

# Az acne kialakulásában szerepet játszó faktorok vizsgálata

## 1. Bevezetés

A pattanásos bőrbetegség (acne) a nyugati típusú fejlett országokban élő lakosság mintegy 80-90%-át érinti, főként a serdülőkor idején. Annak ellenére, hogy a betegség klinikailag jól ismert és jellemzett, a tünetek kialakulásának háttérében álló molekuláris folyamatok a mai napig nem ismertek minden részletükben. Számos olyan faktort azonosítottak, mely fontos szerepet játszik az acne kialakulásában<sup>(1)</sup>. Ezek közül a serdülőkori hormonális változások, az ennek eredményeképpen kialakuló fokozott faggyú (sebum) szekréció<sup>(2)</sup>, az epidermális keratinociták abnormális proliferációs és differenciációs folyamatai<sup>(3)</sup>, valamint a bőr folliculusaiban a kommenzális *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) baktérium fokozott mértékű elszaporodása a legismertebbek, és a legtöbbet kutattak. Mindezek mellett ikerkutatások, és családfaelemzések utalnak arra, hogy az egyéni genetikai faktoroknak is fontos szerepe van.

## 2. Célkitűzés

Munkánk során célunk a *P. acnes* baktérium és a keratinociták kölcsönhatására a bőrsejtekben induló folyamatok pontosabb megismerése, valamint egyéni genetikai hajlamosító és védő faktorok azonosítása és jellemzése volt.

## 3. Eredmények

### 3.1 Előzetes eredmények

Az epidermális keratinociták a professzionális immunsejtekhez hasonlóan képesek a környezetükben található patogének felismerésére és ellenük aktív védőfolyamatok indítására, mely folyamatokban a Toll-like receptor család is részt vesz<sup>(4,5,6)</sup>. Munkacsoportunk korábbi munkáinak eredményeképpen ismert, hogy a TLR2 és TLR4 receptorok központi szerepet játszanak a *P. acnes* baktérium felismerésében, mely folyamatoknak szerepe lehet az acne molekuláris patogenezise során<sup>(7,4)</sup>: baktériumkezelés hatására *in vitro* tenyésztett keratinocitákban számos citokin, kemokin és antimikrobiális hatású fehérjét kódoló gén kifejeződése megváltozik mRNS és fehérje szinten, melyek fontos szerepet játszanak a patogén hatására induló veleszületett immun- és gyulladásos folyamatok kialakításában.

Az egészséges bőrben a keratinociták folyamatos differenciációja figyelhető meg a bazális epidermisztól egészen a szarurétegig. Külső környezeti hatásokra ezek a természetes folyamatok felborulhatnak, a bőrsejtek aktiválódhatnak, és olyan alternatív folyamatok indulhatnak, melyek igazoltan fontos szerepet játszanak számos bőrbetegség kialakulása során (pl. pikkelysömör, sebgyógyulás)<sup>(8)</sup>. Erre az aktivált állapotra jellemző, hogy számos citokin és növekedési faktor kifejeződése fokozódik, melyek közül a legfontosabbak és a legjobban jellemzettek a TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), az IL-1 (interleukin 1), a TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), az INF $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) és a TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ). Sejtaktivációs folyamatok hatására gyakran megfigyelhető a citoskeleton átrendeződése, a

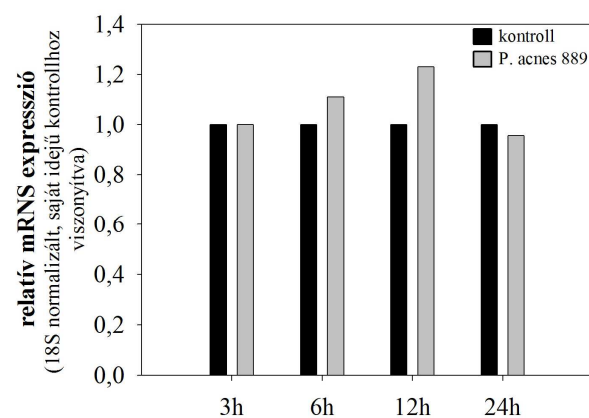
sejtek alakja és vakuolarizáltsága megváltozhat, és a korábban említett citokin és növekedési faktorok hatására számos sejtfelszíni receptor, adhéziós molekula és keratin kifejeződése is fokozódhat<sup>(9,8,10,11)</sup> A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján régóta feltételezik, hogy a keratinociták aktivációs folyamatai az acne molekuláris patogenezisében is fontos szerepet játszhatnak<sup>(12)</sup>, de kevés kísérletes adat áll a rendelkezésre ezen aktivált állapot kialakulásának pontos részleteiről valamint következményeiről acnéban.

### 3.2 A keratinocita aktivációs markerek kifejeződésének vizsgálata *P. acnes* kezelés hatására *in vitro* tenyésztett keratinocitákban

Jelen OTKA pályázat keretében arra a kérdésre kerestünk választ, hogy megváltozik-e, és ha igen milyen mértékben az előzetesen kiválasztott aktivációs marker gének mRNS szintű kifejeződése *P. acnes* baktérium kezelés hatására *in vitro* tenyésztett normál humán keratinocitákban (NHEK). Ehhez keratinocitákat izoláltunk egészséges, plasztikai műtéten áteső személyek bőrmintáinak felhasználásával a munkacsoportunk által korábban meghatározott módszerek és reagensek felhasználásával<sup>(7)</sup>. Ennek során 3. passzázsban levő jól növekedő kultúrákat használtunk, melyeket 6-os szövettenyésztő edényekbe passzáztuk. 24 óra elteltével a sejteket előzetes kísérletekben meghatározott arányban (1:100) *P. acnes* baktériummal kezeltük, majd 0, 3, 6, 12, 24 óra elteltével mintát vettünk. Tri-Reagens segítségével RNS mintákat izoláltunk, melyeket cDNS átírást követően valós idejű PCR analízisnek vetettünk alá. Az Universal Probe Library (Roche, Basel) rendszer, valamint génspecifikus primerek alkalmazásával vizsgáltuk az egyes gének kifejeződésének időbeli változását a baktériumkezelés hatására. A relatív génexpressziók meghatározásánál a 18S riboszómális RNS kifejeződésére normalizáltuk az adatokat, majd a saját idejű kezeletlen kontroll értékekhez viszonyítva határoztuk meg a vizsgált gének kifejeződésének mértékét. A számítások a  $\Delta\Delta Ct$  módszer alkalmazásával történtek.

A baktériumkezelés sikerességét úgy ellenőriztük, hogy megvizsgáltuk a TNF $\alpha$  mRNS kifejeződésének változását a kezelések hatására. Korábbi munkánk során ugyanis igazoltuk, hogy az NHEK sejtekben ezen mRNS kifejeződése jelentősen emelkedik a baktérium kezelés hatására.

Különböző donorok bőrmintáiból izolált sejtekkel elvégezve a fenti kísérleteket azt tapasztaltuk, hogy annak ellenére, hogy az előzetesen meghatározott kísérleti kondíciókat szigorúan követtük, nagy eltéréseket kaptunk mind a bazális TNF $\alpha$  mRNS szintekben, az indukciók mértékében és a változások időbeli kinetikájában. Ezen eltérések pontos oka



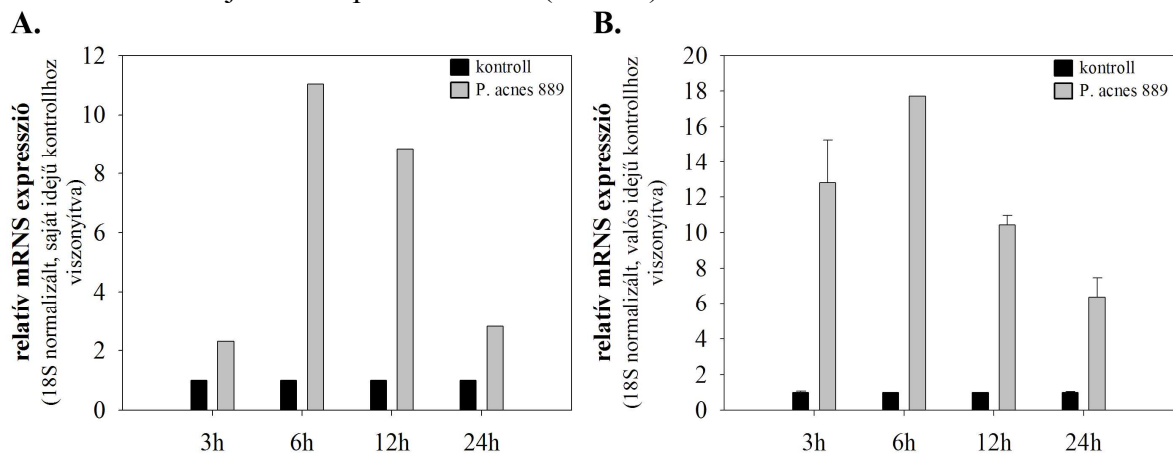
1. ábra. A TNF $\alpha$  mRNS kifejeződése nem változik *P. acnes* 889 baktérium kezelés hatására HaCaT sejtekben. (Reprezentatív kísérlet eredménye.)

jelenleg nem ismert minden részletében, de feltételezzük, hogy a jelenség háttérében szerepe lehet a donorok kor- és nembeli eltéréseinek, a keratinociták forrásául szolgáló bőrminták eredetének (mely testtájrról származtak a minták), valamint a donorok genetikai állománya közötti különbségeknek. Mindezek az előzetes megfigyelések jelentősen megnehezítették kinetikai jellegű tanulmányok folytatását.

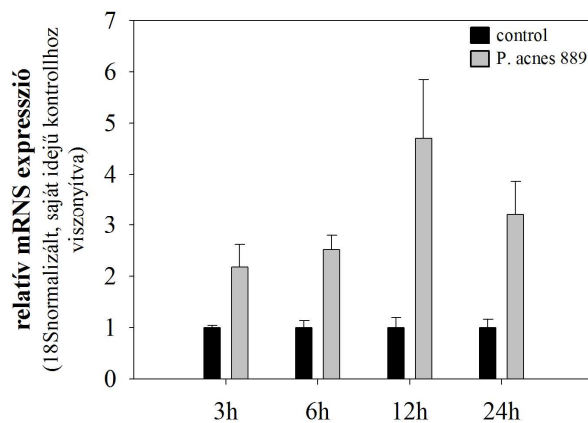
Laboratóriumi körülmények között a különböző bőrbetegségek patogenezisének, valamint a keratinocitákban végbemenő folyamatok vizsgálatához elterjedten alkalmazzák a spontán immortalizációs

folyamatok eredményeképpen kialakult HaCaT keratinocita sejtvonalat. Saját korábbi eredményeink és irodalmi adatok alapján azonban ismert, hogy ezen sejtekben az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor kifejeződése abnormálisan magas szintű<sup>(13)</sup>. Ez a transzkripciós faktor szerepet játszik patogének hatására induló szignálfolyamatok szabályozásában különféle sejtekben. Kontroll kísérleteink igazolták ezeket az adatokat, az NF- $\alpha$ B által szabályozott TNF $\alpha$  mRNS kifejeződése nem mutatott változást HaCaT sejtekben *P. acnes* 889 baktérium kezelés hatására (**1. ábra**), így ezek a sejtek nem voltak alkalmasak a tervezett kísérletek elvégzésére.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a HPV (humán papillóma vírus) E6/16 fehérjével immortalizált humán keratinocita sejtvonal (HPV-KER, előállítója Dr. Tubak Vilmos MTA, SZBK) alkalmas lehet-e kísérleteinkhez. Tesztjeink során azt tapasztaltuk, hogy a baktérium kezelés hatására a TNF $\alpha$  mRNS kifejeződése fokozódik, és ennek kinetikája hasonlóságot mutat az NHEK sejtekben tapasztaltakéval (**2. ábra**).



**2. ábra** A TNF $\alpha$  mRNS kifejeződése hasonló változást mutat *P. acnes* 889 baktérium kezelés hatására NHEK sejtekben (A.) és HPV-ker sejtvonalban (B.) (n=3.)



**3. ábra** Az IL-1A mRNS kifejeződésének változása *P. acnes* 889 baktériumokkal történő kezelést követően HPV-KER sejtvonalban. (n=3)

Párhuzamos kísérletek azt is igazolták, hogy a megfigyelt génexpressziós változások mind mértéküket, mind pedig időbeli lefolyásukat tekintve jól reprodukálhatóak. Mindezek alapján további kísérleteink a HPV-KER sejtvonal alkalmazásával történtek.

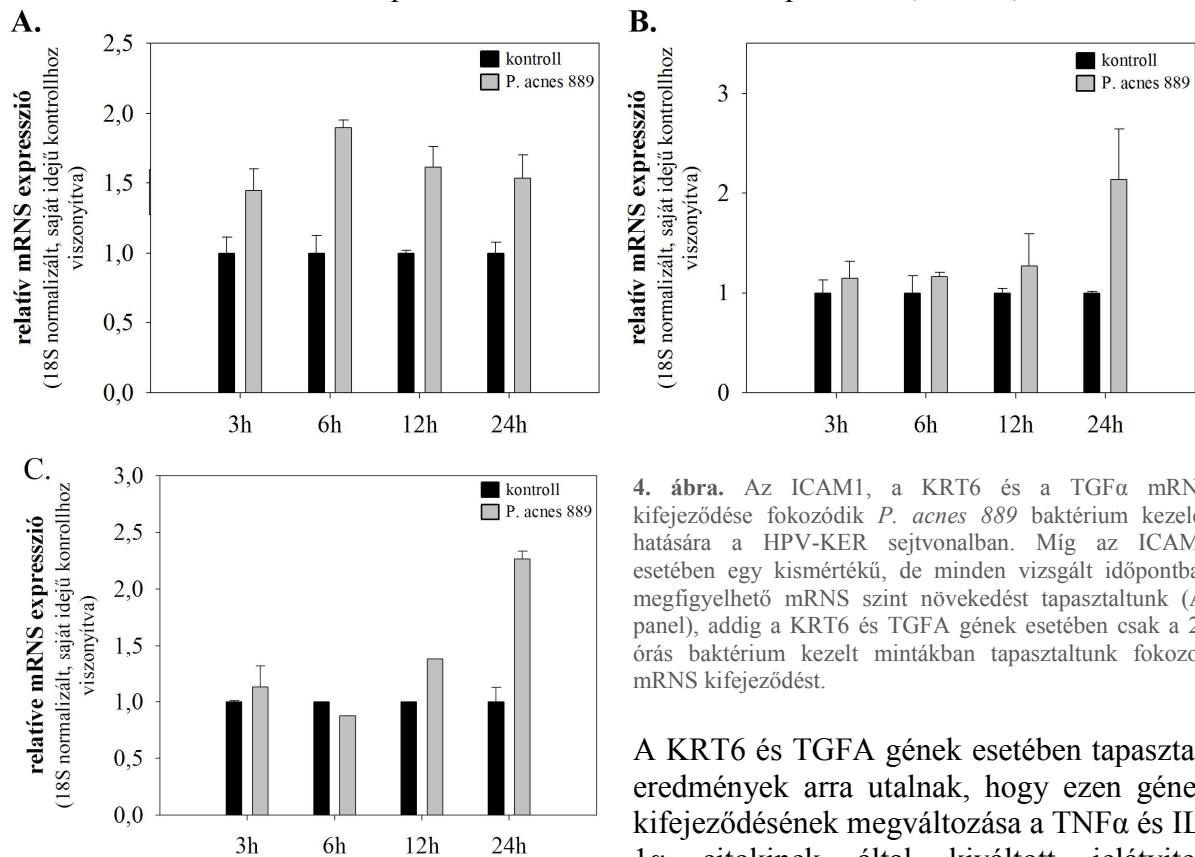
Megvizsgáltuk az IL-1A, TGFA, TGFB, KRT6 (keratin 6), KRT16 (keratin 16), ICAM1 and VCAM1 gének mRNS szintű kifejeződésében bekövetkező változásokat *P. acnes* 889 baktérium kezelés hatására. Ezen gének szerepet játszhatnak a sejtaktivációs folyamatok kialakításában (IL-1A, TNFA), illetve az aktivált állapot jellemző markerei

(TGFA, TGFB, KRT6, KRT16, ICAM1 és VCAM1).

A TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  mRNS-ek kifejeződésének fokozódása már korán, a bakteriális kezelést követően a harmadik órában megfigyelhető volt, és egy tranziens emelkedést követően a 24. órában már újra csökkenő tendenciát mutatott (**2. ábra B panel**, és **3. ábra**). Mindkét citokint korai citokinnek is nevezik, melyeknek igazoltan fontos szerepe van a patogének hatására induló immun és gyulladásos folyamatok szabályozásában.

További eredményeink azt is igazolták, hogy a *P. acnes* 889 baktérium kezelés hatására az ICAM1, a KRT6 és a TGFA gének kifejeződése is fokozódott. Míg az ICAM1 esetében egy kismértékű, de minden vizsgált időpontban megfigyelhető mRNS szintnövekedést

tapasztaltunk (4.A ábra), addig a KRT6 és TGFA gének esetében csak a későbbi, 24 órás baktérium kezelt mintákban tapasztaltunk fokozott mRNS expressziót (4.B ábra).



4. ábra. Az ICAM1, a KRT6 és a TGF $\alpha$  mRNS kifejeződése fokozódik *P. acnes* 889 baktérium kezelés hatására a HPV-KER sejtvonalban. Míg az ICAM1 esetében egy kismértékű, de minden vizsgált időpontban megfigyelhető mRNS szint növekedést tapasztaltunk (A. panel), addig a KRT6 és TGFA gének esetében csak a 24 órás baktérium kezelt mintákban tapasztaltunk fokozott mRNS kifejeződést.

A KRT6 és TGFA gének esetében tapasztalt eredmények arra utalnak, hogy ezen gének kifejeződésének megváltozása a TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokinek által kiváltott jelátviteli

folyamatok eredménye lehet. Ezek az eredmények egybeesnek korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint a TNF $\alpha$  valóban szerepet játszik a KRT6 mRNS kifejeződésének szabályozásában<sup>(14)</sup>, és mindkét citokin képes a TGF $\alpha$  mRNS indukciójára<sup>(8)</sup>. A fenti folyamatok eredményeképpen a keratinociták proliferációja fokozódhat, melynek ismert és központi szabályozója a TGF $\alpha$ .

A vizsgált baktérium kezelt és kontroll mintákban egyik időpontban sem sikerült TGF $\beta$  és VCAM1 mRNS expressziót detektálnunk a UPL rendszer alkalmazásával.

Hasonló kezeléseket végeztünk két másik *P. acnes* klinikai izolátum alkalmazásával (6609 és ATCC), melyek a 889-es törzshöz képest eltérő fajon belüli filogenetikai csoportokba tartoznak. A fenti gének vizsgálata során kapott előzetes eredményeink arra utalnak, hogy eltérés lehet az egyes klinikai izolátumok által okozott génexpressziós változások mértékében és időbeli lefutásában. Ezek az eredmények annak megválaszolásához vihetnek közelebb, hogy mi lehet annak a jelenségnek a hátterében, hogy egy egyébként kommenzális baktériumfajba tartozó egyes altörzsek milyen módon válhatnak patogén folyamatok kiváltóivá.

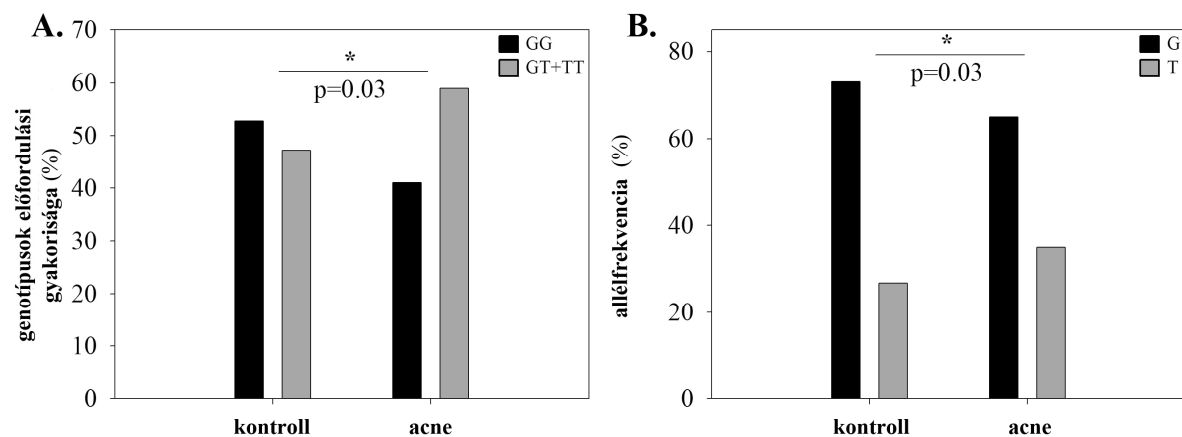
Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a *P. acnes* baktériumkezelés jelátviteli folyamatokat indít keratinocitákban, melynek hatására számos, az aktivációs folyamatokban szerepet játszó gén kifejeződése megváltozik. Az aktivált keratinocitákra jellemző fokozott proliferációs és abnormális differenciációs folyamatok fontos szerepet játszanak az acne patogenezisében.

### 3.3 Az acne kialakulásában szerepet játszó genetikai hajlamosító és védő faktorok azonosítása és jellemzése

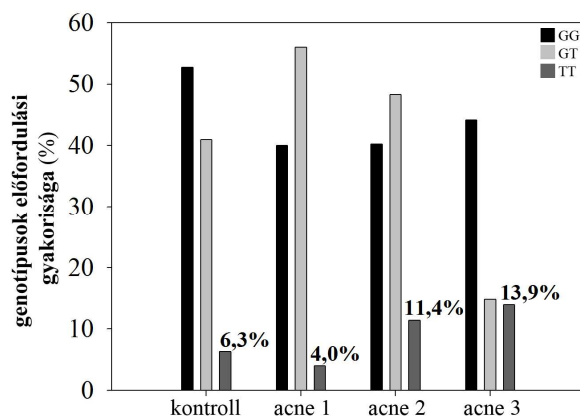
Munkánk során perifériás vérmintákat gyűjtöttünk kontroll egyénektől és acnés betegektől, melyeket a laboratóriumunkban létrehozott génbankban helyeztünk el. Gyűjteményünk jelenleg 129 kontroll (91 nő és 38 férfi) és 229 acnés beteg (136 nő és 93 férfi) mintáját tartalmazza, melyeket retrospektív eset-kontroll vizsgálatokban elemeztünk PCR-RFLP módszer alkalmazásával. A TNFA valamint az IL-1 családba tartozó gének olyan polimorfizmusait vizsgáltuk, melyekről irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy szerepet játszhatnak különféle krónikus gyulladási betegségekre való hajlam kialakításában. Az egyes polimorfizmusok esetében meghatároztuk az egyének genotípusát, majd statisztikai módszerekkel hasonlítottuk a genotípusok és allélok előfordulási gyakoriságát a kontroll egyének és acnés betegek csoportjában.

### 2.3.1. Az IL-1 családba tartozó gének polimorfizmusainak szerepe az acne patogenezisében

Elsőként az IL-1A gén +4845 G>T (rs17561) egynukleotidos polimorfizmusát vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a ritka T (5.B ábra) allél, valamint az ezt tartalmazó genotípusok (5.A ábra) szignifikánsan magasabb arányban fordultak elő az acnés csoportban ( $p=0,03$ ;  $\chi^2$  teszt, 2x2 tábla). Mindez arra utalt, hogy ezen allél hajlamosító faktor lehet az acne patogenezise során a vizsgált populációban.



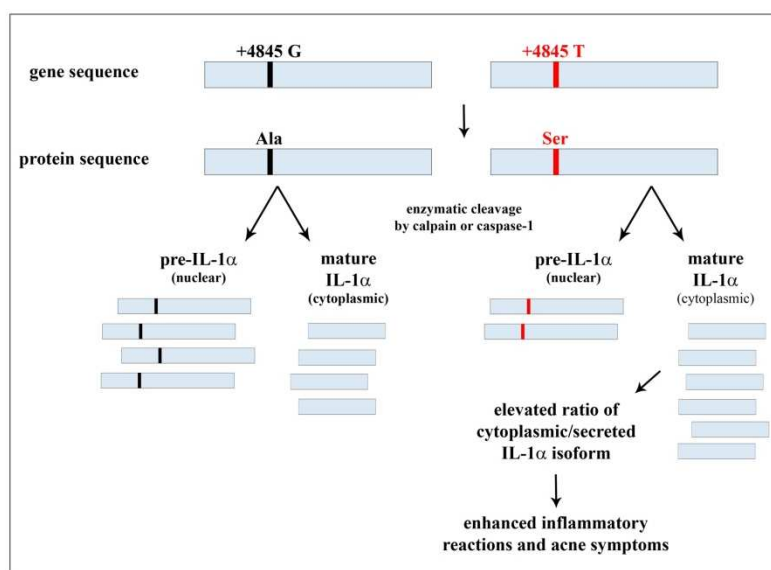
5. ábra. Az IL-1A +4845 T allél (B.), valamint a GT+TT genotípusok előfordulási gyakorisága (A.) az acnés csoportban statisztikailag szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontrollal összehasonlítva, ami arra utal, hogy ez az allél hajlamosító faktor lehet az acne patogenezise során. ( $\chi^2$  teszt, 2x2 tábla).



6. ábra. Az IL-1A +4845 G>T SNP esetében a homozigóta TT genotípusok előfordulási gyakorisága a gyulladási tünetek súlyosságának fokozódásával párhuzamosan csökkent az egyes acnés alcsoportokban ( $\chi^2$  for linear trend analízis,  $p=0,028$ ).

Ezt követően az acnés csoportot 3 alcsoportra osztottuk az egyének által mutatott gyulladási tünetek súlyossága alapján (1. acne comedonica, 2. acne papulopustulosa 3. acne nodulo-cystica csoport). Pozitív korrelációt kaptunk a gyulladás súlyossága, és a ritka allélokot tartalmazó (GT+TT) genotípusok előfordulási gyakorisága között<sup>(15)</sup>.

A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján ismert, hogy az IL-1 $\alpha$  protein kialakulása során egy éretlen, pre-IL-1 $\alpha$  fehérje képződik, mely a 117. és 118. aminosavak közötti enzimatis hasítás eredményeképpen válik éretté<sup>(16)</sup>. Mind az éretlen, mind az érett fehérje izoforma biológiailag aktív, de sejten belüli lokalizációjuk, és a funkciójuk is



7. ábra Az IL-1A +4845(G>T) SNP feltételezett hatásának modellje az acne patogenezisében.

eltér<sup>(17,18)</sup>. Az éretlen forma magi lokalizációt mutat, míg az érett fehérje citoplazmás, és különféle szignálok hatására szekretálódhat<sup>(16)</sup>.

Az SNP jelenlétében alanin-szerin csere történik a proteolitikus hasító hely közvetlen szomszédságában, melynek eredményeképpen mennyisége emelkedik<sup>(19,17)</sup>. A nukleáris és szekretált IL-1α aránya megváltozik, ami az epidermális homeosztázis felborulásához vezethet. A T allél hordozói emiatt gyakrabban szenvednek súlyosabb acnés tünetektől (7. ábra).

Vizsgáltuk emellett az IL-1α természetes antagonistáját (IL1Ra) kódoló gén (IL1RN) második intronjában található VNTR (variable number of tandem repeats) polimorfizmusának szerepét is az acne patogenezisében. Ezen polimorfizmus egyes alléljai hajlamosító faktorként szerepelhetnek krónikus gyulladással járó betegségekre való hajlam kialakításában, acnéval való összefüggést azonban nem sikerült igazolni (1. táblázat)<sup>(15)</sup>.

1. táblázat

VNTR	Genotípusok előfordulási gyakorisága n (%)					$\chi^2$ (P érték)	Allélfrekvencia n (%)			$\chi^2$ (P érték)
	1/1	1/2	1/3	2/2	2/3		1	2	3	
IL-1RN										
Kontroll	56 (47,5)	47 (40,0)	5 (4,2)	8 (6,8)	2 (1,7)	(0,956 <sup>1</sup> )	164 (70,5)	65 (27,5)	7 (3,0)	(0,83 <sup>2</sup> )
Acnés	111 (49,1)	88 (39,0)	8 (3,5)	17 (7,5)	2 (0,9)	0,66	318 (70,4)	124 (27,4)	2 (2,2)	0,37

<sup>1</sup> Pearsons  $\chi^2$  teszt, 2x5-ös tábla

<sup>2</sup> Pearsons  $\chi^2$  teszt, 2x3-as tábla

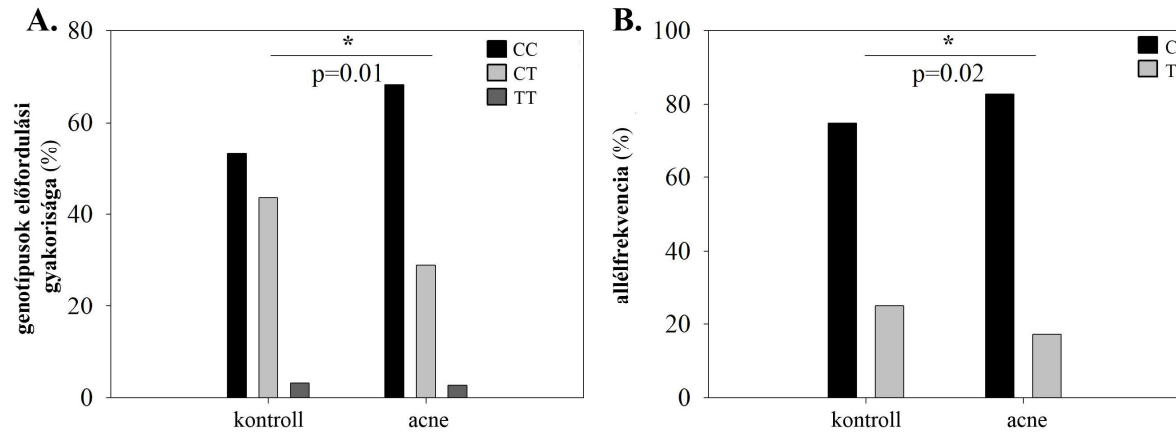
(Az IL-1 család génjeiben található polimorfizmusok acnéval való összefüggéseit vizsgáló kutatásaink eredményeit leíró közleményünk: Szabó et al. Interleukin-1A +4845(G>T) polymorphism is a factor predisposing to acne vulgaris. Tissue Antigens. Nov;76(5):411-5 (2010). IF(2009): 2,330.)

### 2.3.2. A TNFA gén polimorfizmusainak hatása az acne kialakulására

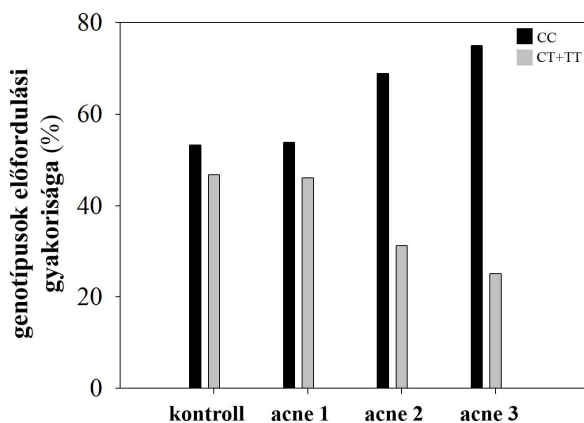
A TNF $\alpha$  citokint kódoló TNFA gén a 6-os kromoszóma rövid karján (6p21.3) helyezkedik el, az MHC III. régióban. A gén szabályozó (promóter) régiója polimorf, számos mikroszatellitát és SNP-t tartalmaz. Munkánk során 5 promóter polimorfizmus (-1031 T>C – rs1799964, -863 C>A – rs1800630, -857 C>T – rs1799724, -308 G>A – rs1800629, -238 G>A – rs361525) szerepét vizsgáltuk az acne patogenezisében, melyek szerepet játszhatnak a gén szabályozásában megfigyelhető allélspecifikus különbségek kialakításában.

A -1031 T>C, -863 C>A és -238 G>A SNP-k esetében nem találtunk eltérést az egyes genotípusok és allélok előfordulási gyakoriságában a kontroll és acnés csoportokat összehasonlítva, ami arra utalt, hogy ezek a polimorfizmusok feltételezhetően nem játszanak szerepet az acnéra való hajlam kialakításában.

A -308 G>A SNP esetében a teljes adatállományt figyelembe véve szintén nem volt szignifikáns különbség az adatokban, a nőket külön analizálva azonban a ritka A allél előfordulási gyakorisága szignifikánsan magasabbnak bizonyult, ami arra utal, hogy hajlamosító szerepe lehet az acné patogenezisében<sup>(20)</sup>. Ennek részletes vizsgálata jelenleg is folytatódik laboratóriumunkban.



8. ábra. A TNFA -857 T allél (B.), valamint a CT+TT genotípusok előfordulási gyakorisága (A.) az acnés csoportban statisztikailag szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy ez az allél védő faktor lehet az acné patogenezisé során. ( $\chi^2$  teszt, 2x3 és 2x3 tábla).



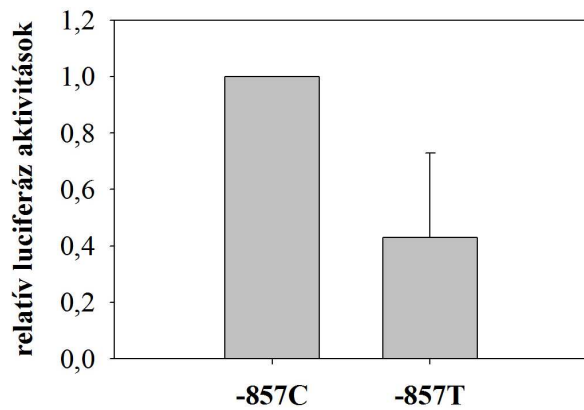
9. ábra. A TNFA -857 C>T SNP esetében a ritka allélokot tartalmazó genotípusok előfordulási gyakorisága (CT+TT) a gyulladós tünetek súlyosságának fokozódásával párhuzamosan csökkent az egyes acnés alcsoportokban ( $\chi^2$  for linear trend analízis,  $p=0,001$ ).

A TNFA -857 C>T SNP esetében a ritka T allél (8B. ábra), valamint az azt tartalmazó genotípusok (CT+TT) (8A. ábra) előfordulási gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt az acnés csoportban, ami arra utal, hogy ez egy védő hatású vagy protektív allél a betegség kialakulása során.

Azt is megfigyeltük, hogy a CT+TT genotípusok előfordulási gyakorisága a gyulladós tünetek súlyosságának fokozódásával párhuzamosan csökkent az egyes acnés alcsoportokban (9. ábra). A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a T allél jelenlétében egy új transzkripciós faktor kötőhely (OCT-1) alakul ki egy NF- $\kappa$ B kötőhely közvetlen szomszédságában, mely zavarhatja a gén NF- $\kappa$ B által történő

szabályozását immunfolyamatokban<sup>(21)</sup>. (A TNFA gén promóter polimorfizmusainak acnéval való összefüggéseit vizsgáló kutatásaink eredményeit leíró közleményünk: Szabó K. et al. TNFA gene polymorphisms in the pathogenesis of acne vulgaris. Arch Dermatol Res. 2011 Jan;303(1):19-27. Epub 2010 Apr 13. IF(2009): 1,844)

Ezen polimorfizmusok funkcionális vizsgálatára riportter konstrukciókat hoztunk létre pGL4.20vektor alkalmazásával, melyekben a luciferáz gén kifejeződése a TNFA promóter szabályozása alatt áll. Két konstrukciót készítettünk, melyek egymástól egyetlen nukleotidban, a -857-es pozícióban tértek el. Ezeket tranziens transzfekcióval HPV-KER sejtekbe juttattuk, majd luciferáz aktivitásokat mértünk. Eredményeink azt mutatták, hogy a -857-es promóter pozícióban ritka T allélt hordozó konstrukció esetében mért luciferáz aktivitások alacsonyabbak a vad C allél esetében mértekkel. Ennek eredménye lehet a T allél hordozóinak kisebb mértékű gyulladós reakciókészsége. Mindez összecseng genetikai



10. ábra. Luciferáz kísérletben a TNFA -857-es pozícióban ritka T allélt hordozó riporter konstrukció esetében rendre alacsonyabb bazális aktivitásokat mértünk, mint a C allélt tartalmazó konstrukció esetében.

*acne vulgaris*. (review article), publikációja folyamatban a *Human Immunology* folyóiratban).

vizsgálataink eredményeivel, melyek szerint a T allél hordozói ritkábban szenvednek súlyosabb acnés tünetektől. Genetikai vizsgálataink eredményét tehát egy funkcionális vizsgálattal is megerősítettük.

A fent részletesen bemutatott munkák, elvégzése, valamint a témában rendelkezésre álló irodalmi adatok feldolgozása során sok új ismeretet és tapasztalatot szereztünk az acne patogenezisének megismerésére irányuló klasszikus és molekuláris genetikai vizsgálatok témájában. Ezek rendszerezéséből egy összefoglaló jellegű cikket is készítettünk. (Szabó K, Kemény L: *Studying the genetic predisposing factors in the pathogenesis of*

#### 4. Diszkusszió

Régóta ismert, hogy az IL-1 $\alpha$  citokin fontos szerepet játszik az acne patogenezisében, már a kezdeti lépések során, a komedók kialakulásától kezdve<sup>(22)</sup>. Kísérletes adatok azt is igazolták, hogy *in vitro* szervkultúrában tartott follikulusokat IL-1 $\alpha$  citokinnel kezelve a komedók kialakulásának korai lépéseire jellemző változások indulnak (keratinocita hiperproliferációs és differenciációs folyamatok)<sup>(23,24)</sup>. A TNF $\alpha$  szerepe az acne korai patogenezisében vita tárgyát képezi. A jelenlegi elképzelések szerint funkciója inkább a késői folyamatok során, a krónikus gyulladásos reakciók kialakításában és fenntartásában van. mRNS szinten mindkét citokin kifejeződésének megváltozása hasonló kinetikát mutat *in vitro* HPV-KER sejtekben, a baktériumkezelést követően igen korán az mRNS expressziók emelkedése figyelhető meg. Megemlítenéd, hogy a keratinociták citoplazmájában preformált IL-1 $\alpha$  fehérje található, mely különféle hatásokra a sejtekből szekretálódhat, melynek hatására induló jelátviteli folyamatok eredménye lehet az IL-1 $\alpha$  és TNF $\alpha$  mRNS szintű változások kialakulása. Eredményeink alapján azonban feltételezhető, hogy a TNF $\alpha$  szerepe a baktérium által induló sejt- és molekuláris biológiai folyamatokban kettős, a késői gyulladásos folyamatokban betöltött szerepe mellett fontos lehet a baktérium hatására induló korai, keratinocita aktivációs folyamatok szabályozásában is.

A TNF $\alpha$  és IL-1 $\alpha$  citokineknek az acne patogenezisében betöltött központi szerepét az is alátámasztja, hogy az őket kódoló gének kifejeződését, valamint a róluk képződő fehérje termékek szerkezetét és ez által funkcióját befolyásoló funkcionális polimorfizmusok genetikai hajlamosító és védő faktorként viselkednek az acnéra való hajlam kialakításában.

Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a vizsgált HPV-KER sejtvonalban, és ezáltal a keratinocitákban a *P. acnes* kezelés aktivációs folyamatokat indít, melynek következtében a sejtek gyulladásos citokineket termelnek. Ezeknek fontos szerepe lehet a veleszületett immun- és az ezzel párhuzamosan elinduló gyulladásos folyamatok szabályozásában. A KRT6 és TGFA mRNS szintű kifejeződése összefüggésben állhat az aktivált keratinociták esetében megfigyelhető fokozott proliferációs és abnormális differenciációs folyamatok kialakulásával.

Eredményeink arra is utalnak, hogy az egyes *P. acnes* törzsek által a keratinocitákban kiváltott folyamatokban eltérések figyelhetők meg. Ezek az eredmények közelebb vihetnek minket annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy miként válhat patogén folyamatok és ezáltal bőrbetegségek kiváltójává egy egyébként kommenzális baktérium.



Mindezek alapján a *P. acnes* baktérium fontos szerepet játszik a keratinociták működési zavarainak kiváltásában, mely folyamatok végeredményben az acné patogenezise során megfigyelhető folliculáris hiperkeratózishoz vezethetnek.

Összességében az OTKA által támogatott munkánk eredményei sok fontos és új adatot szolgáltatottak a serdülőkorú populáció nagy százalékát érintő bőrbetegség pontos patogenezisének megismeréséhez. Ezen adatok elméleti jelentőségükön túl, alapját képezhetik új terápiás eljárások kifejlesztésének.

## 5. Irodalmi hivatkozások

- 1 Koreck, A., Pivarsci, A., Dobozy, A., and Kemeny, L. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatology*, 206:(2)96-105. 2003.
- 2 Pochi, P. E. and Strauss, J. S. Sebaceous gland response in man to the administration of testosterone, delta-4-androstenedione, and dehydroisoandrosterone. *J. Invest Dermatol.*, 52:(1)32-36. 1969.
- 3 Plewig, G., Fulton, J. E., and Kligman, A. M. Cellular dynamics of comedo formation in acne vulgaris. *Arch. Dermatol. Forsch.*, 242:(1)12-29. 1971.
- 4 Pivarsci, A., Bodai, L., Rethi, B., Kenderessy-Szabo, A., Koreck, A., Szell, M., Beer, Z., Bata-Csorgoo, Z., Magocsi, M., Rajnavolgyi, E., Dobozy, A., and Kemeny, L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.*, 15:(6)721-730. 2003.
- 5 Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11:(4)443-451. 1999.
- 6 Zhang, G. and Ghosh, S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin. Res.*, 6:(6)453-457. 2000.
- 7 Nagy, I., Pivarsci, A., Koreck, A., Szell, M., Urban, E., and Kemeny, L. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J. Invest Dermatol.*, 124:(5)931-938. 2005.
- 8 Freedberg, I. M., Tomic-Canic, M., Komine, M., and Blumenberg, M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J. Invest Dermatol.*, 116:(5)633-640. 2001.
- 9 Barker, J. N., Mitra, R. S., Griffiths, C. E., Dixit, V. M., and Nickoloff, B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*, 337:(8735)211-214. 1-26-1991.
- 10 Murphy, J. E., Robert, C., and Kupper, T. S. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J. Invest Dermatol.*, 114:(3)602-608. 2000.
- 11 Nickoloff, B. J. and Turka, L. A. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am. J. Pathol.*, 143:(2)325-331. 1993.
- 12 Cunliffe, W. J. Acne: when, where and how to treat. *Practitioner*, 244:(1615)865-1. 2000.
- 13 Lewis, D. A., Hengeltraub, S. F., Gao, F. C., Leivant, M. A., and Spandau, D. F. Aberrant NF-kappaB activity in HaCaT cells alters their response to UVB signaling. *J. Invest Dermatol.*, 126:(8)1885-1892. 2006.
- 14 Komine, M., Rao, L. S., Freedberg, I. M., Simon, M., Milisavljevic, V., and Blumenberg, M. Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, 116:(2)330-338. 2001.

- 15 Szabo, K., Tax, G., Kis, K., Szegedi, K., Teodorescu-Brinzeu, D. G., Dioszegi, C., Koreck, A., Szell, M., and Kemeny, L. Interleukin-1A +4845(G> T) polymorphism is a factor predisposing to acne vulgaris. *Tissue Antigens*, 76:(5)411-415. 2010.
- 16 Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saido, T., Kawasaki, H., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87:(14)5548-5552. 1990.
- 17 Lee, S., Temple, S., Roberts, S., and Price, P. Complex effects of IL1A polymorphism and calpain inhibitors on interleukin 1 alpha (IL-1 alpha) mRNA levels and secretion of IL-1 alpha protein. *Tissue Antigens*, 72:(1)67-71. 2008.
- 18 Mosley, B., Urdal, D. L., Prickett, K. S., Larsen, A., Cosman, D., Conlon, P. J., Gillis, S., and Dower, S. K. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J.Biol.Chem.*, 262:(7)2941-2944. 3-5-1987.
- 19 Kawaguchi, Y., Tochimoto, A., Hara, M., Kawamoto, M., Sugiura, T., Saito, S., and Kamatani, N. Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity. *Immunogenetics*, 59:(6)441-448. 2007.
- 20 Szabo, K., Tax, G., Teodorescu-Brinzeu, D., Koreck, A., and Kemeny, L. TNFalpha gene polymorphisms in the pathogenesis of acne vulgaris. *Arch.Dermatol.Res.*, 303:(1)19-27. 2011.
- 21 van Heel, D. A., Udalova, I. A., De Silva, A. P., McGovern, D. P., Kinouchi, Y., Hull, J., Lench, N. J., Cardon, L. R., Carey, A. H., Jewell, D. P., and Kwiatkowski, D. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum.Mol.Genet.*, 11:(11)1281-1289. 5-15-2002.
- 22 Aldana, O. L., Holland, D. B., and Cunliffe, W. J. Variation in pilosebaceous duct keratinocyte proliferation in acne patients. *Dermatology*, 196:(1)98-99. 1998.
- 23 Guy, R., Green, M. R., and Kealey, T. Modeling acne in vitro. *J.Invest Dermatol.*, 106:(1)176-182. 1996.
- 24 Guy, R. and Kealey, T. The effects of inflammatory cytokines on the isolated human sebaceous infundibulum. *J.Invest Dermatol.*, 110:(4)410-415. 1998.