

# A transzglutamináz 3 szerepe a dermatológiai megbetegedésekben

Doktori tézisek

**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

## BEVEZETÉS

Dolgozatom a transzglutamináz 3 (TG3) szerepét vizsgálja a dermatológia szempontjából.

Ismertetem a transzglutamináz 3 knockout (TGM3  $-/-$ ) egereken végzett *in vivo* penetrációs vizsgálatainkkal és epikután szenzibilizációs kísérleteinkkel igazolt bőr barrier defektust.

Tárgyalom továbbá Klinikánkon dermatitisz herpetiformisz (DH) miatt gondozott betegekben megfigyelt cryofibrinogénémia szokatlanul magas prevalenciáját, mely kórképben a TG3 mint patognomikus autoantigén szerepel.

A dolgozat így a transzglutamináz 3 bőrrpatológiában eddig nem publikált szerepét ismerteti, egyúttal a transzglutamináz 3 dermatológiában betöltött funkcióit is áttekinti.

### **Látens bőr barrier defektus TGM3 $-/-$ egérben**

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

A bőr barrier funkciója szempontjából a külvilággal közvetlenül érintkező, komplex protein-lipid struktúra, a cornified cell envelope (CE) az első és legfontosabb védővonal. Az intakt szaruréteg kialakulásában az egyes struktúrfehérjék közt stabil izopeptid kötések létrehozó transzglutamináz enzimsalád egyes tagjai – a TG1, TG3, és TG5 – kiemelt jelentőségűek. Az elszarusodás folyamatában elégtelen transzglutamináz aktivitás, ezáltal struktúrájában megváltozott CE esetén bőr barrier defektust várhatunk.

A nemrég létrehozott TGM3  $-/-$  egértörzs a szőrzet abnormis struktúráján, az epidermisz megkésett *in utero* fejlődésén, valamint az izolált corneocyták fokozott fragilitásán kívül egyéb barrier diszfunkcióra utaló eltérést meglepő módon nem mutatott. A transzglutaminázok CE kialakulásában betöltött alapvető szerepéből kiindulva azonban érdemesnek tartottuk a TGM3 $-/-$  egerek bőr barrier funkciójának további vizsgálatát.

## **Cryofibrinogénia vizsgálata dermatitisz herpetiformisban**

A dermatitisz herpetiformis, egy a glutén szenzitív enteropathiához (coeliakia) társult megbetegedések közül. Coeliakiában a transzglutamináz 2 (TG2) szerepel, mint autoantigén; DH-ban azonban a hasonló struktúrájú TG3 válik fő autoantigénné. A DH-s betegekben intermittálóan előforduló akrális purpurák alapján vizsgálni kezdtük a betegpopulációban a cryoglobulin és cryofibrinogén jelenlétét.

### **CÉLKITŰZÉSEK**

- 1.** A közelmúltban bemutatott TGM3 *-/-* egértörzsben a vizsgálok manifeszt bőr barrier defektust nem igazoltak. A TG3 lokalizációját és enzimátikus sajátosságait, 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 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 gyulladásoos reakció látens 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 nyomon követhető.
- 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 szenzibilizálhatóságának 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 Klinikánkon gondozott 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 dapson kezelés hatását a cryoproteinek prevalenciájára.**

## **MÓDSZEREK**

### **TGM3 $-/-$ egér**

A TGM3  $-/-$  egértörzs létrehozása Kölni Egyetemen, C57BL/6 WT háttértörzsben a TGM3 allél 6 exonjában elhelyezett neomycin rezisztencia gén technológia felhasználásával történt. A törzset a Kölni Egyetemmel kollaborációban használtuk. A knockout (KO) állatok hím és nőstény példányai TGM3  $-/-$  homozigóta utódok létrehozására képesek, természetben fenntarthatók.

Az állatokat 12 órás világos-sötét fényciklus mellett tartottuk, a kísérletek idejétől eltekintve szabad táplálék és folyadék hozzáférést biztosítva. Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsa, valamint az illetékes szakhatóságok jóváhagyták (22.1/1049/3/2010).

A szenzibilizációs kísérleteket három koresoportban: 8-12 hetes, 6-, ill. 18-hónapos nőstény egereken végeztük. Mindhárom korosztályban elvégeztük a fülvastagodási válasz (mouse ear swelling test, MEST) és a szövettan kiértékelését. Az áramlás citometriai, szérum IgE méréseket, ill. a P. acnes in vivo assay-t, és a kétfoton mikroszkópos méréseket a 8-12 hetes korosztályban végeztük el.

## **Kontakt érzékenység vizsgálata: a „mouse ear swelling test” – MEST.**

A késői típusú túlérzékenységi reakció kiváltására a fluoreszcein-izotiocianát/dibutil-ftalát (FITC/DBP) modellt alkalmaztuk. Az egerek hasán kb. 2x2 cm-es területet leborotváltunk (0. nap), majd 24 óra múlva (1. nap) a területre szabványos alumínium kamrában 160 $\mu$ l aceton/DBP 1:1 v/v elegyében oldott 0.5%-os FITC oldatot helyeztünk, melyet 24 órán keresztül hagyunk fenn. (A kontroll csoport esetében az oldószer azonos mennyiségét használtuk). A kísérlet 7. napján az exponált területet ismételt borotválása, másnap (8. nap), a 24 órás expozíció ismétlése következett. Egy héttel később, (15. nap) digitális mikrométerrel megmértük az egerek kiindulási fülvastagságát (0h), majd ezt követően mindkét oldali fül dorsalis felszínére 20 $\mu$ l 0,5%-os FITC ill. a kontroll csoportban aceton/DBP 1:1 (v/v) oldatot pipettáztunk. A fülvastagságot 24-, ill. 48 óra múlva ismételten megmértük. Mindkét fül azonos időben mért átlagát használtuk statisztikai kiértékelésre. A fülvastagodás mértéke a gyulladásoos reakció nagyságával arányos.

## **Szövetteni vizsgálatok**

A re-expozíció után 48 órával eltávolított füleket 10%-os pufferelt formalin oldatban fixáltuk, majd standard dehidratációt és parafin beágyazást követően 2 $\mu$ m-es metszetekben hematoxylin-eosin (HE) és toluidinkék festés után vizsgáltuk. A HE festett metszetekben az epidermisz megvastagodását, spongiosist és pörkök képződését, a dermiszben a gyulladásoos infiltrátum jelenlétét értékeltük. A toluidinkékkel festett metszeteken az előbbiektől függetlenül a szubepidermalis, metachromasiásoan festődő hízósejtek átlagos számát vizsgáltuk 5 látótérben, 200x nagyítással. A gyulladást és a hízósejtek számát egyaránt szemikvantitatív skálán (0,+,,++) értékeltük.

## **Áramlási citometriás (flow-citometriás) mérések**

A kiperparált drenáló nyirokcsomókat steril PBS-ben homogenizáltuk. A sejtek fenotípus vizsgálatához az alábbi perkonjugált antitesteket alkalmaztuk: PE-konjugált anti-egér CD3, PerCP-konjugált anti-egér CD4, ill. PE-konjugált anti-egér CD25 (BD Biosciences, San Jose, CA). Méréseinkhez az asztali (bench-top) flow-citóméter rendszert (FACSCalibur) használtuk, az eredményeket CellQuest Pro programmal ábrázoltuk és értékeltük. A mérési küszöböt minden minta esetében  $10^4$  eseményre állítottuk be. Az egyes sejtpopulációk azonosítása a típusos forward scatter (FSC) – side scatter (SSC), dot-plot grafikonokon történt. A CD4, CD25 kettős pozitív sejtek az aktivált T-sejteknek felelnek meg, melyek százalékos arányát vizsgáltuk a lymphocyta kapun belül. A dot-plot ábrák mellett jelöletlen (antitesttel nem inkubált) szuszpenziókon a lymphocyta kaput kizárva, a FITC emissziós hullámhosszán (518-520 nm) hisztogramokat is felvettünk, kihasználva azt, hogy a szenzibilizáció során alkalmazott haptén a FITC volt. A mérésekhez csoportonként 5-5db 8-12 hetes WT, ill. TGM3-/- állatot használtunk.

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

Az *in vivo* mérés során az elaltatott állatok fülének ventrális oldalát szövetbarát ragasztóval tárgylemezre rögzítettük, a fül dorsalis felszínére 2  $\mu$ l 50  $\mu$ g/ml-es dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott FITC-et pipettáztunk, majd 15 perc után kétfoton mikroszkóppal követtük a FITC penetrációját. A mérést az ellenoldali fülön is elvégeztük. Az alkalmazott kétfoton mikroszkópban a minta gerjesztésére 795 nm-re hangolt Ti-zafir lézert használtunk (76 MHz-es ismétlési frekvencia, 190 femto-szekundumos impulzus, átlagteljesítmény maximum 20 mW). A fenti beállítások mellett jól detektálható fluoreszcens jelet kaptunk, de elkerülhető volt a szövetek termikus és fotokémiai károsodása. A detektáláshoz Carl Zeiss gyártmányú (LSM 7MP) mikroszkópot használtunk. A méréseket 20x nagyítású víz immerziós objektívvel végeztük. A penetrációt a jó ábrázolhatóság

érdekében 15, 30, ill. 40 perces időpontokban regisztráltuk. Az optikai szeletelést, azaz „z-stack” technikát 850  $\mu\text{m}$  x 850  $\mu\text{m}$ -es területen, a stratum corneum felől a dermis felé 80  $\mu\text{m}$ -es mélységig végeztük, az egyes horizontális síkok 8  $\mu\text{m}$ -es távolságban helyezkedtek el egymástól, így összességében egy 850  $\mu\text{m}$  x 850  $\mu\text{m}$  x 80  $\mu\text{m}^3$  –es szövetminta került elemzésre. Az összeillesztett 3D-s ábrákat, illetve a fluoreszcencia intenzitás adatokat a ZEN software-rel (Carl Zeiss), a képanalízist az UTHSCA Image Tool for Windows 3.0 verziójú programmal végeztük. A mért fluoreszcencia intenzitás kvantitatív elemzéséhez csoportonként 3-3db, 6-12 hetes TGM3<sup>-/-</sup> ill. WT állat reprezentatív, 30 perces z-stack felvételeit használtuk fel.

### ***In vivo Propionibacterium acnes* assay**

A fülbe szubepidermálisan injektált *P. acnes* masszív gyulladást okozó reakciót provokál. Az egerek bal fülébe Hamilton fecskendővel 20  $\mu\text{l}$  steril PBS-ben szuszpendált  $10^{14}$  CFU *P. acnes* törzset oltottunk. A jobb fül szolgált kontrollként, melybe ugyancsak 20  $\mu\text{l}$  térfogatú, steril PBS-t injektáltunk. A kialakult gyulladást 48 óra elteltével végzett MEST-el értékeltük. A jobb és bal fül vastagsága közötti különbség százalékos aránya alapján értékeltük a létrejött gyulladást okozó reakció mértékét. Csoportonként 3-3db, 6-12 hetes TGM3<sup>-/-</sup> és WT állatot használtunk.

### **Szérum IgE ELISA**

A 48 órás fülvastagság méréssel párhuzamosan üveg kapillárisal vért vettünk a retrobulbaris plexusból. A szérum IgE szint mérésére a közforgalmú ELISA KIT-et (Mouse IgE ELISA BD Biosciences, San Jose CA), illetve a gyártó által ajánlott kiegészítő reagens készletet (OptEIA Reagent Set B) használtuk, a gyártó előírásait követve. A mérésekhez csoportonként 5-5db 8-12 hetes WT, ill. TGM3<sup>-/-</sup> állatot használtunk.

## **Cryofibrinogénia dermatitisz herpetiformisban**

Kizárólag szövettanilag és direkt immunfluoreszcenciával igazolt DH-s betegekben - a betegség aktivitásától és szerológiai markerektől függetlenül - cryofibrinogén és cryoglobulin jelenlétét vizsgáltuk. Összesen 88 DH-s beteg, 60 férfi és 28 nő adatait dolgoztuk fel, az átlag életkor  $36.5 \pm 17.4$  év volt. Kontrollként retrospektív módon feldolgoztuk a 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 betegekben összesen 233 cryoprotein (CF és CG) vizsgálat történt. A csoportot 56 férfi és 177 nő alkotta, az átlag életkor  $52.9 \pm 17.4$  év volt. Vizsgáltuk a cryofibrinogénia prevalenciáját a gluténmentes diétát tartó, valamint gluténmentes diéta (GMD) mellett dapsont is szedő DH szubpopulációkban.

## **Cryofibrinogén (CF) és cryoglobulin (CG) vizsgálata**

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

Cryoglobulin meghatározása: a betegektől ugyancsak  $37\text{ °C}$ -ra előmelegített Vacutainer® natív csövekbe történt vérvétel, majd a vért kémcsőbe történő átfajtése után 3 óráig  $37\text{ °C}$ -on inkubáltuk. Ezt követően a savót lecentrifugáltuk (2000 RPM, 20 perc) és  $4\text{ °C}$ -on tartva 72 óra után



kvalitatív módon értékeltük a megjelenő csapadékot (cryoglobulin). (1 cső 37 °C-on tartott savó szolgált kontrollként.)

### **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.

## **EREDMÉNYEK**

### **MEST eredmények – a 8-12 hetes, 6-, ill. 18 hónapos TGM3 -/- és WT egér populációkban**

**8-12 hetes populáció:** A FITC-kezelt TGM3 -/- csoportban (n=20) a 24. órában  $18 \pm 13 \mu\text{m}$ -es, a 48. órában  $61 \pm 19 \mu\text{m}$ -es fülvastagodást mértünk, míg ugyanezen értékek a WT csoportban (n=16) a 24. órában  $11 \pm 6 \mu\text{m}$ , a 48. órában  $16 \pm 12 \mu\text{m}$  voltak. A 48. órában mért MEST adatok a TGM3 -/- csoportban szignifikánsan magasabbnak ( $p \leq 0.0001$ ) bizonyultak a WT csoporthoz viszonyítva. A vivőanyaggal kezelt csoportok esetében a TGM3 -/- egerek (n=12) a 24. órában  $3 \pm 4 \mu\text{m}$ -es, a 48. órában  $17 \pm 14 \mu\text{m}$ -es fülvastagodást mutattak, a WT egerek (n=9) 24 órás fülvastagodása  $6 \pm 3 \mu\text{m}$ , 48 órás fülvastagodása  $7 \pm 9 \mu\text{m}$ -t volt. A vivőanyaggal történt kezelés esetén szignifikáns különbség nem volt detektálható a csoportok között.

**6 hónapos populáció:** A FITC-kezelt TGM3 -/- csoportban (n=8) 24-, ill. 48 órás kiértékelésnél  $41 \pm 23 \mu\text{m}$ , ill.  $70 \pm 28 \mu\text{m}$ -es fülvastagodási értékeket mértünk, míg a WT csoportban a fülvastagodás a 24. órában  $18 \pm 7 \mu\text{m}$ , a 48. órában  $24 \pm 9 \mu\text{m}$ -es volt. A 48. órában mért MEST értékek ebben a korcsoportban is szignifikánsan magasabbak ( $p \leq 0.0001$ ) voltak a TGM3 -/- egerek között. Vivőanyag kezelés mellett minden csoportnál hasonló, 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±4µm volt, a WT csoport (n=5) 24. órás fülvastagodása 3±3µm, a 48. órában mért értéke 5±7µm volt.

**18 hónapos populáció:** A FITC-kezelt TGM3 -/- egerek (n=5) MEST értéke a 24. órában 30±16µm-nek, a 48. órában 52±18µm-nek bizonyult, míg a WT egerek (n=5) esetében a 24. órában 16±11µm-es, a 48. órában 25±11µm-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) a 24. órában 3±3µm-es, a 48. órában 7±6µm-es MEST értéket, a WT csoport (n=5) tagjai ugyanezen időpontokban 3±3µm-, ill. 5±5µm-es értékeket mutattak. Vivőanyaggal kezelt csoportok között ebben a korcsoportban sem volt detektálható szignifikáns különbség. *A MEST adatok alapján a legidősebb egerek is szenzibilizálhatók voltak, azonban szignifikáns különbséget a másik két korosztály azonos csoportjaihoz képest sem a 24., sem a 48. órában végzett kiértékelésben nem tudtunk igazolni.*

### **Az egereken végzett vizsgálatok szövettani kiértékelése**

A szövettani kiértékeléseket mindhárom korosztályban vizsgáltuk. Az eredmények mindhárom korcsoport esetében jól korreláltak a MEST mérések eredményeivel. A szövettani vizsgálatok során mindhárom korcsoport esetében azonos eltéréseket találtunk. Vivőanyag kezelés mellett sem a WT, sem a TGM3 -/- egerekben nem tapasztaltunk gyulladásra utaló jeleket. FITC kezelés hatására a WT csoportban mérsékelt kevertsejtes dermális infiltrátumot, az epidermisz kifelé forduló kizsáradását láttuk. A FITC kezelt TGM3 -/- csoportokban a dermális gyulladással járó infiltrátum, és az epidermisz hiperpláziája lényegesen nagyobb mértékű volt, itt gyakran figyeltünk meg pörkképződést is, mely a WT csoportban csak elvétve fordult elő.

A toluidinkékkel festett metszeteken, az előbbiektől függetlenül értékelt átlagos hízósejtszám mind a FITC, mind a vivőanyag kezelt csoportban több mint 10 volt látóterenként, számukban életkor szerint sem találtunk szignifikáns különbséget.

## **Áramlási citometria**

A FITC kezelt TGM3<sup>-/-</sup> egerekben az aktivált T-sejtek aránya szignifikánsan ( $p \leq 0.01$ ) magasabb volt ( $24.2 \pm 2.5\%$ ), mint a FITC kezelt WT csoportban ( $8.2 \pm 3.3\%$ ). A vivőanyaggal 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  $2.5 \pm 1.1\%$ ). A non-lymphoid kapuban, antitesttel nem jelölt nyirokcsomó homogenizátumokban a FITC hullámhosszán detektált fluoreszcencia a knockout állatok esetében tendenciájában jelzetten nagyobb mértékű volt, a különbség azonban a vad és knockout csoportok között elhanyagolhatónak bizonyult.

## **Szérum IgE szint**

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

## **In vivo Propionibacterium acnes assay**

A TGM3 <sup>-/-</sup> 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).

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

A FITC a TGM3 <sup>-/-</sup> egerek epidermiszén gyorsan áthatolva 30 perc elteltével kb.  $20 \mu\text{m}$  mélységben jól látható fluoreszcens „frontvonalat” mutatott, míg a WT egerek esetében a FITC lényegesen tovább időzött az epidermisz felszínén, fluoreszcens jele halvány, elmosott mintázattal

ábrázolódott. A sorozatfelvételek kiértékelésével számolt relatív össz fluoreszcencia intenzitás a TGM3  $-/-$  egerekben  $4,5 \pm 0,5x$  nagyobbak mutatkoztak a WT típushoz viszonyítva.

### **Cryofibrinogenémia prevalenciája DH populációban**

A nem szelektált 88 fős dermatitisz herpetiformisban szenvedő beteganyagban, az izolált cryofibrinogenémia igen magas arányban: 48.9%-ban (43/88) fordult elő, míg ez az érték a főként autoimmun beteganyagban vizsgált kontroll populációban is, lényegesen kisebb, 27.5% (64/233) volt. Az izolált cryofibrinogenémia 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 cryofibrinogenémia prevalenciája alacsonyabb, 40% (10/25) volt, míg a gluténmentes diéta mellett egyidejűleg dapsonnal is kezelt csoportban izolált cryofibrinogenémia egy betegben sem (0/8) volt kimutatható. Az izolált cryoglobulinémia és kevert cryofibrinogenémia - cryoglobulinémia hasonló változását a DH-s szubpopulációkban nem tapasztaltuk.

## **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 percután gyulladáshoz való hajlandóságot 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 jutott *P. acnes* antigén stimulusra hasonlóan reagáltak. Ebből következik, hogy TGM3  $-/-$  egerekben megfigyelt fokozott percután

szenzibilizációs hajlam, nem a TG3 hiánya miatt eltérő immunológiai válaszkészségből adódik, hanem annak háttérben a kóros barrier által lehetővé vált fokozott percután antigén penetráció áll.

3. Új módszerrel vizsgálva a kután barrieret, a 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 TGM3 *-/-* 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 cryofibrinogenaemia magas arányban (48,9%) fordult elő. A cryofibrinogenaemia 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 is szedő betegek között volt. A DH-ban gyakori cryofibrinogenaemia magyarázatul szolgálhat a kórképben észlelt akrális purpurákra.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat a transzglutamináz 3 bőrpatólógiában eddig nem ismert szerepét ismerteti, egyúttal a transzglutamináz 3 dermatológiában betöltött funkcióit is áttekinti.

A transzglutaminázok elsődleges szerepe stabil izopeptid kötések kialakításával ellenálló szupramolekuláris struktúrák létrehozása, melyek

fiziko-kémiai barrierként szolgálnak. A bőrben a TG1, TG3 és TG5 szerepe jelentős a stratum corneum és CE kialakításában. A barrier funkció zavarainak leggyakoribb klinikai megnyilvánulásai az ekcémás kórképekben figyelhetők meg (pl. atópia, kontakt dermatitisz), melyekben a kontakt szenzibilizáció iránti fogékonyság jelentősen megnő. A legkülső barrier struktúrát, a CE-t alkotó elemek szerepe a bőr barrier diszfunkcióiban intenzíven kutatott terület, azonban a régióban lokalizálódó transzglutamináz-3 hasonló szerepét eddig nem vizsgálták. Ennek ismeretében a TGM3 -/- egerekben nyugalmi körülmények közt leírt intakt bőr barrier funkciót váratlanul találtuk. Feltételeztük, hogy a TGM3 -/- egér bőrében barrier diszfunkció látens módon van jelen, így stressz körülmények – pl. antigén expozíció – hatására a kontroll egerek bőréből eltérően viselkedik, fokozott szenzibilizációs hajlamot mutathat. Ezért a TGM3 -/- egereket a FITC-DBP kísérletes kontakt dermatitisz modellben vizsgáltuk, melyben igazolni tudtuk a knockout egerek fokozott szenzibilizálhatóságát, 8-12 hetes, 6-, ill. 18 hónapos korban is. Miután azt is igazoltuk, hogy a TGM3 -/- egerek immunreaktivitása nem tér el a WT típustól, a megfigyelt fokozott szenzibilizációból azt a következtetést vontuk le, hogy a TGM3 -/- egerekben a bőr barrier funkciói károsodtak, fokozott percután antigén penetráció, látens barrier diszfunkció kimutatható. A bőr barrier vizsgálatára továbbá egy in vivo kétfoton fluoreszcens mikroszkópos metodikát is kidolgoztunk, amivel a TGM3 -/- egerek bőrének barrier defektusát direkt módon is verifikálni tudtuk.

Dolgozatom második részében, minthogy a TG3 bőrpatólogiában eddig egyetlen igazolt patognomikus szerepe az, hogy coeliakiához társuló dermatitisz herpetiformisban autoantigénként viselkedik, így ez utóbbi kórkepet is tanulmányoztam. A Klinikán dermatitisz herpetiformis miatt gondozott betegekben észlelt szokatlanul magas prevalenciájú cryofibrinogémiát kezdtem vizsgálni. A cryofibrinogénemia prevalenciája alacsonyabb volt a gluténmentes diétát tartó csoportban, míg azt a diétázó és dapsonnal egyidejűleg kezelt csoportban még alacsonyabbnak találtuk. A dermatitisz herpetiformisban kimutatott magas

prevalenciájú cryofibrinogenémia magyarázatul szolgálhat a kórképben megfigyelhető akrális purpurákra, egyúttal a dapson egy lehetséges új hatásmechanizmusát is felveti.

A dermatitisz herpetiformisz háttérében álló coeliakia és az atópiás megbetegedések közös vonása, hogy egy, a külvilág felől érkező káros noxák elleni barrier (bőr, nyálkahártyák, bél) szerepel a pathológiás történések elsődleges helyszínéként. A kórképekben – az örökletes immunológiai predispozíción túl – a barrier funkció primer eltéréseinek szerepe is igen valószínű, melyben a transzglutaminázok közreműködése is jelentős.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. 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, Kárpáti 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. **IF: 3.029**
3. Bognár P, Temesvári E, Németh I, Hársing J, Kuzmanovszki D, Kárpáti S. (2015) Fluorescein-izotiocianát kiváltotta fokozott perkután szenzibilizáció, különböző életkorú transzglutamináz-3 knockout egerekben. *Bőrgyógy Venerol Szle*, 91: 5-9.

### 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.