

A pikkelysömörös bőr proteomikai analízise, és a hiperozmotikus stressz hatása keratinocitákra

PhD értekezés tézisei

dr. Szél Edit



Szeged

2019

**A pikkelysömörös bőr proteomikai analízise,
és a hiperozmotikus stressz hatása keratinocitákra**

PhD értekezés tézisei

dr. Szél Edit

Témavezető:

Groma Gergely, Ph.D.

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2019

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. Szél E, Bozó R, Hunyadi-Gulyás É, Manczinger M, Szabó K, Kemény L, Bata-Csörgő Zs, Groma G: Comprehensive proteomic analysis reveals intermediate stage of non-lesional psoriatic skin and points out the importance of proteins outside this trend. *Sci Rep.* 2019 Aug 6;9(1):11382. doi: 10.1038/s41598-019-47774-5

IF: 4.011

- II. Szél E, Danis J, Sörös E, Tóth D, Korponyai Cs, Degovics D, Prorok J, Acsai K, Dikstein S, Kemény L, Erős G: Protective effects of glycerol and xylitol in keratinocytes exposed to hyperosmotic stress. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2019;12:323-331. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/CCID.S197946>

1. BEVEZETÉS

1.1 A pikkelysömör

A pikkelysömör (pszoriázis) egy krónikus gyulladáshoz vezető bőrbetegség, mely főként a bőr különféle belső és külső stimulusokra adott immunológiai válaszában tapasztalható eltérésekkel jellemezhető. Világszerte a populáció kb. 2%-át érinti, nemi különbségek nélkül. Leggyakoribb (90%) típusa a plakkos pszoriázis. A pikkelysömör pontos oka ismeretlen, azonban a genomszintű asszociációs vizsgálatok során (GWAS) több mint 50, a betegségre való kockázattal összefüggésben álló régiót azonosítottak. Ezen régiók kódoló génei az antigén prezentációval, az interleukin-23 (IL-23) tengellyel, a T-sejt fejlődéssel és polarizációval, a veleszületett immunitással és az immunválaszok negatív szabályozó elemeivel kapcsolatosak. A pikkelysömör nem csupán a bőrre lokalizált, hiszen a betegséget szisztémás gyulladás jellemzi. A társbetegségek közé tartozik az artritisz pszoriatica, a Crohn-betegség, daganatos betegség, a depresszió, a nem alkoholos zsírmáj, a metabolikus szindróma, valamint a kardiovaszkuláris betegségek. A pszoriázis hátterében álló eltérések megértése elengedhetetlenül fontos a betegség hatékonyabb kezelését szolgáló új terápiás lehetőségek kifejlesztése érdekében.

1.1.1 A pikkelysömörös bőr proteomikai vizsgálatai

Különböző, a pszoriázishoz hasonlóan igen összetett betegségek tanulmányozásának, a betegséggel összefüggő mechanizmusok értelmezésének egyik leghatékonyabb módja az érintett szövetekből származó fehérje kivonatok összehasonlító proteomikai analízise. Legjobb tudomásunk szerint ez idáig a széleskörű pszoriázis proteomikai vizsgálatok egyike sem hasonlította össze a tünetes és tünetmentes pikkelysömörös bőrterületeket (mind az epidermist és a dermist) az összehasonlításban referenciaként választott, egészséges egyénekből származó biopsziák bevonásával.

1.1.2 A pikkelysömörös tünetmentes bőr

A pikkelysömörös tünetmentes bőrt különféle külső és belső tényezőkre (pl. mechanikai stressz, alkohol) adott fokozott stresszválasz jellemzi, ami plakkok megjelenéséhez vezet. A pikkelysömörös plakk keletkezésének kulcsfolyamata az abnormális keratinocita proliferáció és differenciáció, mely többek között a bőr barrier funkciójának zavarát okozza.

1.2 A bőr sérült barrierfunkciója és a kapcsolódó ozmotikus hatás

A sérült barrierfunkció irritatív kontakt dermatitiszben (ICD) jelenti a fő patológiai eltérést. A barrier sérülése a bőr fokozott permeabilitásához és transzepidermális vízvesztéshez

(TEWL) vezet. A víz távozása magasabb ozmotikus nyomást eredményez a bőr felső rétegeiben, tehát a lokális hiperozmotikus stimulus hozzájárulhat a betegség kialakulásához.

A hiperozmolaritás csökkenti a sejtvitalitást és növeli az intracelluláris kalcium (Ca^{2+}) koncentrációt HaCaT keratinocitákban. Az ozmotikus stressz további intracelluláris változásokat is indukál. Epiteliális sejtekben a tumor nekrosis faktor-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), az IL-1 β , az IL-8, az IL-6 és az aktivált T-sejtek 5-ös nukleáris faktorának (NFAT-5) emelkedett mRNS szintű expresszióját találták hiperozmotikus körülmények között. Normál humán epidermális keratinocitákban is megfigyelték a $\text{TNF-}\alpha$, az IL-1 β , az IL-6 és az IL-8 emelkedett mRNS szintű expresszióját.

1.3 A poliolkok kedvező hatása a bőrre

A glicerol és a xilitol számos jól ismert kedvező hatást gyakorol a bőrre; antiirritáns és gyulladáscsökkentő hatásukat már korábban kimutattuk. Más *in vitro* kísérletekben a glicerol csökkentette a humán leukocita antigén-DR (HLA-DR) mRNS szintjét, a xilitol pedig gátolta a gyulladáscsökkentő citokin expressziót, illetve fokozta a filaggrin mRNS szintű expresszióját. Továbbá ismert, hogy a glicerol különböző baktériumfajok elsődleges ozmolit rendszerét alkotja. A glicerol és a xilitol ozmolit szerepköre a bőrben azonban még nem teljesen tisztázott.

2. CÉLKITŰZÉS

A pikkelysömörben feltételezhető eltérések mélyebb megértése érdekében célul tűztük ki a korábbi proteomikai vizsgálatok eredményeinek bővítését. A komplex összehasonlításba a tünetmentes és a tünetes bőr mellett egészséges bőrmintákat is bevontunk jelölés mentes szemikvantitatív proteomikai analízisünk során.

Továbbá célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a glicerol és a xilitol – mint ismert hatékony antiirritáns ágensek – védelmet nyújtanak-e a hiperozmotikus stressz ellen *in vitro*. Tanulmányoztuk a két poliolk sejtvitalitására, citotoxicitására, intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra és proinflammatorikus citokin expresszióra gyakorolt hatását hiperozmotikus körülmények között.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- **Résztevők, bőrminták:** Összesen 9 (3x3) krónikus plakkos pszoriázisban szenvedő beteget és ugyanennyi egészséges donort vontunk be vizsgálatunkba. Egészséges, tünetmentes és tünetes, 6 mm átmérőjű, epidermiszt és dermiszt tartalmazó „punch” biopsziákat vettünk a felső-középső gluteális régióról.
- **Az egészséges, tünetmentes és tünetes bőr összehasonlító proteomikai vizsgálata:** A mintákat pengével feldaraboltuk. A bőr fehérjéit szekvenciálisan, négy konszekutív, oldékonyág alapú extrakciós lépésben vontuk ki. Három donor ugyanazon sorszámú extraktumait az egyes vizsgálati csoportokban (egészséges, tünetmentes és tünetes) „pooloztuk”. Az extrakciós lépéseket 3-3 donorral háromszor ismételtük meg. Ezt követően a mintákkal folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás anlizist (LC-MS/MS) végeztünk. Az egyes fehérjék mennyiségi összehasonlításához az egészséges, tünetes és tünetmentes extraktumokban relatív peptid ion kromatogramok és spektrumszámlálás alapján határoztuk meg a szignifikáns különbségeket. Két különböző módszert használtunk: 1) módosított t-próbát (limma) és 2) „rank product” tesztet t-próbával. Két minta között egy fehérje mennyiségét akkor tekintettük különbözőnek, ha legalább az egyik statisztikai próba során szignifikáns eredményt kaptunk ($p < 0,05$) és az abszolút különbség legalább kétszeres volt.
- **UDP-glükóz-6-dehidrogenáz (UGDH) immunfluoreszcens festés:** Pikkelysömörös betegek tünetmentes és tünetes, valamint egészséges donorok bőrmintáit lefagyasztottuk és beágyaztuk, majd 5 μm -es metszeteket készítettünk. Fixálás, permeabilizálás és blokkolás után a metszeteket az UGDH ellen termeltetett, nyúl poliklonális primer antitesttel inkubáltuk. Mosást követően AF546 (kecske anti-nyúl IgG) szekunder antitestet alkalmaztunk.
- **Bioinformatikai analízis:** A pikkelysömör patomechanizmusával korábban még kapcsolatba nem hozott fehérjék azonosítása céljából a fehérje nevét vagy a fehérjét kódoló gén szimbólumát használva irodalomkutatót végeztünk. Az egyes fehérje, illetve gén neveket a „pszoriázis” kulcsszóval társítottuk az R szoftver RISMED csomagját használva. A proteomikai vizsgálat során megváltozott mennyiségben detektált fehérjékkel kapcsolatba hozható sejtszintű mechanizmusok azonosítására az „Ingenuity Pathway Analysis” (IPA) szoftvert használtuk.
- **Sejtkultúra:** HaCaT sejteket a megfelelő anyagokkal kiegészített Dulbecco-féle módosított Eagle-médiumban (DMEM-HG) tenyésztettünk.

- **Sejtviabilitás és citotoxicitás mérés:** A sejteket 0,27% glicerol, illetve 0,45% xilitol tartalmú szérum mentes DMEM-HG oldatban inkubáltuk 60 percig, amit 0,27% glicerolt, illetve 0,45% xilitolt vagy a két poliol egyikét sem tartalmazó, 450, 500 vagy 600 mOsm, szorbitol tartalmú tenyésztő médiummal való inkubáció követett 24 órán át. A sejtviabilitás esszé során 0,5%-os MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) oldatot adtunk a sejtekhez, majd a keletkezett formazán kristályokat szolubilizáltuk, és mértük az optikai denzitást (OD). A citotoxicitás meghatározását „Cytotoxicity Detection Kit PLUS”-szal (Roche Diagnostics, Risch, Switzerland) végeztük a gyártó utasításai szerint.
- **Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásainak mérése:** HaCaT keratinocitákat 13 mm átmérőjű, bevonatot nem tartalmazó steril fedőlemezekre helyeztünk. A fedőlemezekre kitapadt sejteket Tyrode-oldatban inkubáltuk, majd Ca^{2+} érzékeny fluoreszcens festékkel (Fluo-4) töltöttük fel. Ezt követően a sejteket 0,027 és 0,27% glicerol, illetve 0,045 és 0,45% xilitol tartalmú Tyrode-oldatban inkubáltuk. A fedőlemezeket Zeiss Axiovert 100 mikroszkóp kis térfogatú képfelvevő kamrájába helyeztük. A sejteket 450 mOsm, szorbitol tartalmú oldat rapid perfúziójával hiperozmotikus stimulusnak tettük ki, amit az A23187 ionofór hozzáadása követett.
- **RNS extrakció és valós idejű kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT qRT-PCR):** A sejteket 0,27% glicerolt vagy 0,45% xilitolt tartalmazó médiummal 60 percig előinkubáltuk, amit 450 mOsm, szorbitol tartalmú médiummal való inkubáció követett 2 órán át. Negatív kontrollként a kezeletlen sejtek, pozitív kontrollként a csak szorbitollal kezelt sejtek szolgáltak. TRIzol reagenssel a gyártó utasításai szerint RNS-t izoláltunk, és DNase kezelést végeztünk. 1 μg össz-RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk „iScript cDNA Synthesis Kit”-tel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Az RT qRT-PCR kísérleteket a „Universal Probe Library” rendszerrel végeztük. A relatív mRNS szinteket a $\Delta\Delta\text{Ct}$ módszerrel számítottuk ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Proteomikai eredmények

4.1.1 Az egészséges vs. tünetes bőr összehasonlítása, és az ehhez kapcsolódó biológiai folyamatok

A tünetes és egészséges bőrmintákat összehasonlítva 249 fehérje relatív mennyiségében találtunk különbséget. Ezekkel a fehérjékkel fehérje-fehérje kölcsönhatás alapú „enrichment” analízist végezve a következő kategóriákba tartozó biológiai folyamatokat azonosítottuk: fejlődés, proliferáció, expresszió szabályozás és stimulusra adott válasz.

Mivel a pikkelysömörben tapasztalható főbb eltérések között szerepel a megváltozott stressz- és immunválasz, valamint a proliferáció és differenciáció szabályozásának zavara, a tünetes bőrben az egészségeshez képest különbözően expresszálandó fehérjék között mind a négy folyamatban résztvevő, központi szabályozó elemeket kerestünk. Négy ilyen központi fehérjét azonosítottunk (MYBBP1A, PML, PRKDC és STAT1), melyek közül csak a STAT1-et hozták már korábban kapcsolatba a pszoriázissal.

Annak meghatározásához, hogy mely tünetes eltérések és milyen mértékben vannak jelen már a tünetmentes bőrben, az egészséges vs. tünetes bőrben különböző kifejeződést mutató 249 fehérje expressziós szintjét összehasonlítottuk a tünetmentes bőrben mért expressziós szintekkel. A tünetmentes bőrben a 249 fehérje 79,9%-a (199 fehérje) az egészséges, illetve a tünetes bőrrel való összehasonlításban kevesebb mint kétszeres eltérést mutatott. Tehát a fehérjék ezen csoportja egy közbülső diszkrét lépést reprezentálhat az egészséges-tünetes átmenetben.

4.1.2 Eltérő fehérje expresszió a tünetmentes és a tünetes bőrben, és az érintett fehérjékkel kapcsolatos biológiai folyamatok

A tünetmentes és a tünetes bőrproteom összehasonlítása 60, relatív mennyiségében legalább kétszeres eltérést mutató fehérje azonosításához vezetett. 34 fehérje kisebb, 26 nagyobb mennyiségben volt jelen a tünetmentes bőrben a tüneteshez képest. A 60 fehérje funkcionális enrichment analízise különböző, a pszoriázis patomechanizmusával kapcsolatos biológiai folyamatokat tárt fel, beleértve a fejlődést és a stimulusra adott választ. A tünetmentes vs. tünetes bőrben különbözően expresszálandó fehérjék között azonosítottunk olyanokat is, melyek az egészséges vs. tünetes összehasonlításban nem mutattak különbséget. Az egészséges bőrhöz képest 8 fehérje szintje a tünetmentes bőrben magasabb, a tünetes bőrben pedig alacsonyabb volt (tünetmentes>egészséges>tünetes), míg 1 fehérjénél ezzel ellentétes trendet figyelhettünk meg (tünetmentes<egészséges<tünetes).

4.1.3 A fehérje expresszió összehasonlítása tünetmentes és egészséges bőrben

7 fehérje magasabb, 1 alacsonyabb expressziós szintet mutatott tünetmentes bőrben az egészségeshez képest. A 8 fehérje közül a GBP1-et, a KLK10-et és az S100A7-et már kapcsolatba hozták a pikkelysömör patogenezisével, míg a további 5 fehérje a betegség potenciálisan új, korai markere. 4 fehérje (GART, CSE1L, GBP1 és UGDH) relatív mennyisége hasonló volt a tünetmentes és a tünetes bőrmintákban.

4.1.3.1 A proteomikai eredmények megerősítése: UGDH expresszió egészséges, tünetmentes és tünetes bőrben

A tünetmentes és az egészséges bőrproteom összehasonlításakor a legnagyobb expressziós különbséget az UGDH mutatta. Mivel az UGDH-t korábban még nem hozták kapcsolatba a pikkelysömörrel, további analízis céljából ezt a fehérjét választottuk ki. Immunfluoreszcens festéssel az UGDH hasonló epidermális megoszlást mutatott mindhárom típusú bőrmintában, azonban a festődés intenzitásában nyilvánvaló különbségek mutatkoztak: a tünetmentes és a tünetes pikkelysömörös minták robusztusabban festődtek az egészségesekhez képest, ami megerősíti proteomikai eredményeinket.

4.1.4 A pikkelysömörrel kapcsolatban már ismert és új trigger fehérjék

44 olyan fehérjét is azonosítottunk, melyek vagy csak a tünetes vs. tünetmentes, vagy csak a tünetes vs. egészséges összehasonlításban mutattak különbséget. Ezek a fehérjék feltehetőleg a betegség manifesztációjában és/vagy a tünetek fenntartásában játszanak szerepet. Egy számítógép-támogatott, kulcsszó alapú irodalomkutatás szerint a 44 fehérjéből 23-at már kapcsolatba hozták a pikkelysömörrel, míg 21 fehérjénél ez idáig nem találtak összefüggést a betegség patomechanizmusával.

4.1.5 A fehérje mennyiségekben detektált eltérésekkel kapcsolatos pikkelysömör biomarkerek, biológiai funkciók, kanonikus útvonalak és betegség annotáció

A korábban széleskörű genomikai, transzkriptomikai és/vagy proteomikai vizsgálatokban meghatározott biomarkerek közül az AKR1B10-et, a CSTA-t, az FABP5-öt, a PI3-at, az SCCA2-t, a STAT1-et, a STAT3-at és az S100 család tagjait (S100A2, A7-9) vizsgálatunk során is azonosítottuk. Ezek a molekulák magasabb expressziós szintet mutattak tünetes bőrben az egészséges kontrollhoz képest.

A proteomikai vizsgálatban megváltozott mennyiségben detektált fehérjékkel kapcsolatos sejtszintű mechanizmusok azonosítása céljából az IPA szoftverrel további analízist végeztünk. A betegség annotációban való keresés során a „pszoriázis” volt az első találat, amikor a tünetes vs. egészséges, illetve a tünetes vs. tünetmentes különbségeket hasonlítottuk össze.

Ugyanezeknél az összehasonlításoknál a biológiai funkciók annotációjában a „fehérje transzláció iniciációja” és a „*Staphylococcus aureus* elpusztítása” voltak a fő érintett funkciók. A „kanonikus ingenuity pathway” analízis során az „IL-17A szerepe psoriasisban” a 10 legszignifikánsabb kanonikus útvonal között szerepelt, akár a tünetes, akár a tünetmentes bőrt hasonlítottuk össze az egészséggel. Emellett különböző, daganatokkal kapcsolatos, neurológiai és neuromuskuláris kanonikus útvonalakat is azonosítottunk.

4.2 *In vitro* eredmények

4.2.1 A glicerol és a xilitol hatásai hiperozmotikus stressznek kitett HaCaT sejtek viabilitására

24 óra alatt a 600 mOsm szorbitol tartalmú médiumban szignifikánsan csökkent a viabilitás. Szintén jelentős csökkenést tapasztaltunk a poliollal is kezelt csoportokban, azonban a glicerollal való kezelésnél az életképesség értéke szignifikánsan magasabb volt a pozitív kontroll csoporthoz (DMEM-HG + szorbitol (600 mOsm)) képest. Az átlagos citotoxicitás értéke a 0,27% glicerollal + szorbitollal (600 mOsm) kezelt csoportban valamivel alacsonyabb volt, mint a megfelelő kontroll csoportban (DMEM-HG + szorbitol (600 mOsm)), azonban a különbség nem volt szignifikáns.

4.2.2 A 0,45% xilitol védelmet nyújtott a hiperozmotikus stimulus által indukált intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedéssel szemben

A 450 mOsm, szorbitol tartalmú oldattal kiváltott hiperozmotikus stresszt az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció gyors növekedése kísérte, amit a magasabb koncentrációjú (0,45%) xilitol szupprimált.

4.2.3 A poliolok preventív hatása az ozmotikus stressz következtében megemelkedett gyulladási citokin és NFAT5 mRNS expresszióra

A 450 mOsm szorbitol tartalmú médiumban jelentősen megemelkedett az IL-1 α , az IL-1 β , az IL-8 és az NFAT5 mRNS expresszió. Az IL-1 α expresszió emelkedését mind a 0,27% glicerol, mind a 0,45% xilitol megakadályozta. Az utóbbi koncentrációkban alkalmazott két poliollal mellett jelentősen alacsonyabb IL-8 expressziót mértünk ozmotikus stresszben; az expressziós szintek nem különböztek szignifikánsan a kezeletlen kontroll csoporttól. Az IL-1 β és az NFAT5 expressziót csak a 0,27% glicerol mérsékelte.

5. DISZKUSSZIÓ

Az egészséges, tünetmentes és tünetes bőr összehasonlítása proteomikai szinten hiányzott a korábbi széleskörű összehasonlító pszoriázis proteomikai vizsgálatokból. E hiány pótlásának céljából proteomikai analízisünk egészséges bőrmintákat is tartalmazott a pikkelysömörös tünetmentes és tünetes bőrminták mellett.

A tünetmentes vs. tünetes összehasonlításban különbözően expresszálódó 60 fehérje a tünetes vs. egészséges összehasonlításban különbséget mutató fehérjéknek csupán 24,1%-a (60 vs. 249), ami rámutat az egészséges bőr összehasonlításban való részvételének jelentőségére, a betegséggel összefüggő eltérések kimutatása céljából.

A tünetes vs. egészséges vagy a tünetes vs. tünetmentes összehasonlításban különbözően expresszálódó fehérjék alapján a betegség annotáció a pikkelysömörrel mutatta a legerősebb korrelációt. A tünetes vagy a tünetmentes bőrt az egészségeshez hasonlítva a „kanonikus ingenuity pathway” analízis az „IL-17A szerepe pszoriázisban” azonosítását eredményezte. Ezek az annotációk azonban daganattal, neurológiai, neuromuszkuláris vagy izombetegségekkel kapcsolatos mechanizmusokat is feltártak, melyek a pikkelysömör patomechanizmusában való érintettségre vagy a betegségek közötti hasonlóságokra utalhatnak. Mivel a proteomikai és az *in silico* analízis nem tud különbséget tenni sejttípusok között, és nem nyújt információt arról, hogy a mechanikailag összekapcsolt eltérések ugyanazon vagy különböző sejttípusokban történnek-e, további kísérletek szükségesek a feltárt sejtszintű mechanizmusok pszoriázis patomechanizmusával kapcsolatos pontos relevanciájának tisztázására.

A továbbiakban a pikkelysömör patogenezisében kulcsfontosságú folyamatokban – beleértve a stressz- és immunválasz szabályozását, a proliferációt és differenciációt – résztvevő potenciális központi fehérjéket is kerestünk. A központi fehérjék közül a STAT1-et már kapcsolatba hozták a betegséggel, azonban az azonosított további 3 fehérje – a MYBBP1A, a PML és a PRKDC – még nem került látótérbe. A MYBBP1A transzkripciós faktor fontos lehet a patomechanizmusban, mivel a stresszválaszt és a citokineket reguláló NF- κ B korepresszora. Ismert, hogy a PML fehérje egyik izoformája (PML-4) szabályozza az apoptózist és a növekedés szuppresszióját, míg a sejtmagi izoformák részt vesznek a génexpresszió szabályozásában az MHC-I lókuszon. A PRKDC a kettősszálú DNS-ben keletkezett törések felismeréséért és kijavításáért felel, és a c-myc és p53 foszforilációt mediálja, mely a pszoriázisban betöltött fontos szerepére utalhat.

Azon fehérjéket, melyek kifejeződése csak a tünetes bőrben változott meg, „trigger” fehérjéknek nevezzük, mivel az expressziójukban bekövetkező változások a betegség irányába történő elmozdulással hozhatók kapcsolatba. Ezen fehérjék közül a pikkelysömörrel összefüggésben korábban még nem említett fehérjéket két csoportra oszthatjuk. Az első csoport (SGCD, SYNM, MYH11 és ATP1B1) a szöveti mechanoszenzitivitáshoz járulhat hozzá. A második csoport (MPZ, PRX, CSPG4, CNTN1 ITGA8 és ATP1B1) az idegrendszerrel kapcsolatos, mely a perifériás idegrendszer érintettségére utalhat pszoriázisban.

A tünetmentes és az egészséges bőrt összehasonlítva 8 fehérjénél találtunk eltérő expressziót (CSE1L, GART, GBP1, KLK10, MYO18A, S1007A, SMARCA5 és UGDH). Ezek közül 4 fehérje (CSE1L, GART, GBP1 és UGDH) a betegségre hajlamosító tényező lehet, mivel hasonló expressziót mutattak a tünetmentes és a tünetes bőrben. Jelentőségüket figyelmen kívül hagytuk volna, ha az összehasonlításba nem vonunk be egészséges bőrmintákat. A 4 fehérje közül az UGDH mutatta a legnagyobb expressziós különbséget, melyet korábban még nem hoztak összefüggésbe a pikkelysömörrel. Ismert, hogy az UGDH indirekt módon fokozza a kondrocita proliferációt; feltehetőleg fokozott hialuronán termelés révén, mely különböző citokineket köt. Az UGDH *in vitro* termelődésének csökkentése és a következményes csökkent hialuronán termelés azonban nem befolyásolta a keratinocita proliferációt, mely arra utal, hogy a tünetmentes bőrben megfigyelt emelkedett UGDH önmagában nem elegendő a proliferáció módosításához.

További vizsgálataink során a tünetes és a tünetmentes bőrben manifesztálódó eltérésekre és azok mértékére fókuszáltunk. Meglepő, hogy a tünetes vs. egészséges összehasonlításban különbséget mutató 249 fehérje kb. 80%-a átmeneti expressziós szintet mutat a tünetmentes bőrben, mely valószínűleg az ottani korai, a tünetes bőrhöz hasonló elváltozások jelenlétére utal. Ettől a trendtől a fehérjék két csoportja eltérést mutat. 10 fehérje (CHCHD6, CHMP5, COLEC12, FLOT2, ITGA7, LEMD2, NOP56, PLVAP, RRAS és SMARCA5) relatív mennyisége különbözött a tünetmentes és a tünetes bőrben, azonban hasonló volt az egészséges és a tünetes mintákban. Ezek a fehérjék a tünetmentes bőrre karakterisztikus elváltozásokat jelenthetik. További 9 fehérjénél (CD207, COLEC12, CTSV, ITGA7, ITGA8, PLVAP, PSAPL1, SMARCA5 és XP32) az expressziós változások iránya különbözött a tünetmentes és a tünetes mintákban az egészségeshez viszonyítva. Ezekben a fehérjékben bekövetkező változások a tünetmentes állapot fenntartását szolgáló eltéréseket reprezentálhatják. A fehérjék utóbbi két csoportjával széleskörű irodalomkutatót végezve

megállapíthatjuk, hogy minden azonosított fehérje jelátviteli útvonalakkal hozható kapcsolatba különböző szinteken, a sejtfelszíntől a sejtmagig vagy a mitokondriumig. Ezen rendszerek zavara a külső jelekre való fokozott reakcióhoz vezethet, ami hozzájárulhat a pikkelysömörös plakkok fenntartásához.

A pikkelysömörös plakk keletkezésének kulcsfolyamatai az abnormális keratinocita proliferáció, differenciáció, és ezáltal a bőr barrier funkciójának sérülése. A proteomikai analízis során megváltozott mennyiségben detektált fehérjék között szerepel a nukleoszóma átrendeződési faktor komplex egyik összetevője, a SMARCA5. A bazális keratinocitákban csökkenő SMARCA5 szintek szükségesek a proliferációs folyamatok differenciáció irányába történő elmozdulásához. Az XP32 szintén az epidermális differenciációs komplex egyik összetevője, és kapcsolatban áll a bőr barrier funkciójával. További, a mechanikai stresszel (pl. SYN1) és az ozmoreguláció zavarai (pl. ATP1B1) kapcsolatos fehérjéket is azonosítottunk. Ezek az eltérések az abnormális barrier funkcióval együtt nemcsak psoriasisban, hanem irritatív kontakt dermatitiszben (ICD) is jellemzőek.

Az ICD egy gyakori foglalkozási betegség, melyet fokozott TEWL-hez vezető károsodott barrier funkció jellemez. A víz távozása a keratinocitákat magas ozmotikus nyomású közegnek teszi ki. Jelen tanulmány célja az ICD-vel feltehetően együtt járó ozmotikus hatás vizsgálata volt.

Az ozmotikus stressz ozmolaritás és időfüggő módon befolyásolja a sejtek életképességét. Vizsgálataink során a 24 órás 450 és 500 mOsm, szorbitol tartalmú médiummal való kezelés nem volt hatással a sejtek életképességére és a citotoxicitásra, azonban a 600 mOsm-os médiumban már szignifikánsan csökkent a viabilitás a kezeletlen kontroll sejtekhez képest.

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció méréséhez azonban 600 mOsm helyett 450 mOsm ozmotikus stresszt alkalmaztunk annak érdekében, hogy a poliolok Ca^{2+} koncentrációra gyakorolt protektív hatását a 600 mOsm ozmotikus stressz mellett megfigyelt sejthalál folyamatainak kiiktatásával tudjuk vizsgálni. Eredményeink szerint a xilitol megakadályozta a hiperozmotikus szorbitol oldat által indukált intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedést, míg a glicerol nem befolyásolta ezt a paramétert. E különbség okának, valamint a xilitol Ca^{2+} szignálra gyakorolt gátlásának hátterében lévő pontos mechanizmus feltárásához további vizsgálatok szükségesek.

A rapid Ca^{2+} válasz mellett az alkalmazott ozmotikus stressznek hosszabb távú hatásai is vannak. 450 mOsm, szorbitol tartalmú médium 2 órás expozíciója során növekedett az IL-1 α , az IL-1 β és az IL-8 expresszió HaCaT sejtekben. A hiperozmotikus stressz a TNF- α -t

reguláló, valamint az IL-1 és az IL-6 promóteréhez kötődő NFAT5 transzkripció faktor expresszióját is indukálja. Ebből következik, hogy jelen vizsgálatban az NFAT5 emelkedett expressziója hozzájárulhatott a fokozott citokin válaszhoz. A polioloak citokin expresszióra gyakorolt pozitív hatásait számos tényező magyarázhatja. A Ca^{2+} szignál szupprimálása és az NFAT5 expresszió gátlása mellett a glicerol és a xilitol „chaperon” ozmolitként a fehérje szerkezet stabilizálása révén is befolyásolhatja a gyulladási folyamatot.

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen vizsgálatban a pikkelysömörös tünetes, tünetmentes és egészséges bőrminták komplex összehasonlítását végeztük el szemikvantitatív proteomikai analízissel. Továbbá vizsgáltuk a glicerol és a xilitol hatásait hiperozmotikus körülmények között a pikkelysömört, az ICD-t és egyéb bőrszárazsággal járó betegségeket kísérő ozmotikus stressz *in vitro* modelljében.

- Az egészséges, tünetmentes és tünetes bőrminták összehasonlító proteomikai analízise során különféle fehérjéket azonosítottunk, melyek szerepet játszhatnak a pszoriázis patogenezisében. Ezek az eredmények erős alapot biztosítanak további vizsgálatokhoz.
- A tünetes és tünetmentes bőrben az egészségeshez képest ellentétes irányú expressziós változásokat mutató fehérjék a tünetmentes állapot fenntartásában játszhatnak szerepet, és jövőbeli terápiás célpontokként szolgálhatnak.
- A glicerol fenntartotta a sejtvitalitást, míg a xilitol szupprimálta a hiperozmózis indukálta Ca^{2+} szignált, és mindkét poliolt védelmet nyújtott néhány gyulladási citokin fokozott expressziójával szemben hiperozmotikus stresszben.
- A hasonló kémiai szerkezet ellenére a glicerol és a xilitol hatásaiban néhány eltérés mutatkozott. Ez arra enged következtetni, hogy a két poliolt együttes alkalmazása hasznos terápiás lehetőség lehet különféle bőrbetegségekben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani Dr. Kemény Lajos professzor úrnak, hogy lehetőséget biztosított a Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola PhD programjában való részvételre, és kísérleteim elvégzésére a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati Klinikájának laboratóriumában.

Köszönettel tartozom Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna és Dr. Széll Márta professzor asszonyoknak, továbbá Dr. Szabó Kornéliának és Polyánka Hildának a laboratóriumi munkámmal és a kéziratokkal kapcsolatos kiváló javaslataikért és felbecsülhetetlen értékű tanácsaikért.

Köszönöm F. Medzihradzky Katalin professzor asszonynak, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának és az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Kutatócsoportja minden tagjának a tartalmas konzultációkat és a proteomikai analízis elvégzését.

Külön köszönettel tartozom Dr. Shabtay Dikstein professzor úr ötleteiért és támogatásáért. Mérheterlenül hálás vagyok Dr. Groma Gergely témavezetéséért, folyamatos elérhetőségéért, bátorításáért és végtelen türelméért.

Emellett köszönetet mondok másik témavezetőmnek, Dr. Erős Gábornak ötleteiért és értékes javaslataiért. Munkatársai, Dr. Csányi Erzsébet, Dr. Kaszaki József, Dr. Szolnoky Győző, Dr. Hartmann Petra, Dr. Korponyai Csilla és Dr. Degovics Döníz szintén hozzájárultak a publikációs sikerhez.

Dr. Acsai Károly, Dr. Prorok János és Tóth Dániel segítséget nyújtottak a Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének laboratóriumában végzett kísérletekhez, melyért szintén hálás vagyok.

Köszönöm Dr. Manczinger Máténak a proteomikai eredmények statisztikai feldolgozásában biztosított segítségét.

Dr. Danis Judit köszönetet érdemel az *in vitro* kísérletekben való részvételért.

Megtiszteltetés volt számomra két hallgató, Bozó Renáta és Sörös Evelin bevezetése a laboratóriumi és kutatási tevékenységbe. Mindketten jelentős mértékben részt vállaltak a disszertáció elkészítéséhez szükséges laboratóriumi munkából.

A bőrminták gyűjtéséért Dr. Kui Róbertnek, Dr. Belső Nórának és Dr. Gál Brigittának, a minták szövettani feldolgozásáért Dr. Németh Istvánnak és Füg Róbertnének tartozom köszönettel.

Különösen hálás vagyok Kohajda Mónikának fáradhatatlan asszisztenciájáért.

Köszönöm minden munkatársamnak, hogy együtt dolgozhattunk.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon köszönöm minden családtagomnak, különösen férjemnek az elfogadást, a türelmet és a bátorítást.

A vizsgálat az NKFI (korábbi OTKA) PD116992, K111885 és GINOP-2.2.1-15-2016-00007, GINOP-2.3.2-15-2016-00020 kutatási díjak révén, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával (TAMOP-4.2.4.A/2-11-1/2012-0001 “Nemzeti Kiválósági Program” A2-SZGYA-FOK-13-0001) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma Nemzeti Tehetség Programjának (NTP-EFÖ-P-15-0473) támogatásával valósult meg.