

A transzglutamináz 3 szerepe a dermatológiai megbetegedésekben

Doktori értekezés

Dr. Bognár Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Kárpáti Sarolta, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kinyó Ágnes, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Mihály Emese, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy Zoltán Zsolt, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szalai Zsuzsanna, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Orosz Márta, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
2.1 Látens bőr barrier defektus TGM3 -/- knockout egérben	7
2.2 Cryofibrinogenémia dermatitisz herpetiformisban	9
2.3 A transzglutaminázok általános ismertetése (genetika, biokémiai, - élettani funkciók, patológiás működés következményei)	10
2.3.1 Transzglutamináz 1	15
2.3.2 Transzglutamináz 2	15
2.3.3 Transzglutamináz 3	17
2.3.4 Transzglutamináz 4	19
2.3.5 Transzglutamináz 5	19
2.3.6 Transzglutamináz 6	20
2.3.7 Transzglutamináz 7	20
2.3.8 faktor XIIIa	21
2.4 A cornified cell envelope (CE) kialakulása, a transzglutaminázok szerepe	22
2.5 Az epidermális fiziko-kémiai és immun barrier kölcsönös együttműködése, a barrier defektusok jelentősége	25
2.6 A dermatitisz herpetiformisz rövid ismertetése	29
2.7 Cryofibrinogenémia, cryoglobulinémia	32
3. Célkitűzések	33
4. Módszerek	34
4.1 TGM3 -/- egértörzs	34
4.2 Kontakt érzékenység kiváltása – az egér fülvastagodási teszt (mouse ear swelling test – MEST)	36
4.3 Szövettan	38
4.4 Áramlás citometriai (flow-citometriás) mérések	39

4.5 A transzepidermális FITC penetráció <i>in vivo</i> mérése kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával	41
4.6 Szubepidermális <i>Propionibacterium acnes</i> assay	43
4.7 Szérum IgE ELISA	43
4.8 A cryofibrinogén és cryoglobulin vizsgálatok beteganyaga	43
4.9 Cryofibrinogén (CF) és cryoglobulin (CG) meghatározása DH-s betegekben	44
4.10 Statisztikai analízis	44
5. Eredmények	45
5.1 Epikután szenzibilizációs vizsgálatok eredményei a FITC-DBP modellben	45
5.1.1 MEST eredmények – 8-12 hetes, 6, ill. 18 hónapos egér populációkon	45
5.1.2 Hisztopatológiai vizsgálatok eredményei	49
5.1.3 Emelkedett aktivált T-sejt arány a FITC kezelt, TGM3 <i>-/-</i> egerek nyirokcsomóiban	51
5.1.4 Emelkedett szérum össz IgE szint a FITC kezelt TGM3 <i>-/-</i> egerekben	52
5.2 FITC pozitív sejtek detektálása a drenáló nyirokcsomókban flow citometriával	53
5.3 Szubepidermális <i>Propionibacterium acnes</i> assay	54
5.4 Transzepidermális FITC penetráció mérése <i>in vivo</i> kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával	55
5.5 Cryofibrinogénémia és cryoglobulinémia prevalenciája dermatitisz herpetiformisz és kontroll beteganyagban	57
6. Megbeszélés	58
6.1 A bőr barrier defektusok jelentősége a szenzibilizációban, barrier defektusért felelős gének. A transzglutamináz diszfunkciók szerepe a cornified cell envelope formálása során	58
6.1.1 Az eddig megismert jelentősebb barrier defektusok és perkután szenzibilizáció kapcsolata	58
6.1.2 A transzglutaminázok szerepe az epidermisz és cornified cell envelope formálásban	60
6.1.2.1 Transzglutamináz 1	60

6.1.2.2 Transzglutamináz 5	61
6.1.2.3 Transzglutamináz 3	62
6.1.2.4 A dolgozat legfontosabb eredménye a csökkent gyulladáshatásos küszöb és a fokozott szenzibilizáció kimutatása TGM3 knockout egerekben; egy új kután barrier defektus igazolása állatmodellben	66
6.2 Magas cryofibrinogén prevalencia dermatitisz herpetiformisban	72
7. Következtetések	75
8. Összefoglalás	76
9. Summary	77
10. Irodalomjegyzék	78
11. Saját publikációk jegyzéke	97
11.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	97
11.2 A disszertációtól független közlemények	97
12. Köszönetnyilvánítás	98

1. Rövidítések jegyzéke

AD – atópiás dermatitisz

AR – autoszomális recesszív

CCL – chemokine ligand

CCR – chemokin receptor

CDSN – corneodesmosin gén

CE – cornified (cell) envelope

CF – cryofibrinogén

CFU – colony forming unit

CG – cryoglobulin

DBP – dibutil-ftalát

DH – dermatitisz herpetiformisz (Duhring)

DMSO – dimetil-szulfoxid

DPS – dapson

DTH – „delayed type hypersensitivity” – késői típusú túlérzékenységi reakció

ECM – extracelluláris mátrix

EDC – epidermális differenciációs komplex

EMA – endomysium ellenes antitest

EPB4.2 – protein 4.2-t kódoló gén

F13A1 – faktor XIIIa gén

FITC – fluoreszcein-izotiocianát

FLG – (pro) filaggrin gén

FSC – „forward scatter” (lézer sugár „előre történő szóródása” áramlási citometriánál)

FXIIIa – faktor XIIIa

GMD – gluténmentes diéta

GSE – glutén szenzitív enteropathia

H&E – hematoxylin-eosin

IL – interleukin

kDa – kilo-Dalton

KIR – központi idegrendszer

KO – knockout

LEKTI – lympho-epithelial Kazal-type inhibitor

LC – Langerhans sejt

MEST – „mouse ear swelling test” – fülvastagodási teszt

NMFs – natural moisturizing factors

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man (adatbázis)

PBS – „phosphate-buffered saline” – fosztát pufferolt fiziológiás sóoldat

PerCP – Peridinin Chlorophyll Protein Complex

PAMP – pathogen associated molecular pattern

RPM – „revolutions per minute” – percenkénti fordulatszám

SC – stratum corneum

SG – stratum granulosum

SLE – szisztémás lupus erythematosus

SPINK5 – LEKTI-t kódoló gén

SPRs – small proline-rich proteins

SSC – „side scatter” (lézer sugár „oldalirányú szóródása” áramlási citometriánál)

TG – transzglutamináz (protein)

TG1 – transzglutamináz 1 (keratinocyta transzglutamináz)

TG2 – transzglutamináz 2 (szöveti transzglutamináz)

TG3 – transzglutamináz 3 (epidermális transzglutamináz)

TG4-6 – transzglutamináz 4-6

TGM – transzglutamináz (gén)

TGM3 -/- – transzglutamináz 3 knockout

TJ – tight junction

TLR – toll like receptor

TSLP – thymic stromal lymphopoetin

UV – ultraviola

WT – wild type

Δ ET – „ Δ ear thickness” – fülvastagodás

2. Bevezetés

Dolgozatom két nagyobb téma köré épül, ennek megfelelően két nagyobb részre tagozódik.

Először a transzglutamináz 3 knockout (TGM3 $-/-$) egértörzsön végzett epikután szenzibilizációs és in vivo kétfoton mikroszkópos penetrációs kísérleteink során észlelt látens bőr barrier defektust ismertetem (I.). A második részben a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán dermatitisz herpetiformisz (DH) miatt gondozott betegek 88 fős populációjában talált cryofibrinogénemia szokatlanul magas prevalenciáját tárgyalom (II.). Az utóbbi kórképben a transzglutamináz 3, mint autoantigén szerepel. A dolgozat így a transzglutamináz 3 bőrpatóológiában eddig nem publikált szerepét ismerteti, egyúttal a transzglutamináz 3 dermatológiában betöltött funkcióit is áttekinti.

2.1 Látens bőr barrier defektus TGM3 $-/-$ egérben

A látens bőr barrier defektusok jelentőségét elsősorban az atópiás kórképek tüneteinek háttérében tisztázták, valamint kontakt dermatitiszes megbetegedések kialakulásában ismerték fel.

Az atópiás megbetegedések (ekzema, asthma, rhino-conjunctivitis) a fejlett nyugati társadalmakban a populáció közel 20%-át érintik. A jellemzően fiatalkori kezdet, a krónikus lefolyás nemcsak a páciensek életminőségét rontja, hanem nagy terhet ró az egészségbiztosítókra és a társadalomra egyaránt. A polietiológiás kórképben a jól ismert családi halmozottság alapján a genetikai predispozíció már régóta feltételezhető volt. A humán genom szekvenálását követően lehetőség nyílt nagyobb populációk betegség-gén asszociációinak vizsgálatára. A tanulmányok többsége az immunológiai háttérre fókuszált, azonban feltételezhető volt az is, hogy a genetikai fogékonyság inkább valamely epitheliális barrier felépítésében jelentős elemet (elemeket) érint, tehát a barrier diszfunkció az elsődleges faktor, mintegy teret engedve az immunológiai történéseknek. Nyilvánvalóan a két tényező ok-okozati viszonyának de facto elkülönítése - tekintettel arra, hogy kölcsönösen oda-vissza hatnak egymásra -, nem lehetséges. Az utóbbi évtizedben atópiás megbetegedések vizsgálatánál a stratum corneum (SC) terminális differenciációjában és az ún. „cornified cell envelope” (CE)

felépítésében részt vevő filaggrin számos mutációját írták le, főként azon atópiás dermatitiszes betegpopulációban, melyhez extrinsic típusú asthma is társul (*Palmer et al, 200; Irvine et al, 2011*). Ennek jelentősége óriási, hiszen a légutakban, a nyálkahártyákban a filaggrin nem expresszálódik, így közvetlen barrier defektust nem okoz (*De Benedetto et al, 2008*). A kórképekben megfigyelt gyakori szenzibilizáció tehát feltehetően a bőrön keresztül történt ismételt antigén expozíciók következménye, mely a klinikailag jól ismert „atópiás menetelés” genetikai-immunológiai hátterének felel meg. A szubklinikus barrier diszfunkciók tehát hajlamosíthatnak szenzibilizációra.

A bőr barrier funkciója szempontjából a külvilággal közvetlenül érintkező, a szaruréteget összetartó elszarusodott sejtburrok, a CE az első és legfontosabb védővonal, mely izopeptid kötésekkel többszörösen kereszt kötött, ellenálló protein-lipid polimer komplex. A CE stabilitásához hozzájáruló izopeptid kötések kialakítását a transzglutamináz (TG) enzimes család tagjai (TG1, TG3, TG5) katalizálják (*Eckert et al, 2005; Hitomi, 2005*). Elégtelen transzglutamináz aktivitás, ezáltal struktúrájában megváltozott CE esetén barrier defektust várhatunk.

A barrier diszfunkció lehet súlyos, mint pl. a transzglutamináz 1 gén (TGM1) mutációi esetében kialakuló lamelláris ichthyosis (*Schorderet és Hohl, 1995*), de feltételezhető az is, hogy a barrier defektus nyugalmi körülmények között látens, és csak fokozott igénybevétel mellett, pl. irritánsok, allergének, hatására alakul ki permeabilitás fokozódás, és másodlagos gyulladásos reakció. A nemrég létrehozott TGM3 $-/-$ egértörzs a szőrzet abnormális struktúráján, az epidermisz kissé megkésett in utero fejlődésén, valamint az izolált corneocyták fokozott fragilitásán kívül egyéb barrier diszfunkcióra utaló eltérést nem mutatott (*John et al, 2012*). Látens bőr barrier defektust feltételezve – a szenzibilizáció fent tárgyalt jelentőségéből kiindulva – az állatokat a FITC-DBP kontakt dermatitisz modellben vizsgáltuk, melyben csökkent gyulladásos küszöbértéket találtunk, mely látens bőr barrier funkcióra utalt. A TGM3 $-/-$ egérben a FITC fokozott *in vivo* percutan penetrációját, kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával direkt módon is verifikálni tudtuk (*Bognar et al, 2014*).

A TG3 defektusaival kapcsolatban hasonló adatok eddig nem álltak rendelkezésre, a dolgozat benyújtásakor humán TGM3 patológiát sem közöltek ilyen kontextusban.

2.2 Cryofibrinogenémia dermatitisz herpetiformisban.

A második, TG3 dermato-patológiai vonatkozásaihoz kapcsolódó részben a DH-s betegekben előforduló, kutató csoportunk által megfigyelt, szokatlanul magas cryofibrinogenémia prevalenciát tárgyalom (*Bognár, Görög, Kárpáti 2014*). A DH egy a glutén szenzitív enteropathiához (GSE, coeliakia) társult megbetegedések közül. GSE-ben a transzglutamináz 2 (TG2, vagy szöveti transzglutamináz) szerepel autoantigénként. A coeliakiás betegek egy részében jelentkező DH-ban ellenben a hasonló struktúrájú TG3 válik fő autoantigénné, az ún. epitóp spreading jelensége miatt. A DH-s betegekben intermittálóan jelentkező akrális purpura alapján vizsgálni kezdtük a betegpopulációban a cryoglobulin és cryofibrinogén jelenlétét. Míg a cryoglobulin prevalenciája a kontroll - általában autoimmun betegségek és különböző vasculitis miatt vizsgált - csoporttal közel azonos mértékű volt, addig a cryofibrinogenémia előfordulása a DH-s populációban szignifikánsan gyakoribbnak mutatkozott. Ennek pontos okát egyelőre nem ismerjük, azonban a fibrinstabilizáló transzglutamináz izoenzim, a XIIIa faktor szekunder autoimmun érintettsége – tekintettel a transzglutamináz proteinek hasonló térszerkezetére – mint lehetséges magyarázat, felmerül.

Az atópiás megbetegedések és a coeliakia közös vonása, hogy egy, a külvilág felől érkező hatásoknak kitett komplex védőgát (bőr, nyálkahártyák, bél) szerepel a patológiás történések elsődleges helyszínéül. Ezért az immunológiai prediszponáltságon túl, az említett kórképekben a barrier funkció primer eltéréseinek szerepe is igen valószínű, melyben a transzglutaminázok közreműködése is jelentős.

2.3 A transzglutaminázok általános ismertetése (genetika, biokémiai, - élettani funkciók, patológia működés következményei).

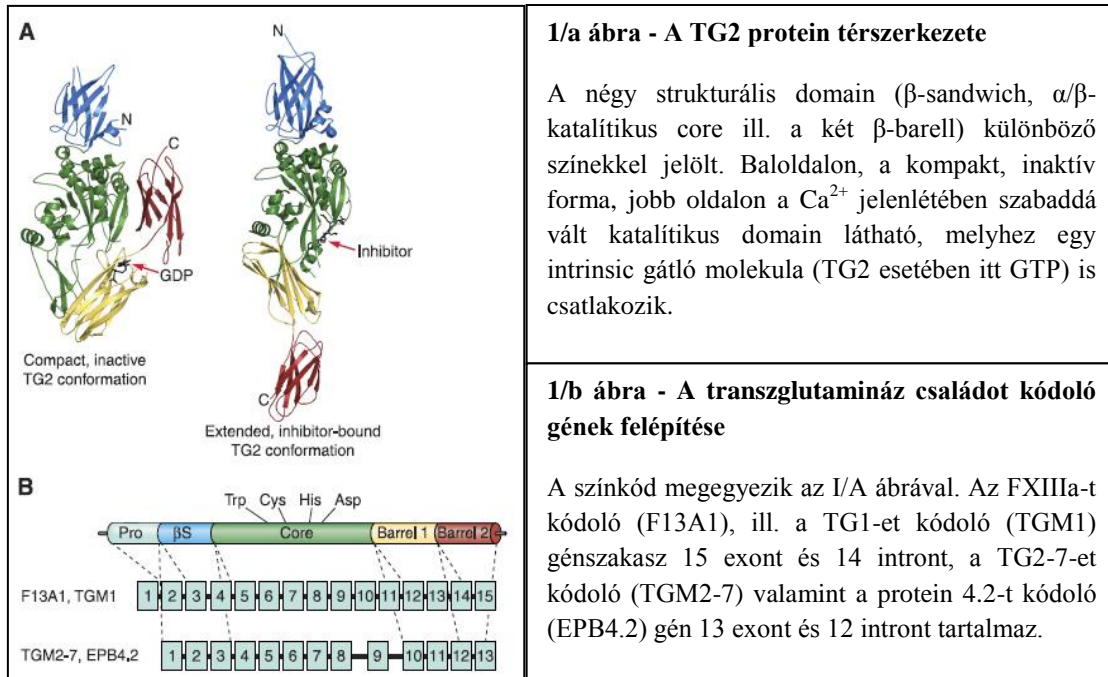
A humán transzglutaminázok a papain-like cisztein proteáz enzim szupercsaládhoz tartoznak (*Yee et al, 1994*). Az első transzglutamináz aktivitású enzimet (a mai nomenklatura szerint transzglutamináz 2) Sarkar és munkatársai írták le 1957-ben (*Sarkar et al, 1957*).

A humán transzglutamináz fehérje-családnak nyolc enzimatikusan aktív tagja van: a faktor XIIIa (FXIIIa), ill. az 1-7-ig számozott transzglutaminázok (TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7), valamint a protein 4.2, utóbbi egy enzimátikus aktivitással nem rendelkező membrán struktúrprotein.

A bőrben a TG1, TG2, TG3 valamint a TG5 expresszálódik, a CE formálódásához a TG1, TG3 és TG5 összehangolt, pontosan szabályozott működése szükséges (*Eckert et al 2005, Hitomi et al 2005, Candi et al 2005*). A TG2 szerepe elsősorban a sebgyógyulásban, valamint az extracelluláris mátrix stabilizálásában jelentős. Bár a TG2 az epidermiszben, a basalis keratinocyták rétegében is expresszálódik, a CE formálásában ismereteink szerint nem vesz részt (*Stephens et al, 2004*).

Az enzimatikusan aktív transzglutaminázok génszerkezete igen hasonló. Az FXIIIa-t (F13A1), ill. a TG1-et kódoló (TGM1) génszakasz 15 exont és 14 intront, míg a TG2-7-et (TGM2-7) és a protein 4.2-t kódoló (EPB4.2) gén 13 exont és 12 intront tartalmaz. Az F13A1 és TGM1 1-es exonja nem kódoló, a 2-es exon egy NH₂-terminális propeptidet kódol, mely aktiválódás során a transzkriptumról lehasad, ill. a 10 és 11-es exon közé egy intron épül be, melyet a TGM2-7 és az EPB4.2 nem tartalmaz. A fenti jellemző génszakaszt, valamint a transzglutaminázok térszerkezetét az 1/a ábra szemlélteti (*Iismaa et al, 2009 után*).

Az enzimátikus aktivitással nem rendelkező erythroid vonal sejtjeinek egyik membrán-struktúrproteinje, a protein 4.2 transzglutamináz szupercsaládhoz sorolását indokolja, hogy genetikailag meglehetősen (37-51%-os) homológiát mutat a transzglutamináz enzimcsaládot kódoló génekkel.

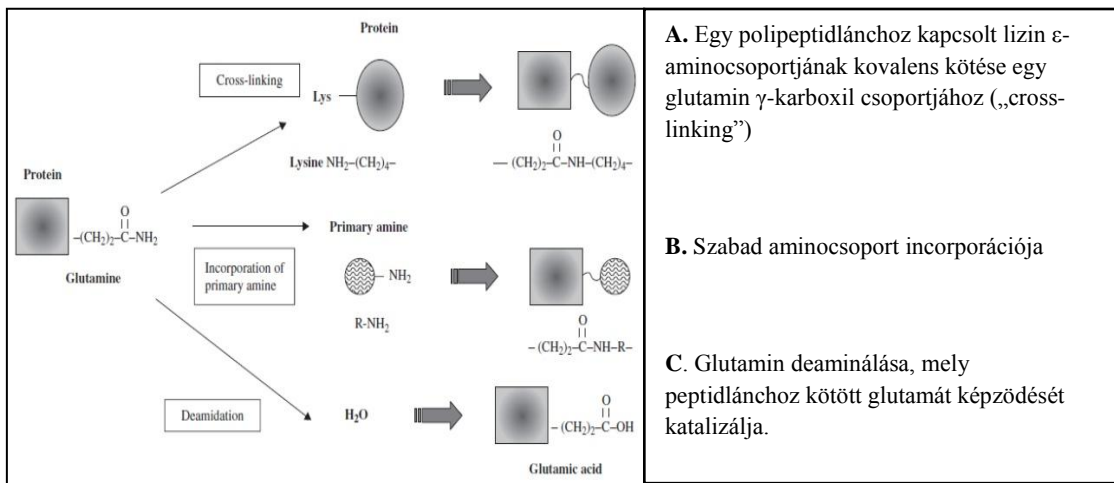


1. ábra (A) Transzglutamináz 2 protein térszerkezete, (B) a transzglutamináz családot kódoló gének felépítése (Forrás: *Iismaa et al, Physiol Rev. 2009 89 (3): 991-1023*)

A transzglutamináz proteinek térszerkezete is nagymértékben hasonlít egymásra, négy jellemző strukturális domaint alkotva, melyek a következők: (1.) az NH_2 -terminállal rendelkező β -sandwich, (2.) a katalitikus aktivitásért felelős erőteljesen konzervált α/β -katalitikus core, ill. (3.-4.) a két COOH -terminállal végződő β -barell régió (1/b ábra, *Iismaa et al, 2009 után*). Ebben az inaktív terciér struktúrában, a katalitikusan aktív régió a molekulán belül úgy helyezkedik el, hogy enzimátikus aktivitást nem tud kifejteni. Ca^{2+} ionok jelenlétében azonban jelentős konformáció-változás következik be, a régió szabaddá válik, így ha egyéb gátló (szabályozó) molekula (pl. GTP) nem kötődik hozzá, már alkalmas enzimátikus funkciójának kifejtésére. Az összes transzglutamináz (a protein 4.2 kivételével) katalitikus domain-jének négy legfontosabb konzervált aminosava a cisztein, a hisztidin, az aszpartát, valamint a triptofán.

A transzglutaminázok legfontosabb enzimátikus funkciója az ún. izopeptid kötések kialakítása. A folyamat biokémiaailag Ca^{2+} függő transzamidáció, leggyakrabban egy polipeptidláncához kapcsolt lizin ϵ -aminocsoportja (vagy egyéb reaktív NH_2 csoport), ill. egy glutamin γ -karboxiamid funkciós csoportja között zajlik. A fenti folyamatot az

angol irodalom „cross-linking”-ként (keresztkötés) említi (2. ábra). Az így kialakult Nε-(γ-glutamil)-lizin izopeptid kötések stabilak, proteázokkal szemben rendkívül ellenállóak. Az izopeptid kötések akár intra-, akár intermolekulárisan is képződhetnek, ezáltal nagyméretű, többszörösen keresztkötött, stabil harmadlagos térszerkezetű polimer struktúrák jönnek létre, melyek szerepe elsősorban a külvilág felé határt alkotó szövetekben jelentős.



2. ábra A transzglutaminázok által katalizált főbb enzimatis reakciók

(Forrás: Hitomi et al, 2005, Eur J Dermatol 15 (5): 313-9)

A transzglutaminázok szövetenként eltérő expressziós mintázatot mutatnak, a leginkább tanulmányozott, és legnagyobb mértékben expresszálandó TG, a FXIII, a TG1, TG2 és TG3, egériben való expressziós és aktivációs mintázatukat újabban *Tatsukawa és mtsai* írták le részletesen (*Tatsukawa et al, 2015*).

A transzglutaminázok a fenti három katalitikus aktivitásuk mellett acilációt, észterifikációt és izopeptid kötések bontását (izopeptidáz) is képesek katalizálni. (*Lorand és Graham, 2003, Király et al, 2015*). Az enzimatisan aktív transzglutaminázokban közös, hogy aktivitásuk emelkedő kalcium koncentrációhoz kötött.

A transzglutaminázok (pl. a szekretált TG2 és faktor XIIIa) a fent részletezett enzimatis működés mellett számos jelátviteli és szabályozó funkció betöltésére is

képesek. Ezáltal számos élettani folyamatban (pl. apoptózis, neuronális differenciáció, ECM képződés, porc és csontfejlődés stb.) nélkülözhetetlenek, kóros működésük pedig számos kóros állapotban (osteoarthritis, atherosclerosis, cataracta stb.) kimutatható (Nemes *et al*, 2009B, Tóth *et al*, 2009, Eckert *et al*, 2014, Kanchan *et al*, 2015). Két demencia típusban (Alzheimer kór, Lewy testes demencia) újabban a transzglutaminázok által stabilan keresztköött szubsztrátok akkumulációját írták le (Zhang *et al*, 2015; Nemes *et al* 2009A).

A TG2-n kívül egyéb transzglutaminázok regulátoros funkciói is ismertek. Újabban ciszplatin indukálta akut veseelégtelenség modellben írták le a TGM1 korai, fokozott expresszióját a tubulusokban, mely a szerzők szerint későbbiekben akár biomarkerként is szerepelhet (Furukawa *et al*, 2015).

A TG-k működésének megismerése újabb farmakoterapiás célpontokat is jelenthet. Példaképp, a TG2 szintetikus inhibitorainak kifejlesztése által, egy egérkísérletes modellben szignifikánsan csökkenthető volt a hipertóniához társuló nephrosclerosis mértéke (Badarau *et al*, 2015).

A TG2 és további transzglutaminázok élettani folyamatokban betöltött szerepének részletes tárgyalása a dolgozat témájához nem kapcsolódnak szorosán, így az alábbi összefoglaló közleményekre utalok (Lorand és Graham, 2003; Eckert *et al*, 2014; Kanchan *et al*, 2015).

Az eddig leírt transzglutamináz enzimekről, valamint a katalitikus aktivitással nem rendelkező protein 4.2-ről az 1. táblázat nyújt áttekintést.

1. Táblázat – a transzglutamináz enzimszalád áttekintése

Gén	Fehérje	Locus	Molekulatömeg (kDa)	Funkció	Expresszió	Patológia	Egyéb nevek
TGM1	TG1	14q11.2	90	CE formálás (ω-hydroxyceramid)	epidermisz (SG), membrán-kötött keratinocita	AR lamelláris ichthyosis	TG _k , keratinocita TG
TGM2	TG2	20q11-12	80	apoptózis, sejtadhézió, mátrix stabilizálás, szignáltranszdukció	számos szövet: sejtmag, citoszol, membrán, ECM	coeliakia (auto-antigén)	TG _k , endothel TG, szöveti/máj TG
TGM3	TG3	20q11-12	77	CE formálás	epidermisz (SG1, SC) folliculus, agy	DH, csökkent bőr barrier funkció	TG _E , callus TG, follicularis TG
TGM4	TG4	3q21-22	77	reprodukción (főleg patkányban), semen koaguláció	prostatata	nem ismert	TG _p , vesiculase, dorsalis prostatica protein 1
TGM5	TG5	15q15.2	81	CE formálás	ubiquiter, praepitium keratinocita, epidermisz (SS, SG3-2), vázizom (kivéve KIR)	acral peeling szindróma	TG _x
TGM6	TG6	20q11	78	nem ismert	KIR, here, tüdő	glutén ataxia	TG _y
TGM7	TG7	15q15.2	81	nem ismert	ubiquiter, főleg herék és tüdő, KIR	nem ismert	TG _z
F XIIIa	F13A1	6q24-25	83	véralvadás, sebgyógyulás, csontképződés, szignáltranszdukció	vérelezke, placenta, synovialis folyadék, chondrocyta, astrocyta, macrophag, dDc, osteoclast, osteoblast	vérekezeség, kóros sebgyógyulás	fibrin-stabilizáló faktor, fibrinolitikáz, plazma TG, Laki-Lorand faktor
Protein 4.2	EPB42	15q15.2	72	membrán integritás, szignáltranszdukció, sejtkecsesítés,	erythrocyta membrán, csontvelő, lép	hereditær spherocytosis	B4.2, ATP-kötő erythrocyta membrán protein 4.2

2.3.1 Transzglutamináz 1 (keratinocyta transzglutamináz)

A TG1-et kódoló TGM1 gén a 14q11.2-es locus-on helyezkedik el. Az enzim egy 106 kDa tömegű inaktív zymogenként expresszálódik, majd Ca^{2+} függő szelektív proteolízis során aktiválódik, melyet a cathepsin-D végez. Expressziója az epidermisz alsó rétegeiben szerény, azonban progresszívan emelkedik a keratinocyta differenciáció során, legnagyobb mértékben a stratum granulosumban mutatható ki (*Steinert et al, 1996A*.) A TG1 nem csak az epidermiszben, hanem a tüdő, vese, máj epithelben, emellett a vasculáris endothel sejtek adherens junkcióiban és a központi idegrendszerben is kimutatható. (*Hiiragi et al, 1999, Baumgartner et al, 2004*).

A keratinocytákban a TG1 zymogen NH_2 -terminálján keresztül mirisztülhez és palmitáthoz, ezáltal membránstruktúrákhoz kötött formában fordul elő (*Steinert et al, 1996B*). A szelektív proteolízis során a zymogenből a három alegységből (10/67/33-kDa) álló, nem kovalens kötésekkel kapcsolt enzimatikusan aktív komplex alakul ki. Az így létrejövő aktivált forma számos CE fehérje keresztkötése mellett (involucrin, envoplakin, periplakin, loricrin) a protein- ω -hidroxilceramid észter kötések (főleg loricrin-hidroxilceramid) kialakulásáért is felelős, amely a CE felépülésének egyik kulcslépése (*Steinert et al, 1996A*). A bőr barrier funkció kialakításában betöltött nélkülözhetetlen szerepét igazolja, hogy a súlyos barrier diszfunkcióval járó, recesszív öröklődésű lamelláris ichtyosisban szenvedő betegek egy csoportjánál mindkét allélon TGM1 mutációkat mutattak ki (*Huber et al, 1995*), ezzel összhangban a TGM1 knockout egérmodellben a fokozott transepidermális vízvesztés miatt a születés után 4-5 órával letális keratinizációs zavart észleltek (*Matsuki et al, 1998*). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a kieső TG1 funkciót a bőrben, a CE kialakításában a többi transzglutamináz nem képes kompenzálni.

2.3.2 Transzglutamináz 2 (szöveti transzglutamináz)

A TG2-t kódoló gén a 20q11-12 régióban helyezkedik el (*Wang et al, 1994*). A legelterjedtebb transzglutamináz, ubiquiter előfordulású, a legtöbb szövetben, mind a citoszolban, mind a nucleusban, mind sejtmembránhoz kötött formában kifejeződik, a keratinocytákban és epitheliumban azonban csak speciális körülmények között, indukált formában (pl. retinsav kezelés hatására). A TG2 a transzamidáz funkció mellett számos

szignál transzdukciós, sejtélettani folyamatban vesz részt. Az egyik legszerteágazóbb biokémiai funkciókkal rendelkező, a legkülönbébb sejtorganellumokban kifejeződő enzimről van szó, mely folyamatos intenzív kutatások tárgya napjainkban is. Többek között GTP-áz, ATP-áz, protein kináz, protein diszulfid izomeráz, izopeptidáz funkciók elvégzésére is képes. (*Nakaoka et al 1994; Eckert et al, 2014 review, Kanchan et al, 2015*). Egyetlen polipeptidláncként rendkívül szerteágazó biológiai funkciókat lát el, így nem meglepő, hogy alléljai rendkívül konzerváltak (*Király et al, 2013*).

A TG2 funkcióinak szabályozásában egyik jelentős molekula a GTP, mely a transzamidációs aktivitását gátolja, azonban GTP kötött konformációban lehetővé teszi szignáltranszdukciós útvonalakban való részvételét. Jellemző, hogy a TG2 vagy transzamidáz, vagy egyéb biokémiai aktivitást mutat, ezek párhuzamos működése – a nem hozzáférhető katalitikus core miatt nem lehetséges (*Ahvazi et al, 2004*).

A TG2 a CE formálásában ugyan nem vesz részt, azonban a dermatológiában jelentős funkciókkal rendelkező enzim. Fontos szerepet játszik a sebgyógyulás folyamatában, ahol szekvenciálisan működik együtt a bőrben expresszálódó további transzglutaminázokkal. A sérülésre adott válaszként először a XIIIa faktor stabilizálja a kialakuló fibrinhálót, ezáltal csillapítva a vérzést (megjegyzendő, hogy saját maga is részt vesz az ECM újraépítésében), melynek további rekonstruálását a dominálón a TG2 végzi, enzimatikus és a fibroblasztokra kifejtett regulátoros szerepe által. Az epithelizáció zavartalan megvalósulásához a TG1, TG3 és TG5 szekvenciális, jól összehangolt működése szükséges (*Haroon et al, 1999; Griffin et al, 2002*).

A TG2 bőrben betöltött további szerepe, a laminin-nidogen komplexek keresztkötése, mellyel hozzájárul a dermo-epidermális kapcsolat megfelelő stabilitásához is (*Aeschlimann és Paulsson 1991*).

A TG2 kóros működését igen szerteágazó funkciója miatt számos pathológiás állapotban leírták (*Eckert et al, 2014 review*). Bőrgyógyászati szempontból a glutén szenzitív enteropathia (GSE, coeliakia) a legfontosabb, a kórképhez gyakran társuló dermatitisz herpetiformisz (DH) miatt. A glutén proteinek (főként a gliadin) prolin és glutamin aminosavakban gazdagok, mely kötéseinek bontását az intestinalis peptidázok nehezen végzik el. Emiatt kisebb immunogén oligo-és polipeptidek az intestinalis

epitheliumon átjutnak, bizonyos HLA típust hordozókban veleszületett, és adaptív immunválaszt provokálnak, az endothel további károsodását okozva. A felhalmozódott gliadint a TG2 deaminálja, immunológiai prediszponáltság esetén deaminált gliadin ellenes antitestek, majd anti-TG2 IgA antitestek alakulnak ki (*Dieterich et al, 1997*). Közös epitópok felismerése révén a poliklonális antitestek több transzglutaminázzal (TG3, TG6) reakciót adnak (epitóp spreading). Az anti-TG3 a dermatitisz herpetiformisz (*Sárdy et al, 2002*), az anti-TG6 (*Hadjivassiliou et al, 2008*) a cerebelláris ataxia kórképekre jellemző autoantitest.

A TGM2 knockout egerek, bár a fent részletezettek alapján a TG2 funkciója széleskörű, normál fenotípusúak, azonban sebgyógyulásuk lassú, izolált fibroblasztjaik kapcsolódása patológiás, motilitásuk csökkent (*Tong et al, 2013*). Továbbá, vélhetően a TG2 apoptózisban betöltött szerepe miatt a TGM2 knockout egerek autoimmun megbetegedésekre is fogékonyabbak (*Szondy et al, 2011*).

2.3.3 Transzglutamináz 3 (epidermális transzglutamináz)

A TGM3 gén a 20-as kromoszóma hosszú karján található (20q11-12) (*Wang et al, 1994*). Hasonlóan a TG1-hez, a TG3 is inaktív zymogénként (77 kDa) fejeződik ki. Aktiválódásához szelektív proteolízis szükséges, melyet a lizoszomális peptidázok, döntően a cathepsin L, kisebb mértékben a cathepsin S végeznek (*Hitomi et al 2005, Cheng et al, 2006*). Az így kialakult, nem kovalens kötésekkel keresztül kapcsolódó 50-, ill. 27- kDa molekulatömegű dimer katalitikus aktivitás kifejtésére azonban még nem képes, ehhez a Ca^{2+} ionok jelenléte szükséges (*Kim et al, 1990*). A Ca^{2+} aktivációban betöltött pontos szerepét *Ahvazi és mtsai* tisztázták (*Ahvazi et al, 2002*). A TG3 teljes enzimatis aktivitásának kialakulásához 3 Ca^{2+} ion kötődése szükséges, melyek mind az 50 kDa-os alegységhez csatlakoznak. Az első Ca^{2+} ion az inaktív zymogénhez kapcsol, annak szerkezetét stabilizálja, csak denaturáció útján választható le. Aktiváció során még két további Ca^{2+} ion kapcsolódása által előidézett konformációs változások szükségesek a teljes enzimatis aktivitás eléréséhez. Megjegyzésre érdemes, hogy a második Ca^{2+} ion kötőhely a XIIIa faktoréval meglehetősen homológiát mutat. A második Ca^{2+} ion kapcsolódása a TG3 térszerkezetében igen kismértékű változást okoz, azonban előfeltétele a harmadik Ca^{2+} ion kötődésének, mely végül konformáció változást előidézve hozzáférhetővé teszi a katalitikus core-t.

A TG3 aktivitását a kalcium koncentráción kívül a GTP is szabályozza, amennyiben GTP kapcsolódik az enzimhez, akkor a harmadik Ca^{2+} ion kötőhelyet egy Mg^{2+} ion foglalja el, mely az enzimaktivitást gátolja (*Ahvazi et al, 2003*). Hasonló GTP mediálta regulációs mechanizmus a TG2 esetében is megfigyelhető.

A bőrben a TG3 a stratum granulosum felső részében (SG1, korábbi nomenklatura szerint átmeneti zóna), ill. a stratum corneum alsó részében expresszálódik leginkább, diffúz citoplazmatikus eloszlást mutatva (*Hitomi et al, 2003*).

A TG3 a CE kialakítása során elsősorban a loricrin és a „small proline rich proteinek” (SPRs) keresztkötését, valamint intramolekuláris izopeptid kötések formálódását katalizálja. Kiemelendő, hogy a folliculusok CE-jének kialakításában a TG3 a legjelentősebb transzglutamináz típus (korábbi elnevezése is erre utal: follicularis TG). Nagy affinitást mutat a döntően itt expresszálódó trichohyalinhoz (*Tarcsa et al, 1997*). A humán TG3 a cuticulában és a szőrszál medulla régióiban igen nagy enzimaktivitással végzi a trichohyalin és keratin intermediér filamentumok keresztkötését, ezáltal a hajszál morfogenezisében kiemelt jelentőségű (*Tarcsa et al, 2005*).

Önmagában TGM3 defektushoz kapcsolt humán kórállapotot a dolgozat benyújtásakor még nem írtak le, azonban a TG3, mint autoantigén szerepel az általában cöeliákiával asszociált dermatitisz herpetiformisban (*Sárdy et al, 2002*). Darier kórban a TG3 és TG5 expresszió teljes diszregulációját mutatták ki: ugyanazon lézió belül mind extrém magas expresszió, mind a teljes hiány kimutatható volt (*Candi et al, 2002*). Szintén említésre méltó, hogy az autoszomális recesszív öröklődésű, ichtyosiform erythrodermával járó, atópiás megbetegedésekkel, kóros bőr barrier funkcióval, valamint abnormis szőrzet (haj) fejlődéssel társult Netherton szindrómában, a bőrben a stratum granulosumban csökkent a TGM1 expresszió, és csaknem hiányzik a TGM3 expressziója (*Raghunath et al, 2004*).

A nemrég leírt TGM3 knockout egérmodellben elsősorban a (i.) szőrzet és bajusz eltérő növekedési mintázatát (hullámos jelleg) és eltérő protein extrahálhatóságát figyelték meg, érdemi kóros bőr barrier funkciót nem. A (ii.) a CE felépítése intaktnak, (iii.) a TEWL és a (iv.) bőrre cseppentett Lucifer-yellow festék penetrációja normálisnak bizonyult. A WT állatokhoz képest azonban, az (v.) epidermális struktúra in utero

fejlődése késett, (vi.) az újszülött állatok a toluidinkék festék retencióját mutatták a szőrszálak isthmus közeli régióiban, valamint (vii.) a knockout állatokból izolált corneocyták fragilitása fokozottnak bizonyult (*John et al, 2012*).

Dolgozatom későbbi részében részletesen tárgyalom a TGM3 knockout törzsben kutatócsoportunk által leírt látens bőr barrier defektust igazoló kísérleteket, a törzsben megfigyelhető fokozott szenzibilizációs hajlamot.

2.3.4 Transzglutamináz 4 (prosztata specifikus transzglutamináz)

A TGM4 gént a 3q21-22 locusban azonosították. Kifejeződése kizárólag a prosztatában és a vesicula seminalis szekrétumában figyelhető meg, feltételezhetően a fenti szekrétumokban található fehérjék keresztkötését végzi. Újabban agresszív viselkedésű prosztata tumorokban írták le, a prognózis biomarkereként és lehetséges terápiás célpontként szerepelhet (*Jiang et al, 2011*).

A TG4 knockout egerek megtermékenyíthetősége jelentősen csökkent, vélhetően a semen elégtelen viszkozitása miatt (*Dean, 2013*).

2.3.5 Transzglutamináz 5

Eltérően a TG1-től és TG3-tól, a TG5 protein (81 kDa) katalitikus aktivitásának kialakulásához nem szükséges proteolízis, Ca^{2+} jelenléte azonban igen. (*Candi et al, 2001*). A TGM5 gén a 15q15.2 locuson található (*Aeschlimann et al, 1998*), expressziója a keratinocytá differenciáció korai szakaszában mutatható ki (str. spinosum, str. granulosum-3,2), aktivitásának regulációja eltér a többi epidermiszben található transzglutaminázétól. Humán keratinocytákban a teljes TG5 protein mellett három alternatív splice variánst is leírtak (delta 3, delta 11, és delta 3/11), melyekben a 3-as, ill. 11-es exonok hiányoznak. Enzimatisz aktivitást csak a teljes TG5 protein és a delta 11 izoforma képes kifejteni. A TG5 és izoformáinak expressziója alacsony szintű, az aktív forma szubsztrátként elsősorban a loricrint, involucrint és az SPRs-eket használja. Hasonlóan több TG izoenzimhez, aktivitását a GTP és az ATP gátolja. A TG5 a sejten belül a sejtmag mátrixához és a citoskeletonhoz, az aktin és vimentin filamentumokhoz kötődik (*Candi et al, 2001*). Pontos szerepe a CE kialakulásának

összetett folyamatában még nem teljesen tisztázott. A TG5 a központi idegrendszeren kívül ubiquiter kifejeződést mutat.

A TGM5 mutációit a genetikailag és klinikailag is heterogén acral peeling szindrómában szenvedők egy csoportjában sikerült igazolni (*Cassidy et al, 2005*). A TG5 kóros, fokozott aktivitását írták le ichthyosis vulgaris, lamelláris ichthyosis és psoriasis esetében is. Darier kórban a TG5 expresszió teljes dysregulációját mutatták ki, egy lézió belül az enzim mind extrém magas expressziója, mind a teljes hiánya egyaránt kimutatható volt (*Candi et al 2002*).

A dolgozat benyújtásakor TGM5 knockout egértörzset nem közöl a szakirodalom.

2.3.6 Transzglutamináz 6

A TGM6 gén a 20q11-es locuson található. A TG6 fehérje a hereszövetben, a tüdőben, legnagyobb mértékben azonban a központi idegrendszerben expresszálódik, alternatív splicing révén két formában fordul elő. Az eddigi adatok alapján aktiválódásához hasonlóan a legtöbb TG-hez proteolízis szükséges. Allosztérikus szerkezetének, ezáltal aktivitásának modulálásában, hasonlóan a TG2- és TG3-hoz, Ca^{2+} ionok és guanin nukleotidok vesznek részt. A TG6 pontos funkciója még nem tisztázott, szerepét neurogenesisben és motoros funkciókban közreműködő neuronokban feltételezik (*Thomas et al, 2013*). A glutén szenzitív enteropathiahoz esetenként társuló cerebelláris ataxiás betegekben anti-TG6 IgA autoantitesteket, valamint a Purkinje sejtekben TG6-IgA depozitumokat írtak le (*Hadjivassiliou et al, 2008*).

TGM6 knockout egértörzs a dolgozat benyújtásakor nem szerepel a szakirodalomban.

2.3.7 Transzglutamináz 7

Legkevesebb adattal a transzglutamináz-7 enzimiről rendelkezünk. Locusa a 15q15.2-n található. Expressziója fiziológias körülmények között a hereszövetben, a tüdőben és a központi idegrendszerben történik. Magas metasztatikus kockázatú emlődaganatokban a TG7 expresszióját fokozottnak találták (*Jiang et al, 2003*), ennek gyakorlati jelentősége egyelőre nem ismert.

TGM7 knockout törzset a dolgozat benyújtásakor még nem írtak le.

2.3.8 XIIIa faktor (plazma transzglutamináz)

A plazma transzglutaminázként is ismert XIIIa faktor legismertebb funkciója a véralvadási kaszkád utolsó lépéseként a kialakult fibrinháló stabilizálása. A XIIIa faktort kódoló F13A1 gén a 6p24-25 locuson található. A plazma transzglutamináz a szolúbilis forma mellett számos szövetben megtalálható, így a thrombocytákban, astrocytákban, macrophagokban, a dermális dendritikus sejtekben, a placentában, a synovialis folyadékban, a szívizomban és az osteoblasztokban is (*Lorand et al 1993, Lorand et al, 2003*) Leginkább a véralvadási kaszkád aktiválódása során betöltött szerepét ismerjük. A plazmában két „A” és két „B” alegységből álló heterotetramerként található molekulában az „A” alegység az enzimatikusan aktív, míg a „B” alegység, hordozó fehérjeként funkcionál. A heterotetramer hasítását a thrombin végzi, majd a szabaddá váló „A” alegység, Ca^{2+} jelenlétében a fibrinháló térszerkezetét stabilizálja. A XIIIa faktor, hasonlóan a TG2-höz, szerteágazó biológiai szabályozó folyamatokban is részt vesz. Szerepét igazolták gyulladási folyamatokban, a csont és porc szintézisében, valamint sebgyógyulásban is (*Siri et al, 2009*).

Az F13A1 hiány autoszomális recesszív öröklésmentet mutató, vérzékenységgel és sebgyógyulási zavarral járó kórállapot okoz. Az F13A1 knockout egértörzsben ezzel összhangban véralvadási zavar, csökkent szöveti regeneráció, gyakori abortusz és károsodott angiogenesis mutatható ki (*Eckert et al, 2014 review*).

2.4 A cornified cell envelope (CE) kialakulása, a transzglutaminázok szerepe

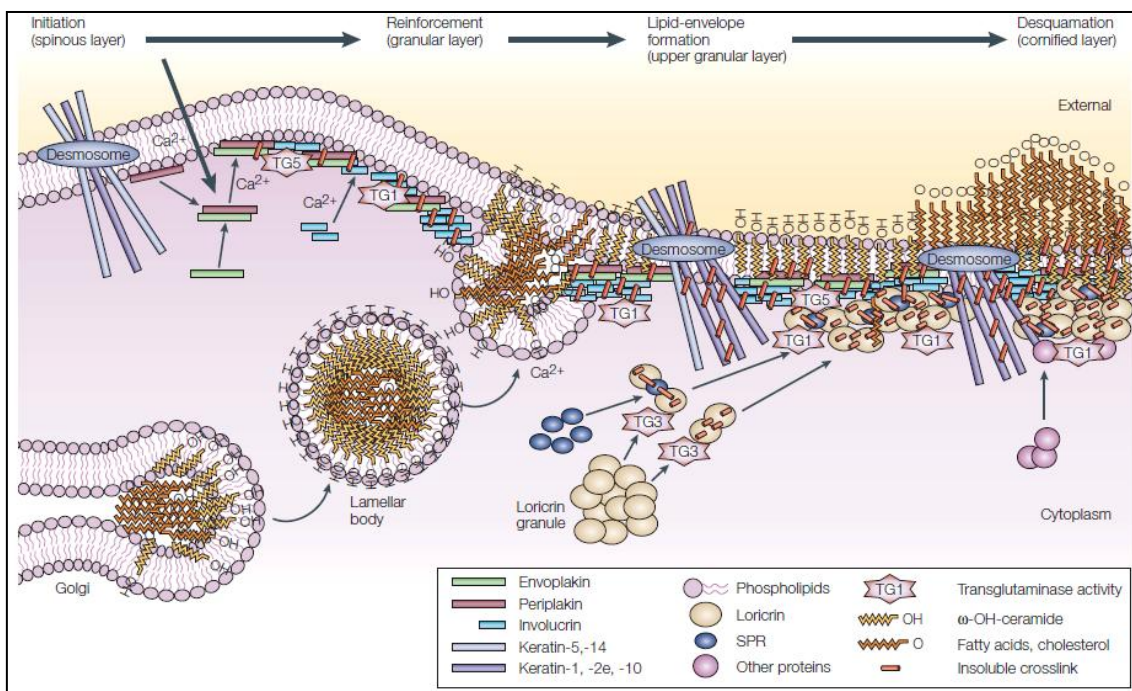
A transzglutamináz enzimesaládot tárgyaló 3. fejezetben az egyes TG enzimeket már részletesen ismertettem. Jelen fejezet a CE formálódásának fontosabb lépéseit tárgyalja, a folyamatban résztvevő transzglutaminázok (TG1, TG3, TG5) szerepére fókuszálva.

A CE az epidermisz legkülső részén elhelyezkedő keratinocyták terminális differenciálódása során kialakuló szarusejteket ún. corneocytákat övező, kb. 10 nm vastag, többszörösen keresztkötött polimer fehérjestruktúrából, és az ahhoz a TG1 által kovalens kötésekkel kapcsolt kb. 5 nm vastagságú lipid burokból álló komplex (*Nemes és Steinert 1999, Candi et al, 2005*). A CE kialakulása térben és időben szigorúan szabályozott folyamat, mely megkezdéséhez az intracelluláris Ca^{2+} ion koncentráció emelkedése szükséges (*Steinert és Marekov, 1999*).

A CE-ben számos különböző protein található, melyek egy része az ún. „epidermális differenciációs komplexnek” (EDC) nevezett génszakaszon (1q21) kódolt (pl. involucrin, loricrin, SPRs, profilaggrin, S100 proteinek) (*Mischke et al, 1996; Zhao és Endler, 1997, Kypriotou et al, 2012*). A CE specifikus fehérjék mellett jelentősek a dezmoszomális (envoplakin, periplakin), ill. egyéb struktúrproteinek is (keratin intermediér filamentumok, cornifelin, late envelope proteins stb.). A számos különböző protein közötti izopeptid keresztkötések kialakítását elsősorban a TG1 végzi.

A CE kialakulásának részleteit a 3. ábra tekinti át. A folyamat első lépésként az involucrin izopeptid kötésekkel kovalensen kapcsolódik dezmoszomális envoplakinhoz és periplakinhoz, melyet a TG1 és kisebb mértékben a TG5 katalizál. Ez a protein komplex a sejtmembrán alatti területre orientálódik, majd a TG1 az involucrint észterkötésekkel – a lamelláris testekből menetközben felszabaduló – hosszú szénláncú hidroxil-ceramidokhoz kapcsolja, ezáltal a keratinocyták még meglévő sejtmembránja alatt protein-konglomerátum alakul ki, mely mintegy horgonyzó struktúraként szolgál a CE-t alkotó további proteinek kapcsolódásához. Egyúttal a hidroxil-ceramid kötésekkel kapcsolt hosszú szénláncú zsírsavak a keratinocyták membrán kettős lipidrétegébe szervesen integrálódnak. A „horgonyzó” polimer struktúrához kapcsolódó legjelentősebb fehérjéje a loricrin, mely a CE összes proteintömegének kb. 75%-át adja.

A lipofil lorincrin a citoplazmatikus közegben granulumok formájában helyezkedik el. A lorincrint a TG3, főleg SPRs „hidakon” keresztül valamint a lorincrin molekulán belül létrehozott intramolekuláris keresztkötések kialakítását követően – az előbbi – sejtmembránnal már kapcsolódó, „horgonyzó” protein komplexhez köti. Az összetett proteinháléhoz végül az intermedier keratin filamentumok is kovalensen kapcsolódnak. Tehát a TG1, TG3 és TG5 koordinált működése szükséges a CE strukturális integritásának kialakulásához.



3. ábra A cornified cell envelope felépülésének fontosabb lépései

(Forrás: Candi et al, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 (4):328-40)

A fenti történésekkel (CE protein komplex képződése) párhuzamosan, a barrier funkció szempontjából szintén fontos lépésként, kiemelendő a keratohyalin granulumból felszabaduló filaggrin degradációs termékek szerepe is. A filaggrin egyrészt a keratin tonofilamentumokat keratohyalinná aggregálja, majd többszörös proteolízise során az ún. természetes hidratáló faktorok (natural moisturizing factors, NMF –pl. urokánsav, pirrolidon-karboxilsav) alapanyagául is szolgál, melyek nem kovalens módon kapcsolódnak a CE-hez. Az NMF szerepe a felszíni kissé savas fiziológias pH

kialakításában, az aktinikus károsodás kivédésében és a fiziológias vízvisszatartásban jelentős (*Irvine et al, 2011*).

Az intakt barrier funkció kialakításában az elszarusodás folyamata mellett a megfelelően koordinált desquamatio folyamata is rendkívül fontos, a két ellentétes folyamat együttesen felelős a bőr adekvát barrier funkciójának fenntartásáért. A hámlás diszregulációja éppúgy megbonthatja a barrier funkciót, így percután szenzibilizációhoz vezethet, mint a nem megfelelően zajló elszarusodás, (pl. SPINK5 gén mutációk-LEKTI diszfunkció- Netherton syndroma) (*Chavanas et al, 2001; Walley et al, 2001*).

2.5 Az epidermális fiziko-kémiai és immun barrier kölcsönös együttműködése, a barrier defektusok jelentősége

Az epidermális differenciáció (elszarusodás, cornificatio) majd a kialakult corneocyták hámlása (desquamatio) egyaránt szigorúan szabályozott folyamat. Mindkettő előfeltétele az anatómiailag és funkcionálisan intakt CE kialakulásának.

A többrétegű elszarusodó laphám evolúciója a szárazföldi élet létrejöttének előfeltétele volt. Egyrészt védelmet nyújt a külvilág felől érkező kártékony fizikai, kémiai, mikrobiológiai stimulusoktól, másrészt biztosítja a szervezet megfelelő folyadék- és ionháztartását. Mindehhez nagy mechanikai nyíróerőket is elviselő, kompakt, ugyanakkor, szükség szerinti adaptációra képes struktúrára kialakulására volt szükség.

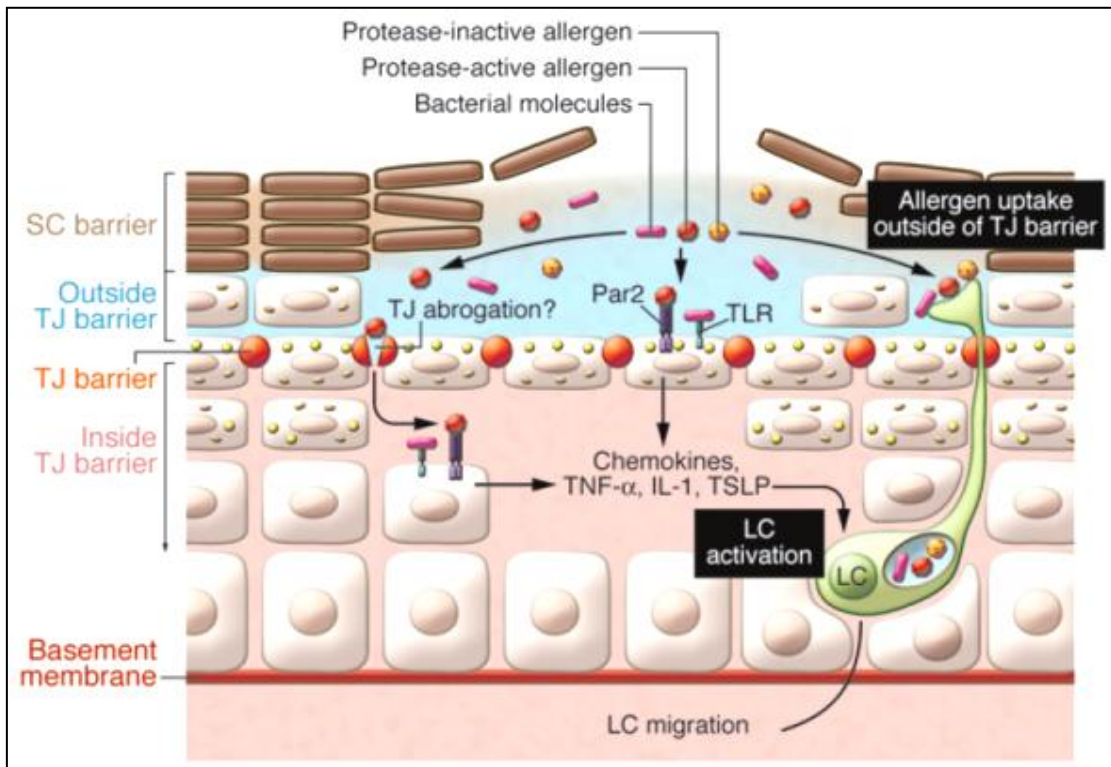
Az epidermisz differenciációja majd a CE formálódása térben és időben szigorúan szabályozott. A *str. basale* kerekded osztódó sejtjei részben helyben maradnak, és folyamatosan osztódnak, részben a felszín felé haladva létrehozzák a „tüskés-sejtek” rétegét, a *str. spinosumot*, melyben a sejtek alakja romboiddá válik, a „tüskék” az összekapcsoló desmosomáknak felelnek meg. A *str. spinosum* sejtjei tovább differenciálódva létrehozzák a *str. granulosum* rétegét, melyben megjelennek a keratohyalin granulomok és lamelláris testek. A *str. granulosum* sejtjei tovább osztódva egyre laposabbá válva, a korábbi nomenklatúra szerint az átmeneti (transitionalis), újabban stratum granulosum 1 (SG1) rétegén keresztül, az ellapult, sejtorganellumait elvesztő corneocytákból álló *str. corneumot* alkotják (Mackenzie, 1975). Érdekesképpen megemlíthető, hogy az egér fülének igen vékony epidermiszében is gyakorlatilag mindegyik réteg megtalálható (Mackenzie, 1970).

A bőr barrier funkciójáért döntően az epidermisz felel, melynek két legfontosabb fiziko-kémiai barrier struktúrája (i) a stratum corneum és a CE, valamint a (ii) a *str. granulosum*-ban található tight junction (TJ) réteg. A stratum corneum a „levegő-folyadék” („air-liquid interface”) határt képező fizikai barrier, míg a TJ réteg két folyadék kompartmentet választ el egymástól, így „folyadék-folyadék” („liquid-liquid interface”) barrierként szolgál (Brandner et al, 2015). Ehhez a fiziko-kémiai barrierhez elválaszthatatlanul hozzátartozik a bőr professzionális antigén prezentáló sejtjeiből álló Langerhans sejt hálózat, mely elsőként találkozik a fizikai barrieren átjutott antigénekkal, ezáltal meghatározó a bőr immunológiai barrier funkciójában.

A „fiziko-kémiai” és „immunológiai barrier” nem választható el egymástól, szabályozott módon együttműködik, ill. kölcsönösen oda-vissza hat egymásra (*Kubo et al, 2012*). A fizikai barrier minősége befolyásolja a kialakuló immunválasz tulajdonságait. A Langerhans sejtek nyúlványai nyugalmi állapotban megközelítik, de nem lépik át a TJ kapcsolatokat. A stratum corneum károsítása (pl. aceton kezelés, a külső sejtsorok ragasztószalaggal történő eltávolítása – ún. „tape stripping”) a keratinocyták proinflammatorikus citokintermelését (TSLP, TNF- α , IL-1 β) váltja ki, mely aktiválja Langerhans sejteket (*Wood et al, 1992*). Az aktivált LC-k nyúlványai ez -által képesekké válnak a TJ rétegen kívüli kompartmentből is antigén felvételre. *Kubo és mtsai* 2009-ben igazolták azonban, hogy ennek ellenére a TJ rétegen kívül-, és belül eső kompartmentek izolálása – a sérült stratum corneum és CE után, mintegy másodlagos védővonalként – továbbra is megmarad, melyet a de novo szintetizált, dinamikus keratinocyt-LC-TJ barrier tart fenn (*Kubo et al, 2009*)(4. ábra).

Jelenleg úgy tűnik, hogy az intakt TJ barrieren keresztül prezentált antigének főként protektív, Th₂ (IgG₁) humorális immunválaszt váltanak ki. Ellenben, ha az antigén már a TJ barrieren belül eső kompartmentben kerül az immunrendszer antigén prezentáló sejteinek látókörébe, (elsősorban dermális dendritikus sejtek, macrophagok de LC is) akkor a kialakuló immunválasz már számos, dominálón már nem a protektív IgG₁ humorális immunitás kialakulásának irányában halad tovább (*Ouchi et al, 2011*).

A fiziko-kémiai, és immunológiai barrier közötti kapcsolatot a fizikai barrier károsodását érzékelő, a veleszületett immunrendszer részét képező ún. „danger signal” receptorok tartják fenn. Ezek közé tartoznak a toll like receptorok (TLR –főként a TLR2 és TLR4), valamint a protease activated receptor 2 (PAR2). Aktiválódásuk hatására megkezdődik a keratinocyták proinflammatorikus és chemokin termelése, az in loco kialakuló „inflammosoma” képződése. Mindebből az is következik, hogy a fiziko-kémiai barrier minősége befolyásolja az immunológiai barrier működését is (*Wood et al, 1992; Nishibu et al, 2007; Ebner et al 2007; Briot et al 2009, Dai et al, 2011; Ouchi et al 2011*).



4. ábra Károsodott bőr barrier és szenibilizáció kapcsolata

- *Danger signal-ok (TLR, PAR2 aktiváció) hatására aktiválódó Langerhans sejtek -*

Az ábrán mutatott esetben az antigén felvétele a TJ rétegen kívüli kompartmentből történik, a fiziko-kémiai barrier így részlegesen fennmarad, ez a folyamat általában IgG₁ típusú antitesttermeléssel járó protektív immunválaszt eredményez. Ha az antigén – akár kémiai szerkezete, akár a dezintegrálódott, vagy genetikai okokból elégtelenül működő epidermális barrier miatt – és a cutan immun surveillance-t végző sejtek ettől eltérő módon találkoznak, akkor nagyobb eséllyel alakul ki allergiás immunválasz. (Forrás: Kubo et al, 2012, The Journal of Clinical Investigation, vol 122, 443)

Az epidermisz integritását elsősorban (i) diferenciációja (elszarusodás v. cornificatio), (ii) strukturális felépítése (CE ill. corneodesmosomák, desmosomák, TJ), (iii) szabályos lipid-fehérje homeosztázisa, (iv) ill. a proteázok és inhibitoraik által szigorúan szabályozott hámlás határozza meg. Ezzel összhangban több, a fenti folyamatokban résztvevő gén érintettségét írták le atópiás dermatitiszben és atópiás dermatitisz-szerű, ekzemával és fokozott szenzibilizációs hajlammal társuló kórképekben (*Barnes KC, 2010; Kubo et al. 2012*).

Az eddig leírt fontosabb ilyen géneket foglalja össze az alábbi 2. táblázat.

2. táblázat Atópiás dermatitisz és atópiás dermatitisz szerű kórképek genetikai háttere (*Kubo et al, 2012 után*)

Protein (Gén)	Funkció	Referenciák
Filaggrin (FLG)	Kreatohyalin granulomok fő alkotója keratin filamentumok rendezése degradációs termék: NMF	Smith FJD et al 2006; Novak et al, 2007
Serin peptidase inhibitor, Kazal type 5 (SPINK5)	KLK5 és KLK7 pH-függő gátlása	Walley AJ et al, 2001
Kallikrein-related peptidase (KLK7)	corneodesmosoma hasítása	Vasilopoulos Y et al, 2004
Corneodesmosin (CDSN)	corneodesmosma struktúrprotein	Oji V et al, 2010
Cystatin A (CSTA)	háziporatka protease cystein protease inhibitora	Vasilopoulos Y et al, 2007
Claudin 1 (CLDN1)	TJ transzmembrán protein	De Benedetto A et al, 2011

A transzglutamináz ill. TG3 defektusok jelentősége atópiás dermatitiszben, valamint a szenzibilizációra való hajlam aspektusából még nem ismert.

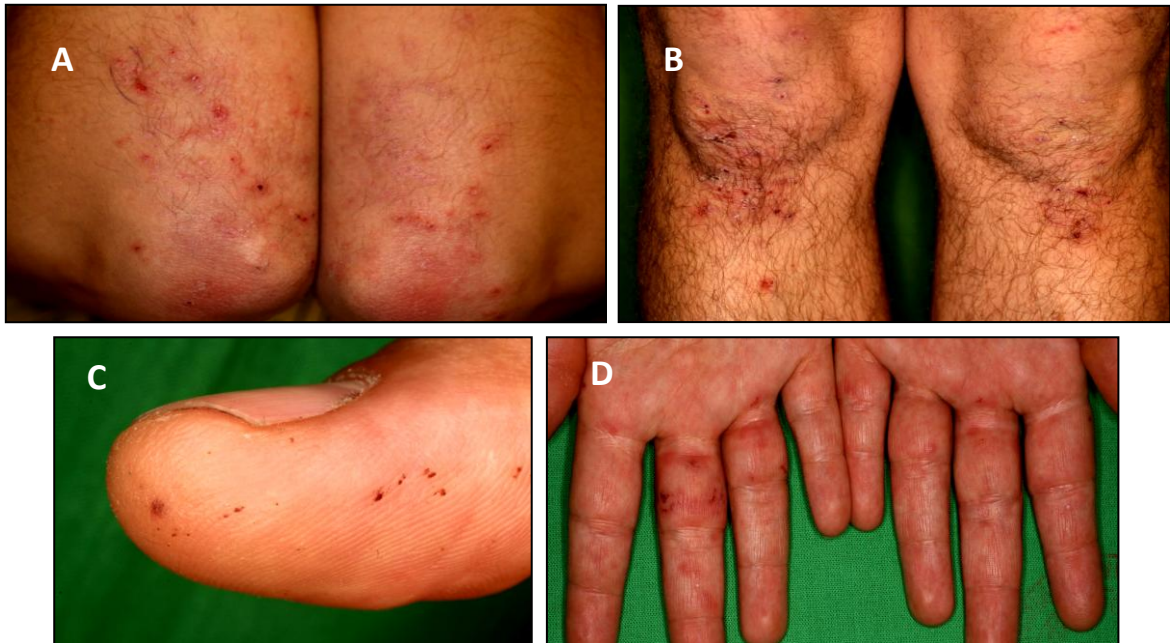
2.6 A dermatitisz herpetiformisz rövid ismertetése

A dermatitisz herpetiformisz (DH) ritka, dominálón papulovesiculosus tünetekkel járó, viszkető bőrbetegség. A DH-s betegek egyidejűleg, csaknem kivétel nélkül, tünetszegény gluténszenzitív enteropathiában (coeliakia, GSE) is szenvednek. Érdekes ugyanakkor, hogy a klinikailag manifeszt tünetekkel járó coeliakiások, általában DH tüneteit nem mutatják. A GSE a DH-val ellentétben lényegesen gyakoribb megbetegedés, prevalenciája országonként változik. Magyarországon *Korponay-Szabó és mtsai* 1999-ben több szerológiai teszt párhuzamos alkalmazásával (a GSE-ben nem ritkán előforduló IgA hiányos esetek szűrésére is gondolva) 427 gyermek szűrővizsgálatát végezték el, közöttük a coeliakia prevalenciáját meglepően magasnak 1:85-nek találták. A DH-ban kimutatható bélpatólógiai eltérések, szerológiai tesztek csaknem azonosak a coeliakiában észleltekkkel, mindkét kórkép oki kezelése a szigorú gluténmentes diéta (GMD). Emellett, mind a coeliakia, mind a DH igen gyakran társul HLA-DQ2 és HLA-DQ8 allélok hordozásával (*Spurkland et al, 1997*), kialakulásuk hátterében – legalábbis kezdetben – azonos patológiás történések állnak. A DH (és coeliakia) patogenezisében, a glutén, ill. pontosabban annak alkoholos kivonása során maradó fehérjefrakció: a gliadin a központi szereplő. A gliadint a bél lumenben jelenlevő intestinális peptidázok nehezen bontják, így a gliadin és kisebb immunogén oligopeptidek a vékonybél lamina propriáján keresztülvándololnak, majd az endomysium rétegét elérve a TG2 szubsztrátjává válnak. A gliadint a TG2 deaminálja és genetikai fogékonyság esetén IgA típusú deaminált gliadin és TG2 ellenes antitestek termelődése indul (*Godkin és Jewell, 1998*).

Folyamatos gliadin terhelés mellett a fenntartott immunstimuláció – és egyre romló bélnyálkahártya barrier funkció – miatt epitóp spreading következik be, megkezdődik az anti-TG3 IgA antitestek képződése is, melyek a DH fő autoantigénjei (*Sárdy et al, 2002*).

A DH klinikai képe igen polimorf. Jellemzőek a nem specifikus néhány mm-es erythemas papulák, papulovesiculák, gruppirozott hólyagcsák, erosiok és excoriatiók. A nem specifikus elemi jelenségekkel szemben azonban igen jellemző a tünetek eloszlása: a könyök-, és térdízületek felett (5. ábra a, b), glutealisan, a hát felső-középső régiójában valamint a vállakon. A betegek egy részében jellegzetes a főként kézujjakon,

ritkábban a lábujjakon, illetve a tenyéren jelentkező diszkrét haemorrhagiás papulosus tünetek, akrális purpurák megjelenése is (Karpati *et al*, 1986, Karpati 2012) (5. ábra, c, d).

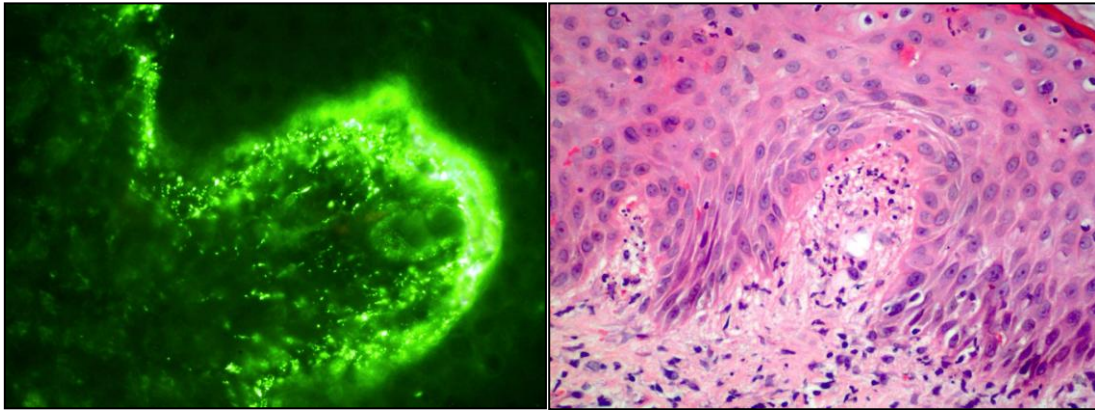


5. ábra A dermatitisz herpetiformisz típusos polimorf bőrtüneti

A könyökök (A) és térdék (B) feszítő felszíne feletti jellemző lokalizáció.
Akrális purpurák a hüvelykujjon (C), a tenyéren (D).

A dermatitisz herpetiformisz autoantigénje a TG3 (Sárdy *et al* 2002), mely az ellene képződött IgA típusú antitestekkel és C3-al együtt a dermális papillák csúcsán granuláris praecipitatumot képez. A jelenség a perilezionális bőr direkt immunfluoreszcens vizsgálatával jól kimutatható (6. ábra, a). A jellemző praecipitatumok akár évekkel később, a kórkép aktivitásától függetlenül tünetmentes állapotban is kimutathatók a bőrből. A tünetes bőrből készült biopszia hagyományos szövettani vizsgálata során jellemző a dermális papillák csúcsán észlelt fibrin jelenléte, mely a legkorábban megjelenő szövettani jelenség, emellett hamarosan neutrophil leukocytá gyülem és szubepidermális résképződés is megfigyelhető (6. ábra, b). A DH diagnózisa önmagában a szövettani vizsgálat alapján azonban nem mondható ki. A DH diagnózisának felállításában a legfontosabb a bőr direkt immunfluoreszcens vizsgálata,

emellett szükséges a szérumban a coeliakiában is kimutatható anti-TG2 (korábban endomysium ellenes antitest – EMA) jelenlétének vizsgálata is. A társuló látens coeliakia miatt ajánlott a vékonybél felső szakaszából történő multiplex biopszia, lehetőség szerint direkt immunfluoreszcencia elvégzésével együtt, melyben az IgA-TG2 ellenanyagok kötődése coeliakiára jellemző.



6.ábra: (A) Dermatitisz herpetiformisban jellemző granuláris IgA depozitum a papillák csúcsán. (B) A dermális papillákon megjelenő fibrin, neutrophilek (itt magtörmelék) és induló szubepidermális résképződés.

A DH tüneti kezelésében a dapsone (DPS) sikerrel alkalmazható, azonban ez nem befolyásolja a coeliakia aktivitását, nem állítja meg a kórkép progresszióját. A DH és coeliakia egyetlen oki kezelése kizárólagosan a szigorú és következetes gluténmentes diéta.

A cryofibrinogén jelenlétét az alábbi okokból kezdtük vizsgálni dermatitisz herpetiformisban.

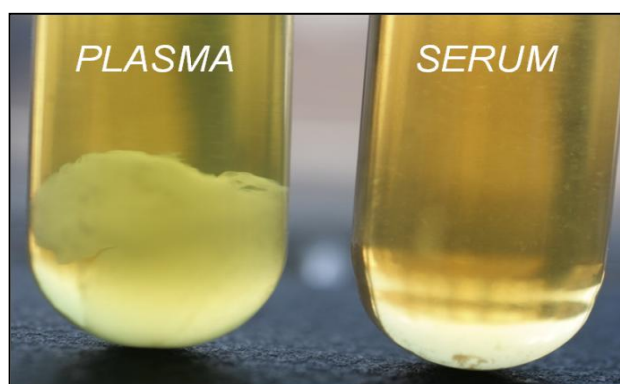
1. A papilláris dermisben a betegség korai stádiumában már megjelenő fibrin, fibronectin (Reitamo et al 1981; Jakubowicz et al 1981) és a TG3-IgA-C3 csapadék helye azonos.

2. A DH-s betegek egy részénél akralis purpurák jelennek meg (Karpati et al, 1986; Hongang et al, 2012).

3. Több esetismertetés is megjelent dermatitisz herpetiformis sikeres, nagy dózisu, kizárólagos heparin kezeléséről (Alexander Jo 1963; Tan et al, 1996).

2.7 Cryofibrinogénia, cryoglobulinémia

A cryofibrinogén (CF) kizárólag – az alvadásában gátolt vérből származó – plazmában található cryoprotein frakció. A CF-et tartalmazó plazma 4°C-ra hűtve jól látható csapadékot képez, mely csapadék 37°C-ra történő visszamelegítéssel feloldódik. [Ezzel szemben a cryoglobulin (CG), a savó globulin frakciójából származó módosult, hűtés mellett (4°C) szintén kicsapódó igen heterogén cryoprotein populációja]. A cryofibrinogént módosult fibrin, fibrinogén, fibronektin és faktor VIII képezi. Ha a vérben a fenti cryoproteinek valamelyike kimutatható cryofibrinogéniáról ill. cryoglobulinéniáról beszélünk. (7. ábra)



7. ábra Cryofibrinogénia

A bal oldalon 4°C-ra hűtött plazmában megjelenő csapadék utal a CF jelenlétére. A jobb oldali kémcsőben a 4°C-ra hűtött szérumban – minthogy a véralvadási kaszkád elemei már nincsenek jelen – csapadék nem észlelhető.

A tünetmentes cryofibrinogénia előfordulása a normál populációban 0-7% között mozog, míg ez az arány, bármilyen okból hospitalizált betegek esetében 8-13% közé tehető. A CF lehet primer (ismeretlen okú, vagy esszenciális), gyakoribb azonban betegséghez, leginkább autoimmun kórképekhez, vagy malignus szolid, ill. haematológiai folyamatokhoz történő társulása (szekunder cryofibrinogénia).

A cryofibrinogénia gyakran tünetszegényen zajlik, a Raynaud-jelenség ritka, a bőrtünetek közül leginkább az akrális purpurák, esetleg kisebb akrális ulceratiók kísérik (Michaud and Pourrat, 2013).

A cryofibrinogénia és dermatitisz herpetiformisz társulását munkacsoportunk írta le elsőként, a klinika heterogén DH-s beteganyagában 88 páciens adatai alapján (Bognár, Görög, Kárpáti, 2014).

3. Célkitűzések

1. A közelmúltban bemutatott TGM3 *-/-* egértörzsben a vizsgálok manifeszt bőr barrier defektust nem igazoltak. A transzglutamináz 3 lokalizációját és enzimátikus sajátságait, valamint elvárható szerepét a CE formálódásában, a knockout állatokban bőr barrier defektust feltételeztünk. Ez alapján célként tűztük ki a kután barrier funkcionális vizsgálatát a bőrön alkalmazott antigén terhelés mellett, amelyhez a jól dokumentált FITC-DBP kontakt dermatitisz modellt alkalmaztuk. Amennyiben feltételezzük, hogy a TGM3 *-/-* egértörzs immunaktivitása nem tér el a WT egerektől, azonos epikután antigén stimulusra adott fokozott gyulladáshoz vezetett bőr barrier defektust igazol.
2. A TGM3 *-/-* egerek FITC-DBP kontakt dermatitisz modell vizsgálata mellett célunk volt a TG3 hiányos egerek immunválaszát a kután barrier megkerülésével is vizsgálni.
3. Továbbiakban célként tűztük ki egy új *in vivo* metodika kidolgozását (kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával), mellyel a FITC perkután penetrációja *in vivo* is nyomonkövethető.
4. A bőr barrierfunkció időskorban rendszerint bekövetkező hanyatlásának ismeretében célul tűztük ki a FITC-DBP modellben különböző életkorú (8-12 hetes, 6 hónapos, 18 hónapos) TGM3 *-/-* illetve WT egér populációk szenibilizálhatóságának összehasonlító vizsgálatát.
5. DH-ban a TG3 patognomikus autoantigénként szerepel. A kórképben a típusos lokalizációjú papulovesiculák mellett gyakran észlelt akrális purpurák alapján vizsgálni kezdtük a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján kezelt DH-s beteganyagban a cryofibrinogén, cryoglobulin jelenlétét. Célunk volt, hogy a cryoproteinek prevalenciáját egy 88 fős DH-s betegpopulációban felmérjük, egyúttal vizsgáljuk a gluténmentes diéta, és dapsone kezelés hatását a cryoproteinek prevalenciájára.

4. Módszerek

4.1 TGM3 $-/-$ egértörzs

A TGM3 $-/-$ egértörzset a Kölni Egyetemen (Universität zu Köln) Prof. Dr. Mats Paulson és Prof. Dr. Neil Smyth vezetésével Susan John állította elő. A knockout (KO) törzs létrehozása a TGM3 allél 6. exonjában elhelyezett neomycin rezisztencia gén technológia felhasználásával történt. A C57BL/6 (WT) gént blasztocytákba ültetve előbb kimerát, majd stabil inszerciót elérve, többszöri visszakeresztezés után a stabil TGM3 $-/-$ törzs létrehozható volt. A KO állatok hím és nőstény példányai egyaránt életképesek, tenyészthetők, TGM3 knockout homozigóta utódok létrehozására képesek voltak (John *et al*, 2012). A TGM3 $-/-$ törzset a fenti kutatócsoporttal kollaborációban használtuk.

A TGM3 $-/-$ egerek fenotípusára a legjellemzőbb eltérés a fiatal életkorban jellegzetes hullámos szőrzet (8. ábra), mely az életkor előrehaladtával lényegesen kevésbé kifejezett.



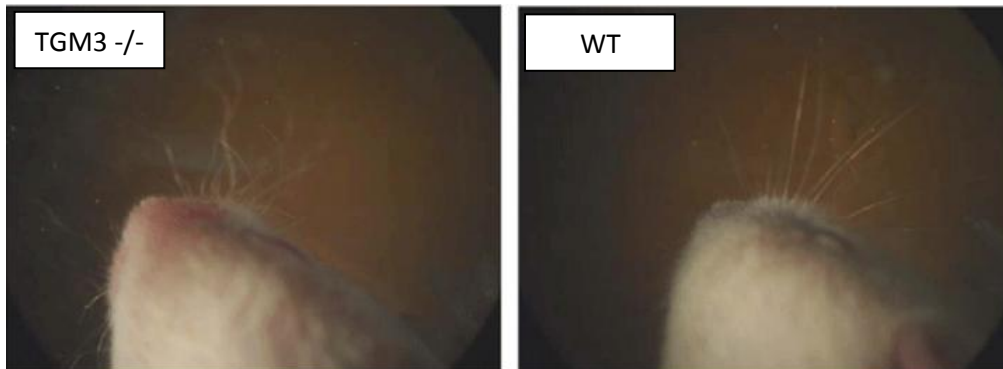
8. ábra 4 hetes TGM3 $-/-$ egér fenotípusa

Jellegzetes hullámos szőrzet, mely az állatok idősebbé válásával csaknem eltűnik.

(Forrás: John *et al*, PLoS One, 2012; 7(4):e34252.)

Ugyancsak jellegzetes- és idősebb életkorban is tapasztalható eltérés a TGM3 $-/-$ egerek sajátos „hullámos”, szabálytalan bajsza (9. ábra).

A szőrzet és bajusz szokásostól eltérő fenotípusú megjelenéséért valószínűleg a keratin függelékben nagymértékben kifejeződő trichohyalin - mint egyik fő TG3 szubsztrát - szuboptimális kereszt kötése felelős.



9. ábra TGM3 $-/-$ egér és C57BL/6 (WT) egér bajusz fenotípusa

A baloldalon látható TGM3 knockout egér bajsza „töredezett”, egyenetlen struktúrát mutat (egész élet során megmaradó fenotípus), míg a jobb oldalon látható C57BL/6 WT egér bajsza egyenes.

A knockout állatok háttér törzse a C57BL/6-os vad típus (WT) volt, így kontrollként minden kísérlethez ezt a törzset alkalmaztuk.

Az állatokat 12 órás sötét-világos ciklusú állatházban tartottuk, a kísérletek idejétől eltekintve szabad táplálék és folyadék hozzáféréssel. Az állatokat a kísérleteket megelőző napon egyesével, alumínium ráccsal fedett műanyag dobozokban helyeztük el.

Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsa, valamint az illetékes szakhatóságok jóváhagyták (22.1/1049/3/2010).

A szenzibilizációs kísérleteket három korcsoportba osztott egereken végeztük el: 8-12 hetes, 6-, ill. 18- hónapos nőstény állatokkal. Mindhárom korosztályban vizsgáltuk a fülvastagodási választ (mouse ear swelling test, MEST), illetve szövettanilag is értékeltük a füleket.

A flow-citometriás analízist, szérum IgE vizsgálatot, ill. a Propionibacterium acnes kiváltotta in vivo assay-t, valamint az in vivo kétfoton mikroszkópos méréseket a 8-12 hetes nőstény állatokon végeztük el.

4.2 Kontakt érzékenység kiváltása – az egér fülvastagodási teszt (mouse ear swelling test – MEST)

Az irodalom számos különböző metodikát - szenzibilizáló ágenszt és expozíciós időt - ismertet késői típusú túlérzékenységi reakció (DTH – delayed type hypersensitivity) egerekben történő kiváltására. Kísérleteinkhez a fluoreszcein-izotiocianát / dibutil-ftalát (FITC/DBP) modellt választottuk. A szenzibilizáció kiváltásához alapvetően *Hvid és mtsai (2009)* által leírt metodikát alkalmaztuk, módosításokkal.

A KO egerek hasán kb. 2x2 cm-es területet leborotváltunk (0. nap). 24 óra múlva (1. nap) a területre szabványos alumínium kamrában (Finn Chamber, 18mm, Phoenix, AZ) 0.5%-os FITC oldatot (oldószer: aceton/DBP (1:1 v/v) arányú elegye) helyeztünk el 24 órás okklúziót biztosítva (*10. ábra, a*). Kontroll csoportok esetében 160µl aceton/DBP 1:1 (v/v) arányú elegyét használtuk. A reagenseket a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO) rendeltük. Az okkluzív kötést 24 óra múlva (2. nap) távolítottuk el. A kísérlet 7. napján a korábban már leborotvált és exponált területet ismét leborotváltuk, majd másnap (8. nap), a 24 órás okkluzív epikután expozíciót a csoportnak megfelelően korábban is alkalmazott oldatok ugyanazon mennyiségével megismételtük. Az alumínium kamrák eltávolítása a 9. napon történt. Egy héttel később, a kísérlet 15. napján digitális mikrométer segítségével megmértük az egerek kiindulási fülvastagságát (0h), majd ezt követően mindkét oldali fül hátsó oldalán 20µl 0,5%-os, aceton/DBP 1:1 v/v oldatban oldott FITC ill. a kontroll csoportokban aceton/DBP 1:1 (v/v) arányú oldatával ecsetelés történt (*10. ábra, b*). A kezelt állatok füleinek vastagságát 24 és 48 órát követően ismételten megmértük (*10. ábra, c*). Mindkét fül azonos időben mért átlagát használtuk fel statisztikai kiértékelésre. A fülvastagság mérése minden esetben az apex középvonalában, arra merőlegesen történt. A fülvastagodás mértéke a létrejött gyulladással arányos. A MEST megbízhatóságát számos kémiai anyaggal végzett szenzibilizációs kísérlettel igazolták, az arany standardnak tekintett lymphocita transzformációs teszthez viszonyítva. (*Kim et al, 1990; Gad SC 1994; Garrigue et al, 1994; Kimber et al 1994; Kern et al 2010*).

Az alábbi 10. ábrán a fenti részletezett szenzibilizáció és re-expozíció folyamata látható lépésenként.



10. ábra (a) Epikután szenzibilizáció FITC ill. aceton/DBP oldattal, 24 órás okklúzióbat alkalmazva, két alkalommal (1 hetes különbséggel) szenzibilizáltuk az állatokat.



10. ábra (b) Re-expozíció a fülre A re-expozíció (antigén „challenge”) a fülék dorsalis oldalán, az első szenzibilizáció után 2 héttel történt a korábban alkalmazott anyagokkal.



10. ábra (c) MEST (fülvastagodás) értékelése A fülvastagodás a 24. ill. 48. órában mért fülvastagság és a kiindulási fülvastagság különbsége.

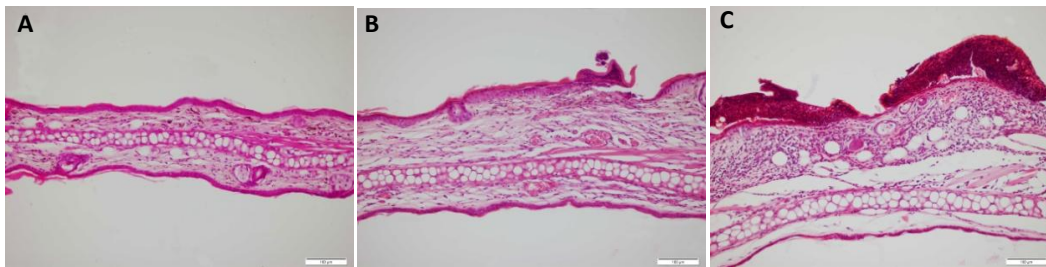
4.3 Szövettan

A 48 órás fülvastagság mérés után az állatok eutanáziája történt, majd a fülek eltávolításra kerültek.

A füleket 10%-os neutrális pufferelt formalin oldatban fixáltuk, majd standard dehidratációs, ill. parafin beágyazásos feldolgozást követően 2µm-es metszetekben hematoxylin-eosin (HE), valamint toluidinkék festés után vizsgáltuk.

A szövettani kiértékelés során, a gyulladás szemikvantitatív értékelésére a *Hvid és mtsai (2009)* által leírt módszer módosított változatát alkalmaztuk.

A HE festett metszetekben az epidermis hiperproliferációját, spongiosist és pörkök, a dermisben a gyulladásos infiltrátum jelenlétét értékeltük „0” (fiziológias állapot) ill. „++” (masszív gyulladásos reakció) közt elhelyezkedő szemikvantitatív skálán (11. ábra, a-c).



11. ábra A gyulladásos reakció szemikvantitatív értékelése

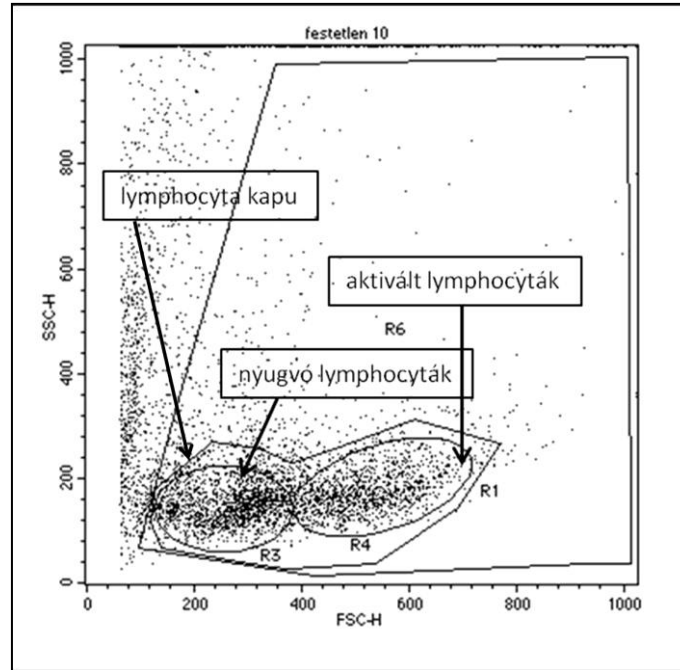
Baloldalon (A) a normál egérfül hisztológiai képe (szemikvantitatív skála = „0”). A középső kép (B), mérsékelt lobsejtes infiltrációt, epidermális hiperproliferációt, körülírt pörkképződést mutat (szemikvantitatív skála = „+”). Jobb oldalon (C) masszív gyulladásos infiltrátum, oedema és kifejezett haemorrhagias pörkképződés látható (szemikvantitatív skála= „++”) (bar=100µm, H&E festés).

A toluidinkékkel festett metszeteken az előbbiektől függetlenül a szubepidermalis, metachromasiásan festődő hízósejtek átlagos számát vizsgáltuk 5 látótérben, 200x nagyítással. A hízósejtszám szemikvantitatív kiértékelésére az alábbi skálát alkalmaztuk: 0-5 hízósejt = „0”, 5-10 hízósejt = „+”, >10 = „++”. A hízósejtszám az egy látótérben észlelt átlagos hízósejt számot jelöli.

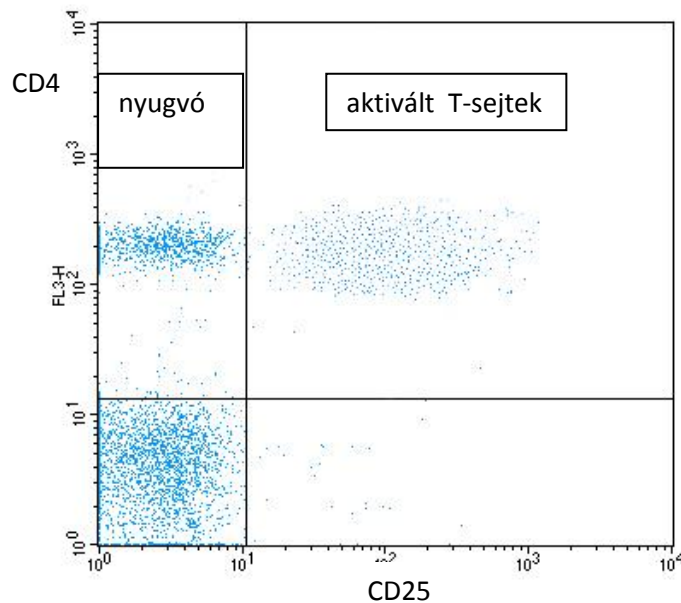
4.4 Áramlás citometriai (flow-citometriás) mérések

A fülek eltávolításával egy időben a drenáló nyirokcsomókat (2-4 db/állat) is kipreparáltuk, steril PBS-be helyeztük, majd petricsészében steril üvegeszközzel homogenizáltuk. A sejtszuszpenziót lecentrifugáltunk, majd a homogén felülúszót ismét PBS-ben szuszpendálva három egyenlő alliquot készítettünk. A sejtek fenotípus vizsgálatához az alábbi konjugált antitesteket alkalmaztuk: phycoerythrin-konjugált anti-egér CD3, PerCP-konjugált anti-egér CD4, ill. phycoerythrin-konjugált anti-egér CD25. Mindegyik alkalmazott antitestet a PharMingen International-tól (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szereztük be. Az antitesteket a mérések előtt pretitráltuk, a festési idők tekintetében a gyártó ajánlásait követtük. Méréseinkhez az asztali (bench-top) flow-citométer rendszert (FACSCalibur, PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) használtuk, az eredményeket CellQuest Pro program (PharMingen International, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 3.1-es verziójával ábrázoltuk és értékeltük. A mérési küszöböt minden minta esetében 10 ezer eseményre állítottuk be. A citométeren áthaladó sejtre eső lézerefény előrefelé történő szóródása (FSC) a sejt méretéről, míg az oldalirányú szóródás (SSC) a sejt méret mellett elsősorban a granuláltságról, morfológiai sajátosságokról informált. Az egyes sejt populációk azonosítása a típusos forward scatter (FSC) – side scatter (SSC), dot-plot grafikonokon történt (12. ábra, 13. ábra). A dot-plot ábrák mellett jelöletlen (antitesttel nem inkubált) szuszpenziókon a lymphocytákat kizárva, a FITC emissziós hullámhosszán (518-520 nm) hisztogramokat is felvettünk, felhasználva azt, hogy a szenzibilizáció során FITC-et alkalmaztunk.

Az eredményeket a CellQuest program 3.1-es verziójának használatával ábrázoltuk, ill. értékeltük. A flow-citometriás analíziseket 8-12 hetes nőtény állatokon végeztük el, a szenzibilizált és kontroll csoportokból 5-5 állat került felhasználásra.



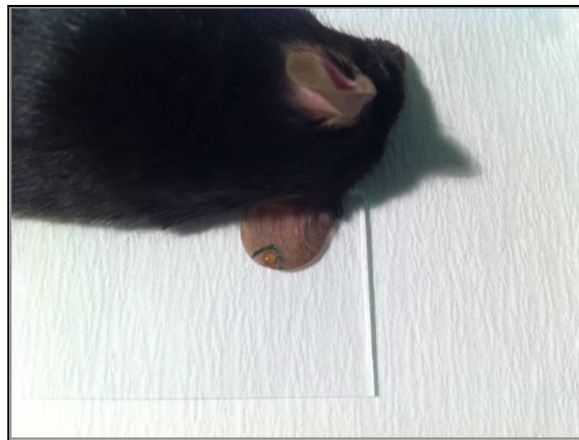
12. ábra Az áramlási citometria során felvett kapuk. Az X-tengely mentén a sejtek mérete (FSC), az Y-tengely mentén a sejtek granuláltsága (SSC) növekszik. R1= lymphocyták kapu, R3=nyugvó lymphocyták R4=blasztos lymphocyták, R6= nem lymphoid sejtek



13. ábra Az X-tengely mentén a CD25 expresszió mértéke, az Y-tengely mentén a CD4 expresszió mértéke növekszik. Bal oldalt a nyugvó, jobb oldalt az IL-2 nagy affinitású receptort (CD25) expresszáló aktivált T-sejt populáció.

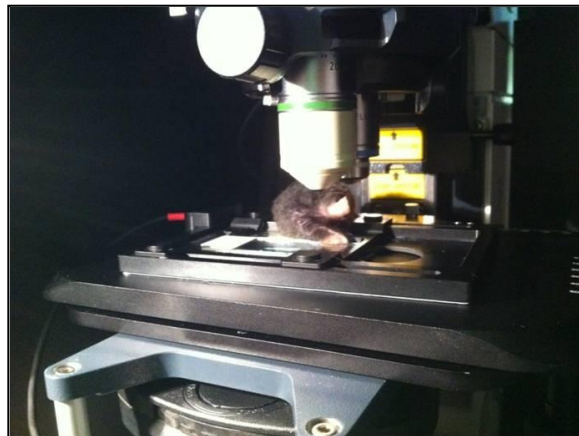
4.5 A transzepidermális FITC penetráció *in vivo* mérése kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával

Az állatokat intraperitonealis anaestheticummal elaltattuk, majd az egyik fülük ventrális oldalát állatorvosi gyakorlatban használt szövetbarát ragasztó (Vetbond™, 3M, St Paul, MN, USA) segítségével tárgylemezre rögzítettük. A fül dorsalis felszínére 2 µl 50 µg/ml-es dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott FITC-et pipettáztunk, majd az oldat száradása (15 perc) után kétfoton mikroszkóppal követtük a FITC penetrációját *in vivo* (14. ábra, 15. ábra). A mérést az ellenoldali fülön is elvégeztük.



14. ábra FITC penetráció *in vivo* mérése

Az altatott egér fülének ventrális oldala szokványos tárgylemezhez rögzített. A dorsalis felszínen mérjük a FITC transzepidermális penetrációját.



15. ábra *In vivo* FITC penetráció – kétfoton mikroszkóp

A kísérleti állat a kétfoton mikroszkóp tárgyasztalára helyezve.
A FITC penetráció mérése a 15. 30. és 40. percben.

A FITC, mint fluorofór gerjesztési hullámhossza kétfoton gerjesztési technikát alkalmazva az infravörös ($\lambda_{\max}=795$ nm) tartományba esik, azaz - szemben a hagyományos konfokális lézer technológiával -, nem a látható kék ($\lambda_{\max}=490$ nm), tartományban. Kétfoton excitáció során két, röviddel egymás után leadott alacsony energiájú foton vált ki egy nagy energiájú gerjesztő fotont (*Denk et al, 1990, Periasamy, 2001*). A FITC maximális emissziós hullámhossza ez esetben is a zöld tartományba - λ_{\max} emisszió =520-525 nm- esik.

A gerjesztéshez egy nagy teljesítményű, impulzus-üzemű, 795 nm hullámhosszra hangolt Ti-zafír lézert (FemtoRose 100 TUN NoTouch, R&D Ultrafast Lasers, Budapest, Hungary) használtunk. Az alkalmazott lézernyaláb gaussi sugárprofil mellett 76 MHz-es ismétlési frekvenciával 190 femto-szekundumos impulzusokat generált. A mintára eső átlagteljesítmény maximum 20 mW volt, mely mellett jól detektálható fluoreszcens jelet generáltunk, és így elkerülhető volt a szövetek termikus és fotokémiai károsodása (*Antal and Szipőcs, 2012*). A létrejött jelet megfelelő hullámhosszú szűrőkön át (bandpass ill. dichroikus filterek), egy Carl Zeiss gyártmányú kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkóppal detektáltuk (LSM 7MP). A méréseket 20x nagyítású víz immerziós objektívvel végeztük. Tájékoztató kísérletek után a penetrációt a jó ábrázolhatóság érdekében 15, 30, ill. 40 perces időpontokban regisztráltuk. Az optikai szeletelést, azaz „z-stack” technikát 850 μm x 850 μm -es területen, a stratum corneum felől a dermis felé 80 μm -es mélységig végeztük, az egyes horizontális síkok 8 μm -es távolságban helyezkedtek el egymástól, így összességében egy 850 μm x 850 μm x 80 μm^3 -es szövetminta került elemzésre. Az összeillesztett 3D-s ábrákat, illetve a fluoreszcencia intenzitás adatokat a ZEN software (Carl Zeiss) segítségével határoztuk meg. A mért fluoreszcencia intenzitás kvantitatív elemzéséhez csoportonként 3-3 állat reprezentatív, 30 perces z-stack felvételeit használtuk fel, vagyis az egész „virtuális” szövetminta fluoreszcenciáját mértük. A fluoreszcencia intenzitás analíziséhez az UTHSCA Image Tool for Windows 3.0 verziójú programot használtuk (*Breunig et al, 2012, König, 2000*).

A kísérletekhez csoportonként 3db 6-12 hetes WT ill. KO egeret használtunk.

4.6 Szubepidermális *Propionibacterium acnes* assay

A fülbe szubepidermálisan injektált *P. acnes* masszív gyulladást provokál (De Young LM et al, 1984). Az egerek bal fülébe Hamilton fecskendővel 20µl steril PBS-ben szuszpendált 10^{14} CFU *Propionibacterium acnes* törzset oltottunk. A jobb fül szolgált kontrollként, melybe ugyancsak 20µl térfogatú, steril PBS-t injektáltunk. A kialakult gyulladást 24 óra elteltével a MEST-nél leírt módosított *Hvid*-féle metodika szerint értékeltük. A jobb és bal fül vastagsága közötti különbség százalékos aránya alapján értékeltük a létrejött gyulladást.

4.7 Szérum IgE ELISA

A 48 órás fülvastagság méréssel párhuzamosan üvegkapilláris segítségével vért vettünk a retrobulbaris plexusból, majd az alvadás és centrifugálás után létrehozott szérumot -20 °C-on tároltuk az ELISA kísérletek elvégzéséig. A szérum IgE szint mérésére a közforgalmú ELISA KIT-et (Mouse IgE ELISA set, cat. no. 555248, BD Biosciences, San Jose CA), illetve a gyártó által ajánlott kiegészítő reagens készletet (OptEIA Reagent Set B (pH9.5 buffer) cat. no. 550534) BD Biosciences, San Jose CA) használtuk. A mérések során a gyártó előírásait követtük. A mérésekhez 5-5db 8-12 hetes WT, ill. TGM3-/- állatot használtunk.

4.8 A cryofibrinogén és cryoglobulin vizsgálatok beteganyaga

A tanulmányban kizárólag szövettanilag és direkt immunfluoreszcenciával igazolt dermatitisz herpetiformisban szenvedő betegeket vizsgáltunk - a betegség aktivitásától és szerológiai markerektől függetlenül - cryofibrinogén és cryoglobulin jelenléte után kutatva. Összesen 88 DH-s beteg, 60 férfi és 28 nő adatait dolgoztuk fel, az átlag életkor 36.5 ± 17.4 év volt.

Kontrollként retrospektív módon feldolgoztuk a Semmelweis Egyetem, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika laboratóriumában történt két éves periódusban cryofibrinogén és cryoglobulin feltételezett jelenléte miatt elvégzett vizsgálatok adatait.

Ezek a vizsgálatok főként autoimmunitás irányában vizsgált, vagy már diagnosztizált betegeknél (SLE, dermatomyositis, Raynaud-jelenség, különböző vasculitisek), valamint kisebb arányban egyéb bőrbetegek (különböző etiológiájú fekélyek, urticaria, livedo reticularis, mycosis fungoides) heterogén csoportjában történtek. A feldolgozott periódusban nem DH-s betegeknél összesen 233 cryoprotein (CF és CG) vizsgálat történt. A csoportot 56 férfi és 177 nő alkotta, az átlag életkor 52.9 ± 17.4 év volt.

4.9 Cryofibrinogén (CF) és cryoglobulin (CG) meghatározása DH-s betegeknél

Cryofibrinogén meghatározása: a betegektől 37 °C-ra előmelegített Vacutainer® (BD Biomedical, San Jose CA) natív csövekbe történt vérvétel. A levett vért 37 °C-on tartott kémcsövekbe fejtettük át, melyekhez 1ml steril 3,8%-os nátrium-citrát oldatot adtunk, majd az így alvadásban gátolt vért 4 °C-ra lehűtött centrifugában, 20 percig 2000 RPM fordulatszámon centrifugáltuk. A plazmát 4°C-on tartva 72 óra elteltével kvalitatíve értékeltük a csapadék (cryofibrinogén) jelenlétét. (1 cső 37 °C-on tartott plazma szolgált kontrollként.)

Cryoglobulin meghatározása: a betegektől ugyancsak 37 °C-ra előmelegített Vacutainer® natív csövekbe történt vérvétel, majd a vért kémcsőbe történő átfajtása után 3 óráig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a savót lecentrifugáltuk (2000 RPM, 20 perc) és 4°C-on tartva 72 óra után kvalitatív módon értékeltük a megjelenő csapadékot (cryoglobulin). (1 cső 37 °C-on tartott savó szolgált kontrollként.)

4.10 Statisztikai analízis

A statisztikai kiértékeléshez a nem parametrikus Student-féle T próbát (Mann-Whitney teszt) alkalmaztuk. Szignifikánsnak tekintettük az 5%-nál alacsonyabb p valószínűségi értéket ($p \leq 0.05$). Az analízis során az IBM SPSS Statistics 19 Software-t (IBM, Armonk, NY) használtuk.

5. Eredmények

5.1 Epikután szenzibilizációs vizsgálatok eredményei a FITC-DBP modellben

A FITC-DBP hatására kialakuló gyulladási választ az alábbi módokon vizsgáltuk:

- MEST (24, ill. 48 órás kiértékelés)
- szövettani vizsgálat (H&E, toluidinkék)
- flow-citometria (aktivált T- sejtek aránya a drenáló nyirokcsomókban)
- szérumban IgE szint mérése

A vizsgálatokat három korcsoportba (8-12 hetes, 6, ill. 18 hónapos populáció) tartozó TGM3 -/- és WT állatokon végeztük. A MEST-et és szövettani analízist mindhárom korcsoportban elvégeztük. A flow-citometriás és szérumban IgE szint méréseket kizárólag a 8-12 hetes populációkban végeztük el.

5.1.1 MEST eredmények – 8-12 hetes, 6, ill. 18 hónapos egér populációkon.

8-12 hetes populáció

A FITC-kezelt TGM3 -/- csoportban (n=20) 24 órában 18 ± 13 μm -es, 48 órában 61 ± 19 μm -es fülvastagodást mértünk, míg ugyanezen értékek a WT csoportban (n=16) 24 órában 11 ± 6 μm , 48 órában 16 ± 12 μm volt.

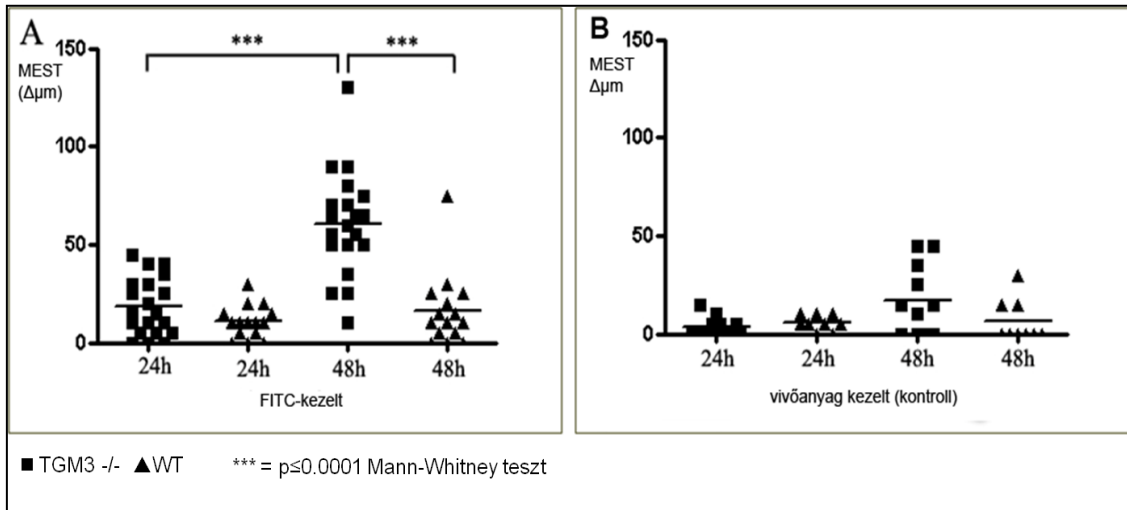
A 48 órában mért MEST adatok a TGM3 -/- csoportban szignifikánsan ($p \leq 0.0001$) magasabbnak bizonyultak a WT csoporthoz viszonyítva. A vivőanyaggal kezelt kontroll csoportok esetében a TGM3 -/- egerek (n=12) 24 órában 3 ± 4 μm -es, 48 órában 17 ± 14 μm -es fülvastagodást mutattak. A WT egerek (n=9) 24 óras fülvastagodása 6 ± 3 μm , 48 óras fülvastagodása 7 ± 9 μm -t ért el. A vivőanyaggal történt kezelés esetén szignifikáns különbség nem volt detektálható a csoportok között (lásd 16. ábra „a” panel, 17. ábra „a” panel).

6 hónapos populáció

A FITC-kezelt TGM $-/-$ csoportban ($n=8$) 24, ill. 48 órás kiértékelésnél $41\pm 23\mu\text{m}$, ill. $70\pm 28\mu\text{m}$ -es fülvastagodási értékeket észleltünk, míg a WT csoportban 24 órában $18\pm 7\mu\text{m}$, 48 órában $24\pm 9\mu\text{m}$ -es fülvastagodást regisztráltunk. A 48. órában mért MEST értékek ezen korcsoport esetében is szignifikánsan magasabbak ($p\leq 0.0001$) voltak a TGM3 $-/-$ egerek között. Vivőanyag kezelés mellett gyakorlatilag elhanyagolható mértékű fülvastagodást regisztráltunk. A TGM3 $-/-$ csoport ($n=6$) esetében a 24 órás érték $3\pm 12\mu\text{m}$, a 48 órás érték $7\pm 4\mu\text{m}$, a WT csoport ($n=5$) 24 órás fülvastagodása $3\pm 3\mu\text{m}$, a 48 órában mért értéke $5\pm 7\mu\text{m}$ volt. Szignifikáns különbség nem volt kimutatható (17. ábra, „b” panel).

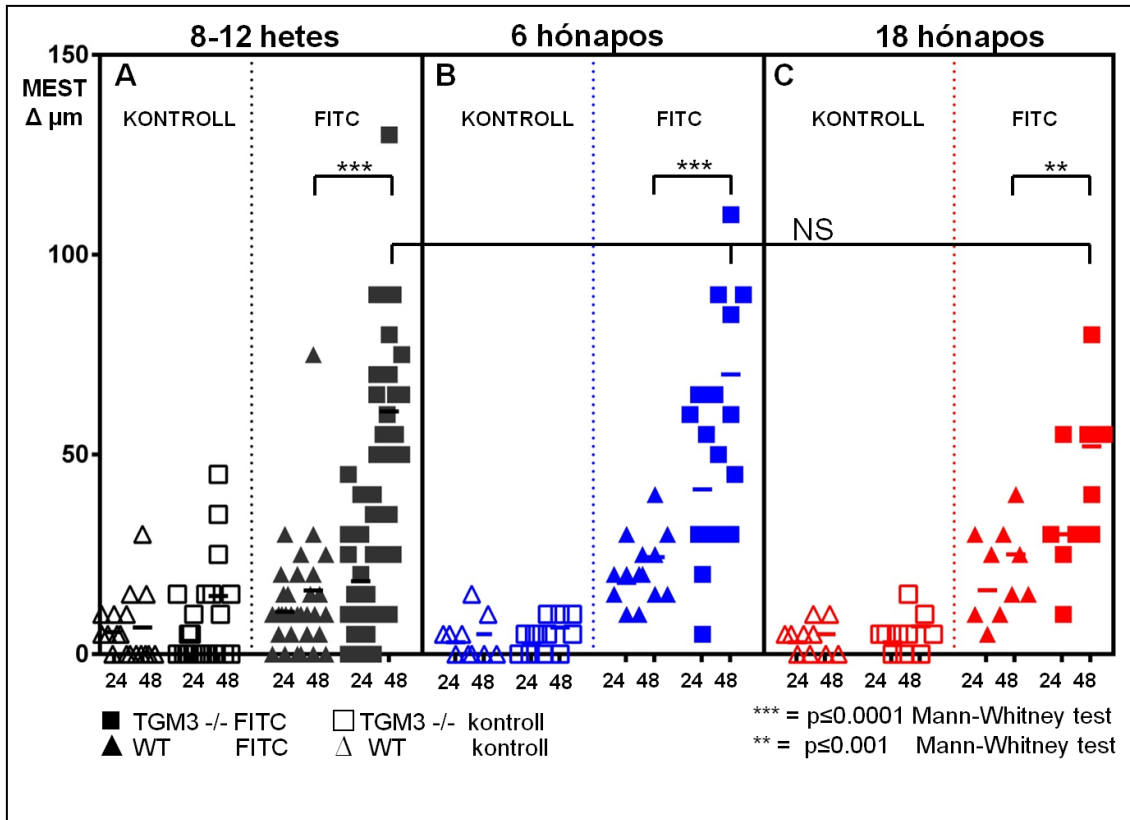
18 hónapos populáció

A MEST adatok alapján a legidősebb egerek is szenzibilizálhatók voltak, de szignifikáns különbséget a másik két korosztály azonos időben mért MEST értékei között nem tudtunk igazolni. A FITC-kezelt TGM3 $-/-$ egerek ($n=5$) MEST értéke 24 órában $30\pm 16\mu\text{m}$ -nek, 48 órában $52\pm 18\mu\text{m}$ -nek bizonyult, míg a WT egerek ($n=5$) esetében a 24 órában $16\pm 11\mu\text{m}$ -es, 48 órában $25\pm 11\mu\text{m}$ -es MEST értékeket regisztráltunk. A FITC-kezelt KO és WT csoport között 48 órában mért fülvastagodás ebben a korcsoportban is szignifikánsan magasabbnak ($p\leq 0.001$) bizonyult a TGM3 $-/-$ egerek javára. A vivőanyaggal kezelt csoportokban a TGM3 $-/-$ egerek ($n=5$) 24 órában $3\pm 3\mu\text{m}$ -es, 48 órában $7\pm 6\mu\text{m}$ -es MEST értéket, a WT csoport ($n=5$) tagjai ugyanezen időpontokban $3\pm 3\mu\text{m}$ -, ill. $5\pm 5\mu\text{m}$ -es értékeket mutattak. Vivőanyaggal kezelt csoportok között ebben a korcsoportban sem volt detektálható szignifikáns különbség (17. ábra, „c” panel).



16. ábra 8-12 hetes állatokon végzett MEST mérések eredményei

Az „A” panelen a FITC kezelt csoportok, a „B” panelen a vivőanyaggal kezelt csoportok láthatók. A ■ szimbólum a TGM3 $-/-$, a ▲ szimbólum a WT csoportra utal, a grafikon függőleges tengelyén a fülvastagodás mértéke látható. A FITC kezelés hatására mind a WT, mind a TGM3 knockout csoportban észleltünk szenzibilizáció kialakulására utaló fülvastagodást (MEST válasz), mely a TGM3 $-/-$ populációban, a 48 órás kiértékelésben szignifikánsan nagyobb mértékű volt ($p \leq 0.0001$). A vivőanyaggal kezelt csoportok közt sem a 24, sem a 48 órás kiértékelés során nem mértünk szignifikáns különbséget a csoportok között. Néhány TGM3 $-/-$ egérben azonban vivőanyag kezelés mellett is megfigyeltünk kismértékű fülvastagodást, melyet az aceton irritáló hatásának tulajdonítottunk.



17. ábra MEST válasz életkorok szerinti csoportosításban

A négyzet szimbólumok a TGM3 $-/-$, a háromszög szimbólumok a WT csoportokra, a kitöltöttek a FITC, az üresek a vivőanyaggal kezelt csoportokra vonatkoznak. A függőleges tengelyen a fülvastagodás mértékét, a vízszintes tengelyen, az ábrán jelölt csoportokat tüntettük fel. Az „A” panel a 8-12 hetes, a „B” a 6 hónapos, a „C” a 18 hónapos populációk adatait mutatja.

FITC kezelésre mindhárom korosztály esetében kialakult a késő típusú hiperszenzitívitási reakciót jelző MEST válasz, mely minden korcsoportban a 48. órában tetőzött. A 48. órás fülvastagodási értékek a FITC kezelt, TGM3 $-/-$ csoportokban, mindhárom életkorban szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a megfelelő életkorú vad genotípushoz viszonyítva. A korcsoportok azonos időpontban mért reaktivitása között azonban szignifikáns különbséget nem észleltünk. Vivőanyag kezelés mellett egyik korcsoport sem mutatott jelentősebb fülvastagodási választ, a knockout és vad típusú állatok válaszkészségben oldószer kezelés mellett nem találtunk szignifikáns különbséget.

5.1.2 Hisztopatológiai vizsgálatok eredményei

A FITC-el ill. vivóanyaggal történt re-expozíció után az állatok füleit eltávolítottuk, majd a módszerek fejezetben leírtak szerint H&E és toluidinkék festéssel, szemikvantitatív skálák segítségével értékeltük azokat. A szövettani elemzéseket - csakúgy, mint a MEST-et - mindhárom korcsoportban elvégeztük. A szövettani elemzés során legjobban az epidermisz kiszélesedése, pörkösödés megjelenése, valamint a dermisz kevert sejtes infiltrátumának mértéke volt megítélhető, míg az ödéma jelenléte (mely a MEST-ben jól detektálható), a standard deszikkációs módszerek miatt szövettanilag lényegesen kevésbé megbízhatóan értékelhető. Azonban a szövettani eredmények mindhárom korosztály esetében jól korreláltak a MEST mérések eredményeivel.

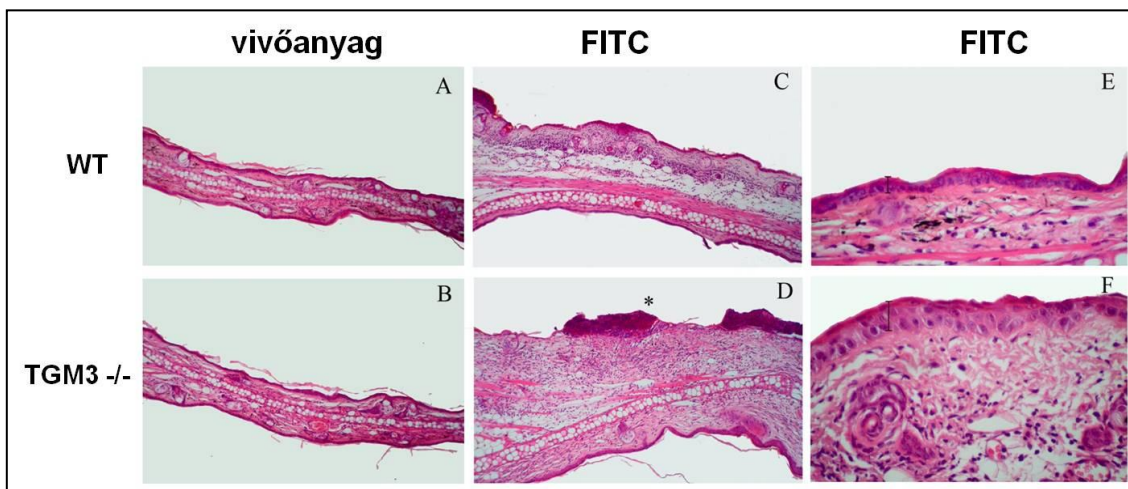
A szövettani vizsgálatok során mindhárom korcsoport esetében azonos eltéréseket találtunk. Vivóanyag (DBP-aceton) kezelés mellett sem a WT, sem a TGM3 -/- egerek esetében nem tapasztaltunk gyulladásra utaló hisztológiai jeleket (18. ábra a, b). FITC kezelés hatására a WT csoportban mérsékelt kevertsejtes gyulladással infiltrátumot, az epidermisz kismértékű kiszélesedését (spongiosis) láttuk (18. ábra c, e). A FITC kezelt TGM3 knockout csoportokban a dermális gyulladással infiltrátum, valamint az epidermisz hiperplázia lényegesen nagyobb mértékű volt, gyakran figyeltünk meg haemorrhagias pörkképződést is, mely a WT csoportban csak ritkán fordult elő (18. ábra d, f).

A toluidinkékkel festett metszeteken, az előbbiektől függetlenül értékelt szubepidermális átlagos hízósejt szám minden csoportban több mint 10 volt látóterenként, számukban életkor szerint sem találtunk szignifikáns különbséget.

A fentieknek megfelelően kiértékelt adatokat az 3. táblázat mutatja be szemikvantitatív skálán.

3. Táblázat A gyulladásos válaszreakció összefoglaló hisztopatológiai kiértékelése (szemikvantitatív skála). FITC kezelés mellett a vad típusú egerekben mérsékelt, a TGM3 knockout csoportban kifejezett gyulladásos reakció alakult ki, míg vivőanyag kezelés mellett gyakorlatilag fiziológias szövettani képet láttunk mindkét csoport esetében. A hízósejt számot sem a FITC, sem a vivőanyag kezelés nem befolyásolta. A megfigyelések mindhárom korcsoportban azonosak voltak.

Csoportok	Epidermális hyperplasia	Dermális infiltrátum	Hízósejtek
TGM3 -/- FITC	++	++	++
TGM3 -/- kontroll	0	0	++
WT FITC	+	+	++
WT kontroll	0	0	++



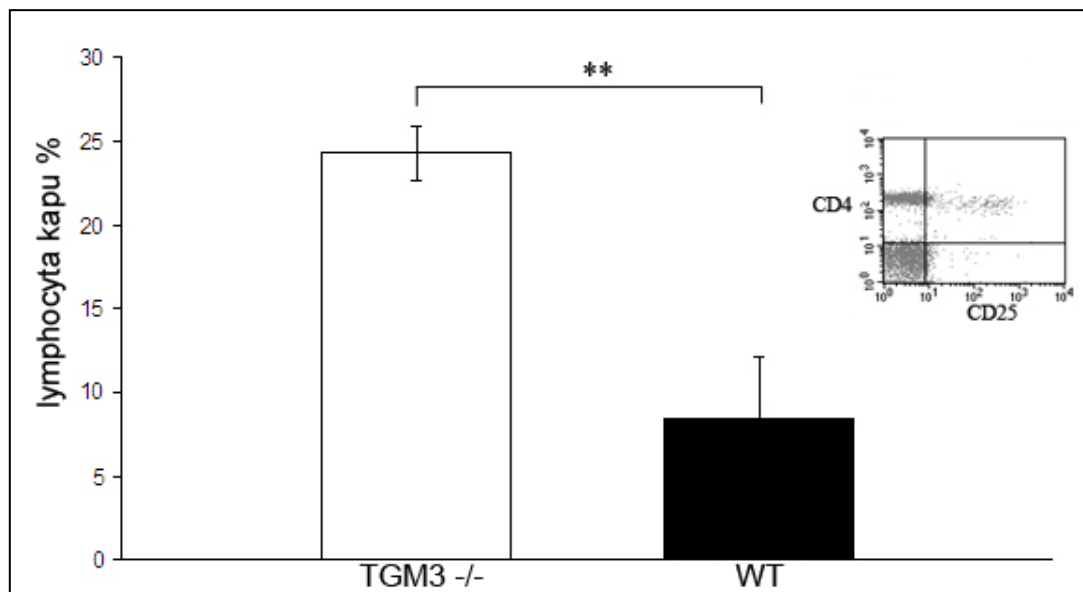
18. ábra Típusos szövettani képek, 8-12 hetes állatokban.

Vivőanyag kezelés mellett lényegében fiziológias viszonyok a vad (A), és knockout (B) csoportban. FITC kezelésre kialakult mérsékelt gyulladásos infiltrátum a vad (C) és masszív infiltrátum ill. pörkösödés a knockout (D) csoportban. FITC kezelés mellett tapasztalt epidermális hiperplázia a vad (E) és TGM3 knockout (F) egerekben.

5.1.3 Emelkedett aktivált T-sejt arány a FITC kezelt, TGM3 $-/-$ egerek nyirokcsomóiban

A fokozott gyulladást jelző nagyobb mértékű fülvastagodás és sejtes infiltrátum kialakulásával párhuzamosan várható volt, hogy a regionális nyirokcsomókban T-sejt aktiváció zajlik. Ennek igazolására FITC és vivőanyag kezelt knockout és vad típusú egerek drenáló nyirokcsomóit a 48 órás fülvastagság méréssel egy időben eltávolítottuk, szuszpendáltuk, majd azokon áramlási-citometriát végeztünk. A CD4, CD25 kettős pozitív sejtek az aktivált T-sejteknek felelnek meg, melyek százalékos arányát vizsgáltuk a lymphocytáknak belül. Úgy találtuk, hogy a FITC-kezelt TGM3 $-/-$ egerekben az aktivált T-sejtek aránya szignifikánsan ($p \leq 0.01$) magasabb volt ($24.2 \pm 2.5\%$), mint FITC kezelt WT társaikéban ($8.2 \pm 3.3\%$) (19. ábra).

Az oldószerrel (DBP: aceton) kezelt populációkban a knockout és vad típusok között az aktivált T-sejtek arányában szignifikáns különbség nem volt detektálható (WT csoport: $1.4 \pm 0.8\%$; TGM3 knockout csoport $2.5 \pm 1.1\%$).

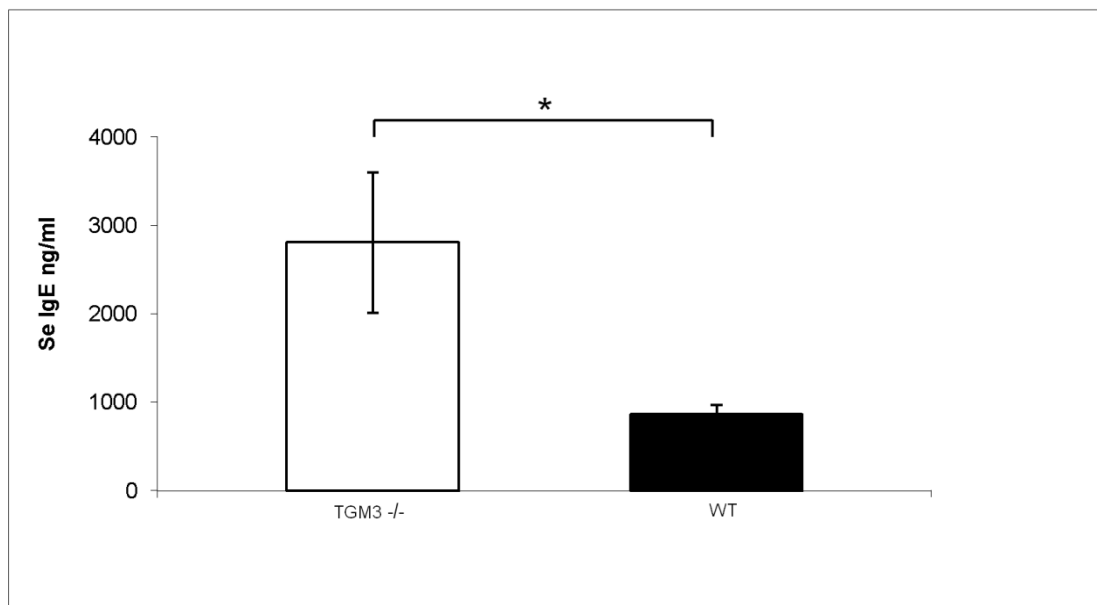


19. ábra Aktivált (CD4, CD25 pozitív) T-sejtek emelkedett aránya a FITC kezelt egerek drenáló nyirokcsomóiban. A FITC kezelés mellett az aktivált T-sejtek arányát a knockout csoportban szignifikánsan ($p \leq 0.01$) magasabbnak találtuk, mint a vad genotípusú egerek esetében.

5.1.4 Emelkedett szérum össz IgE szint a FITC kezelt TGM3 $-/-$ egerekben

Az össz IgE szint mérésével arra kerestünk választ, hogy az aktivált T-sejtek nagyobb aránya, a fokozott MEST válasz és hisztológiailag is verifikált gyulladás mellett létrejön-e a FITC-DBP modellre jellemző Th2-polarizált immunválasz. Méréseink során azt találtuk, hogy a FITC-kezelt knockout állatok össz szérum IgE szintje a vad típusúakhoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett.

A totál szérum IgE szint a FITC-kezelt vad típusú állatokban (n=5) 868 ± 107 ng/ml, míg a TGM3 knockout csoportban (n=5) szignifikánsan magasabb $2,810 \pm 796$ ng/ml volt ($p \leq 0.05$) (20. ábra). A naiv, kezeletlen WT egerekben (n=5) 72 ± 35 ng/ml, a TGM3 knockout állatokban (n=5) 87 ± 27 ng/ml össz IgE szinteket mértünk.



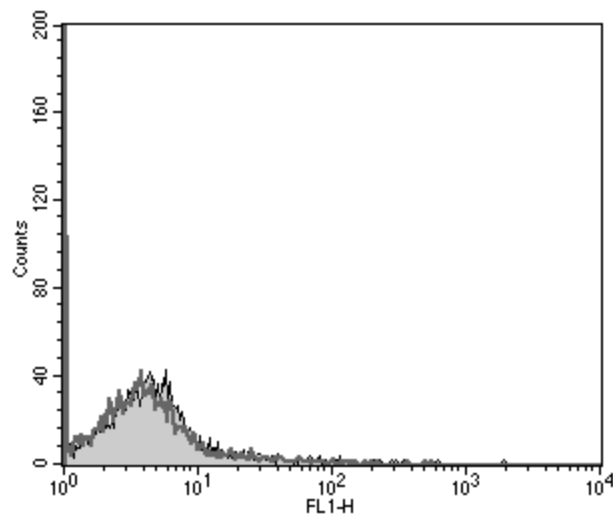
20. ábra Szignifikánsan emelkedett IgE szint a FITC kezelt TGM3 $-/-$ egerekben

FITC kezelés hatására a naiv állatok közt mért IgE szint jelentős emelkedését tapasztaltuk mind a WT, mind a TGM3 knockout csoportban, azonban az emelkedés a knockout populációban szignifikánsan magasabbnak bizonyult ($p \leq 0.05$).

5.2 FITC pozitív sejtek detektálása a drenáló nyirokcsomókban flow citometriával

Kihhasználva a FITC erőteljes fluoreszcens tulajdonságát, flow-citométerrel 5-5 db WT és TGM3 $-/-$ egér jelöletlen nyirokcsomó szuszpendátumában lemértük a lymphocytákn kívül eső sejtekben a FITC emissziós maximumán detektálható fluoreszcenciát.

Feltételeztük, hogy a TGM3 knockout állatok epidermiszén több FITC penetrál, így a Langerhans sejtek és dermális dendritikus sejtek nagyobb mennyiségű FITC prezentálására képesek a drenáló nyirokcsomókban. Bár a knockout állatok esetében tendenciájában jelzetten nagyobb mértékű fluoreszcens jelet kaptunk, a különbség a vad és knockout csoportok között elhanyagolható volt (21. ábra).



21. ábra FITC emissziós hullámhosszán detektált fluoreszcens jel hisztogramja egy reprezentatív TGM3 $-/-$ és WT egérben

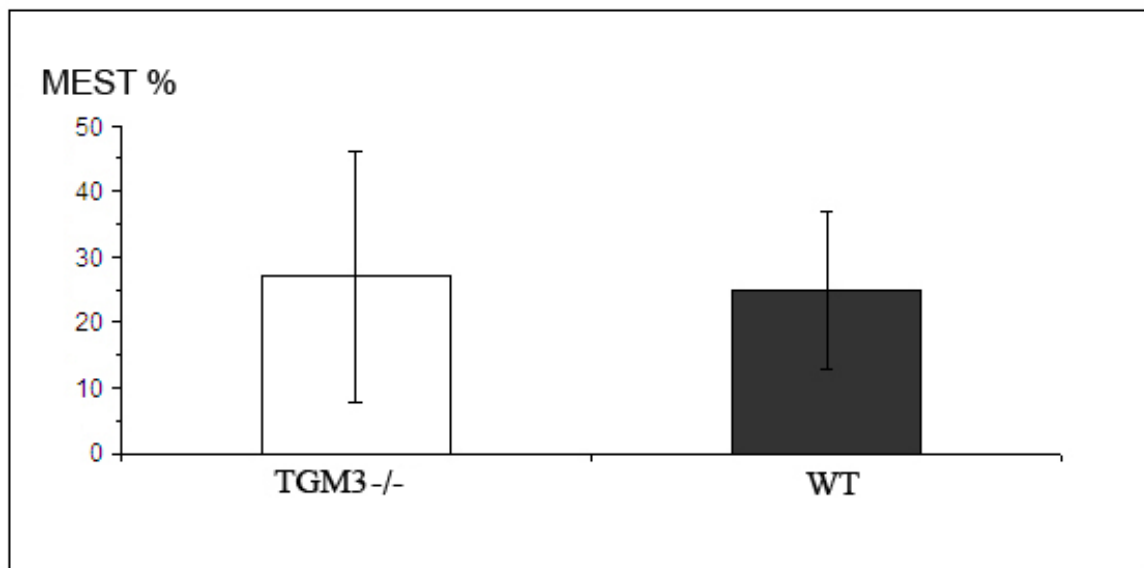
A világosszürke szín a WT, a sötétszürke szín a TGM3 knockout egérre utal. A függőleges tengelyen a detektált „fluoreszcens esemény” (sejtszám), a vízszintes tengelyen a mért fluoreszcencia intenzitása látható. A knockout egerek esetében több fluoreszkáló sejtet detektáltunk, azonban a különbség - akár a sejtek számát, akár a fluoreszcencia intenzitás maximumát tekintve - minimálisnak mutatkozott.

5.3 Szubepidermális Propionibacterium acnes assay

Annak vizsgálatára, hogy a FITC-DBP modellben mutatott fokozott szenzibilizációs hajlam nem pusztán a TGM3 knockout egerek eltérő immunválaszának következménye, szubepidermálisan adott *P. acnes* törzs kiváltotta MEST-et végeztünk.

A szubepidermálisan az állat fülébe injektált *P. acnes* egér, ill. patkány modellben masszív, hosszantartó gyulladásos választ provokál, mely alkalmas az immunválasz nem specifikus monitorizálására is. A módszer segítségével az epidermiszt megkerülve az antigént közvetlenül a dermiszbe jutattuk, és feltételeztük, hogy ha így alakul ki eltérő mértékű gyulladásos reakció, az nyilvánvalóan az eltérő immunválasz következménye.

Ahogy az 22. ábrán is látható, a knockout és WT egértörzs hasonlóképpen reagált a beadott antigénre. A 48. órában mért MEST-en a TGM3 $-/-$ törzs $27 \pm 19.3\%$ -os, míg a WT törzs $25 \pm 12.2\%$ -os fülvastagodást mutatott az ellenoldali steril PBS kezelt fülhöz viszonyítva, mely különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0.2254$, Mann-Whitney teszt).

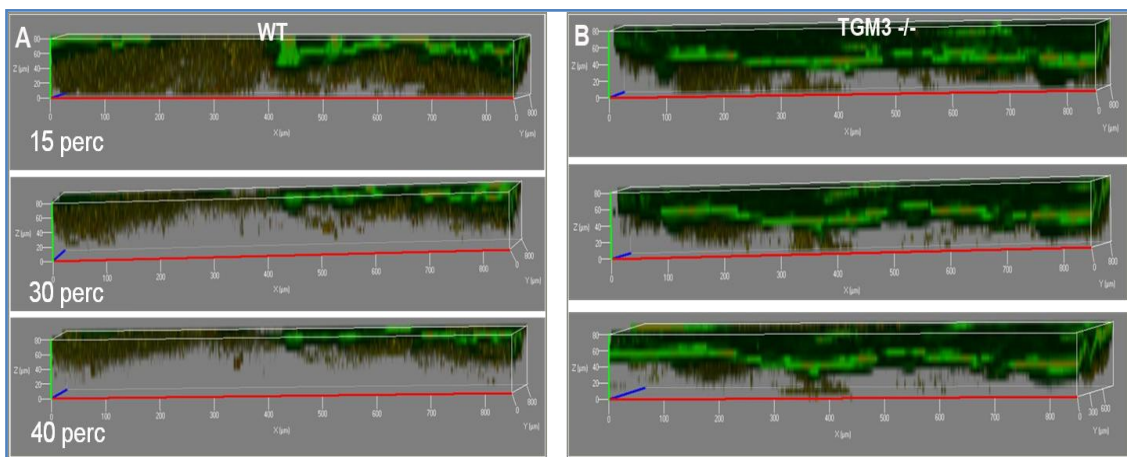


22. ábra Szubepidermálisan adott *P. acnes* indukálta fülvastagodás (MEST)

Az epidermisz alá injektált $20\mu\text{l } 1 \times 10^{14}$ CFU *P. acnes* törzs hasonló mértékű fülvastagodást váltott ki a TGM3 knockout és vad típusú egerek esetében.

5.4 Transzepidermális FITC penetráció mérése *in vivo* kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával

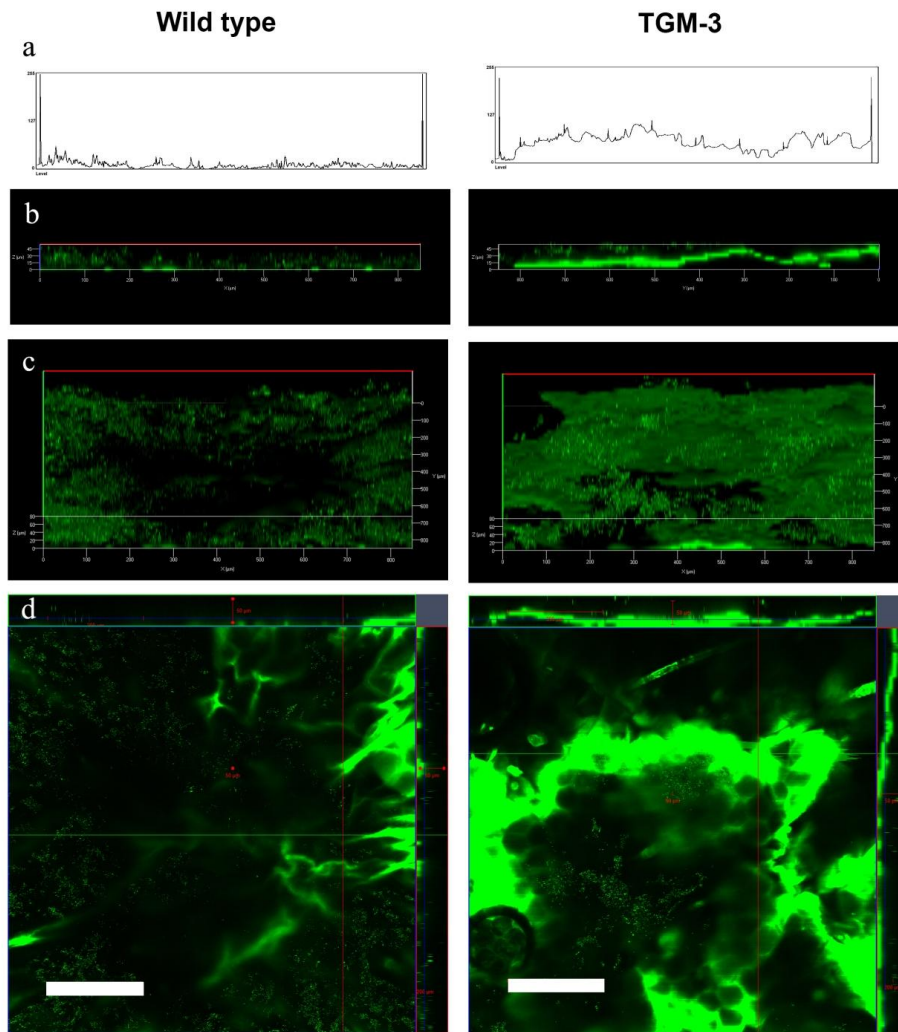
Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a FITC perkután penetrációja eltérő a TGM3 knockout és WT egerek esetében. A különbség mind a penetráció mintázatában, mind sebességében szembevető volt. A FITC a TGM3 $-/-$ egerek epidermiszén gyorsan áthatolva 30 perc elteltével 20 μm mélységben jól látható fluoreszcens „frontvonalat” mutatott, míg a WT egerek esetében a FITC lényegesen tovább időzött az epidermisz felszínén, fluoreszcens jele halvány, elmosott, homályos mintázatú volt. (23. ábra a, b; 24. ábra).



23. ábra FITC *in vivo* perkután penetrációja kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiával

„A” panel: altatott WT egér fülének dorsalis részére cseppentett 50 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú FITC oldat halvány, szóródott, elmosott szélű fluoreszcens jele. Az oldat az intakt epidermiszén, mint elsődleges barrieren nehezen és lassan penetrál.

„B” panel: azonos körülmények között vizsgált TGM3 $-/-$ egérben mért FITC penetrációs kísérletek fluoreszcens jele. Itt az oldat epidermális penetrációja szinte azonnal megfigyelhető, jól látható fluoreszcens frontvonal alakul ki már 15-30 perc elteltével is, a FITC gyorsan és egyenletesen halad át a TGM3 $-/-$ egér károsodott barrier funkciójú epidermiszén.



24. ábra FITC penetráció jellemzői és kvantifikációja in vivo kétfoton mikroszkópiával

„a” és „b” panel: x-z tengelyre illesztett sorozatfelvételek frontális nézetben, a stratum corneumtól 80 μm mélységig. Míg a WT egerek esetében a FITC oldat felületi retenciójának szórt, gyenge fluoreszcens jele látható, addig a TGM3 $-/-$ egerekben jól megfigyelhető egy éles fluoreszcens penetrációs frontvonal. Az „a” panel a relatív fluoreszcencia intenzitást jelzi, itt a vízszintes tengelyen a vizsgált területet, a függőleges tengelyen a fluoreszcencia intenzitását jelöltük. A sorozatfelvételek kiértékelése során a relatív fluoreszcencia intenzitás $4,5 \pm 0,5\text{x}$ -ös növekedést mutatott a TGM $-/-$ egerekben a WT típushoz viszonyítva.

„c” és „d” panel: eltérő penetrációs mintázat a 3D-s ábrákon. A TGM3 $-/-$ egerekben csaknem homogén fluoreszcencia észlelhető a minta egész mélységében, míg WT egerek esetében a FITC oldat alacsony intenzitású, szóródott mintázatot mutat.

5.5 Cryofibrinogenemia és cryoglobulinemia prevalenciája dermatitisz herpetiformisz és kontroll beteganyagban

A nem szelektált 88 fős dermatitisz herpetiformisz ban szenvedő beteganyagban, az izolált cryofibrinogenemia igen magas arányban: 48.9%-ban (43/88) fordult elő, míg ez az érték a főként autoimmun beteganyagban vizsgált kontroll 233 fős populációban lényegesen kisebb, mindössze 27.5% (64/233) volt. Ezzel szemben az izolált cryoglobulinemia a DH-s betegek mindössze 2.3%-ban (2/88), míg a kontroll beteganyagban 9.4%-ban (22/231) fordult elő. A kevert cryofibrinogenemia és cryoglobulinemia mindkét csoportban közel azonos arányban volt kimutatható, a DH-s populációban 9.1%-ban (8/88), a kontroll esetében 6.9%-ban (16/233).

A heterogén DH-s beteganyagot csoportokra osztottuk, külön vizsgálva a cryoproteinek jelenlétét (i) a diétát nem tartó, (ii) a kizárólag gluténmentes diétát (GMD) tartó, (iii) és a gluténmentes diétát tartó, egyidejűleg dapsont (DPS) is szedő betegekben.

Az izolált cryofibrinogenemia a diétát nem tartó DH-s populációban igen magas arányban, 60%-ban (33/55) fordult elő. A már diétázó, de dapsont nem szedő DH-s populációban az izolált cryofibrinogenemia prevalenciája alacsonyabb, 40% (10/25) volt, míg a GMD mellett egyidejűleg dapsonnal is kezelt csoportban izolált cryofibrinogenemia egy betegben sem (0/8) volt kimutatható. Az izolált cryoglobulinemia és kevert cryofibrinogenia - cryoglobulinemia hasonló változását a DH-s szubpopulációkban nem tapasztaltuk. (4. táblázat)

4. táblázat Cryofibrinogénia, cryoglobulinémia ill. együttes prevalencia, dermatitisz herpetiformisz és kontroll beteganyagban.

Dermatitisz herpetiformisz betegek	Csoport (n=)	Cryofibrinogen+	Cryoglobulin+	Cryofibrinogen+ Cryoglobulin+
összes	88	43 (48.9%)	2 (2.3%)	8 (9.1%)
nincs GMD, nincs DPS	55	33 (60%)	0 (0%)	4 (7.27%)
GMD, nincs DPS	25	10 (40%)	2 (8%)	2 (8%)
GMD + DPS	8	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)
Kontroll betegek	233	64 (27.5%)	22 (9.4%)	16 (6.9%)

6. Megbeszélés

A dolgozat a transzglutamináz 3 (TG3) ma még alig ismert szerepét vizsgálja a szervezetben. Részben egészséges bőrben a kután barrierben betöltött funkcióját kívánja meghatározni, melyet az enzim hiányának vizsgálatával, állatkísérletben analizál. Másrészt patológiás körülmények között, TG3 elleni autoantitestek jelenlétében, dermatitisz herpetiformisban (DH) hívja fel a figyelmet egy eddig ismeretlen laboratóriumi adatra: a betegekben igen gyakori cryofibrinogenaemiára. Ezt a keringésből kimutatható módosult fibrinogén-fibrin reakciót a bőrben leírt IgA-TG3-fibrinogén-fibrin-fibronectin csapadék miatt ítéli a TG3 szempontjából is jelentősnek.

6.1 A bőr barrier defektusok jelentősége a szenzibilizációban, barrier defektusért felelős gének. A transzglutamináz diszfunkciók szerepe a cornified cell envelope formálása során.

6.1.1 Az eddig megismert jelentősebb barrier defektusok és perkután szenzibilizáció kapcsolata.

A CE, mint a külvilággal közvetlenül érintkező struktúra meghatározó a bőr barrier funkció fenntartásában. Diszfunkciója a bőr barrier sérülésével jár, melynek egyik következménye a külvilág felől érkező antigének fokozott penetrációja, mely következményes kután vagy szisztémás szenzibilizációhoz vezethet. A sérült bőr barrier és szenzibilizáció kapcsolata, az asztmával társult atópiás dermatitiszben (AD) szenvedő betegpopuláción észlelt gyakori filaggrin (FLG) mutációk felfedezése óta (*Palmer et al, 2006*) intenzíven kutatott területté vált. Az első mutációk felfedezése után megindult kutatások számos új AD asszociált FLG mutáció felfedezéséhez vezettek, (*Sandilands et al, 2007*), az újabb populáció specifikus mutációkról kapcsolatos új közlemények napjainkban is születnek (*Park et al, 2015*). Hamarosan a FLG mutációk nikkell és egyéb kémiai anyagok provokálta kontakt dermatitiszre hajlamosító szerepét is leírták (*Novak et al, 2008; Thyssen et al, 2010*). A FLG diszfunkció jelentősége a bőrtüneteken jóval túlmutat, az atópiás spektrum többi kórképében, így élelmiszer allergiákban, extrinsic asztmában, rhinitisben is ismert hajlamosító szerepe. (*Irvine et al, 2011; McAleer és Irvine, 2013; Ogradowczyk et al, 2014*). A filaggrin mutációk felfedezése

főként az atópiás dermatitisz kontextusában, új lendületet adott a bőr barrier diszfunkciók vizsgálatának.

Napjainkig kétségtelenül a FLG mutációk és az AD kapcsolatáról rendelkezünk a legtöbb adattal, azonban egyéb, főként – a filaggrinhoz hasonlóan – a CE kialakulásában és/vagy fenntartásában, ill. bontásában résztvevő proteinek defektusai és atópiás dermatitisz „szerű” kórképek kapcsolatát írták le. Még a filaggrin AD-ben betöltött szerepének felismerése előtt az atópiás dermatitiszhez hasonló bőrtünetekkel, pruritusszal, magas szérum IgE szinttel és trichorrhexis invaginata-val jellemzett autoszomális recesszív módon öröklődő Netherton szindróma hátterében egy szerin proteáz inhibitor (LEKTI) kódoló gén, a SPINK5 mutációit írták le (*Chavanas et al, 2000; Harper et al, 2001; Furio és Hovnanian, 2014*). A proteázok és inhibitoraik fontos szerepet játszanak a hámlás folyamatának koordinálásában. A Netherton szindrómában jelentkező LEKTI hiányában kóros mértékben fokozott kallikrein 5 aktivitás a corneodesmosomák felgyorsult hasításával intenzív hámláshoz, barrier diszfunkcióhoz vezet. Mindez lehetőséget teremt a fokozott allergén penetrációra, következményes szenzibilizációra. Fontos azonban megemlíteni, hogy mind atópiás dermatitiszben, mind Netherton szindrómában számos immunológiai eltérést is kimutattak. *Ronnel és mtsai* Netherton szindrómás betegekben csökkent memória B-sejt képződést és immunglobulin termelést, inkomplett izotípus váltást, normálisnál alacsonyabb NK sejt aktivitást találtak (*Renner et al, 2009*). *Furio és mtsai* Netherton szindrómás betegekben kimutatták, hogy a gátlás nélkül maradó kallikrein 5 nem csak a corneodesmosomális proteinek fokozott degradációjáért felelős, hanem aktiválja a PAR2 receptorokat is, melyek pro-inflammatorikus citokinek (TNF- α , IL1, TSLP) felszabadulását indukálják. Ennek következtében a károsodott barrier mellett, a szenzibilizáció kialakulására hajlamosító citokin milieu alakul ki, mely szintén nélkülözhetetlen a szenzibilizáció folyamatában. (*Furio et al, 2014*).

További barrier diszfunkció-szenzibilizáció kapcsolt kórképre példaként említhetjük a „generalizált peeling skin szindróma B-típusát”, mely AR módon öröklődő, élethosszig tartó lemezes hámlással, viszketéssel és élelmiszer allergiákkal kísért kórkép, hátterében a corneodesmosin gén (CDSN) mutációja miatti komplett corneodesmosin protein hiány áll, mely a corneodesmosomák legfontosabb struktúrproteinje (*Oji et al, 2010*). Hasonló

atópiás dermatitisz „szerű” kórképek egyéb genetikai predisponáltságnál is előfordulnak, melyekben a már említett közös vonás, a bőr barrier funkció károsodása, általában a CE vagy tight junction (TJ) struktúrák érintettsége által (*Kubo et al, 2012 review*). Az epidermiszt alkotó keratinocytákat – minthogy fizikai barrier funkciójuk mellett egyúttal proinflammatorikus citokinek expresszálása, PAMP-ok felismerését végző Toll-like receptorok kifejezésére is képesek – akár a veleszületett immunitás kiterjesztett részének is tekinthetjük. Ebből egyértelműen következik, hogy zavart struktúra mellett a bőr asszociált immunrendszer („skin immune system”) kisebb-nagyobb mértékű eltéréseit is várhatjuk („immunológiai barrier” diszfunkció), melyek magára a fiziko-kémiai barrier funkcióra is visszahatnak.

6.1.2 A transzglutaminázok szerepe az epidermisz és cornified cell envelope formálásban.

A fentiek egyértelmű bizonyítják, hogy a barrier diszfunkció szenzibilizációra hajlamosító állapot, a legfontosabb barrier struktúra pedig maga az epidermisz, ill. annak külvilággal közvetlenül érintkező része a CE. Az epidermiszben expresszálódó TG1, TG3 és TG5 összehangolt működése – stabil izopeptid és protein-lipid polimer struktúrák létrehozása által – nélkülözhetetlen az elszarusodás és az intakt CE kialakulásának folyamatában (*Eckert et al 1995, Hitomi et al 2005, Candi et al. 2005, Nemes és Steinert 1999*).

A transzglutaminázok CE formálásában betöltött szerepét humán patológia kapcsán leírt mutációk és állatkísérletes adatok is alátámasztják. Az epidermális transzglutamináz defektusok közé illesztve foglalom össze a dolgozat új eredményeként bemutatott TG3 hiány sajátosságait.

6.1.2.1 Transzglutamináz 1

A TGM1 gén mutációit írták le, az autoszomális recesszív öröklődésű lamelláris ichtyosisban (OMIM #242300) szenvedő betegek egy csoportjánál (*Huber et al, 1995*). A lamelláris ichtyosis bőrtünetei már születéskor észlelhetők, a legtöbb csecsemő ún.

collodium bébi vagy erythrodermával járó fenotípust mutat. A collodium membrán általában néhány nappal a születés után leválik, később a xerosis, nagyelemű pikkelyes hámlás, palmoplantáris keratoderma, köröm dystrophia dominál. A TGM1 asszociált formák Európában jellemzők, újabban azonban egy kínai testvérpárnál is leírtak, a korábbiaktól eltérő locuson TGM1 mutációt a kórkép hátterében (*Zhang et al, 2015B*). Bizonyos TGM mutációknál a törzs bőrének érintettsége a legkifejezettebb, feltehetően az enzim hőmérsékletfüggő aktivitása miatt. A kórképet számos másodlagos tünet komplikálhatja, többek között ectropion, hőmérséklet diszreguláció (izzadási képtelenség), fertőzésekre való fogékonyság, alopecia. (*Bőrgyógyászat és Venerológia, Kárpáti szerk., 2013 671-72, OMIM adatbázis*).

A TGM1 knockout egérmodellben a keratinizáció olyan fokú zavarát észlelték, hogy a nagyfokú transzepidemális vízvesztés miatt az állatok születés után 4-5 órával elpusztultak (*Matsuki et al, 1998*). A CE formálásában a TG1 aktivitás nélkülözhetetlen, vélhetően azért, mert ez a transzglutamináz izoenzim végzi a protein-lipid (döntően loricrin-hidroxilceramid) burok észter kötésekkkel történő összekapcsolását.

6.1.2.2 Transzglutamináz 5

A TG5 pontos jelentősége és szerepe az elszarusodás komplex folyamatában még nem teljesen tisztázott. Az epidermisz stratum granulosumának alsóbb sejsoraiban expresszálódó protein aktivitását a citoszkeletonhoz kapcsoltn fejt ki (*Candi et al, 2001*).

Cassidy és mtsai 2005-ben írták le először a TGM5 gén missense mutációit mindkét allélon acral peeling szindrómában szenvedők egy csoportjában. A genetikailag és klinikailag is heterogén betegpopulációban azóta számos új TGM5 mutációt igazoltak (*van der Velden JJ et al 2015*). Az acral peeling szindróma (OMIM #609796) ritka, autoszomális recesszív módon öröklődő genodermatózis, melyet a peeling skin szindróma lokalizált formájának tekintenek. 2015-ig összesen 103 betegről jelent meg közlés, főként Európából (*van der Velden JJ et al 2015, OMIM adatbázis*). A kórképre a kéz és láb dorsalis és lateralis részén észlelt felületes hámlás és hólyagképződés jellemző, szövettanilag a lízis a stratum granulosum és corneum határán látható. A

tünetek néhány hónapos, vagy korai gyermekkorban kezdődnek, megjelenésüket mechanikai stressz, nedvesség provokálhatja. TGM5 knockout egérmodellt még nem írtak le.

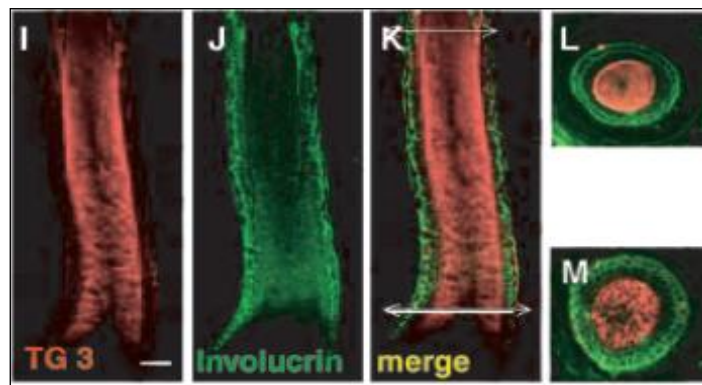
6.1.2.3 Transzglutamináz 3

A TG3 szintén részt vesz a keratinizáció, a CE és a follicularis hám kialakításában. Eltérően a TG1 és TG5-től, a dolgozat benyújtásakor önmagában, a TGM3 mutációihoz kapcsolt kórképet még nem írtak le.

A TGM3 gén a 20q11-12 locuson helyezkedik el, a TG3 protein expressziója a stratum granulosum - stratum corneum határán a legintenzívebb. A 77 kDa molekulatömegű inaktív zymogén szelektív proteolízis révén aktiválódik, melyet a cathepsin-L végez (Cheng *et al*, 2006). Az enzimatikusan aktív forma 50/27 kDa molekulatömegű, nem kovalens kötésekkel kapcsolódó heterodimer, mely az epidermisz teljes transzglutamináz aktivitásának jelentős részét teszi ki (Kim *et al*, 1990). A TG3 a CE formálásában döntően az inszolubilis loricrin molekulák SPRs („small proline rich proteins”) hidakkal történő összekapcsolásával, ill. számos CE struktúrprotein intramolekuláris izopeptid kötéseinek katalizálásával vesz részt (Candi *et al*, 2005).

A TG3-at először tengerimalac szőrtüszőiből izolálták, korábbi elnevezése is erre utal: follicularis transzglutamináz (Chung és Folk, 1972). Egérben a TG3 mRNS a bőrön kívül az agyban, gyomorban, lépben, vékonybélben, a here és izomszövetben is kimutatható. A TG3 a here és gyomornyálkahártya szövetben az epidermiszhez hasonló mértékben expresszálódik, a hereszövetben azonban a zymogen bár kifejeződik, ez kisebb mértékű, mint a bőrben. Egér here és agyszövetben a TG3 aktív, de pontos funkcióját egyelőre nem ismerjük. (Hitomi *et al*, 2001) Az egér gyomornyálkahártyáján megfigyelt nagy TG3 aktivitás oka, a gyomornyálkahártya szövettani hasonlósága a humán epidermisszel (ti. elszarusodást mutat) (Hitomi *et al*, 2001). A TG3 a trichohyalin, keratin intermedier filamentumok és a keratin asszociált proteinek keresztkötése által a follicularis epidermisz, a szőrzet, és haj morfogenezisében rendelkezik kitüntetett szereppel (Thibaut *et al* 2005, Thibaut *et al*, 2009).

A TG3 expressziós mintázata egérben és humán folliculusban eltérő, az egér és humán szőrtüsző és szőrszál szerkezete azonban azonos. Egér szőrszálban a szőrszál fontosabb részei a medulla és cortex, melyet egy egy sejtsorból álló cuticula réteg vesz körül. A TG3 expressziója egérben, mindhárom rétegben megfigyelhető (Lee et al, 1996; Yamane et al, 2010), a TG3 expresszió (és aktivitás) a szőrszálat közvetlenül borító belső gyökérhüvelyben is kimutatható, főleg annak középső és felső szakaszában. (Steinert et al, 2003). A TG3 preferált szubsztrátja a folliculusokban a TG3 expresszióval ko-lokalizáltan nagymértékben kifejeződő trichohyalin (Lee et al, 1993; Tarcsa et al, 1997). Humán folliculusban ezzel szemben Thibaut és mtsai (2005) megfigyelései alapján a TG3 kizárólag a hajszál cortex és cuticula régióiban fejeződik ki (25. ábra), míg a belső gyökérhüvelyben elhanyagolható mértékű az expresszió, itt ugyanis a transzglutamináz aktivitásért a TG1 és TG5 felel elsődlegesen.



25. ábra A transzglutamináz 3 expressziója humán folliculusban (I) transzglutamináz 3 expresszió a cuticula és a cortex rétegeiben ; (J) involucrin expresszió a belső gyökér-hüvelyben; (K, L, M) TG3 és involucrin expresszió együttes ábrázolása (Forrás: Thibaut et al, J Invest Dermatol. 2005, 125:581-5)

Bár izolált TG3 diszfunkcióhoz, ill. TGM3 mutációhoz kapcsolt humán kórállapotot még nem írtak le, a TG3 érintettségéről azonban néhány dermatológiai kórállapotban már vannak ismereteink.

A klinikum szempontjából a legjelentősebb, hogy a TG3, mint autoantigén szerepel a coeliákiával asszociált DH-ban, a dermális papillák csúcsán IgA-val kolokalizációt mutatva (Sárdy et al, 2002). Darier kórban a TGM3 és TGM5 expressziós mintázat teljes diszregulációját írták le, ugyanazon lézióon belül mind extrém magas, mind null expresszió formájában (Candi et al, 2002). Említésre méltó, hogy Netherton

szindrómában, a stratum granulosumban csökkent a TGM1 expresszió, és csaknem hiányzik a TGM3 expressziója (*Raghunath et al, 2004*). Ezekben a monogén örökletes kórképekben a TG3 szerepe a kután pathomechanizmusban még tisztázásra vár.

TGM3 knockout egértörzssel kapcsolatban az első adat 2007-ből található, egy előzetes eredményeket bemutató nemzetközi konferencián ismertetett publikáció formájában (*Thiebach et al, 9th International Conference on Transglutaminases and Protein Cross-linking, Morocco, Sept 1–4, 2007*). A szerzők a knockout állatokban kóros szőr,- ill. bajuszfejlődést (csavart struktúra, hullámos lefutás) és a szőrszálak fokozott protein extraktibilitását ismertették.

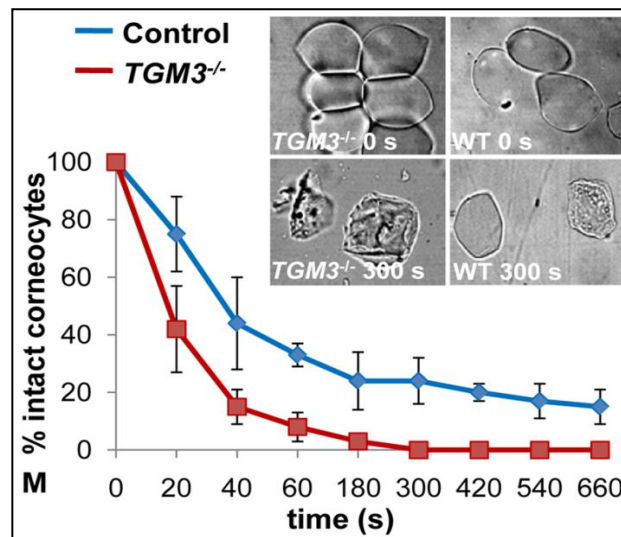
2015-ben *Brennan és mtsai* igazolták, hogy egy 1942-ben közölt, spontán mutáció során kialakult hullámos szőrű egértörzs sajátos fenotípusának hátterében szintén a TGM3 gén mutációja áll (*Hertwig, 1942; Brennan et al, 2015*).

A dolgozatban vizsgált C57BL/6 háttéren létrehozott TGM3 knockout egértörzset *John és mtsai* írták le 2012-ben (*John et al. 2012*).

Munkacsoportunk évtizedek óta foglalkozik a TG3 szerepével DH-ban, ezért nagy érdeklődéssel követtük a TG3 hiányának sajátosságait a KO egértörzsből. A törzs, bár a TG3 expressziója széleskörű, életképesnek bizonyult, stabil genetikai állománnyal rendelkezve homozigóta tenyészetben fenntartható volt. A TGM3 $-/-$ egértörzs bőrének fenotípusát döntően ex vivo metodikákkal leíró munkacsoport (*John et al, 2012*) néhány minor eltéréssel - mint az in utero megkésett CE formáció, valamint az izolált corneocyta fokozott fragilitása - kívül nem találtak különbséget a knockout egerek interfollicularis epidermiszében, ellenben a szőrzet fejlődése major abnormálításokat mutatott. *John és munkatársai* a TGM3 $-/-$ törzs részletes, elsősorban morfológiai leírására törekedtek, a funkcionális bőr barrier részletes vizsgálatát csak érintőlegesen végezték el. A közlemény szerint a TGM3 knockout egerek bőre makroszkóposan, ill. fénymikroszkóp alatt vizsgálva normál fenotípusú, a stratum corneum felépítése ultrastrukturálisan fiziológiás. Ugyancsak normális expressziót mutatnak a keratinocita differenciációban jelentős CE struktúrproteinek is (involucrin, loricrin, filaggrin, keratin 1, 10 és 14). Jelentősebb eltérések kizárólag a szőrzet és a bajusz morfológiájában találhatók. A fiatal knockout állatok szőre jellegzetesen hullámos lefutású, mely jelleg

az életkor előrehaladásával nagymértékben csökken, azonban fénymikroszkóp alatt a szőrszálak a vad típushoz képest vékonyabbak, manipuláció során jellemzően sérülékenyek, töredeznék. A KO állatok bajsa is sajátos morfológiai jegyekkel rendelkezik, a vad típusnál vékonyabb és tengelye körül többszörösen csavart, mely jelleg az egész élet folyamán megmarad.

A normál CE felépítés ellenére a szerzők ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy a TGM3 knockout állatok bőrből izolált corneocyták ultrahangos roncsolással szemben lényegesen kevésbé ellenállóak, mint a WT egerekből nyert sejtek (26. ábra).



26. ábra TGM3 knockout egerekből izolált corneocyták ultrahangos roncsolással szembeni csökkent ellenállása. (Forrás: John et al, PLoS One, 2012; 7 (4): e34252)

A megfigyelt corneocyta instabilitás volt az egyik oka a látens barrier diszfunkció irányában történő vizsgálatainknak, ti. ez már önmagában is jelölhet látens bőr barrier defektust, mely stressz körülmények között (pl. allergén vagy irritáns expozíció) csökkent gyulladáscsökkentő küszöbérték formájában jelentőssé válhat.

Megemlítem, hogy a corneocyta morfológia minor eltéréseit atópiás dermatitiszben Hölzle és Plewig már 1977-ben megfigyelte, miszerint az atópiás dermatitiszben szenvedők izolált corneocytái kisebbek az egészséges populációban megfigyelhetőknél. Eredményeiket később precízebb metodikákkal más szerzők is megerősítették

(*Kashibuchi et al 2002*). Az AD populációban ugyanakkor a corneocyta méret és morphologia klinikai relevanciája jelenleg nem ismert.

A rejtett, nyugalmi körülmények között látens bőr barrier defektusok jelentőségét támasztja alá a klinikai tapasztalat is, hogy pl. atópiás dermatitiszes tünetek környezeti hatásokra (víz, száraz levegő, detergensok, egyéb irritánsok és allergén expozíció) súlyosbodhatnak, az atópiás bőr gyulladással „küszöbértéke” alacsonyabb, hétköznapi szóhasználattal „érzékenyebb”.

John és mtsai a barrier funkció tájékozódó megítélésre két vizsgálatot végeztek el, melyek szerint a knockout egerek (i) transzepidermális vízvesztése, és a (ii) fluoreszcens Lucifer-yellow festék penetrációja a kontroll csoporttól nem tér el. A TEWL elsősorban az „inside-outside” barrier funkció jellemzésére szolgál, normál értéke azonban nem zárja ki szubklinikus barrier defektus fennállását. A filaggrin null mutációk egérmódelleként is szolgáló ft/ft egérben nyugalmi körülmények közt a TEWL normális, azonban paracellularis barrier defektus ill. irritánsokkal és kontakt allergénekkal szemben csökkent gyulladással küszöb mutatható ki (*Scharschmidt et al, 2009*).

Ugyanakkor tudjuk, hogy a penetrációs vizsgálatok az „outside-inside” barrier jellemzésére szolgálnak, ami sok esetben nem korrelál a TEWL-el (*Proksch et al. 2008*). Az „outside-inside” barrier funkció minor eltéréseinek precíz vizsgálatához megfelelően érzékeny metodika alkalmazása szükséges.

6.1.2.4 A dolgozat legfontosabb eredménye a csökkent gyulladással küszöb és a fokozott szenzibilizáció kimutatása TGM3 knockout egerekben; egy új kután barrier defektus igazolása állatmodellben.

A TG3 lokalizációja és sajátságai, valamint a TGM3 -/- egerekről közölt adatok alapján feltételeztük, hogy az állatok, bár nyugalmi („steady state”) körülmények között intakt bőr barrierrel rendelkeznek, látens barrier diszfunkció azonban stressz körülmények között kimutathatóvá válik. Ennek igazolására a klinikailag hasonló, látens bőr barrier diszfunkciókban leginkább releváns és gyakorlati szempontból is jelentős helyzetet, a

kontakt allergénekkal szembeni fokozott szenzibilizálhatóságot, csökkent gyulladásoz küszöbértéket modelleztük egy jól dokumentált kontakt dermatitisz modellben. Kísérleteinkben egyúttal az outside-inside barrier precízebb, in vivo vizsgálatát is célul tűztük ki, melyhez kétfoton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópot használtunk. Feltételezve a barrier funkció életkorral történő romlását, különböző életkorú (8-12 hetes, 6, ill. 18 hónapos) egerek szenzibilizálását is elvégeztük. Annak kizárására, hogy a TG3 hiánya nem direkt az immunrendszer működését módosítja, a barrier megkerülésével közvetlenül teszteltük az egereket. A TGM3 knockout állatok *nem perkután* indukált immunreaktivitását, *in vivo* subkután injiciált P. acnes által provokált gyulladás kiváltásával vizsgáltuk.

A számos késői típusú allergiás kontakt dermatitisz egérmodell közül választásunk több okból is a FITC-DBP modellre esett. Ez a késői típusú túlérzékenységi modell, ellentétben a legelterjedtebb oxazonon, vagy a dinitro-fluorobenzol modellel T_H2 polarizált immunválaszt provokál (*Dearman és Kimber 2000; Christensen és Haase, 2012*). BALB/c egerekben a FITC-DBP modellel létrehozott gyulladásoz infiltrátum nagyon hasonló a humán atópiás dermatitisz akut stádiumában észlelt gyulladásozra (*Larson et al 2010*).

A FITC-DBP antigén modell régóta használt előnye, hogy a FITC, mint fluoreszkáló haptén a sejtfelszínhez kapcsolódva meg is jelöli az antigén prezentációt végző sejteket. A FITC fluoreszcens tulajdonságát használták *Kripke és munkatársai* is, amikor 1990-ben elsőként bizonyították, hogy az epidermális Langerhans sejtek az antigént (FITC-et) in loco az MHCII molekulákhoz kapcsoltan prezentálják, és maguk a bőrből elvándorolt Langerhans sejtek detektálhatók a drenáló nyirokcsomókban (*Kripke et al, 1990*).

Kísérleteink során a TGM3 knockout csoport drenáló nyirokcsomóiban detektált FITC pozitív sejtek, bár nem szignifikánsan, de tendenciájukban nagyobb arányban jelentek meg, mint a vad típusú állatok esetében (*21. ábra*). A nyirokcsomókban detektált a FITC pozitív sejtek vagy (i) Langerhans sejtek, vagy (ii) dermális dendritikus sejtek, vagy (iii) a nyirokcsomó FITC-et prezentáló rezidens dendritikus sejtjei lehetnek. Minthogy célunk nem az immunológiai történések részletes jellemzése, hanem a funkcionális bőr barrier vizsgálata volt, emellett a FITC-DBP egy már részleteiben is jellemzett DTH modell, a szubpopulációk vizsgálatát nem végeztük el. Bár a különbség

nem bizonyult szignifikánsnak, a knockout csoportban tapasztalt nagyobb arányú fluoreszcenciát a TGM3 -/- bőr fokozott epidermális permeabilitása egyik indirekt jelének tartjuk.

Sato és mtsai, amikor a dermális macrophag populáció perkután szenzibilizációhoz való hozzájárulását vizsgálták, egyúttal azt is megfigyelték, hogy a FITC-DBP modellben empirikusan alkalmazott DBP önmagában nem szenzibilizál, azonban a dermális makrofágok mobilizálásával elősegíti a FITC prezentációját, így ebben a DTH modellben nélkülözhetetlen adjuváns szerepet tölt be (*Sato et al 1998*). A későbbiekben több fiatalat észterről is bebizonyosodott, hogy a DBP-hez hasonlóan viselkedve mobilizálja a dermális makrofág populációt (*Imai et al 2006*). *Shigeno és mtsai* végül igazolták, hogy a DBP hatására fokozódik a thymic stromal lymphopoietin (TSLP) szekréciója, mely magyarázza a már korábban leírt T_H2 dominanciát (*Shigeno et al 2009*).

Érdekesképpen megemlítem, hogy a fiatal észtereket a műanyagipar kiterjedten alkalmazza pl. a PVC gyártása során, melynek mechanikai ellenálló képességét, rugalmasságát növeli. A fiatalok környezetbeli jelenlétének humán egészségre gyakorolt hatása számos aspektusból még tisztázatlan, főleg a szigorodó előírások miatt használatuk visszaszorulóban van (*Malveda and Michael; 2015 -"Chemical Economics Handbook Report on Plasticizers",43 old*).

Hasonló $T_{(h)2}$ citokinprofil egyúttal az atópiás dermatitis korai fázisára is jellemző, melynek kialakításában a TSLP is központi szerepet tölt be. Kimutatták, hogy az atópiás dermatitiszben szenvedők keratinocytái az egészséges kontrollokhöz képest nagyobb mennyiségben szekretálnak TSLP-t. A TSLP jelentősége, hogy az általa aktivált dendritikus sejtek a $T_{(h)2}$ polarizációt elősegítő chemokineket (CCL17, CCL22) expresszálnak, a naív T_H -sejteket az allergiás (T_H2 -polarizált) válaszra jellemző IL-4, IL-5, IL-13, és TNF-alfa citokinprofil szekrécióra ösztönzik, míg a T_H1 irányba polarizáló IL-10 és interferon-gamma szekréciót gátolják (*Soumelis et al 2002*).

A fentiekben tárgyalt FITC-DBP modellben provokált gyulladást több módszerrel is verifikáltuk.

A gyulladás jelenlétét tájékozódó vizsgálatként, az egyszerűsége és megbízhatósága miatt gyakran alkalmazott fülvastagodási teszttel (mouse ear swelling test, MEST) vizsgáltuk (Gad et al, 1994). A MEST előnye, hogy a gyulladásos sejtek minőségétől függetlenül, a gyulladást törvényszerűen kísérő oedemával együtt egészében értékelhető a folyamat. *A MEST-et mindhárom életkorú populációban elvégeztünk, melyet mindhárom TGM3 knockout korcsoport esetében szignifikánsan nagyobb mértékűnek találtuk, az azonos korú WT csoportokhoz viszonyítva (17. ábra).* Hasonlóan a MEST-el kapcsolatos közlésekkel a FITC-re adott gyulladásos választ mi is a 48. órában találtuk legkifejezettebbnek, mind TGM3 $-/-$, mind WT egerekben, életkortól függetlenül.

A fülvastagság mérést követő szövettani kiértékelés során, a MEST-el összhangban, a dermisz gyulladásos sejtes infiltrációja, az epidermális hyperplasia ill. pörkképződés kifejezettebb volt mindhárom TGM3 knockout korcsoportban, a megfelelő életkorú WT egerekhez viszonyítva (18. ábra, 3. táblázat).

A MEST és szövettani vizsgálatok alapján a kontakt szenzibilizálhatóság mindhárom életkorban kialakult, a fogékonyságban életkori különbséget nem tudtunk kimutatni.

A szenzibilizáltság mértékének pontosabb megítélésére a fiatal (8-12 hetes) populációban a drenáló nyirokcsomókban megjelenő aktivált T-sejtek arányát és a szérum IgE szintet is vizsgáltuk. A mérések során úgy találtuk, hogy *a FITC-kezelt TGM3 $-/-$ populáció drenáló nyirokcsomóiban megjelenő aktivált T-sejtek aránya (19. ábra), valamint szérum IgE szintje (20. ábra) szignifikánsan emelkedett a kontroll WT állatokhoz képest, amely további bizonyítékként szolgál a TGM3 knockout egér fokozott szenzibilizációs hajlamára, a látens barrier defektusra.*

A különböző életkorú egerek vizsgálatát elsősorban azon klinikai tapasztalat alapján találtuk érdemesnek, mely szerint az öregedő bőr gyulladásos küszöbértéke gyakran csökkent. Irodalmi adatok alapján a pusztán intrinsic módon, azaz „photoaging” nélkül öregedő CE az életkor előrehaladásával számos funkcionális, strukturális, valamint génexpressziós eltérést mutat (Rinnerthaler et al, 2013). Példaként említhető a korrallal csökkenő filaggrin és lorocin de növekvő TG1 expresszió, míg ezzel szemben a TG3 kismértékben csökkenő jelenléte (Ghadially et al, 1995; Rinnerthaler et al, 2013). Ezek a változások a bőr barrier funkció általános hanyatlásának irányába mutatnak, ami

mellett bizonyos anyagok transzepidermális penetrációja fokozódhat, pl. irritánsokkal szemben a gyulladásos küszöbérték csökkenhet.

Ezeztől a változásától függetlenül azonban egy másik fontos tényező is megjelenik: a bőr immunrendszere is „öregszik”, idősebb populációban, a késői típusú túlérzékenységi reakció kiválthatósága csökkenhet (*Vukmanovic-Stejjic et al; 2011; Temesvári et al 2004*).

Az egerek immunreaktivitását direkt módon vizsgáló szubkután P. acnes tesztet, ill. a kétfoton mikroszkópos méréseket az idősebb egérpopuláció korlátozott egyedszáma miatt, ezekben a korosztályokban (6, ill. 18 hónapos) nem tudtuk elvégezni. Azonban kísérleteink tanúsága szerint így is megállapítható, hogy *a TGM3 -/- törzsben fokozott perkután szenzibilizációs hajlam az életkor előrehaladásával közel azonos mértékű marad*, sem növekedést, sem szignifikáns csökkenést nem mutat (*17. ábra*) (*Bognár és mtsai, 2015*).

Összességében bizonyítható volt, hogy a TGM3 knockout egerek a FITC-DBP modellben erőteljesebben szenzibilizálhatók, mint az azonos korú WT (C57BL/6) egerek. Minthogy a knockout és WT állatok P. acnes-ra adott immunválasza hasonló mértékű volt (*22. ábra*), így megállapítható, hogy a knockout állatokban kialakult fokozott gyulladásos reakció a bőrön keresztüli fokozott antigénterhelés és nem eltérő immunreaktivitás következménye.

A barrier defektust direkt módon, az alkalmazott modellben szereplő haptén, a FITC fokozott in vivo perkután penetrációjával is igazolni tudtuk.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy kísérleteink során mindhárom korcsoportban a TGM3 knockout egerek fokozott szenzibilizálhatóságát, csökkent gyulladásos küszöbértékét találtuk, a megfelelő életkorú vad típusú állatokhoz viszonyítva. Ugyanakkor a három korcsoportban a provokált gyulladás intenzitása közel azonos volt.

Az elszarusodás folyamatában számos kompenzatórikus lehetőség rejlik: a szaruréteg kialakulásában résztvevő proteinek (loricrin, involucrin) redundáns módon expresszálódnak, több transzglutamináz izoenzim is részt vesz a folyamatban, a transzglutamináz izoenzimek szubsztrátjai között jelentős átfedés figyelhető meg. Így

feltételezésünk szerint a nyugalmi körülmények között *John és mtsai* által a TGM3 knockout törzsben, a már említett minor eltéréseken kívül intakt bőr barrier funkciót magyarázhatja, hogy a kiesett TG3 aktivitást valamely másik transzglutamináz izoenzim, vagy – eddig nem vizsgált – struktúrprotein kompenzálja. A kompenzatórikus mechanizmusok azonban stressz körülmények – jelen esetben antigén expozíció – esetén elégtelenné válnak, és az addig látens bőr barrier diszfunkció manifesztálté válik.

A 4 hetesnél fiatalabb TGM3 knockout egerek szőrzetében észlelt eltérések azonban a TG3 follicularis epidermisz formálásában kitüntetett, egyéb módon nem kompenzálható szerepére utalnak. Minthogy a TGM3 knockout egér follicularis epidermisze nyugalmi körülmények között sem tekinthető intaktnak, a fokozott szenzibilizáció legalábbis részben a folliculusokon keresztül is megvalósulhatott. A fokozott szenzibilizáció mellett a TGM3 $-/-$ egerek barrier diszfunkcióját, egy általunk kidolgozott igen érzékeny, *in vivo* kétfoton mikroszkópos metodikával vizsgálva, a FITC fokozott perkután penetrációjának mérésével direkt módon is bizonyítani tudtuk.

A TGM3 mutációk humán vonatkozásai jelenleg nem ismertek.

6.2 Magas cryofibrinogén prevalencia dermatitisz herpetiformisban

A cryofibrinogén (CF), sajátos cryoprotein, mely 4C°-ra hűtött alvadásában gátolt plazmában csapadékot képez, azonban savóban (alvadásgátló nélkül megalvad vér felülúszója) nem. A csapadékot 37C°-ra felmelegítve, annak ismételt oldódása figyelhető meg. A cryoglobulin (CG), a savóban fellelhető módosult cryoprotein immunglobulin frakció, mely a véralvadási kaszkád elemeit nem tartalmazza.

Cryofibrinogénémia az egészséges populáció 0-7%-ban, míg a bármilyen okból kórházi osztályon kezelt beteg populációjában kb. 8-13%-ban észlelhető. Cryofibrinogénémia gyakran tünetszegényen, vagy alig észrevehető klinikai tünetekkel zajlik. Bőrtünetként elsősorban az akrákon észlelt purpurák, vagy Raynaud jelenség formájában mutatkozhat. A CF főbb összetevői a fibrinogén, fibrin, és fibronectin, melyhez kisebb mennyiségben fXIIIa (fibrin stabilizáló faktor) is kötődik (*Michaud and Pourrat, 2013*). Szekunder formában számos kórképpel (pl. haematológiai malignitások, szolid tumorok, autoimmun kórképek) társulhat, azonban DH asszociált formája eddig nem volt ismert. A DH klinikumát és pathogenesisét a bevezetés fejezetben már ismerttettem. Röviden a patognomikus folyamat a gliadin provokálta TG3 ellenes antitestek (főként IgA) megjelenése, melyek a dermális papillák csúcsán granuláris TG3-IgA csapadékot képeznek (*Sárdy et al 2002*). A kórkép lappangó coeliakiával társul, először anti-TG2 antitestek (equivalens az endomysium ellenes antitesttel - EMA), majd epitóp spreading révén anti-TG3 antitestek termelődése figyelhető meg.

A DH-ban szenvedő betegek egy részénél akrális – tenyéri, talpi, vagy ujjbegyeken jelentkező – purpuriform bőrtünetek is megfigyelhetők (*Kárpáti 1986; Hongang et al 2012; Kárpáti. 2012*). Ismert, hogy a dermális papillák csúcsán, még a TG3-IgA csapadék és neutrophil microabscessusok megjelenése előtt fibrin, fibrinogén és fibronectin jelenik meg (*Reitamo et al 1981; Jakubowicz et al 1981*).

DH-s betegpopulációban érdemesnek találtuk megvizsgálni a cryofibrinogen jelenlétét a következők miatt:

- (i) a dermális papillák csúcsán észlelt korai fibrin és fibrinogén csapadék jelenléte,
- (ii) az akrális purpurák előfordulása,
- (iii) esetismertetésekben leírt magas dózisu heparinkezelés hatékonysága
(*Alexander 1963; Tan et al 1996*),
- (iv) a bőrtünetek autológ szérummal provokálhatók, amit a szérum heparin vagy epsilon-amino capronsav elő kezelése meggátol (*Cox et al, 1991*).

A nem szelektált DH-s betegek 48.9% -ban találtunk cryofibrinogémiát. A CF pozitivitás a sem gluténmentes diétát nem tartó, sem dapsont nem szedő betegek csoportjában bizonyult a legmagasabbnak (60%). Ahogy az eredmények fejezetben ismertettem, a cryofibrinogénia jelenléte a különböző ideje gluténmentes diétát tartó csoportban 40%, míg a diéta mellett dapsont is szedő csoportban 0% volt (*4. táblázat*).

Eredményeink alapján cryofibrinogénia jelenlétére DH esetén, főleg ha az akrális purpurákkal is jár, mindenképp érdemes gondolni. A jelenség hátterét még egyelőre nem tudjuk pontosan. Magyarozatként feltételezhető, hogy a DH-ban kimutatható IgA típusú transzglutamináz ellenes antitestek (anti TG2 és TG3) jelenléte hatással lehet a cryofibrinogén kialakulásában. Korábban *Kárpáti és mtsai (Karpáti et al, 1997)* leírták, hogy a dapsont kezelés cryofibrinogénia esetében csökkentette a cryofibrinogén mennyiségét.

A DH és fibrinogén rendszer közötti összefüggésben több közlemény is született. Nemrég *Taylor és mtsai* a DH-ban szenvedőkben a dermális papillákban a fibrinogén depozitumok festődési intenzitását is hasonlónak találták az IgA-TG3 komplexekével, mely jelenség IgA vasculitis, vagy IgA pemphigoidban nem volt észlelhető (*Taylor et al, 2015*). Ezen túlmenően azt is kimutatták, hogy a dermális papillákban az immunkomplex részeként jelenlévő TG3, enzimikus aktivitását megtartja.

A fenti közleményekben arra utalnak, hogy DH-ban a fibrinogén-fibrin-fibrinolízis rendszer érintett, ennek azonban a pathomechanizmusban betöltött szerepe egyelőre nem tisztázott.

Eredményeink magyarázatul szolgálhatnak a kórképben szenvedők egy részénél tapasztalt akralis purpurákra, továbbá a dapson egy lehetséges új hatásmechanizmusát is felvetik a betegségben. A fenti eredmények alapján a dapson aktivitását, a cryofibrinogén, és fibrinogén-fibrin-fibrinolízis rendszer DH-ban játszott szerepét jelenleg is vizsgáljuk.

7. Következtetések

1. A stratum corneum-granulosum alkotórészeként ismert TG3 hiányát a TGM3 $-/-$ egerekben vizsgálva megállapítottuk, hogy a knockout állatok a megfelelő C57BL/6 WT egerekhez viszonyítva a FITC-DBP modellben szignifikáns mértékben fokozott szenzibilizációs hajlamot, vagyis csökkent perkután gyulladásozó küszöböt mutatnak. Ezt a TGM3 $-/-$ egér esetében látens bőr barrier defektus indirekt jelének tartjuk.
2. A TGM3 $-/-$ és WT egerek, az epidermisz megkerülésével közvetlenül a dermiszbe jutató P. acnes antigén stimulusra hasonlóan reagáltak. Ebből következik, hogy TGM3 $-/-$ egerekben megfigyelt fokozott perkután szenzibilizációs hajlam, nem a TG3 hiánya miatt eltérő immunológiai válaszkészségből adódik, hanem annak háttérben a kóros barrier által lehetővé vált fokozott perkután antigén penetráció áll.
3. Új módszerrel vizsgálva a kután barriert, kétfoton abszorpciós fluoreszcens mikroszkópos *in vivo* méréseink során a FITC – jelen esetben, mint fluorofor – a TGM3 $-/-$ egerek bőrén keresztül fokozott, ill. eltérő mintázatú penetrációját tudtuk igazolni. A kidolgozott új eljárás tehát alkalmas látens barrier defektusok vizsgálatára.
4. A FITC-DBP modellben a TGM $-/-$ egerek mindhárom (8-12 hetes, 6.- ill. 18 hónapos) korcsoportban fokozott szenzibilizációt mutattak az azonos életkorú WT egerekhez viszonyítva, ugyanakkor a szenzibilizálhatóság mértéke az életkorral, sem a TGM3 $-/-$, sem a WT egerek esetében nem változott szignifikánsan. Ennek háttérben feltételezhető, hogy a FITC-DBP penetrációja az életkorral érdemben nem változik.
5. A DH-s betegek (n=88) nem szelektált csoportjában a cryofibrinogénia magas arányban (48,9%) fordult elő. A cryofibrinogénia prevalenciája még magasabb volt a GMD-t nem tartó betegek körében. A már bizonyos ideje diétázók csoportjában a prevalencia csökkent és legalacsonyabb a GMD-t tartó és dapsont szedő betegek között volt. A DH-ban gyakori cryofibrinogénia magyarázatul szolgálhat a kórképben észlelt akrális purpurákra.

8. Összefoglalás

A dolgozat a transzglutamináz 3 bőrpatólogiában eddig nem ismert szerepét ismerteti, egyúttal áttekinti az enzim dermatológiában betöltött funkcióit is. A transzglutaminázok legfőbb funkciója izopeptid kötések kialakításával ellenálló, fiziko-kémiai barrierként szolgáló struktúrák létrehozása. Barrier diszfunkció esetén a kontakt szenzibilizáció iránti fogékonyság jelentősen megnő. A bőr legkülső struktúráját, a cornified cell envelope-ot alkotó elemek szerepe a bőr barrier diszfunkcióiban intenzíven kutatott terület, azonban a régióban lokalizálódó transzglutamináz 3 szerepét ebben a kontextusban eddig nem vizsgálták. Ennek ismeretében a TGM3 $-/-$ egerekben nyugalmi körülmények közt leírt intakt bőr barrier funkciót váratlannak találtuk. Feltételeztük, hogy a TGM3 $-/-$ egerek bőre stressz körülmények, pl. antigén expozíció hatására fokozott szenzibilizációs hajlamot mutathat. A TGM3 $-/-$ egereket ezért a FITC-DBP kontakt dermatitisz modellben vizsgáltuk, melyben igazolni tudtuk azok WT egerekhez viszonyított fokozott szenzibilizálhatóságát, 8-12 hetes, 6-, ill. 18 hónapos korban is. Miután azt is igazoltuk, hogy a TGM3 $-/-$ és WT egerek immunreaktivitása nem eltérő, a fokozott szenzibilizációból azt a következtetést vontuk le, hogy a TGM3 $-/-$ egerekben a bőr barrier funkció zavara látens módon van jelen. A barrier további vizsgálatára egy *in vivo* kétfoton mikroszkópos metodikát is kidolgoztunk, amivel a TGM3 $-/-$ egerek bőrének barrier defektusát direkt módon is verifikálni tudtuk.

Dolgozatom második részében, minthogy a transzglutamináz 3 bőrpatólogiában eddig igazolt egyetlen patognomikus szerepe, hogy dermatitisz herpetiformisban autoantigénként szerepel, így ez utóbbi kórképet is tanulmányoztam. A SE, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján dermatitisz herpetiformis miatt gondozott betegekben észlelt szokatlanul magas prevalenciájú cryofibrinogémiát kezdtem vizsgálni. A cryofibrinogénemia prevalenciája alacsonyabb volt a gluténmentes diétát már tartó csoportban, míg a diéta mellett dapsonnal is kezelt betegekben a cryofibrinogénemia prevalenciája még alacsonyabbnak mutatkozott. A dermatitisz herpetiformisban kimutatott magas prevalenciájú cryofibrinogénemia magyarázatul szolgálhat a kórképben észlelt gyakori akrális purpurákra, egyúttal a dapson egy lehetséges új hatásmechanizmusát is felveti.

9. Summary

My thesis describes the previously unrecognized role of transglutaminase 3 in skin pathology, furthermore reviews its dermatological functions. The main role of transglutaminases is to catalyse isopeptide bindings, thus forming supramolecular structures which contribute to the intact physico-chemical barrier of the outermost skin layer, namely the “cornified cell envelope”. On the other hand, the disturbance of barrier function leads to increased susceptibility to contact sensitization being important in eczematous diseases. The role of other elements of the cornified cell envelope is an intensively researched area; still, the similar function of transglutaminase 3 has not been investigated. Consequently we found the intact skin barrier function of TGM3 $-/-$ mice in standstill conditions unexpected. We hypothesized that TGM3 $-/-$ mouse skin barrier dysfunction is present in a latent manner, so under stress conditions – i.e. antigen exposure – it may show increased sensitization rate. Therefore TGM 3 $-/-$ mice were examined in the FITC-DBP contact dermatitis model, in which we found an increased sensitization of knockout mice in ages of 8-12 weeks, 6 and 18 months as well. Consequently, it was confirmed that the immunoreactivity of TGM3 $-/-$ mice does not differ from that of the WT type; based on the observed increased sensitization, we concluded that the skin barrier function was damaged in the TGM3 $-/-$ mice and a latent barrier dysfunction could be demonstrated. Furthermore we developed a new in vivo penetration assay using two- photon microscopy, by which we could directly demonstrate the skin barrier defect of TGM3 $-/-$ mice.

In the second part of my thesis, I analysed dermatitis herpetiformis, as in this disorder, transglutaminase 3 acts as a pathognomonic autoantigen. I started to examine the unusually high prevalence of cryofibrinogenemia found in dermatitis herpetiformis patients treated in our department. The prevalence of cryofibrinogenemia was lower in the group on already gluten-free diet, whereas the prevalence was even lower in the group treated with dapsone and gluten-free diet concomitantly.

The high prevalence of cryofibrinogenemia detected in dermatitis herpetiformis may be the reason for the frequent occurrence of acral purpuras seen in the disorder; in addition it suggests a possible new mechanism of action of dapsone.

10. Irodalomjegyzék

Aeschlimann D, Koeller MK, Allen-Hoffmann BL, Mosher DF. (1998) Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. Detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Biol Chem*, 273: 3452-3460.

Aeschlimann D, Paulsson M. (1991) Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization. *J Biol Chem*, 266: 15308-15317.

Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM, Rastinejad F. (2004) Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *J Biol Chem*, 279: 7180-7192. Erratum in: *J Biol Chem*. 2007 Apr 27;282(17):13139.

Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM. (2003) Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *J Biol Chem*, 278: 23834-23841.

Ahvazi B, Kim HC, Kee SH, Nemes Z, Steinert PM. (2002) Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J*, 21: 2055-2067.

Alexander Jo. (1963) The treatment of dermatitis herpetiformis with heparin *Br J Dermatol*, 75: 289-93.

Antal PG, Szipócs R. (2012) Tunable, low-repetition-rate, cost-efficient femtosecond Ti:sapphire laser for nonlinear microscopy. *Appl. Phys. B*, 107: 17-22.

Badarau E, Wang Z, Rathbone DL, Costanzi A, Thibault T, Murdoch CE, El Alaoui S, Bartkeviciute M, Griffin M. (2015) Development of Potent and Selective Tissue Transglutaminase Inhibitors: Their Effect on TG2 Function and Application in Pathological Conditions. *Chem Biol*, 22: 1347-1361.

Barnes KC. (2010) An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol*, 125: 16-29.

Baumgartner W, Golenhofen N, Weth A, Hiiragi T, Saint R, Griffin M, Drenckhahn D. (2004) Role of transglutaminase 1 in stabilisation of intercellular junctions of the vascular endothelium. *Histochem Cell Biol*, 122: 17-25.

Biri B, Kiss B, Király R, Schlosser G, Láng O, Kóhidai L, Fésüs L, Nyitray L. (2015) Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2. *Biochem J*, 2015 Oct 20. pii: BJ20150843

Brandner JM, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck LA, De Benedetto A. (2015) Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers*, 3: e974451.

Brennan BM, Huynh MT, Rabah MA, Shaw HE, Bisailon JJ, Radden LA 2nd, Nguyen TV, King TR. (2015) The mouse wellhaarig (we) mutations result from defects in epidermal-type transglutaminase 3 (Tgm3). *Mol Genet Metab*, 116: 187-191.

Bognar P, Nemeth I, Mayer B, Haluszka D, Wikonkal N, Ostorhazi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pasztoi M, Buzas EI, Szipocs R, Kolonics A, Temesvari E, Karpáti S. (2014) Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 134: 105-111.

Bognár P, Görög A, Kárpáti S. (2014) High prevalence of cryofibrinogenaemia in dermatitis herpetiformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2014 Dec 10.

Bognár P, Temesvári E, Németh I, Hársing J, Kuzmanovszki D, Kárpáti S. (2015) Fluoreszcein-izotiocianát kiváltotta fokozott perkután szenzibilizáció, különböző életkorú transzglutamináz-3 knockout egerekben. (DOI 10.7188/bvsz.2015.91.1.1.)

Bőrgyógyászat és Venerológia, Kárpáti szerk., 2013, 671-72 oldal

Breunig HG, Bückle R, Kellner-Höfer M, Weinigel M, Lademann J, Sterry W, König K. (2012) Combined in vivo multiphoton and CARS imaging of healthy and disease-affected human skin. *Microsc Res Tech*, 75: 492-498.

Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P, Hovnanian A. (2009) Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med*, 206: 1135-1147.

Candi E, Oddi S, Paradisi A, Terrinoni A, Ranalli M, Teofoli P, Citro G, Scarpato S, Puddu P, Melino G. (2002) Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J Invest Dermatol*, 119: 670-677.

Candi E, Oddi S, Terrinoni A, Paradisi A, Ranalli M, Finazzi-Agró A, Melino G. (2001) Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro. *J Biol Chem*, 276: 35014-35023.

Candi E, Schmidt R, Melino G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 328-340.

Cassidy AJ, van Steensel MA, Steijlen PM, van Geel M, van der Velden J, Morley SM, Terrinoni A, Melino G, Candi E, McLean WH. (2005) A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet*, 77: 909-917.

Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, Bonafé JL, Wilkinson J, Taïeb A, Barrandon Y, Harper JI, de Prost Y, Hovnanian A. (2000) Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet*, 25: 141-142.

Cheng T, Hitomi K, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Yamamoto K, Nishi K, Watts C, Reinheckel T, Schalkwijk J, Zeeuwen PL. (2006) Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem*, 281: 15893-15899.

Chung SI, Folk JE. (1972) Transglutaminase from hair follicle of guinea pig (crosslinking-fibrin-glutamyllysine-isoenzymes-purified enzyme). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69: 303-307.

Christensen AD, Haase C. (2012) Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS*, 120: 1-27.

Costanzo A, Fausti F, Spallone G, Moretti F, Narcisi A, Botti E.(2015) Programmed cell death in the skin. *Int J Dev Biol*, 59: 73-78.

Cox NH, Friedmann PS. (1991) Induction of lesions of dermatitis herpetiformis by autologous serum. *Br J Dermatol*, 124: 69-73.

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. (2011) Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 127: 806-814.

De Benedetto A, Qualia CM, Baroody FM, Beck LA. (2008) Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa. *J Invest Dermatol*, 128: 1594-1597

De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 127: 773-786

De Young LM, Young JM, Ballaron SJ, Spires DA, Puhvel SM. (1984) Intradermal injection of *Propionibacterium acnes*: a model of inflammation relevant to acne. *J Invest Dermatol*, 83: 394-398.

Dean MD. (2013) Genetic disruption of the copulatory plug in mice leads to severely reduced fertility. *PLoS Genet*, 9: e1003185.

Dearman RJ, Kimber I. (2000) Role of CD4(+) T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology*, 101: 442-451.

Denk W, Strickler JH, Webb WW. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248: 73-76.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, 3: 797-801.

Ebner S, Nguyen VA, Forstner M, Wang YH, Wolfram D, Liu YJ, Romani N. (2007) Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 119: 982-990.

Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminkaya M, Belkin AM, Colak G, Johnson GV, Mehta K. (2014) Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev*, 94: 383-417.

Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA. (2005) Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*, 124: 481-492.

Fésüs L. (2011) Cellular biochemistry of the multifunctional transglutaminase 2: challenging issues and novel concepts. *FEBS J*, 278: 4703.

Furio L, Hovnanian A. (2014) Netherton syndrome: defective kallikrein inhibition in the skin leads to skin inflammation and allergy. *Biol Chem*, 395: 945-958.

Furukawa K, Yamane M, Tatsukawa H, Hitomi K. (2015) Early response as shown by enhancement of transglutaminase 1 expression after cisplatin-induced acute kidney injury. *Arch Biochem Biophys*, 586: 27-32.

Gad SC. (1994) The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. *Toxicology*, 93: 33-46.

Garrigue JL, Nicolas JF, Fragnals R, Benezra C, Bour H, Schmitt D. (1994) Optimization of the mouse ear swelling test for in vivo and in vitro studies of weak contact sensitizers. *Contact Dermatitis*, 30: 231-237.

Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. (1995) The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest*, 95:2281-2290.

Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. (2002) Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J*, 368: 377-796.

Hadjivassiliou M, Aeschlimann P, Strigun A, Sanders DS, Woodroffe N, Aeschlimann D. (2008) Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol*, 64: 332-343.

Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS. (1999) Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J*, 13: 1787-1795.

Hertwig P. (1942) Neue mutationen und koppelungsgruppen bei der hausmaus, *Z. indukt Abstamm Vererbungsl*, 80: 220-246.

Hiiiragi T, Sasaki H, Nagafuchi A, Sabe H, Shen SC, Matsuki M, Yamanishi K, Tsukita S. (1999) Transglutaminase type 1 and its cross-linking activity are concentrated at adherens junctions in simple epithelial cells. *J Biol Chem*, 274: 34148-34154.

Hitomi K, Horio Y, Ikura K, Yamanishi K, Maki M. (2001) Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*, 33: 491-498.

Hitomi K, Presland RB, Nakayama T, Fleckman P, Dale BA, Maki M. (2003) Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J Dermatol Sci*, 32: 95-103.

Hitomi K. (2005) Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol*, 15: 313-319.

Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. (2013) Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, 133: 303-315.

Hölzle E, Plewig G. (1977) Effects of dermatitis, stripping, and steroids on the morphology of corneocytes. A new bioassay. *J Invest Dermatol*, 68: 350-356.

Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SP, Ponec M, Bon A, Lautenschlager S, Schorderet DF, Hohl D. (1995) Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science*, 267: 525-528.

Hubiche T, Ged C, Benard A, Léauté-Labrèze C, McElreavey K, de Verneuil H, Taïeb A, Boralevi F. (2007) Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm Venereol*, 87: 499-505.

Hur WS, Mazinani N, Lu XJ, Britton HM, Byrnes JR, Wolberg AS, Kastrop CJ. (2015) Coagulation factor XIIIa is inactivated by plasmin. *Blood*, 126: 2329-2337.

Hvid M, Jensen HK, Deleuran B, Kemp K, Andersson C, Deleuran M, Vestergaard C. (2009) Evaluation of FITC-induced atopic dermatitis-like disease in NC/Nga mice and BALB/c mice using computer-assisted stereological toolbox, a computer-aided morphometric system. *Int Arch Allergy Immunol*, 149: 188-194.

Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. (2009) Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev*, 89: 991-1023.

Imai Y, Kondo A, Iizuka H, Maruyama T, Kurohane K. (2006) Effects of phthalate esters on the sensitization phase of contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate. *Clin Exp Allergy*, 36: 1462-1468.

Irvine AD, McLean WH, Leung DY. (2011) Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med*, 365: 1315-1327.

Jakubowicz K, Dabrowski J, Maciejewski W. (1971) Deposition of fibrin-like material in early lesions of dermatitis herpetiformis. *Ann Clin Res*, 3: 34-38.

Jiang WG, Ablin R, Douglas-Jones A, Mansel RE. (2003) Expression of transglutaminases in human breast cancer and their possible clinical significance. *Oncol Rep*, 10: 2039-2044.

Jiang WG, Ablin RJ. (2011) Prostate transglutaminase: a unique transglutaminase and its role in prostate cancer. *Biomark Med*, 5: 285-291.

John S, Thiebach L, Frie C, Mokkapati S, Bechtel M, Nischt R, Rosser-Davies S, Paulsson M, Smyth N. (2012) Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PLoS One*, 7: e34252.

Kanchan K, Ergülen E, Király R, Simon-Vecsei Z, Fuxreiter M, Fésüs L. (2013) Identification of a specific one amino acid change in recombinant human transglutaminase 2 that regulates its activity and calcium sensitivity. *Biochem J*, 455: 261-272.

Kanchan K, Fuxreiter M, Fésüs L. (2015) Physiological, pathological, and structural implications of non-enzymatic protein-protein interactions of the multifunctional human transglutaminase 2. *Cell Mol Life Sci*, 72: 3009-3035.

Karpati S, Sardy M, Marschalko M, Horvath A (1997) New clinical approach in treatment of cryofibrinogenemia-diamino-diphenyl-sulfone seems to decrease the amount of cold precipitated serum-proteins-in vitro. *J Invest Dermatol*, 109: 463. (Abstr.No.:358)

Karpati S, Torok E, Kosnai I. (1986) Discrete palmar and plantar symptoms in children with dermatitis herpetiformis Duhring. *Cutis*, 37: 184-187.

Kárpáti S. (2012) Dermatitis herpetiformis. *Clin Dermatol*, 30: 56-59.

Kashibuchi N, Hirai Y, O'Goshi K, Tagami H. (2002) Three-dimensional analyses of individual corneocytes with atomic force microscope: morphological changes related to age, location and to the pathologic skin conditions. *Skin Res Technol*, 8: 203-211.

Kern PS, Gerberick GF, Ryan CA, Kimber I, Aptula A, Basketter DA. (2010) Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. *Dermatitis*, 21: 8-32.

Kim HC, Lewis MS, Gorman JJ, Park SC, Girard JE, Folk JE, Chung SI. (1990) Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem*, 265: 21971-21978.

Kimber I, Dearman RJ, Scholes EW, Basketter DA. (1994) The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93: 13-31.

Király R, Barta E, Fésüs L. (2013) Polymorphism of transglutaminase 2: unusually low frequency of genomic variants with deficient functions. *Amino Acids*, 44: 215-225.

Király R, Thangaraju K, Nagy Z, Collighan R, Nemes Z, Griffin M, Fésüs L. (2015) Isopeptidase activity of human transglutaminase 2: disconnection from transamidation and characterization by kinetic parameters. *Amino Acids*, 2015 Aug 7.

König K. (2000) Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc*, 200: 83-104.

Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. (1990) Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol*, 145: 2833-2838.

Kubo A, Nagao K, Amagai M. (2012) Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest*, 122: 440-447.

Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. (2009) External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*, 206: 2937-2946.

Kypriotou M, Huber M, Hohl D. (2012) The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol*, 21: 643-649.

Larson RP, Zimmerli SC, Comeau MR, Itano A, Omori M, Iseki M, Hauser C, Ziegler SF. (2010) Dibutyl phthalate-induced thymic stromal lymphopoietin is required for Th2 contact hypersensitivity responses. *J Immunol*, 184: 2974-2984.

Lee SC, Kim IG, Marekov LN, O'Keefe EJ, Parry DA, Steinert PM. (1993) The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem*, 268: 12164-12176.

Lee JH, Jang SI, Yang JM, Markova NG, Steinert PM. (1996) The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. Stratified squamous epithelial-specific expression in cultured cells is mediated by binding of Sp1 and ets transcription factors to a proximal promoter element. *J Biol Chem*, 271: 4561-4568.

Lorand L, Graham RM. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 140-156.

Lorand L, Jeong JM, Radek JT, Wilson J. (1993) Human plasma factor XIII: subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol*, 222: 22-35.

Mackenzie IC. (1975) Ordered structure of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 65: 45-51.

Mackenzie IC. (1970) Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature*, 226: 653-655.

Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H, Hashida M, Iizuka H, Ikawa M, Okabe M, Kondoh G, Kinoshita T, Takeda J, Yamanishi K. (1998) Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1044-1049.

McAleer MA, Irvine AD. (2013) The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol*, 131: 280-291.

Michaud M, Pourrat J. (2013) Cryofibrinogenemia. *J Clin Rheumatol*, 19: 142-148.

Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. (1996) Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*, 106: 989-992.

Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM. (1994) Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science*, 264: 1593-1596.

Nemes Z, Petrovski G, Aerts M, Sergeant K, Devreese B, Fésüs L. (2009, A) Transglutaminase-mediated intramolecular cross-linking of membrane-bound alpha-synuclein promotes amyloid formation in Lewy bodies. *J Biol Chem*, 284: 27252-27264.

Nemes Z, Fésüs L. (2009, B) Methods to analyze transglutamination of proteins involved in apoptosis. *Methods Mol Biol*, 559: 107-116.

Nemes Z, Marekov LN, Fésüs L, Steinert PM. (1999) A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 8402-8407.

Nemes Z, Steinert PM. (1999) Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*, 31: 5-19.

Nishibu A, Ward BR, Boes M, Takashima A. (2007) Roles for IL-1 and TNF alpha in dynamic behavioral responses of Langerhans cells to topical hapten application. *J Dermatol Sci*, 45: 23-30.

Novak N, Baurecht H, Schäfer T, Rodriguez E, Wagenpfeil S, Klopp N, Heinrich J, Behrendt H, Ring J, Wichmann E, Illig T, Weidinger S. (2008) Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *J Invest Dermatol*, 128: 1430-1435.

Ogrodowczyk A, Markiewicz L, Wróblewska B. (2014) Mutations in the filaggrin gene and food allergy. *Prz Gastroenterol*, 9: 200-207.

Oji V, Eckl KM, Aufenvenne K, Nätebus M, Tarinski T, Ackermann K, Seller N, Metzger D, Nürnberg G, Fölster-Holst R, Schäfer-Korting M, Hausser I, Traupe H, Hennies HC. (2010) Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *Am J Hum Genet*, 87: 274-281.

Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K. (2011) Langerhans cell antigen capture

through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med*, 208: 2607-2613.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38: 441-446.

Park J, Jekarl DW, Kim Y, Kim J, Kim M, Park YM. (2015) Novel FLG null mutations in Korean patients with atopic dermatitis and comparison of the mutational spectrain Asian populations. *J Dermatol*, 42: 867-873.

Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JH, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA, Johansen JD, Karlberg AT, Kimber I, Lepoittevin JP, Liebsch M, Maibach HI, Martin SF, Merk HF, Platzek T, Rustemeyer T, Schnuch A, Vandebriel RJ, White IR, Luch A. (2012) Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci*, 69: 763-781.

Periasamy Ammasi (ed) (2001) *Methods in Cellular Imaging* Oxford University Press

Pietroni V, Di Giorgi S, Paradisi A, Ahvazi B, Candi E, Melino G. (2008) Inactive and highly active, proteolytically processed transglutaminase-5 in epithelial cells. *J Invest Dermatol*, 128: 2760-2766. Erratum in: *J Invest Dermatol*. 2010 Oct; 130(10):2517.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17: 1063-1072.

Qin XY, Fujii S, Shimizu A, Kagechika H, Kojima S. (2015) Carboxylic Derivatives of Vitamin K2 Inhibit Hepatocellular Carcinoma Cell Growth through Caspase/Transglutaminase-Related Signaling Pathways. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 61: 285-290.

Radek JT, Jeong JM, Murthy SN, Ingham KC, Lorand L. (1993) Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 3152-3156.

Raghunath M, Tontsidou L, Oji V, Aufenvenne K, Schürmeyer-Horst F, Jayakumar A, Ständer H, Smolle J, Clayman GL, Traupe H. (2004) SPINK5 and Netherton syndrome: novel mutations, demonstration of missing LEKTI, and differential expression of transglutaminases. *J Invest Dermatol*, 123: 474-483.

Reitamo S, Reunala T, Kontinen YT, Saksela O, Salo OP. (1981) Inflammatory cells, IgA, C3, fibrin and fibronectin in skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 105: 167-177.

Renner ED, Hartl D, Rylaarsdam S, Young ML, Monaco-Shawver L, Kleiner G, Markert ML, Stiehm ER, Belohradsky BH, Upton MP, Torgerson TR, Orange JS, Ochs HD. (2009) Comèl-Netherton syndrome defined as primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 124: 536-543. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 124: 1318.

Rinnerthaler M, Duschl J, Steinbacher P, Salzmann M, Bischof J, Schuller M, Wimmer H, Peer T, Bauer JW, Richter K. (2013) Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. *Exp Dermatol*, 22: 329-335.

Samuelov L, Sprecher E. (2014) Peeling off the genetics of atopic dermatitis-like congenital disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 134: 808-815.

Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. (2007) Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 127: 1282-1284.

Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. (2002) Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med*, 195: 747-757.

Sarkar, N.K, Clarke, D.D., Waelsch, H. (1957) An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 25: 451-452.

Sato K, Imai Y, Irimura T. (1998) Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity. *J Immunol*, 161: 6835-6844.

Scharschmidt TC, Man MQ, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg JP, Silva KA, Mauro TM, Hupe M, Cho S, Wu Y, Celli A, Schmuth M, Feingold KR, Elias PM. (2009) Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *J Allergy Clin Immunol*, 124: 496-506.

Shah SA, Ormerod AD. (2000) Dermatitis herpetiformis effectively treated with heparin, tetracycline and nicotinamide. *Clin Exp Dermatol*, 25: 204-205.

Shigeno T, Katakuse M, Fujita T, Mukoyama Y, Watanabe H. (2009) Phthalate ester-induced thymic stromal lymphopoietin mediates allergic dermatitis in mice. *Immunology*, 128 (1 Suppl): e849-857.

Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csoz É, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR. (2012) A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 431-436.

Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH. (2006) Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*, 38: 337-342.

Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 3: 673-680.

Stalder JF, Tennstedt D, Deleuran M, Fabbrocini G, de Lucas R, Haftek M, Taieb C, Coustou D, Mandeau A, Fabre B, Hernandez-Pigeon H, Aries MF, Galliano MF, Duplan H, Castex-Rizzi N, Bessou-Touya S, Mengeaud V, Rouvrais C, Schmitt AM, Bottino R, Cottin K, Saint Aroman M. (2014) Fragility of epidermis and its consequence in dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 28 Suppl 4:1-18.

Steinert PM, Chung SI, Kim SY. (1996) Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 221: 101-106.

Steinert PM, Kim SY, Chung SI, Marekov LN. (1996) The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 271: 26242-26250.

Steinert PM, Marekov LN. (1999) Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol Biol Cell*, 10: 4247-42461.

Steinert PM, Parry DA, Marekov LN. (2003) Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *J Biol Chem*, 278: 41409-41419.

Stephens P, Grenard P, Aeschlimann P, Langley M, Blain E, Errington R, Kipling D, Thomas D, Aeschlimann D. (2004) Crosslinking and G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses. *J Cell Sci*, 117: 3389-3403.

Sturniolo MT, Chandraratna RA, Eckert RL. (2005) A novel transglutaminase activator forms a complex with type 1 transglutaminase. *Oncogene*, 24: 2963-2972.

Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Fésüs L. (2011) Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and TG2^{-/-} mouse. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 78: 295-345.

Takehita K, Yamasaki T, Akira S, Gantner F, Bacon KB. (2004) Essential role of MHC II-independent CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. *Int Immunol*, 16: 685-695.

Tan CC, Sale JE, Brammer C, Irons RP, Freeman JG. (1996) A rare case of dermatitis herpetiformis requiring parenteral heparin for long-term control. *Dermatology*, 192: 185-186.

Tarcsa E, Marekov LN, Andreoli J, Idler WW, Candi E, Chung SI, Steinert PM. (1997) The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J Biol Chem*, 272: 27893-27901.

Tatsukawa H, Abe N, Ohashi S, Hitomi K. (2015) Distribution of transglutaminase family members in mouse whole body sections. *Biochem Biophys Res Commun*, 467: 1046-1051.

Taylor TB, Schmidt LA, Meyer LJ, Zone JJ. (2015) Transglutaminase 3 present in the IgA aggregates in dermatitis herpetiformis skin is enzymatically active and binds soluble fibrinogen. *J Invest Dermatol*, 135: 623-625.

Temesvári E, González R, Marschalkó M, Horváth A (2004) Age dependence of diphenylcyclopropanone sensitization in patients with alopecia areata. *Contact Dermatitis*, 50: 381-382.

Thiebach L, John S, Paulsson M, Smyth N. (2007) The role of TG3 and TG6 in hair morphogenesis and in the establishment of the skin barrier function. 9th International Conference on Transglutaminases and Protein Cross-linking Morocco, Sept 1–4, 2007.

Thibaut S, Candi E, Pietroni V, Melino G, Schmidt R, Bernard BA (2005) Transglutaminase 5 expression in human hair follicle. *J Invest Dermatol* 125:581–585.

Thibaut S, Cavusoglu N, de Becker E, Zerbib F, Bednarczyk A, Schaeffer C, van Dorsselaer A, Bernard BA. (2009) Transglutaminase-3 enzyme: a putative actor in human hair shaft scaffolding? *J Invest Dermatol*, 129: 449-459.

Thomas H, Beck K, Adamczyk M, Aeschlimann P, Langley M, Oita RC, Thiebach L, Hils M, Aeschlimann D. (2013) Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function. *Amino Acids*, 44: 161-177.

Thyssen JP, Johansen JD, Linneberg A, Menné T, Nielsen NH, Meldgaard M, Szecsi PB, Stender S, Carlsen BC. (2010) The association between null mutations in the filaggrin gene and contact sensitization to nickel and other chemicals in the general population. *Br J Dermatol*, 162: 1278-1285.

Tong L, Png E, Aihua H, Yong SS, Yeo HL, Riau A, Mendoz E, Chaurasia SS, Lim CT, Yiu TW, Iismaa SE. (2013) Molecular mechanism of transglutaminase-2 in corneal epithelial migration and adhesion. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1304-1315.

Tóth B, Garabuczi E, Sarang Z, Vereb G, Vámosi G, Aeschlimann D, Blaskó B, Bécsi B, Erdődi F, Lacy-Hulbert A, Zhang A, Falasca L, Birge RB, Balajthy Z, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. (2009) Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol*, 182: 2084-2092.

Vasilopoulos Y, Cork MJ, Murphy R, Williams HC, Robinson DA, Duff GW, Ward SJ, Tazi-Ahnini R. (2004) Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 123: 62-66.

Vasilopoulos Y, Cork MJ, Teare D, Marinou I, Ward SJ, Duff GW, Tazi-Ahnini R. (2007) A nonsynonymous substitution of cystatin A, a cysteine protease inhibitor of house dust mite protease, leads to decreased mRNA stability and shows a significant association with atopic dermatitis. *Allergy*, 62: 514-519.

van der Velden JJ, van Geel M, Nellen RG, Jonkman MF, McGrath JA, Nanda A, Sprecher E, van Steensel MA, McLean WH, Cassidy AJ. (2015) Novel TGM5 mutations in acral peeling skin syndrome. *Exp Dermatol*, 24: 285-289.

Vukmanovic-Stejic M, Rustin MH, Nikolich-Zugich J, Akbar AN. (2011) Immune responses in the skin in old age. *Curr Opin Immunol*, 23: 525-531.

Walley AJ, Chavanas S, Moffatt MF, Esnouf RM, Ubhi B, Lawrence R, Wong K, Abecasis GR, Jones EY, Harper JI, Hovnanian A, Cookson WO. (2001) Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet*, 29: 175-178.

Wang M, Kim IG, Steinert PM, McBride OW. (1994) Assignment of the human transglutaminase 2 (TGM2) and transglutaminase 3 (TGM3) genes to chromosome 20q11.2. *Genomics*, 23: 721-722.

Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. (1992) Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest*, 90: 482-487.

Yamane A, Fukui M, Sugimura Y, Itoh M, Alea MP, Thomas V, El Alaoui S, Akiyama M, Hitomi K. (2010) Identification of a preferred substrate peptide for transglutaminase 3 and detection of in situ activity in skin and hair follicles. *FEBS J*, 277: 3564-3574.

Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. (1994) Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 7296-7300.

Zhang J, Wang S, Huang W, Bennett DA, Dickson DW, Wang D, Wang R. (2015, A) Tissue Transglutaminase and Its Product Isopeptide Are Increased in Alzheimer's Disease and APP^{swe}/PS1^{dE9} Double Transgenic Mice Brains. *Mol Neurobiol*, 2015 Sep 19.

Zhang SQ, Li CX, Gao XQ, Qiu WY, Chen Q, Li XM, Zhou X, Tian X, Tang ZP, Zhao T, Zhang F, Zhang XB. (2015, B) Identification and functional characterization of a novel transglutaminase 1 gene mutation associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Int J Dermatol*. 2015 Jul 28. doi: 10.1111/ijd.12806. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26220141.

Zhao XP, Elder JT. (1997) Positional cloning of novel skin-specific genes from the human epidermal differentiation complex. *Genomics*, 45: 250-258.

Zöller-Utz IM, Esslinger B, Schulze-Krebs A, Dieterich W. (2010) Natural hidden autoantibodies to tissue transglutaminase cross-react with fibrinogen. *J Clin Immunol*, 30: 204-212.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Bognár P, Nemeth I, Mayer B, Haluszka D, Wikonkal N, Ostorhazi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pasztoi M, Buzas EI, Szipocs R, Kolonics A, Temesvari E, Karpáti S. (2014) Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 134: 105-111. **IF: 7.216**
2. Bognár P, Görög A, Kárpáti S. (2014) High prevalence of cryofibrinogenaemia in dermatitis herpetiformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2014 Dec 10.
3. Bognár P, Temesvári E, Németh I, Hársing J, Kuzmanovszki D, Kárpáti S. (2015) Fluoreszcein-izotiocianát kiváltotta fokozott perkután szenzibilizáció, különböző életkorú transzglutamináz-3 knockout egerekben. *Bőrgyógy Venerol Szle*, 91: 5-9.

11.2 A disszertációtól független közlemények

1. Bánvölgyi A, Balla E, Bognár P, Tóth B, Ostorházi E, Bánhegyi D, Kárpáti S, Marschalkó M. (2015) Lymphogranuloma venereum: the first Hungarian cases. *Orv Hetil*. 156: 36-40.
2. Bognár P, Holló P, Erős N, Hársing J, Kárpáti S. (2014) Papuloerythroderma Ofuji *Bőrgyógy Venerol Szle*, 88: 153-155.
3. Fodor K, Bognár P, Kiss J, Holló P, Marschalkó M, Szlávik J, Bánhegyi D, Kárpáti S. (2011) Bőrtünetek alapján diagnosztizált HIV esetek *Bőrgyógy Venerol Szle*, 87: 149-154.

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a doktori munkám során szakmai segítségükkel és baráti támogatásukkal mellett álltak. Mindenekelőtt őszintén hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Kárpáti Sarolta Professzor Asszonynak, aki szakmai útmutatásával, észrevételeivel és bátorításával legközvetlenebbül segítette munkám előrehaladását. Őszinte köszönet illeti Dr. Temesvári Erzsébet Professzor Asszonyt is, szakmai észrevételeiért, gyakorlati segítségéért és bátorításáért egyaránt.

Köszönettel tartozom Dr. Hársing Juditnak a metszetek szövettani kiértékelésénél nyújtott önzetlen segítségért. Hálával tartozom a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika allergológiai munkacsoportjából Németh Ilonának, a kísérletek szervezése és kivitelezése során nyújtott folyamatos segítségéért, támogatásáért.

Köszönöm a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika genetikai laboratórium munkatársainak, Mazán Mercédesznek és Pintér Dórának a nyirokcsomók feldolgozásában és az ELISA vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Őszinte köszönettel tartozom Dr. Buzás Edit Professzort Asszonynak, a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet igazgatójának a kollaborációban nyújtott gyakorlati segítségért és azért az önzetlen szakmai segítségért, mely hozzájárult a kísérletes munka eredményéhez.

Köszönöm az MTA Wigner Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet munkatársainak Dr. Szipőcs Róbertnek, Dr. Kolonics Attilának, valamint Haluszka Dórának a kétfoton mikroszkópos mérésekben nyújtott segítséget. Köszönettel tartozom az intézetnek a munkám befejezéséhez nyújtott anyagi segítségért is.

Köszönöm Dr. Görög Anna segítségét a dermatitisz herpetiformiszos beteganyag feldolgozásában.

Köszönöm a Klinikán dolgozó orvos kollégáimnak a munkám megírását elősegítő ügyeletcseréket, betegellátásban nyújtott segítséget.

Hálával tartozom családomnak, akik szeretetükkel és támogatásukkal lehetővé tették a doktori munka megírását. Hálás vagyok Édesapámnak, aki megszeretette velem a természettudományokat.

Szeretném megköszönni Eszternek mindazt a szeretetet, megértést, amivel bátorított és mellettem állt és azt a türelmet, mellyel elviselte a munkámmal járó nehézségeket.