagénnel, a FN-hez és integrinhez, beleértve az $\alpha 5\beta 1$ -integrin is. Jól ismert, hogy kulcsfontosságú szerepet játszik a sebgyógyulásban.

A periostin szerepét széles körben vizsgálták az atópiás dermatitiszben (AD), amely szintén gyulladásos bőrbetegség, viszont immunpatológiája eltér a pikkelysömörétől. Kimutatták, hogy a periostin fontos szerepet játszik a Th2 útvonal által közvetített gyulladásos betegségekben, mint például az AD, ahol az IL-4 és IL-13 aktiválja a periostin termelést a fibroblasztokban. A periostin nem csak a gyulladt dermiszben, hanem az AD-s betegek szérumban is megemelkedik, és szintje korrelált a betegség súlyosságával is.

Asztmában a légúti hámsejtek IL-13 által indukált periostint fejeznek ki, amelyek fokozzák az asztmás tüneteket. Rheumatoid arthritisben a periostin szintje megemelkedik a szérumban, és az ízületi szövetből és az ízületi folyadékból származó sejtekben is fokozott kifejeződést mutat.

A periostin az artériák meszesedését is képes előidézni, ezáltal szerepet játszik az érlemezésben is.

2. Célkitűzés

A pikkelysömör egy gyulladásos betegség, amely leginkább a bőrt és az ízületeket érinti. A pikkelysömörös tünetmentes bőrben már olyan elváltozások vannak jelen, beleértve a BM eltéréseit, amelyek a dermális-epidermális junction mentén „mikrosebekben” nyilvánulnak meg. A BM rendellenességek közé tartozik többek között az EDA⁺FN, az $\alpha 5\beta 1$ -integrin és a COMP túlzott kifejeződése, valamint a laminin réteg egyenetlensége. A periostin egy ECM fehérje, amely kölcsönhatásba léphet számos molekulával, beleértve más ECM fehérjéket is, mint például az $\alpha 5\beta 1$ -integrin. Számos szövetben megtalálható, így a bőrben is, ahol normál körülmények között a dermiszben lokalizálódik. A főként Th2 útvonal által közvetített AD-ban a periostin fontos szerepet játszik, ahol szérumban biomarkerként szolgál, mivel ott megnő a mennyisége, és ez a növekedés korrelációt mutat a betegség súlyosságával, továbbá a gyulladt dermiszben is megnő a kifejeződése. Az AD-vel ellentétben a periostin funkciója pikkelysömörben nem ismert.

Ezen korábbi eredmények alapján célul tűztük ki a periostin lehetséges szerepének vizsgálatát a pikkelysömör patomechanizmusában.

Célunk volt

- a szérumban a periostin szintjének meghatározása kezeletlen és szisztémásan kezelt pikkelysömörös betegekben és egészséges egyéneknél.
- a periostin szöveti kifejeződésének vizsgálata egészséges, pikkelysömörös tünetmentes, tünetes és gyógyult, korábban tünetes bőrben.
- a periostin fehérje szintjének meghatározása az egészséges, pikkelysömörös tünetes, gyógyult és egészséges bőrben, valamint a fehérje mRNS kifejeződésének vizsgálata egészséges, pikkelysömörös tünetmentes és tünetes bőrben.
- a periostin kifejeződés tanulmányozása, különböző típusú *ex vivo* sebgyógyulás modellekben.
- egy új *ex vivo* BM-sérülés indukált bőrmodell létrehozása a periostin és a β 1-integrin kifejeződésének vizsgálatára, mivel a pikkelysömörös bőrben a BM-ben „mikrosebek” vannak jelen.
- a periostin és a β 1-integrin közötti potenciális kapcsolat tanulmányozása *in vitro* sebgyógyulás modellben.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták gyűjtése

Vizsgálatainkba krónikus plakkos típusú pikkelysömörben szenvedő betegeket vontuk be, és meghatároztuk a kezdeti Psoriasis Area Severity Index (PASI) értéküket. Összesen 105 pikkelysömörös betegtől és 49 egészséges önkéntestől gyűjtöttünk szérumban mintát. A kezeletlen betegek (n=41) a mintavétel előtt 4 héttel nem részesültek lokális, és 8 héttel szisztémás kezelésben. A kezelt betegek (n=64) különböző típusú biológiai terápiákat vagy immunszuppresszánsokat kaptak. Punch biopsziákat (6 mm átmérőjű) gyűjtöttünk a kezeletlen pikkelysömörös betegek tünetes (n=4) és tünetmentes (n=4, legalább 6 cm-re a léziótól) bőrterületeiről, valamint egészséges egyénektől (n=4). A különböző *ex vivo* sebgyógyulási modellekhez szintén egészséges egyénektől került begyűjtésre bőrminta (n=5). Szisztémásan kezelt betegek gyógyult, korábban tünetes, (n=4) bőrterületeiről gyűjtöttünk mintát. A Helsinkai Nyilatkozat szabályait követve minden donor írásos beleegyezését adta a mintavétel előtt. A tanulmány protokolljait Szegedi Tudományegyetem Kutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá (HCEMM-001, 10/2020, 4702, 2020 január 20; PSO-VA0223-001, 65/2018, 4236, 2018

március 19, Szeged, Magyarország; PSO-CELL-01, 90/2021, 4969, 2021 április 26, Szeged, Magyarország; PSO-EDAFN-002, 34/2015, 3517, 2015 február 23, Szeged, Magyarország).

3.2. Sejtkultúrák

A keratinociták és fibroblasztok izolálására egészséges és gyógyult pikkelysömörös, korábban tünetes bőr biopsziákat használtunk. A primer keratinocitákat epidermális növekedési faktorról és szarvasmarha agyalapi mirigy kivonattal kiegészített szérumentes tápközegben, míg a fibroblasztokat alacsony glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápközegben tenyésztettük, amely 5% magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazott. Mindkét tápoldatot 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal és 1% L-glutaminnal egészítettük ki. A sejteket 75 cm²-es sejtenyésző flasksokban tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO₂ mellett, párasított körülmények között. A tápfolyadékokat 2-4 naponta cseréltük, és a sejteket 80%-os konfluenciánál passzáltuk. A keratinocitákat a harmadik passzázsban, a fibroblasztokat az ötödik passzázsban 80%-os konfluencia mellett használtuk a kísérletekhez.

3.3. A szérum periostin szintjének meghatározása

A szérum periostin szintjét szendvics típusú enzimhez kötött immunszorbens esszével (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

3.4. Génexpressziós adatok elemzése

A periostin génexpresszió elemzéséhez a GEO Profile adatbázist (GDS4602, ID:100674764) használtuk, amely nyilvánosan elérhető microarray adatokat tárol az egészséges (n=64), pikkelysömörös tünetes (n=58) és tünetmentes (n=58) bőrből.

3.5. Western blot vizsgálat

A bőr biopsziákat felaprítottuk és 6 M guanidin-hidroklorid oldatban inkubáltuk a fehérjék extrakciójához. A felülúszót összegyűjtöttük és etanol alapú precipitálást végeztünk, majd a pelletet 3 M ureában oldottuk vissza. A fibroblaszt és keratinocita tenyészeteket PBS oldatban gyűjtöttük össze, majd lizáltuk. A sejtlizátumokat, valamint az *ex vivo* sebgyógyulási és tenyésztett sóhasított modellek tápfolyadékát 4X loading pufferrel forraltuk, a szöveti kivonatokat pedig β -merkaptóetanollal kiegészítve forraltuk, majd az összes fehérje kivonatot 4-20%-os Mini-PROTEAN®TGX™ gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5%-os zsírszegény tejporos TBS-sel blokkoltuk, vagy 1% szarvasmarha szérumalbuminnal kiegészítve vagy anélkül, majd egy éjszakán át inkubáltuk egérben termeltetett anti-humán periostin, nyúlban termeltetett anti-humán periostin, nyúlban termeltetett anti-humán aktin vagy egérben termeltetett anti-humán GAPDH antitestekkel. A

kimutatást torma-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel végeztük, és a sávokat kemilumineszcens módszerrel és LI-COR C-DiGit blot szkennellettük láthatóvá.

3.6. A tape stripping, az *ex vivo* sebgyógyulási és tenyésztett sókezelt modellek létrehozása

A tape stripping modellek létrehozásához (n=3) a biopsziákat 10-szer egymást követően ragasztószalaggal befedtük, majd a szalagot letéptük. Az *ex vivo* sebgyógyulási modellekhez (n=5) 1 cm átmérőjű bőrminták közepét 4 mm átmérőjű punch késsel megsebesítettük. A tenyésztett sókezelt modellekhez (n=5) 6 mm átmérőjű bőr biopsziákat inkubáltunk 1 M NaCl-ban 5 órán át 4 °C-on. Az összes típusú sebzett mintát 24 vagy 72 órán keresztül levegő-folyadék határfelületen tenyésztettük inszerteken DMEM F12 tápfolyadékban, melyet 10% FBS-sel és 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal egészítettünk ki. A mintákat kriogél mátrixba ágyaztuk a festéshez, és a felülúszókat (n=3) begyűjtöttük.

3.7. Szöveti jelölések

3.7.1. Hematoxilin-eozin festés

A hematoxilin-eozin festést a tape stripping, az *ex vivo* sebgyógyulási és a tenyésztett sókezelt modelleken végeztük a gyártó utasításai szerint Leica ST5020 Multistainer készülékben.

3.7.2. Immunfluoreszcens jelölés

A fagyasztott, 4% paraformaldehiddel fixált és 0,25% TritonX-100 permeabilizált 6 µm-es bőrmetszeteket 3% normál kecskeszérummal és 1% szarvasmarha szérumalbuminnal blokkoltuk. Az immunjelöléshez egérben termeltetett anti-humán periostin és β1-integrin antitestet használtunk egy éjszakán át, amit Alexa Fluor 647-tel konjugált kecskében termeltetett anti-egér IgG másodlagos antitest követett. Izotípus kontrollként egér IgG1κ-t használtunk, a sejtmagokat pedig 4',6-diamidino-2-fenil-indollal jelöltük. A megjelenítést, a képfeldolgozást és a fluoreszcencia meghatározását Zeiss Axio Imager Z1 mikroszkóppal, ZEN 2012 Microscope Imaging szoftverrel és Fiji szoftverrel végeztük.

3.8. *In vitro* scratch assay

A primer egészséges keratinocitákat 6 lyukú edényekre szélesztettük $5 \cdot 10^5$ sűrűséggel, majd 5 órával a szélesztés után 1 µg/ml β1-integrin blokkoló antitestet adtunk hozzá. 24 óra elteltével a teljesen összenőtt tenyészeteket megkarcoltuk és 24 órán át tovább tenyésztettük, majd a sejteket összegyűjtöttük Western blot analízishez. A sebzáródást Zeiss AxioLab Vert.A1 mikroszkóppal követtük.

3.9. Statisztikai analízis

Minden adatot a kontroll csoportokra normalizáltunk. Két csoport összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük, több mint két csoport esetében Kruskal-Wallis vagy ANOVA tesztet, majd páros Wilcoxon tesztet vagy Tukey post hoc tesztet használtunk. A korrelációkat Spearman-féle teszttel határoztuk meg. *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$ vagy * $P < 0,05$ statisztikailag szignifikánsnak minősült. Az adatok elemzését és ábrázolását az R-Studio szoftverrel vagy a Prism-GraphPad 8 szoftverrel végeztük.

4. Eredmények

4.1. A szérumbeli periostin szintje a szisztémásan kezelt pikkelysömörös betegekben a legmagasabb, és független a klinikai jellemzőiktől

A gyulladáscsökkentő markerek szérumbeli szintjének (VEGF, survivin, uPar, FN adatok nincsenek feltüntetve) vizsgálatakor azt találtuk, hogy korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan a periostin fehérje szintje szignifikánsan emelkedett a pikkelysömörös betegekben. A szisztémásan kezelt betegek csoportjában volt a legmagasabb a periostin szérumbeli szintje. Nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a férfi és női betegek, illetve a fiatalabb és idősebb betegek között, és a testtömegindex (BMI) sem befolyásolta a mért periostin szinteket.

Ellentétben az AD-vel, amelyben a periostin szérumbeli szintje szorosan összefügg a betegség súlyosságával és aktivitásával, pikkelysömörben a szérumbeli periostin szintje nem korrelált a betegség súlyosságával. Végezetül, összehasonlítottuk a szérumbeli periostin szintjét biológiai és egyéb szisztémás terápiaiban részesülő betegekénél, de nem találtunk szignifikáns különbséget.

4.2. A periostin mRNS szintje lecsökken a pikkelysömörös tünetes bőrben

Megvizsgáltuk a periostin mRNS szintjét egészséges, pikkelysömörös tünetmentes és tünetes bőrben, melyhez a nyilvánosan elérhető GEO Profile adatbázisból származó adatokat használtuk fel. A tünetes bőrben szignifikánsan csökkent periostin mRNS kifejeződést detektáltunk a tünetmentes és egészséges bőrhöz képest.

4.3. A periostin kifejeződése a dermisszel ellentétben megemelkedik a pikkelysömörös bőr a bazális keratinocitáiban

Ismert, hogy egészséges bőrben a periostin a papilláris dermiszben helyezkedik el. A periostin immunfluoreszcens jelölésével kimutattuk, hogy a pikkelysömörös kezeletlen betegek tünetes és tünetmentes bőrén, valamint, különösen a kezelt betegek korábban tünetes, gyógyult bőrén a periostin kifejeződése alacsonyabb volt a dermiszben az egészséges bőrhöz képest. Ezzel ellentétben, az epidermiszben a bazális keratinociták rétegében fokozott periostin kifejeződést figyeltünk meg, amely a legintenzívebben a gyógyult, korábban tünetes bőrben volt detektálható. Western blot analízissel szignifikánsan alacsonyabb periostin szintet találtunk

a teljes bőrből származó kivonatokban mind a tünetes, mint a gyógyult mintákban az egészséges bőrből származó mintákhoz képest. A Western blot analízis kimutatta, hogy a gyógyult bőrből származó keratinociták periostin kifejezése is megemelkedik az egészséges sejtekhez képest.

4.4. A dermális fibroblasztokban a periostin termelése eltérő mintázatot mutat az epidermális keratinocitákétól

Ismert, hogy a periostint mind a keratinociták, mind a fibroblasztok különböző molekuláris hatásokra fejezik ki. Megvizsgáltuk, hogy az egészséges bőrből származó tenyésztett fibroblasztok és a keratinociták hogyan fejezik ki a periostint, és azt is találtuk, hogy mindkét tenyésztett sejttípus képes a periostin termelésére, azonban a periostin monomer formája jellemzőbb volt a fibroblasztokra.

4.5. A periostin kifejeződése megnő az *ex vivo* sebgyógyulási és a tenyésztett sókezelt modellekben, ellentétben a tape stripping modellekkel

A különböző típusú sérülések periostin kifejeződésre gyakorolt hatásának vizsgálatára *ex vivo* bőrt felhasználva különböző sebzés típusokat alkalmaztunk: ún. tape stripping modellt az AD-re jellemző sérült barrier modellezésére; 3D *ex vivo* sebgyógyulási modellt, ahol klasszikus módon sebet ejtettünk; és újonnan kifejlesztettünk egy sóval kezelt, majd tenyésztett modellt, is, ahol a kezeléssel BM sérülést idéztünk elő. A tape stripping modellben nem volt megfigyelhető a periostin kifejeződése a bazális keratinocitákban 24 és 72 óra elteltével sem. Ezzel ellentétben, az *ex vivo* sebgyógyulási modellben 24 óra elteltével a sebszéleken intenzív periostin kifejeződést figyeltünk meg a bazális keratinocitákban. A tenyésztett sókezelt mintákban fokozott periostin kifejeződést figyeltünk meg a bazális keratinociták rétegében 72 óra elteltével, összehasonlítva a 24 órás modellel. Mivel a bazális keratinocitákban a periostin fokozott kifejeződését figyeltük meg, az *ex vivo* sebgyógyulási modellből a sebzések utáni 0. és 24. órában felülúszót gyűjtöttünk, valamint a tenyésztett sóhasított modellek felülúszójából is mintát gyűjtöttünk 0, 24 és 72 órával a sebzés után. A bazális keratinocitákban megfigyelt megemelkedett periostin kifejeződéshez hasonlóan megemelkedett periostin szintet mértünk a felülúszókban is.

4.6. Az periostinhoz hasonlóan, a β 1-integrin kifejeződése is megemelkedik a bazális keratinocitákban mind az *ex vivo* sebgyógyulási, mind a tenyésztett sókezelt modellekben

Korábbi adataink arra engednek következtetni, hogy a β 1-integrin kulcsfontosságú szerepet játszik BM sérülés esetén az epidermisz stabilizálásában a pikkelysömörös tünetmentes bőrben. Annak vizsgálatára, hogy a bazális keratinocitákon lévő β 1-integrin érzékeli képes-e a sérüléseket, és ezáltal potenciálisan hozzájárulhat-e a BM sérülés által kiváltott fokozott

periostin kifejeződéshez, immunfluoreszcens festést végeztünk a tenyésztett *ex vivo* sebgyógyulási és tenyésztett sókezelt modelleken. Hasonlóan a periostinhoz, a sebzés után 24 órával a bazális keratinocitákban is megnövekedett β 1-integrin kifejeződést detektáltunk az *ex vivo* sebgyógyulási, valamint a tenyésztett sókezelt modellekben is a 72 órás mintákban a 24 óráshoz képest.

4.7. A periostin kifejeződése lecsökken β 1-integrin blokkolásra normál humán epidermális keratinocitákban

Annak vizsgálatára, hogy a β 1-integrin közvetítheti-e a periostin termelését, β 1-integrin-blokkolást alkalmaztunk *in vitro* scratch, azaz karcolásos sebgyógyulási vizsgálatban, normál humán keratinociták felhasználásával. A β 1-integrin blokkolása a sebek késleltetett záródását eredményezte a nem blokkolt normál keratinocitákhoz képest. A Western blot analízis kimutatta, hogy a periostin termelés lecsökkent a keratinocitákban a β 1-integrin blokkolásra a nem blokkolt kontrollhoz viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a β 1-integrin elengedhetetlen a megfelelő sebgyógyuláshoz, és hozzájárul a periostin indukciójához is.

5. Megbeszélés

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a pikkelysömör nem csak a bőrt érintő betegség, hanem szisztémás gyulladással járó betegségnek is tekinthető, amely a keringésben megjelenő rendellenességekkel jár. A periostin különböző gyulladással járó betegségekben is szerepet játszik, például az asztmában, érlemezésben, reumás ízületi gyulladásban és más bőrbetegségekben, mint például az AD. Megemelkedett szérumban periostin szintet mutattak ki az AD és pikkelysömörben szenvedő betegeknél, de szintje az AD-ben volt a legmagasabb, és korrelált a betegség súlyosságával. Az AD-ben a tünetek javulásával a szérumban periostin szintje a normál szintre lecsökkent. Vizsgálataink során szignifikánsan emelkedett szérumban periostin szintet azonosítottunk pikkelysömörben szenvedő betegekben az egészséges egyénekhez képest, azonban a periostin szintje az AD-s betegekkel ellentétben a szisztémásan kezelt betegeknél volt a legmagasabb. Bár a pikkelysömörös betegek szérumban periostin szintje tendenciózus korrelációt mutatott a betegek életkorával, nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a betegek klinikai adataival. A pikkelysömörben végzett megfigyelésünkhöz hasonlóan, a reumatoid arthritisben is kimutatták, hogy a remisszióban lévő betegek szérumban periostin szintje magasabb volt, mint az egészséges egyéneké, ami összefüggésre utal a szérumban periostin szintje és a tünetek javulása között.

Az AD-ben a gyulladt bőrt fokozott fibroblaszt-proliferáció, a BM-megvastagodása és az ECM fehérjék fokozott termelése jellemzi, mely során a periostin termelődése is megnő. Hasonló szöveti elváltozások vannak más Th2 útvonal által közvetített betegségekben is, mint

például az asztma, ahol a szérumban a periostin szintje a gyulladásos aktivitást tükrözi, így a betegség biomarkereként szolgál. Az AD-s bőrrel szemben periostin pozitivitást találtunk a tünetes és a tünetmentes bőr bazális keratinocitáiban is az egészséges bőrhöz képest, ugyanakkor a kezeletlen betegek tünetes bőrén a periostin eloszlása lecsökkent a dermális-epidermális junctionál, amit az mRNA szintje és a western blot analízis is igazolt. Mivel a legjelentősebb szérumban a periostin szintet a szisztémásan kezelt pikkelysömörben szenvedő betegeknél mutattuk ki, megvizsgáltuk a gyógyult, korábban tünetes bőr periostin kifejezését is. A gyógyult bőrben csökkent mértékű periostin eloszlást figyeltünk a dermisben, ezzel ellentétben az epidermisben a bazális keratinociták mutatták a legintenzívebb periostin pozitivitást. A gyógyult keratinociták az egészséges sejtekhez képest jelentősen nagyobb mértékben termeltek periostint *in vitro* tenyészetekben, ami a sejtek aktivált állapotára utal. A tenyésztett primer normál humán keratinociták és fibroblasztok western blot analízise során azt tapasztaltuk, hogy a periostin monomer formája jellemzőbb volt a fibroblasztokra. Továbbá, a fibroblasztokból származó monomer periostin forma hasonló volt ahhoz, amit a western blot analízissel a teljes szöveti extraktumokban detektáltunk, ami arra utal, hogy a fibroblasztok jelentős mértékben hozzájárulnak a teljes bőr periostin tartalmához. Ismert, hogy az IL-4 és az IL-13 képes serkenteni a fibroblasztok periostin termelését, valamint a periostin kifejeződése az AD-s betegek tünetes dermisében is megemelkedik, ám az epidermális keratinociták periostin pozitivitása nem mutatható ki. Az IL-13 periostin-függő módon képes aktiválni az IL-24-et a keratinocitákban, ami a filaggrin szintézis csökkenését okozza, ami így az epidermális barrier diszfunkciójához vezet AD-ben.

Számos tanulmány leírta, hogy mind a pikkelysömörös tünetmentes, mind a tünetes bőr hasonlóságot mutat a sebgyógyulási folyamatokkal, továbbá ismert a keratinociták aktivációja is a sebgyógyulás során. A tünetmentes bőrben már beszámoltak a keratinociták „pre-aktivált” állapotáról. Leírták azt is, hogy az egér bőrén a sebzés után a periostint a migráló, azaz vándorló keratinociták fejezik ki. Mivel pikkelysömörben a dermális-epidermális junctionában jelenlévő BM eltérések már a tünetmentes bőrben is jelen vannak, valamint a BM-ban mikrosebek fordulhatnak elő és a keratinocitákban is sebgyógyulásszerű folyamatok indukálódnak, ezért létrehoztunk egy tenyésztett sókezelt modellt a BM sérülések modellezésének érdekében. A sókezelt modellben a keratinociták megnövekedett periostin kifejeződése azt jelzi, hogy a periostin termelés indukációjáért hozzájárulhatnak a dermális-epidermális junctiona sérülései. Ez a sebgyógyulásszerű folyamat a tünetmentes és a tünetes bőrben is jelen van, és a gyógyult, korábban tünetes bőrben a sebgyógyulási folyamat bekapcsolva maradhat, mely felerősödhet a terápia hatására. Azonban további vizsgálatokra

van szükség annak megválaszolásához, hogy ezek a változások meddig vannak jelen a gyógyult bőrben. Az *ex vivo* sebgyógyulási és tenyésztett sóhasított sebmodelljeink felülúszójában mért emelkedett periostin szint arra utalhat, hogy a bazális keratinociták aktiválódása során termelődött periostin felszabadulhat, ami részben magyarázhatja a szisztémásan kezelt pikkelysömörös betegekben észlelt emelkedett szérum periostin szintet. Korábbi állatkísérletek kimutatták, hogy a periostin elősegíti az artériák meszesedését, és hiánya védelmet nyújt az érlemeszesedés ellen, a megnövekedett szérum periostin így szerepet játszhat a pikkelysömörben szenvedő betegeknél leírt szisztémás gyulladásban.

AD-ben az epidermális barrier sérülése a keratinociták felső rétegében lokalizálódik, ezért az AD bőr modellezésére a tape stripping sebgyógyulási modellt alkalmaztunk. Ebben a modellben a periostin kifejeződése nem indukálódott a keratinocitákban, ami azt jelzi, hogy a bőr epidermális barrierjének károsodása nem indukálja a periostin kifejeződését a keratinocitákban. A pikkelysömörös bőr kóros BM szerkezetét az integrinek képesek érzékelni. A rendellenes BM szerkezet és a BM-et érő sérülések a keratinociták túlzott $\alpha 5\beta 1$ -integrin termelését eredményezik. Korábban már beszámoltunk arról, hogy a $\beta 1$ -integrin és a COMP fehérje kölcsönhatásba léphetnek egymással a pikkelysömörös tünetmentes bőrben a szakadozott laminin réteg miatt. A $\beta 1$ -integrin blokkolása a periostin kifejeződésének csökkenését eredményezte a karcolásos sebgyógyulási modellünkben, ami azt jelzi, hogy a $\beta 1$ -integrin közvetítheti a periostin termelődését sebzéskor. A PI3K/AKT a növekedési faktorok fő szabályozója, és részt vesz a periostin kifejeződésének szabályozásában is, valamint ismert, hogy, a TGF- β és az integrinek ezen az úton is aktiválhatják a periostin termelődését. Bár nem vizsgáltuk a pontos mechanizmust arra vonatkozóan, hogy a $\beta 1$ -integrin hogyan indukálja a periostin termelést, további kísérletek feltárhatják, hogy bazális keratinocitákban BM sérülés hatására a $\beta 1$ -integrin a PI3K/AKT útvonalon keresztül befolyásolhatja-e a periostin kifejeződését. Összefoglalva, a $\beta 1$ -integrin közvetítheti a bazális keratinociták rendellenes BM-indukálta periostin kifejeződést, így az a BM sérülések érzékelőjeként szolgálhat.

Ez az első tanulmány, amely leírja a megnövekedett periostin kifejeződést a pikkelysömörös keratinocitákban, ami potenciálisan hozzájárulhat a betegségben kimutatott megnövekedett szérum periostin szinthez. Ellentétben az AD tünetes bőrével, ahol a Th2-típusú citokinek stimulálják a fibroblasztokat a periostin termelés fokozására, a pikkelysömörös bőrben a bazális keratinociták kulcsszerepet játszanak a fokozott periostin termelésben. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a bazális keratinociták aktivált állapotban vannak a pikkelysömörös tünetmentes, a tünetes és leginkább a gyógyult, korábban tünetes epidermiszben, és sebgyógyuláshoz hasonló fenotípust mutatnak, mely a periostin fokozott

kifejeződésében mutatkozik meg, ami a rendellenes BM-et tükrözi. A $\beta 1$ -integrin, amely szintén megnövekedett mértékben fejeződik ki a sejtekben, hozzájárul a fokozott periostin termeléshez. Eredményeink azt is bemutatják, hogy a szöveti rezidens sejtek hogyan aktiválódnak a szövetben bekövetkező különböző sebzési behatásokra. A BM által kiváltott kóros sebgyógyulás, mint potenciális kompenzációs mechanizmus már a tünetmentes bőrben beindul, jelen van a lézióban, és a terápia hatására felerősödik, majd a gyógyult bőrben is aktív marad.

ÖSSZEFOGLALÁS

A pikkelysömör egy Th1 és Th17 útvonal által közvetített gyulladós bőrbetegség, ahol a BM eltérései már jelen vannak a tünetmentes bőrben is. Ezen BM elváltozások közé tartozik az EDA⁺FN, az $\alpha 5\beta 1$ -integrin és a COMP fokozott kifejeződése, valamint a szakadozott laminin réteg is. A periostin számos szövetben jelen van, beleértve a bőrt is, ahol normál körülmények közt a dermiszben található meg, és képes kölcsönhatásba lépni számos más ECM-molekulával, például az $\alpha 5\beta 1$ -integrinnel.

Ebben a tanulmányban kimutattuk, hogy pikkelysömörben a szérum és a bazális keratinociták periostin termelése megemelkedik. Továbbá a szisztémásan kezelt betegek szérumában azonosítottuk a legmagasabb szinten a periostin fehérjét, amely emelkedett szérumszintek függetlenek voltak a betegek klinikai adataitól.

Az immunfluoreszcens festés intenzív periostin kifejeződést mutatott ki a bazális keratinociták rétegében a pikkelysömörös tünetes, tünetmentes és különösen a gyógyult, korábban tünetes bőrben, ellentétben az egészséges bőrrel. A dermiszben azonban lecsökkent a periostin eloszlása a pikkelysömörös tünetes, tünetmentes és különösen a gyógyult bőrben, mely az epidermiszben megfigyelt jelenségekkel ellentétes.

Különböző *ex vivo* sebgyógyulási modelljeink, különösen a BM sérülés modellünk, a bazális keratinocitákban megnövekedett periostin kifejeződést, és a gyógyulás során a felülűszóban megemelkedett mennyiségű periostin jelenlétét mutatták ki. Azt is megállapítottuk, hogy modellünkben a periostin mellett a $\beta 1$ -integrin kifejeződése is hasonlóan megemelkedett a bazális keratinocitákban, blokkolása a karcos sebgyógyulási vizsgálatainkban pedig a periostin csökkenéséhez vezetett, így a fokozott periostin termelést a $\beta 1$ -integrin közvetítheti. Ezek az eredmények a periostin szerepére utalnak a pikkelysömörös bőr bazális keratinociták sebgyógyulási fenotípusában, ami a pikkelysömörös bőrben leírt BM-rendellenességek eredménye lehet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kemény Lajosnak, hogy részt vehettem a Ph.D. programban, és elvégezhettem a kísérleteimet a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laboratóriumában.

Ezúton is szeretném kifejezni hálámat mentoromnak, Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsannának a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján a kutatómunkám irányításáért, valamint a Ph.D. munkám során nyújtott folyamatos támogatásáért és tanácsaiért.

Köszönettel tartozom másik mentoromnak, Dr. Bozó Renátának a kutatómunkám irányításáért, tanácsaiért, a technikák megismertetéséért és az érzelmi támogatásért.

Köszönettel tartozom Dr. Papp Benjamin Tamásnak, aki a klinikai adatok kiértékelésében és a statisztikai elemzésekben segített.

Hálás vagyok Ameneh Ghaffariniának is, hogy segédkezett a biológiai minták gyűjtésében, az adatelemzésben és értékes tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom Kohajda Mónikának a folyamatos, fáradhatatlan segítségért és köszönöm továbbá Dr. Kui Róbertnek, Dr. Varga Ákosnak, Dr. Vigh András Istvánnak és Dr. Vidács László Dánielnek a pikkelysömörös betegek bevonását és a biológiai minták gyűjtésében való segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani minden önkéntesnek, aki vér- és bőrmintát biztosított.

Külön köszönettel tartozom kollégáimnak, Dr. Konczné Dr. Gubán Barbarának, Dr. Göblös Anikónak, Balogh Fanninak, Tariné Palotás Zsuzsannának és Dr. Buknicz Tündének az évek során nyújtott szellemi és technikai segítségéért, a támogatásukért és barátságukért.

Végül, de nem utolsósorban nagyon hálás vagyok minden családtagnak és barátoknak, akik végtelen szeretetükkel, türelmükkel, támogatásukkal és bátorításukkal segítettek.

Ez a tanulmány az EU Horizont 2020 kutatási és innovációs programjából a 739593. számú szerződés, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Iroda K135084 (Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna) és PD138837 (Dr. Bozó Renáta) keretében valósult meg. Munkánkat a Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatta azáltal, hogy részt vehettem a Ph.D. programban (H-1103 Budapest, Gyömrői u. 19-21.).