

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Tereza Drobníková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Funkce epidermálních proteinů v integritě kožní bariéry

Drobníková Tereza

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Drobníková**
Osobní číslo: **C13307**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Funkce epidermálních proteinů v integritě kožní bariéry**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma se zaměřením na úlohu epidermálních proteinů v integritě kožní bariéry.
2. Popsat možnosti analýzy epidermálních proteinů - molekulárně-biologické a instrumentální metody.
3. Stěžejní část věnovat dysfunkci epidermálních proteinů u kožních nemocí a během procesu stárnutí kůže.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

-Web of Science

-PubMed

-dle pokynů vedoucího a konzultanta BP

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Marek Svoboda**

Katedra biologických a biochemických věd

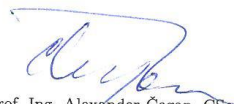
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

Tereza Drobníková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi Mgr. Marku Svobodovi a vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za ochotu, konzultace, cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá funkcí epidermálních proteinů v integritě kožní bariéry. Jedná se o teoretickou část, která zahrnuje základní definici kůže a úlohy epidermálních proteinů. Práce se dále zaměřuje na možnosti analýzy epidermálních proteinů a jejich dysfunkci u různých onemocnění a během procesu stárnutí kůže.

KLÍČOVÁ SLOVA

epidermis, epidermální proteiny, analýza, onemocnění, stárnutí kůže

TITLE

Epidermal proteins in the integrity of the skin barrier.

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the function of epidermal proteins in the integrity of the skin barrier. It is the theoretical part, which includes the basic definition of skin and the role of epidermal proteins. The work also focuses on the possibilities of analysis of epidermal proteins and their dysfunction in various diseases and during aging of the skin.

KEYWORDS

epidermis, epidermal proteins, analysis, illness, aging of the skin

Obsah

ÚVOD.....	11
1. KŮŽE.....	12
1.1. STAVBA KŮŽE	12
1.1.1. PODKOŽNÍ VAZIVO	13
1.1.2. DERMIS.....	13
1.1.3. EPIDERMIS.....	14
1.2. FUNKCE EPIDERMIS	17
1.2.1. BARIÉEROVÁ FUNKCE	17
1.2.2. OSTATNÍ FUNKCE.....	17
2. EPIDERMÁLNÍ PROTEINY.....	19
2.1. STRUKTURÁLNÍ PROTEINY	20
2.1.1. PROTEINY ZROHOVATĚLÉ OBÁLKY KORNEOCYTU	20
2.1.2. PROTEINY V CYTOSOLU KORNEOCYTU	21
2.2. ENZYMY	22
2.2.1. ENZYMY SOUVISEJÍCÍ S BARIÉROU	23
2.3. OSTATNÍ PROTEINY	24
2.4. ANALÝZA PROTEINŮ	25
3. DEFEKTY EPIDERMÁLNÍCH PROTEINŮ VE SPOJENÍ S EPIDERMÁLNÍ BARIÉROU	28
3.1. ATOPICKÁ DERMATITIDA	28
3.1.1. DŮSLEDKY ABNORMALIT EPIDERMÁLNÍ BARIÉRY U AD	29
3.1.2. EPIDERMÁLNÍ KERATINOCYTY U AD.....	29
3.2. PSORIASIS	30
3.3. ICHTHYOSIS VULGARIS	31
3.4. DALŠÍ KOŽNÍ ONEMOCNĚNÍ	32

3.5.	STÁRNUTÍ KŮŽE	33
3.5.1.	Vliv na epidermální proteiny	33
4.	Závěr	35
5.	Reference	36

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura epidermis [6].	13
Obrázek 2: Schéma Western Blottu (1 , 2 , 3 krok) [39].	25
Obrázek 3 Výsledek IHC metody exprese claudinu-1 u staré kůže vizualizované konfokálním mikroskopem. [12].	26
Obrázek 4: Typický klinický vzhled a umístění AD u dětí [49].	29
Obrázek 5: Červený plak krytý bělavo-stříbrnou šupinou typický pro typ: psoriasis vulgaris [52].	30
Obrázek 6: Ruka pacienta s typickým šupinatěním [56].	32

Seznam zkratek

CE – Zrohovatělá obálka (z angl. Cornified Envelope)

TGase – Transglutaminasa (z angl. Transglutaminase)

SMase – Sfingomyelinasa (z angl. Sphingomyelinase)

SC – Stratum corneum

UV – Ultrafialové (z angl. Ultraviolet)

LG- Lamelární granula

TJ – Těsné buněčné spoje (z angl. tight junction)

VMK – Volné mastné kyseliny

AK – Aminokyseliny

LB – Lamelární tělíčka (z angl. Lamellar Bodies)

FLG – Filaggrin

NMF – Přírodní hydratační faktor (z angl. Natural Moisturizing Factors)

IHC – Imunohistochemie

HPLC – Vysoce účinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)

TOF – hmotnostní detektor (z angl. *Time of Flight*)

MS – Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)

EDC - Epidermální diferenciační komplex (z angl. Epidermal differentiation complex)

AD – Atopická dermatitida

TEWL – Transepidermální ztráta vody (z angl. Transepidermal water loss)

ÚVOD

Předložená bakalářská práce se zabývá epidermálními proteiny, které zajišťují integritu kožní bariéry lidského organismu. Funkci kožní bariéry plní výhradně epidermis, nejsvrchnější část kůže, která se člení do několika diferenciacních vrstev. Integritu kožní bariéry zajišťují především proteiny zrohovatělé obálky (CE, z angl. Cornified Envelope), enzymy a ostatní minoritní proteinové složky, jako např. anti-mikrobiální peptidy.

Proteiny společně s korneocyty poskytují stabilní, mechanicky a chemicky odolné lešení pro ukládání a organizaci extracelulární lipidové matrix [1]. Mezi enzymy svou důležitostí dominují především transglutaminasa (*TGase*) a sfingomyelinasa (*SMasa*), které procesují proteiny respektive lipidy k vytvoření bariéry rohové vrstvy – *stratum corneum* (SC).

V dnešní době nám analytické metody umožňují detekovat a kvantifikovat jednotlivé proteiny i v komplexním biologickém vzorku, studovat jejich strukturu či interakce s ostatními molekulami, nebo vizualizovat specifické proteiny *in vivo*. Robustní a spolehlivá metoda identifikace proteinu není základem pouze pro výzkum, ale i pro diagnostiku v klinické praxi.

Řada kožních onemocnění je totiž spojena s mutací a následnou dysfunkcí proteinů, které se podílejí na tvorbě bariéry. Navíc některé těžko rozlišitelné fenotypy kožních onemocnění mohou být způsobeny mutací jiných proteinů. U dvou kožních onemocnění s největší prevalencí, atopická dermatitis a psoriasis, hraje v patogenezi roli narušená kožní bariéra a přítomnost abnormálních hladin některých integrálních proteinů.

S narůstajícím věkovým průměrem lidské populace se dostala do popředí i otázka stárnutí kůže, kdy především vlivem vnějších faktorů dochází ke snížení její funkční kapacity [2]. Zestárlá kůže má horší bariérovou funkci, což je způsobeno především celkovým úbytkem lipidové matrix. Studií zabývajících se proteiny v rámci stárnutí kůže je však málo.

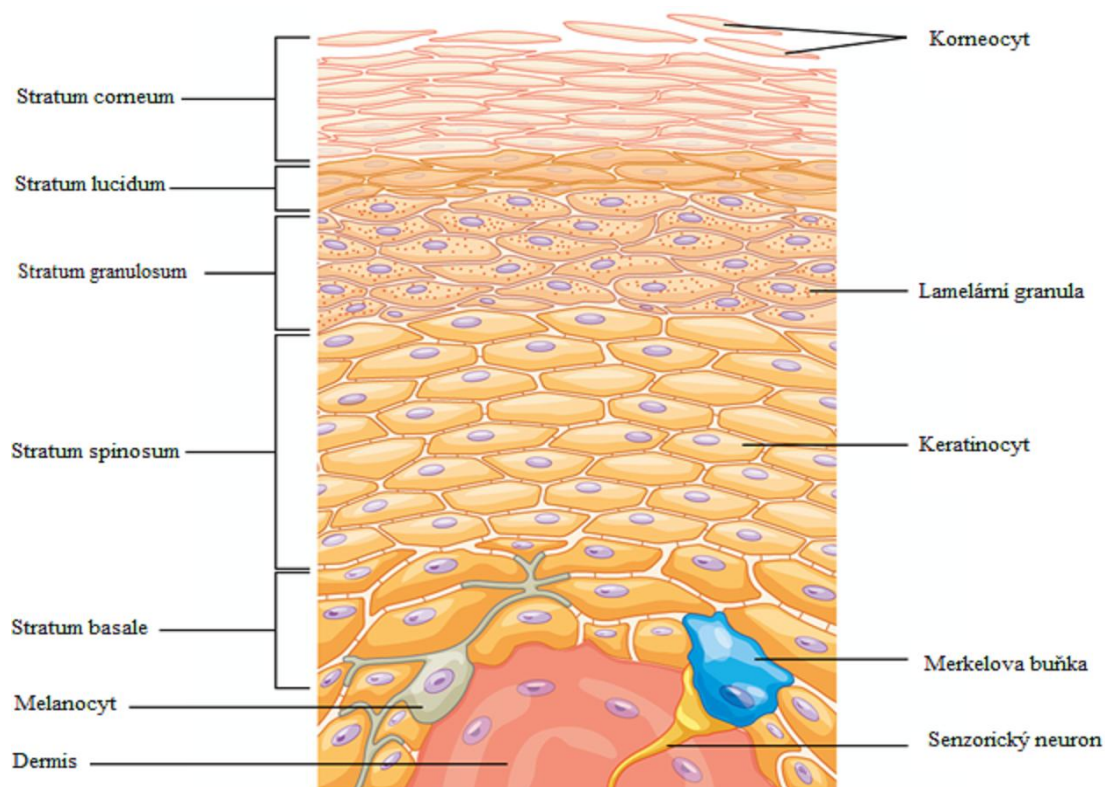
1. KŮŽE

Kůže je nepostradatelný orgán v lidském těle, který tvoří bariéru mezi okolním světem a vnitřním prostředím organismu. Ač se jedná o rozměrný orgán, ani hmotnost a ani funkční povrch kůže nemají největší parametry. Spousta vědců a dermatologů i přesto mylně označuje kůži za největší orgán lidského těla a nesčetné množství publikací a titulů začíná zažitým dogmatickým obratem „*the skin is the largest organ*“. Pravdou však je, že ani hmotnost a ani funkční povrch kůže neodpovídá tvrzení, že se jedná o největší orgán lidského těla. Hmotnost kůže se celkově pohybuje okolo 3,86 kg nebo 5,5 % z celkové tělesné hmotnosti člověka o průměrné váze 70 kg. Co se týká povrchu lidské kůže, její plocha je totožná s povrchem lidského těla. Povrch těla u 70 kg člověka odpovídá 1,7 m² což je poměrně málo ve srovnání například s povrchem sliznice gastrointestinálního traktu, kde se povrch odhaduje zhruba o velikosti fotbalového hřiště [3].

Tloušťka kůže se odvíjí od určité oblasti na těle. Oční víčko má například vrstvu kůže nejtenčí, měří méně než 0,1 mm zatímco dlaně a chodidla mají nejtlustší vrstvu, o rozměrech cca 1,5 mm [4].

1.1.STAVBA KŮŽE

Kůže se skládá ze dvou hlavních vrstev – epidermis (pokožka) a dermis (škára). Podkožní vrstva, nacházející se pod dermis, již není považována za část kůže [5].



Obrázek 1: Struktura epidermis [6].

1.1.1. PODKOŽNÍ VAZIVO

Podkožní vazivo je tvořeno tukovou tkání obsahující *adipocyty* (tukové buňky), které jsou složeny do tukových polštářků, ze *speciálních kolagenních vláken*, které spojují adipocyty a z *krevních cév*. Objem tukové vrstvy v různých lokalitách těla kolísá [7].

1.1.2. DERMIS

Nachází se pod epidermis a je zodpovědná za poskytování živin a fyzickou podporu pro epidermis. Dermis obsahuje lymfatické cévy (regulují tělesnou teplotu a vyživují epidermis), nervová zakončení, vlasové folikuly a žlázy. Je připojena k epidermis pomocí bazální membrány. Pro efektivní propojení epidermis a dermis se utvářejí tzv. rýhy, které toto propojení stabilizují a umožňují výměnu živin mezi dermis a epidermis.

Dermis se skládá celkem ze dvou vrstev – retikulární a papilární. **Papilární vrstva** obsahuje nervy a papily, které vyživují pokožku, zatím co **retikulární vrstva** je tvořena silnými pojivovými tkáněmi, které obsahují kolagen a elastická vlákna, která odpovídají za pružnost a sílu kůže a zároveň jsou obklopeny hmotou, která obsahuje kyselinu hyaluronovou, která se podílí na udržování objemu kůže [5].

1.1.3. EPIDERMIS

Epidermis se skládá z rohovatějícího vrstevnatého dlaždicového epitelu. Obsahuje celkem čtyři hlavní typy buněk, z nichž většina jsou keratinocyty, které tvoří 90 % všech buněk nalezených v této vrstvě. Dále obsahuje melanocyty, které tvoří 8 % epidermálních buněk a jsou odpovědné za produkci pigmentu – melaninu, Langerhansovy buňky, které se podílejí na imunitní reakci a Merkelovy buňky. Epidermis je avaskulární, tedy bez přítomnosti krevních cév a metabolická výměna tak probíhá difúzí prostřednictvím vaskularizované dermis [5].

Většinou je kůže rozlišována na tlustý a tenký typ a toto označení se vztahuje k síle epidermální vrstvy, jež se u tenké kůže pohybuje mezi 75–150 μm a u tlustého typu v rozmezí 400–800 μm . Vliv na tloušťku epidermis má celá řada faktorů, jako např. věk, typ pleti, pohlaví, pigmentace či obsah krve [8].

Epidermis se skládá z několika vrstev, včetně: *Stratum basale* (nejhlubší vrstva, také nazývána jako *Stratum germinativum*), *Stratum spinosum* (ostnitá vrstva), *Stratum granulosum* (zrnitá vrstva), *Stratum lucidum* (konečky prstů, dlaně, ploska nohy) a *Stratum corneum* (SC) viz obr. 1. [6]. Tyto vrstvy představují různé fáze zrání keratinocytů a jejich pohyb je směřován od *stratum basale*, kde dochází k dělení buněk, až ke SC, kde následně deskvamují, což zajišťuje kontinuální obnovu epidermis [5].

A. *Stratum basale* se skládá z jedné řady cylindrických buněk – bazálních keratinocytů, což jsou epidermální kmenové buňky [5]. V této bazální vrstvě probíhá dělení a proliferace keratinocytů, které jsou připojené k bazální membráně. Buňky, které opouštějí bazální vrstvu, procházejí koncovou diferenciací a pohybují se přes ostatní vrstvy až k povrchu pokožky. V průběhu embryonálního vývoje vede buněčné dělení ke vzniku nových, diferencovaných buněčných typů, nebo ke zvýšení celkového počtu buněk v embryu. Naproti tomu hlavní role buněčného dělení v dospělosti je nahradit buňky, které byly ztraceny prostřednictvím apoptózy či nekrózy, čímž se udržuje počet buněk na konstantní úrovni [9].

Zároveň se ve *stratum basale* vyskytují i melanocyty a Merkelovy buňky viz obr. 1 [6]. *Melanocyty* zde slouží jako ochrana před ultrafialovým (UV, z angl. Ultraviolet) zářením. Mají dlouhé, štíhlé výběžky, které obsahují granula melaninu - pigment patřící mezi polychinony s vysoký obsahem tyrozinu syntetizován melanocyty v melanosomech [7]. Výběžky melanocytů procházejí mezi keratinocyty, prostřednictvím kterých dochází k transportu granul melaninu. Melanin v keratinocytech se shromažďuje kolem jádra a tvoří tak obal, který chrání DNA keratinocytů před poškozením způsobeným UV zářením. Jakmile jsou granula uvnitř keratinocytů, shromáždí se a začnou tvořit ochranný obal kolem jádra a

chrání tak keratinocyty před poškozením způsobeným UV zářením. *Merkelovy buňky* jsou rozptýleny mezi keratinocyty a zprostředkovávají citlivost na dotek senzorickému neuronu [5].

B. *Stratum spinosum* se skládá z kubických, nebo lehce zploštělých buněk. Tato dlaždicová vrstva je složena z různých buněk, které se liší ve tvaru, struktuře ale i v závislosti na jejich umístění. Například suprabazální trnové buňky mají mnohostěnný tvar a zaoblené jádro, zatímco buňky horní trnové vrstvy jsou obecně větší a plošší, protože jsou tlačeny směrem k povrchu kůže. Keratinocyty ve vyšší vrstvě *stratum spinosum* obsahují lamelární granula (LG), což jsou membránou vázané organely obsahující glykoproteiny, glykolipidy, fosfolipidy, volné steroly a množství kyselých hydroláz, včetně lipázy, proteázy, kyselých fosfatáz a glykosidázy. Hojnost hydrolytických enzymů tak ukazuje, že LG jsou druhem lysozomu [4].

Dceřiné buňky keratinocytů již v této vrstvě ztrácejí schopnost dělení a tyto jednotlivé buňky se spojují dohromady skrz buněčné spoje, *adherent junctions* (jedná se o intercelulární spojku založenou na aktinu, která je zprostředkována kadheriny a kateniny) [10] a *gap junctions* (zajišťují mezibuněčnou komunikaci a to tím, že umožňují přenos iontů, jako je Ca^{2+} a Mg^{2+} a malých molekul menších než 1 kDa, jako je např. inositol 1, 4, 5 -trisfosfát, cAMP, cGMP a ATP mezi buňkami, což je důležité v celé řadě fyziologických procesů, včetně buněčného růstu a buněčné diferenciaci) [11], a intracelulární mosty, zvané desmozomy. Desmozomy mají trnité výběžky, které drží sousední buňky blízko u sebe, což přispívá k pevnosti v tahu a pružnosti epidermis. Migrují sem i *Langerhansovy buňky*, vyvinuté ze speciálních dendritických buněk imunitního systému, které se vyskytují v dermis, brzlíku a lymfatických uzlinách. Langerhansovy buňky se ve *stratum spinosum* podílejí na imunitní odpovědi proti mikroorganismům. Fungují tak, že přitahují a fagocytyují mikroby a prezentují své antigeny T -lymfocytům a tím (aktivací T -lymfocytů) zlikvidují příslušné buňky [5].

C. *Stratum granulosum* se skládá celkem z 3-5 vrstev. V této vrstvě buňky procházejí procesem zvaným apoptóza, což je cílená, geneticky programovaná buněčná smrt, během které se rozpadá jádro buňky. Buňka následně umírá a není schopna provádět žádné metabolické funkce. V této fázi keratinocyty ztrácí své jádro a začínají kumulovat strukturální proteiny CE keratinocytů, především pak keratin [5]. Ve *stratum granulosum* se nacházejí již výše zmiňované desmozomy a zejména LG, která jsou v této vrstvě nejvíce zastoupena a nesou prekurzory pro lipidovou bariéru a spolu s nimi jsou zde přítomny i keratohyalinní granula (prekurzory pro CE). Dále tato vrstva jako jediná obsahuje těsné buněčné spoje - tzv.

tight junction (TJ), které spojují sousední buňky, kontrolují paracelulární dráhu molekul a oddělují apikální a bazolaterální část buněčné membrány. Během epidermální regenerace, syntéza TJ proteinů předchází tvorbě SC a proto TJ mohou představovat záchranný systém, když je bariéra SC narušena, napadena nebo chybí. Dále je ve *stratum granulosum* zároveň zaznamenána nejvyšší koncentrace vápníku, zatímco jeho koncentrace v SC je velmi nízká, protože SC je relativně „suchá“ vrstva s extracelulárním obsahem tuků a není schopna tedy rozpouštět ionty. Po narušení propustnosti bariéry, po přísunu vody do SC dochází ke ztrátě gradientu vápenatých iontů. Tento úbytek vápníku reguluje lamelární část exocytózy. Vápník je velmi důležitý regulátor syntézy proteinů v epidermis, včetně regulace činnosti transglutaminázy [12].

D. *Stratum lucidum* se skládá z 3-5 vrstev jasných, mrtvých keratinocytů, které jsou zploštělé a skládají se z velkého množství keratinu a zahuštěných plazmatických membrán. Tato vrstva leží mezi *stratum granulosum* a *stratum corneum* a poskytuje určitý stupeň „hydroizolace“ na kůži. Jednotlivé buňky jsou opět spojeny pomocí desmozomů a neobsahují žádné buněčné organely. Vyskytuje se pouze v oblastech, kde je kůže silná, jako jsou např. dlaně nebo chodidla [5].

E. *Stratum corneum* je tzv. rohová vrstva, která již nemá buněčných charakter a je složena z 25-30 vrstev zploštělých, odumřelých keratinocytů, jinak nazývaných korneocyty. Jedná se o vnější vrstvu pokožky. Ve většině částí těla je tloušťka SC 10-20 μm , nicméně se může o několik μm lišit. SC obsahuje 15 % vody (pro srovnání - celé tělo obsahuje v průměru 65 % vody) a skládá se z 2 odlišných strukturálních prvků: korneocytů a mezibuněčných lipidů, které hrají zásadní roli v ochranné funkci kožní bariéry [13].

Korneocyty jsou odvozeny od bezjaderných keratinocytů, které poskytují strukturální podporu SC. Korneocyty postrádají klíčové intracelulární organely, jádro či mitochondrie, které jsou degradovány během závěrečné diferenciaci keratinocytů. Jejich membrána se skládá ze strukturálních proteinů, jako je *involucrin*, *loricrin* či *keratolinin*, ale i z tzv. „hybridních“ proteinů, které obsahují rozšířené, opakované peptidové motivy, jako např. *alexin I*, *profilaggrin*, *repetin* a *trichohyalin*. Zároveň je membrána složena i z 0,05 μm silné vrstvy specializovaných lipidů, volných mastných kyselin (VMK), ceramidů či cholesterolu a to vše je v bezprostředním kontaktu s membránou. Korneocyty jsou propojeny pomocí korneodesmosomů, stejně jako v epidermis keratinocyty pomocí desmozomů [13].

Intracelulární lipidový matrix se nachází mezi korneocyty a tvoří zhruba 10-15 % suché hmotnosti SC. Druhy lipidů obsažených v SC jsou dle hmotnosti složeny z 50 % ceramidy, dále z 10 % VMK, 25 % cholesterolem a z 15 % deriváty cholesterolu a glukosylceramidu.

Většina z nich je syntetizována keratinocyty v *stratum granulosum* a horní vrstvě *stratum spinosum*.

SC představuje pouze 10% z celé kůže, ale přispívá k více než 80 % kožní bariérové funkce. Paradoxem vrstvy SC je, že biologicky významnou funkci (bariérovou) plní odumřelá tkáň [13].

1.2.FUNKCE EPIDERMIS

Fyziologická funkce kůže vždy těsně souvisí s její anatomickou strukturou a rolí hraničního orgánu oddělujícího vnější a vnitřní prostředí [7].

1.2.1. BARIÉROVÁ FUNKCE

Nejdůležitější funkcí kůže je efektivní bariéra mezi okolním světem a vnitřním prostředím těla [14].

Bariérová funkce SC je zajištěna lamelárními membránami skládajících se z lipidů, které jsou kovalentně vázané na CE složenou ze zesíťovaných proteinů. Na rozdíl od buněčných membrán, které se skládají převážně z fosfolipidů, tyto lamely obsahují převážně již výše zmiňované ceramidy, cholesterol a VMK. Většina z těchto lipidů, je syntetizována keratinocyty a je balena v malých organelách známých jako LG, které pocházejí z Golgiho aparátu. Před ukončením diferenciací keratinocytů ve *stratum granulosum* jsou LG exocytovány do intercelulárního prostoru a enzymaticky zpracovány tak, aby vytvářela nepřerušované vrstevnaté lamely – tzv. lamelární membrány. Jedinečná lipidová kompozice LG a lamelárních membrán v SC odráží vícestupňový proces tvorby bariér. A právě tím jsou vhodné pro zajištění funkce bariéry [15,16].

Kromě lipidů dodávají LG také enzymy. Lysosomální a jiné enzymy přítomné v extracelulárním oddělení jsou odpovědné za přeměnu lipidů potřebnou k vytvoření bariérových lamel a také za reakce, které vedou k deskvamaci [15].

1.2.2. OSTATNÍ FUNKCE

Existuje ještě celá řada dalších funkcí, které epidermis zprostředkovává. Jednou z nich je např. **Sekreční funkce** - kůže produkuje keratin (skleroprotein, který vzniká v rámci proliferace a diferenciací keratinocytů), maz (sekret olejovité konzistence obsahující mastné kyseliny, mono-, di-, triacylglyceroly,...), pot (hypotonický sekret obsahující Na, K, Cl, Ca, fosfáty,...) a melanin (pigment patřící mezi polychinony s vysokým obsahem tyrozinu) [5].

Metabolická funkce – v rámci udržování a regenerace struktur zde probíhá metabolismus sacharidů, proteinů, lipidů. Sekreční a depotní funkcí (metabolismus sacharidů jako

energetický zdroj) se kůže vzhledem k jejímu rozsahu podílí na metabolismu celého organismu. Konkrétně v horních vrstvách epidermis, která je avaskulární dochází vlivem UV záření k přeměně provitaminů ve vitamin D [7].

Senzorická funkce – vzhledem k tomu, že všechny epidermální buňky (keratinocyty, melanocyty, Langerhansovy buňky i Merkelovy buňky) exprimují sensorové proteiny a neuropeptidy regulující neuroimunitní kůži, musí hrát úlohu v epidermálním sensorickém systému. A právě díky tomu, že je kůže sensorickým orgánem, umožňuje tak organismu zprostředkovat informace o zevním i vnitřním prostředí prostřednictvím receptorů, které registrují chlad, teplo, tlak, bolest, atd. [17].

Imunologická funkce – vzhledem k frekvenci kontaktu s antigeny zevního prostředí je kůže významným a vlastně i největším imunologickým orgánem. V epidermis jsou imunokompetentní buňky především keratinocyty a Langerhansovy buňky [7].

2. EPIDERMÁLNÍ PROTEINY

Proteiny jsou univerzální makromolekulární sloučeniny živých systémů, které mají klíčové funkce téměř ve všech biologických procesech. Žádná jiná skupina látek neplní v organismu tolik rozmanitých funkcí, jako jsou např. regulační funkce, obranné funkce, enzymové katalýzy, transport látek přes membránu, kontrola růstu a diferenciace buněk atd. Proteiny jsou kovalentně a nekovalentně spojeny s jinými biomolekulami včetně lipidů, sacharidů, nukleových kyselin, fosfátových skupin, flavinů, hemových skupin a kovových iontů. Proteiny jsou lineární polymery sestavené z monomerních jednotek – aminokyselin (AK). V organismech se vyskytují stovky AK, nicméně v proteinech nalezneme pouze 20 různých druhů (kromě pár výjimek), které je možno kombinovat v řetězcích a prostorovém uspořádání nesčetným množstvím způsobů. Co se týče struktury proteinů, ta je nezbytně důležitá pro jejich správnou funkci a je popisována ve čtyřech úrovních – jako struktura primární, sekundární, terciární a kvarterní. Proteiny lze rozdělit do více skupin, kdy základní dělení je na jednoduché a složené proteiny, ale je možné je dělit ještě dle rozpustnosti, tvaru, či lokalizace nebo dějů ve kterých působí [18,19,20].

CE a její externí lipidová obálka navázána na korneocyty společně poskytují stabilní, mechanicky a chemicky odolné lešení pro ukládání a organizaci extracelulární matrix [1]. CE je nejméně rozpustná složka korneocytů SC. Nerozpustnost byla zpočátku připisována křížové vazbě disulfidovými vazbami a v poslední době i přítomnosti isodipeptidových vazeb N^ε(γ-glutamy1) lysinu, protože toto zesíťování je odolné vůči štěpení jak běžných enzymů, tak i drsných chemických činidel, jako hydroxidy či surfaktanty. Tvorba tohoto zesíťování je katalyzována *TGase*mi, z nichž byly v epidermis detekovány tři odlišné enzymy (nazývané TGase C, E a K) [21]. Tvorba CE se obecně definuje jako složitá, ale vysoce řízená sekvence událostí zahrnující postupné ukládání odlišných proteinů s postupnou progresí tloušťky obalu a tuhosti [22]. A právě tato CE o tloušťce 15nm, která obklopuje cytosol korneocytů, sestává z několika vysoce zesíťovaných cytosolických proteinů včetně involucrinu, loricrinu, desmoplakinu, envoplakinu, cytostatinů a pancornulinů/cornifinů (malé proteiny bohaté na prolin) [1].

2.1. STRUKTURÁLNÍ PROTEINY

Strukturální proteiny lze rozdělit na proteiny zrohovatělé obálky CE korneocyty (loricrin, involucrin, small proline-rich protein a envoplakin) a proteiny v cytosolu korneocyty (filaggrin a keratiny) [21].

2.1.1. PROTEINY ZROHOVATĚLÉ OBÁLKY KORNEOCYTU

A. *Loricrin* – je vysoce nerozpustný peptid obsahující jednu složku keratohyalinních granulí a představuje až 80 % hmotnosti CE. Loricrin je zesítován do CE v pozdním diferenciačním procesu, tj. okamžitě po sekreci lamelárních tělísek (LB, z angl. Lamellar Bodies) a je obsažen v intracelulárních granulích, ze kterých je následně uvolňován v granulárních a přechodných zónách a poté je použit v obalové sestavě [1,23]. Loricriny jsou proteiny bohaté na glycin-serin-cystein. Jak již bylo zmíněno, na rozdíl od všech ostatních předpokládaných bílkovinných složek buněčné obálky jsou loricriny vysoce nerozpustné (alespoň zčásti) a to kvůli zesíťování disulfidovými vazbami. Přítomnost takových vazeb tak poskytuje vysvětlení mimořádné nerozpustnosti loricrinu prostřednictvím zesíťování na buněčnou obálku a může také vysvětlit nízké hladiny monomerního loricrinu v rovnovážném stavu v cytoskeletálních extraktech epidermis [21].

B. *Involucrin* – kompletní DNA a genomové klony kódující lidský involucrin byly izolovány v roce 1986. Proteinová sekvence, stanovená z cDNA sekvence, má opakující se strukturu tyče a molekulovou hmotnost 68 kDa. Involucrin je exprimován relativně brzy v diferenciaci keratinocytů v suprabasálních buněčných vrstvách epidermis. V epidermis se produkuje konkrétně ve vrstvě *stratum spinosum* v časném stádiu diferenciaci keratinocytů. Ve spojitosti s tímto proteinem hraje důležitou roli i enzym, tzv. *TGase* – pro níž je involucrin substrátem a následné produkty zajišťují zesíťování CE. Jedná se oproti výše zmiňovanému loricrinu o rozpustný protein, který se ukládá na cytoplazmatickou stranu plazmatické membrány. Existují i nepřímé důkazy o přítomnosti více zesíťovaných druhů v obalech připravených z kultivovaných buněk, které naznačují, že proces zesíťování je progresivní (tj. další časové vazby jsou navzájem propojeny) [1,23].

C. *Small proline-rich proteins (SPRR)* - jsou malé proteiny bohaté na prolin, exprimované v terminálně diferencovaných lidských keratinocytech. Geny SPRR tvoří rodinu multigenů shlukovanou v segmentu DNA o velikosti 300 kb na chromozomu 1q21 (shluk genů, které kódují proteiny s funkcemi v epidermální tvorbě) v blízkosti již dříve popisujících genů loricrinu a involucrinu. Tento cluster obsahuje přibližně osm genů SPRR2, dva geny SPRR1

a jeden gen SPRR3 a jejich struktura je podobná struktuře loricrinu i involucrinu. Bylo prokázáno, že SPRR jsou prekurzorové proteiny, zároveň i s dalšími členy multigenu SPRR, jako je např. cornifin. A to vzhledem k tomu, že SPRR2 a SPRR3 jsou jednak považovány za potenciální transglutaminasové substráty. Jsou umístěny na obvodu buňky a v některých buňkách také v cytoplazmě terminálně diferencovaných keratinocytů. V neposlední řadě bylo také v posledních studiích poukázáno na to, že SPRR jsou totožné s pancornuliny, což je rodina malých, rozpustných a základních prekurzorových proteinů CE. Ve skutečnosti SPRR a pancornuliny vykazují nejen podobnou molekulovou hmotnost, ale také identickou distribuci tkání. SPRR proteiny jsou diferencovaně exprimovány jak *in vivo*, tak *in vitro* a jsou vyvinuty tak, že slouží jako vysoce specializované proteiny pro buněčné obaly ve stratifikovaných epitelech a stejně jako např. involucrin se podílí na zesílení CE [22].

V nedávných studiích bylo zjištěno, že novým členem této genové rodiny je i SPRR4, který vykazoval velmi nízkou nebo nedetekovatelnou úroveň exprese v normální lidské kůži nebo jiném stratifikovaném skvamózním epitelu, ale byl jasně indukován UV zářením jak *in vivo*, tak *in vitro* [24].

D. Envoplakin (210-kD protein) - je prekurzor CE spadající do rodiny desmoplakinů se zdánlivou molekulovou hmotností 210 kD a je překládán z 6,5 kb mRNA, která je přepisována z jediného kopírovaného genu. Stejně jako ostatní prekurzory CE je envoplakin nerozpustný v SDS a β -merkaptoethanolu při aktivaci TGase v kultivovaných keratinocytech. Envoplakin je exprimován v keratinizujícím a nekeratinizujícím rozvrstveném skvamózním epitelu, nikoliv však v jednoduchých epitelích nebo nonepiteliálních buňkách. Funkcí envoplakinu je aktivace TGase. Imunofluorescenční barvení ukázalo, že v epidermálních keratinocytech, jak *in vivo*, tak v kultuře, byl protein během koncové diferenciaci podstatně více regulován a částečně lokalizován pomocí desmosomálních proteinů. Byla potvrzena lokalizace envoplakinu a desmoplakinu u desmozomů a na keratinových vláknech v různých diferencovaných vrstvách epidermis. Zároveň sekvenční analýza ukázala, že envoplakin je homologní s proteiny vázajícími keratin, desmoplakin, bulózní pemfigoidní antigen 1 a plectin. Předpovídaná struktura envoplakinu, jeho homologie s jinými známými bílkovinami a jeho expresní vzorec silně naznačují, že je spojen s plazmatickou membránou a může spojit keratinové vlákna a desmosomy s CE [25].

2.1.2. PROTEINY V CYTOSOLU KORNEOCYTU

A. Filaggrin – je kódován genem filaggrinu (*FLG*) v epidermálním diferenciačním komplexu na chromozomu 1q21. *FLG*, podobný genům kódujícím trichohyalin, homerin

a repetin, patří do rodiny "fúzovaných" genů, jejichž členi jsou charakterizováni přítomností velké repetiční domény sestávající z několika proteinových motivů uspořádaných v tandemu [26]. Prekurzor profilaggrin je zpočátku vysoce fosforylovaný a akumuluje se v keratohyalinových granulích. Během zrání se defosforyluje a proteolyticky štěpí, aby se uvolnily jednotlivé molekuly *FLG* [27]. *FLG* obsahuje tři exony a dva introny. Exon 1 je nekódovaný a translace proteinů začíná v exonu 2. Lidský profilaggrin je protein bohatý na histidin o velikosti 400 kDa, který obsahuje mezi 10 a 12 tandemově uspořádanými filaggrinovými opakováními, které jsou lemovány na obou stranách dvěma částečnými filaggrinovými repeticemi a N - a C - koncovými doménami. U lidí je každé opakování *FLG* identické ve velikosti (324 AK) a obsahuje krátkou spojovací oblast, která je proteolyticky štěpena během konverze základní molekuly profilaggrinu na aktivní monomery. *FLG* je rozhodující pro tvorbu korneocytů - agreguje keratiny, čímž tvoří základ korneocytu a oporu pro obálku. Vzhledem k tomu, že obsah vody v SC klesá, *FLG* je proteolyzován na kyselinu pyrrolidinkarboxylovou a trans-urokanovou, které přispívají ke složení přírodního hydratačního faktoru (NMF, z angl. Natural Moisturizing Factors). Tyto produkty rozpadu působí jako osmolyty, které se z velké části podílejí na hydrataci korneocytů [26].

B. Keratiny – patří do skupiny polypeptidů nerozpustných ve vodě o molekulové hmotnosti 40-70 kD a jsou považovány za hlavní strukturální proteiny epidermis [28]. Keratiny tvoří tonofilamenta, která jsou rozpoznatelná pod elektronovým mikroskopem v cytoplasmě téměř všech skutečných epiteliálních buněk nebo tkání. Podjednotková složka keratinových vláken se liší podle druhu buňky, období embryonálního vývoje, stadia histologické diferenciaci, buněčného růstového prostředí a stavu choroby [29]. Analýza keratinů extrahovaných z epidermis naznačuje, že buňky vnitřních vrstev obsahují primárně malé keratiny, zatímco buňky vylučujících vrstev obsahují kromě malých keratinů velké keratiny. Ve všech živých vrstvách byl přítomen keratin 50 a 58 kDa včetně relativně nediferencované bazální buněčné vrstvy, zatímco 56 kDa keratin a 65 až 67 kDa keratiny byly spojeny pouze s více diferencovanými buňkami nad bazální vrstvou. Posledně jmenované keratiny mohou být proto považovány za molekulární markery keratinizace [30].

2.2.ENZYMЫ

Enzymy v živých systémech slouží jako biokatalyzátory, tj. urychlují většinu chemických dějů, které v nich probíhají. Díky své povaze jsou řazeny mezi proteiny. Podle zapojení enzymu v určité reakci rozlišujeme enzymy, které využívají jen vlastní protein, a enzymy,

které pro svou funkci potřebují další složku, která není složena z AK. Tato složka, potřebná pro enzym je tzv. *kofaktor*, který může mít jak anorganickou, tak i organickou podstatu. Látka, jejíž přeměnu enzym katalyzuje, se nazývá substrát (S) a ten je následně přeměňován na produkt (P). Co se týče dělení enzymů, jsou děleny zejména podle typu katalyzované reakce na *oxidoreduktázy*, *transferázy*, *hydrolázy*, *lyázy*, *ligázy* a *izomerázy*. Dělení může být ale i dle místa vzniku a účinku (buněčné a sekreční enzymy), podle různého obsahu ve tkáních, podle subcelulární lokalizace či podle biologického poločasu [31,32].

2.2.1. ENZYMYSOUVISEJÍCÍ S BARIÉROU

Mezi enzymy, které jsou úzce spjaty s epidermis a její funkcí bariéry je třeba zmínit zejména *TGase*.

Transglutaminasa (TGase) – obsahuje rodinu enzymů závislých na vápníku, které katalyzují tvorbu kovalentních isopeptidových vazeb proteinů [33]. Čtyři členové rodiny *TGase* jsou exprimovány v keratinocytech nebo v epidermálních tkáních – *Tgase1*, *TGase2*, *TGase3* a *TGase5* a hrají důležitou roli v procesu diferenciaci a zároveň se podílejí i na konstrukci epidermálního povrchu [34]. **TGase1** je enzym zodpovědný za sestavení keratinocytů v CE a je kódována genem *TGM1* umístěným na chromozomu 14q11.2. Exprese *TGase1* je závislá na diferenciaci a je iniciována ve vrstvě *stratum spinosum*. Většina *TGase1* je zakotvena k plazmatické membráně keratinocytů, kam se dostává prostřednictvím endoplazmatického retikula a mastných acylových vazeb (myristát, palmitát), které jsou přítomné na amino-konci *TGase1* [34,35]. **TGase2** je enzym kódovaný *TGM2* genem lokalizovaným na chromozomu 20q11.12. *TGase2* je exprimována pouze v keratinocytech a dalších povrchových buňkách za specifických podmínek. *TGase2* může jednak fungovat jako protein aktivující vápník nebo jako signální protein na bázi guaninového nukleotidu. *TGase2* má intracelulární funkce v povrchových epiteliálních buňkách a v podkladových fibroblastech, také má úlohu při stabilizaci extracelulární matrix a stabilizuje rezidentní keratinocyty. **TGase3** je enzym kódovaný *TGM3* genem lokalizovaným na chromozomu 20q11.12. *TGase3* je exprimována v horních epidermálních vrstvách a je lokalizován v cytoplazmě. Aktivita *TGase3* vyžaduje proteolytické štěpení zymogenu a vazbu vápníku a jakmile jsou tyto požadavky splněny, vznikne zesíťování. Kromě toho je aktivita *TGase3* regulována guaninovými nukleotidy. **TGase5** je enzym kódovaný *TGM5* genem lokalizovaným na chromozomu 15q15.2. *TGase5* je exprimována ve vrstvách *stratum spinosum* a *stratum granulosum*. Je to relativně necharakterizovaný enzym a není plně známo,

jak se jeho aktivita podílí na regulaci buněk, nicméně bylo zjištěno, že je úzce spjat s jadernou matrix [34].

Jak již bylo zmiňováno v kapitole o kůži, intracelulární lipidy SC tvoří epidermální permeabilitu a přibližně 50 % těchto mezibuněčných lipidů jsou ceramidy. V normální kůži se ceramidy produkují v SC degradací glukosylceramidů β -glukocerebrosidázou a hydrolýzou sfingomyelinu SMase [36].

SMase - je další z řady enzymů, které jsou důležité pro funkci kožní bariéry a jsou zodpovědné za zpracování lipidů. SMase je zapojena do mnoha důležitých fyziologických i patologických procesů, včetně signální transdukce zprostředkované ceramidy, která vede k apoptóze indukované cytokiny, buněčné diferenciaci a různé imunitní a zánětlivé reakce, ale i agregaci lipoproteinů uvnitř cévní stěny, či intracelulární přenos a metabolismus cholesterolu. V normální epidermis je SMase lokalizována v cytoplasmě buněk *stratum granulosum* a bylo zároveň prokázáno, že je obsažena ve frakci bohaté na LG [36].

Ve spojení s kůží existuje celá řada dalších enzymů, jako např. superoxiddismutasa, glutathionperoxidáza a další [36].

2.3.OSTATNÍ PROTEINY

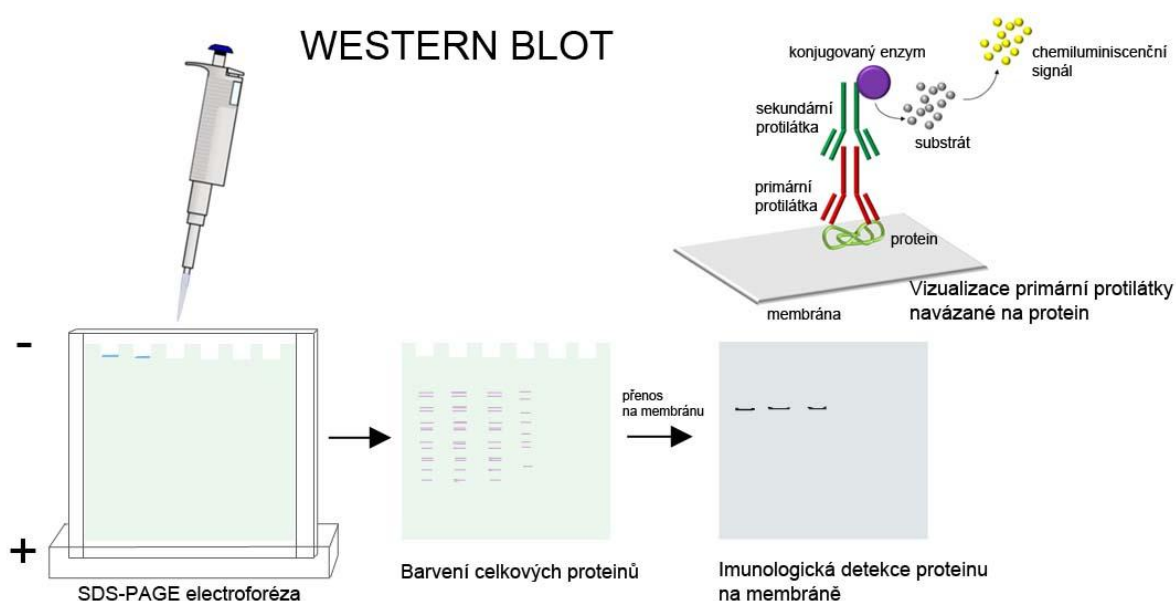
Antimikrobiální proteiny – mají antimikrobiální aktivitu proti bakteriálním, houbovým a virovým patogenům. Kůže vytváří řadu antimikrobiálních peptidů, které tvoří součást vrozené imunity epiteliální bariéry. Hlavní antimikrobiální peptidy nalezené u lidí jsou *defenziny* a *katelcidiny*, které inaktivují a zabíjejí napadající mikroorganismy. **Defenziny** jsou charakterizovány šesti cysteinovými zbytky, které tvoří tři intramolekulární disulfidové můstky a jsou rozděleny na α - a β -defenziny na základě distribuce cysteinů a vazeb disulfidových vazeb. Bylo identifikováno šest lidských α -defenzinů; Čtyři z nich nazvaných lidské neutrofilní peptidy 1-4 jsou generovány neutrofily a další dva lidské defenziny-5 a 6 jsou produkovány a uloženy v sekrečních granulích střevních buněk. Na rozdíl od α defenzinů jsou lidské β -defenziny (hBD) tvořeny hlavně epiteliálními tkáněmi včetně kůže a dýchacího traktu. Zatím byly v lidské kůži identifikovány čtyři hBDs, jmenovitě hBD-1, 2, -3 a -4. **HBD-1** je konstitutivně produkován různými epiteliálními tkáněmi, její exprese je zvláště prominentní v terminálních vrstvách kůže a může být indukována lipopolysacharidem a peptidoglykenem v keratinocytech. **HBD-2** je lokalizován do nejvrchnějších vrstev epidermis a hladiny hBD-2 se dramaticky zvyšují u diferencovaných keratinocytů. **HBD-3** byl detekován jak v epiteliálních, tak v neepiteliálních tkáních. Exprese **HBD-4** je indukovatelná v primárních keratinocytech. **Katelcidiny** obsahují vysoce konzervovanou N - koncovou

kathelinovou doménu a C - koncovou kationtovou antimikrobiální doménu, která se stává aktivní po štěpení. U člověka je přítomen pouze jeden katelcidin LL-37. LL-37 byla identifikována v myeloidních buňkách a později byla prokázána exprese v různých epiteliích a zejména v keratinocytech zanícené pokožky [37].

2.4. ANALÝZA PROTEINŮ

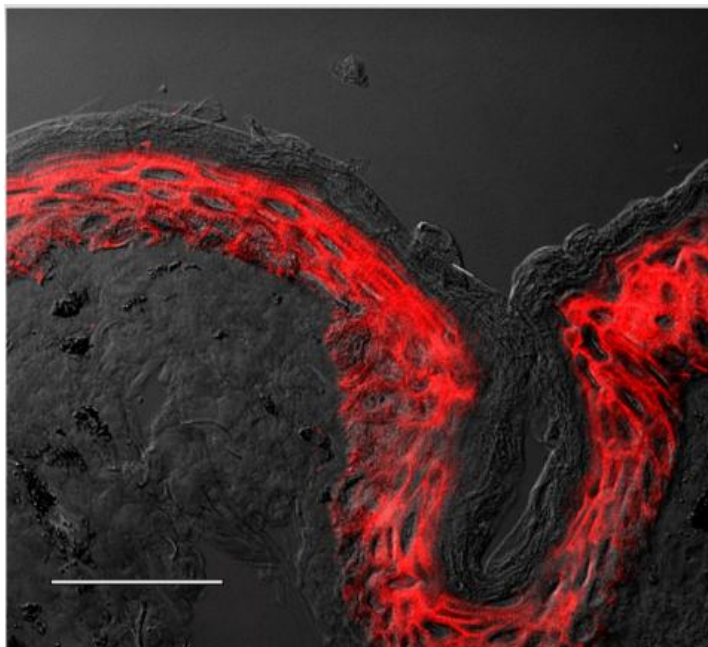
Existuje celá řada metod od jednorozměrných až po vícerozměrné. Vzhledem k tématu mé bakalářské práce jsem se zaměřila na 5 nejčastěji užívaných metod ke stanovení epidermálních proteinů [38].

Nejvíce využívanou metodou je tzv. **Western blotting** - je důležitá technika používaná v buněčné a molekulární biologii. Pomocí western blotu je možné identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů extrahovaných z buněk [38]. Technika využívá k plnění tohoto úkolu tři prvky: (1) rozdělení podle velikosti, (2) přenosu na pevný nosič a (3) označování cílového proteinu za použití vhodné primární a sekundární protilátky pro vizualizaci viz obr. 2. [39]. Při této technice se směs proteinů oddělí na základě molekulové hmotnosti - tedy podle typu, gelovou elektroforézou. Je velmi důležité si uvědomit, že údaje získané pomocí Western blotu jsou typicky považovány za semikvantitativní. Je to proto, že western blotting poskytuje relativní srovnání hladin bílkovin, ale ne absolutní míru kvantity [38].



Obrázek 2: Schéma Western Blottu (1 , 2 , 3 krok) [39].

Další z technik, jejichž užívání je rozšířené je **imunohistochemie (IHC)** – jedná se o techniku, která je kombinací imunologických a chemických reakcí vizualizovaných pomocí fotonického mikroskopu. Základem je detekce antigenů v tkáňových řezech pomocí specifických protilátek. Vazba antigen-protilátka je detekována barevnou histochemickou reakcí viditelnou světelnou nebo fluorescenční mikroskopií [40]. Jinými slovy, základním principem IHC, stejně jako u jiných "speciálních" histochemických metod, je vizuální lokalizace buněčných nebo tkáňových cílových molekul viz obr. 3 [12]. Dnes se k vizualizaci preparátů připravených metodou IHC používá jako nejmodernější dostupná technologie konfokální laserová mikroskopie (je schopna zobrazovat normální a abnormální morfologii kůže a dynamické procesy *in vivo*, a to jak v laboratorním, tak klinickém prostředí) [41].



Obrázek 3: Výsledek IHC metody exprese claudinu-1 u staré kůže vizualizované konfokálním mikroskopem. [12].

(červená: myší anti-protilátka claudin-1 + anti-myší IgG konjugovaná s Alexa 555)

Za poslední pár let byl zaznamenán pokrok v oblasti přímého spojení separačních a spektrálních technik, kdy mezi nejčastěji užívané patří tzv. **HPLC/MS** – jedná se o kombinaci vysoce výkonné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. *High Performance Liquid Chromatography*) s hmotnostní spektrometrií (MS, z angl. *Mass Spectrometry*). Princip je založen na tom, že směs látek se nejprve rozdělí separační technikou vhodnou pro danou směs (HPLC) a následně se po rozdělení látek vhodnou spektrální metodou (MS) získají strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. Při optimálních podmínkách je možné identifikovat jednotlivé složky neznámé směsi nebo popř. alespoň částečně odvodit

jejich struktury. V počátcích vývoje této metody se využívala pro spojení HPLC/MS klasická elektronová popř. chemická ionizace. Dnes se používá ionizace za atmosférického tlaku, což umožňuje práci s mikrokolonami i s konvenčními kolonami v systémech jak s obrácenými, tak i s normálními fázemi při běžných pracovních podmínkách používaných v HPLC. Výhodou je vysoká citlivost, naopak jediným omezením je možnost použití pouze těkavých elektrolytů, které slouží jako přísada do mobilní fáze. Dalším významným parametrem v MS analýze proteinů je hmotnostní rozsah hmotnostního detektoru, který by měl být co největší. Proto se nejčastěji pro analýzu proteinů používá hmotnostní detektor TOF (z angl. *Time of Flight*) [42,43].

Z dalších užívaných separačních metod je tzv. **2D elektroforéza** (dvojezměrná gelová elektroforéza) – jedná se o kombinaci dvou elektroforetických postupů s vysokým rozlišením (isoelektrické zaostřování a SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza), která poskytuje mnohem větší rozlišení než jakýkoli postup samotný. V gelu prvního rozměru se solubilizované proteiny oddělí na základě izoelektrického bodu. Tento gel se pak nanese na vrchol gelu SDS-destičky a dojde k procesu elektroforézy. Proteiny v gelu prvního rozměru migrují do gelu druhého rozměru, kde jsou separovány na základě jejich molekulové hmotnosti [44].

Poslední značně rozšířenou metodou je tzv. **ELISA** – což je imunochemická metoda, která je založena na navázání enzymu na protilátku, který slouží ke značení antigenu a tím i celého imunokomplexu. Navázání enzymu se znázorňuje reakcí se substrátem za vzniku barevného produktu. Výsledek se poté hodnotí fotometricky. V současnosti plně automatizované přístroje v lékařských laboratořích po celém světě používají princip imunotestu s enzymem jako reportérovým štítkem pro rutinní měření nespočetných analytů ve vzorcích pacientů. ELISA je založena zejména na principu imunotestu spíše s enzymem, než radioaktivitou jako reportérovým štítkem [45].

Dalšími užívanými metodami je průtoková cytometrie, imunofluorescence či imunorprecipitace [25]. Expres proteinu se dá hodnotit i nepřímo analýzou genové exprese proteinu, např. metodou PCR [46].

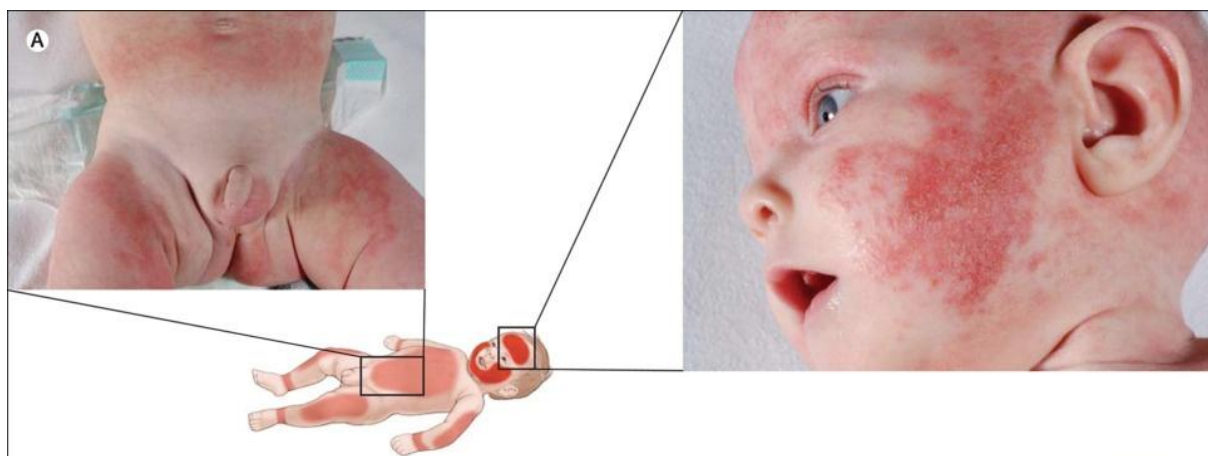
3. DEFEKTY EPIDERMÁLNÍCH PROTEINŮ VE SPOJENÍ S EPIDERMÁLNÍ BARIÉROU

Neporušená epidermální diferenciace je rozhodující pro neporušenou funkci bariéry kůže. Epidermální diferenciální komplex (EDC, z angl. Epidermal Differentiation Complex) je shluk genů na chromozomu 1q21 kódující proteiny, které plní důležité funkce v terminální diferenciaci lidské epidermis, včetně *FLG*, loricrinu, SPRR proteinů a dalších. Jiné geny kódují proteiny vázající vápník rodiny S100A, proteiny pozdního zkorodovaného obalu a multifunkčních proteinů (pro)filaggrin a trichohyalin. EDC představuje pozoruhodný soubor strukturně a evolučně příbuzných genů, které úzce spolupracují v komplexním mechanismu epidermální diferenciace. Nedávno se objevily důkazy o tom, že variace v rámci genů EDC hraje důležitou roli v patogenezi tří běžných kožních onemocnění - *atopické dermatitidy (AD)*, *psoriasis* a *ichthyosis vulgaris* [47].

3.1. ATOPICKÁ DERMATITIDA

AD je chronický zánětlivý stav kůže, kterému často předchází astma a alergické poruchy. Tyto stavy jsou charakterizovány suchou kůží, zvýšenou hladinou IgE v séru a periferní eozinofilii. Klinický fenotyp, který charakterizuje AD je produktem interakcí mezi geny citlivosti, prostředím, defektní funkcí bariéry kůže a imunologickými odezvami. Celoživotní prevalence AD je 10-20 % u dětí a 1 -3 % u dospělých [48]. Typickým výskytem AD u dětí je zejména v oblasti loketních a podkoleních jamek, na hýždích, popř. v oblasti obličeje viz obr. 4 [49]. AD je rozdělena na dvě formy: „vnější“ forma, která je spojena se senzibilizací zprostředkovanou IgE, která zahrnuje 70-80 % pacientů a forma „vnitřní“ bez zprostředkované IgE senzibilizace zahrnující 20-30 % pacientů. Obě formy AD mají asociovanou eozinofilii [48].

Existuje celá řada faktorů, které přispívají k šíření AD včetně alergenů, dráždivých látek a zároveň bylo zjištěno, že i stres dokáže vyvolat imunologické změny a v kombinaci s poškrábáním může rovněž vést ke vzniku AD [48].



Obrázek 4:Typický klinický vzhled a umístění AD u dětí [49].

3.1.1. DŮSLEDKY ABNORMALIT EPIDERMÁLNÍ BARIÉRY U AD

Jak je již známo, kožní bariéra hraje klíčovou roli při imunitní kontrole a homeostáze a při prevenci pronikání mikrobiálních produktů a alergenů. Právě poruchy, které narušují strukturální integritu, nebo imunitní funkce kožní bariéry hrají klíčovou roli v patogenezi AD. Pacienti trpící AD mají vždy snížené hodnoty zejména filaggrinu [50]. Zároveň ale dochází ke snížené regulaci u loricrinu a involucrinu ve srovnání se zdravými jedinci a naopak ke zvýšené regulaci SPRR proteinů, zejména S100A8 a S100A7 [47].

Epidermis pacientů s AD je charakterizována výrazným narušením bariéry a pacienti mají zvýšenou citlivost na alergickou senzibilizaci, stejně jako mikrobiální kolonizaci a infekce.

Výsledkem nedostatku filaggrinu u AD je snížená hydratace SC, což vede ke stoupajícímu vodnímu gradientu v celé SC a ke zvýšení transepidermální ztráty vody (TEWL). Kromě toho produkty rozkladu filaggrinu hrají důležitou roli při okyselování SC a snížená tvorba metabolitů filaggrinu může vést ke zvýšení hodnoty pH SC, a tím dojde k aktivaci řady serinových proteáz. Zvýšení aktivity serinové proteázy indukované pomocí pH by mohlo následně vést k poškození bariéry a k precipitaci zánětu Th2 u AD. Co se týká velikosti dysfunkce kožní bariéry, ta vždy koreluje se závažností onemocnění s AD. Zda-li dysfunkce kožní bariéry předchází zánětu kůže a defekty epidermální bariéry zahajují vývoj AD, zůstává nevyřešenou otázkou [51].

3.1.2. EPIDERMÁLNÍ KERATINOCYTY U AD

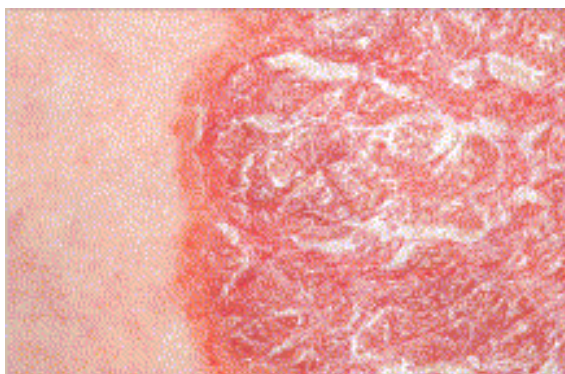
Keratinocyty od AD pacientů produkují jedinečný profil chemokinů a cytokinů po mechanické stimulaci, např. poškrábání nebo vystavení prozánětlivým cytokinům. Jsou také důležitým zdrojem thymického stromálního lymfopoetinu, který aktivuje DCs pro přípravu

naivních Th buněk k produkci IL-4 a IL-13. Tato pozorování mohou vysvětlit vazbu mezi poškrábáním a vyvoláním zánětu kůže zprostředkovaného Th2 v AD. Keratinocyty také mají u AD nedostatečnou schopnost syntetizovat antimikrobiální peptidy potřebné pro vrozené imunitní odpovědi proti mikrobům [48].

3.2.PSORIASIS

Psoriasis je dalším chronickým zánětlivým onemocněním kůže, charakterizovaný tlustými, stříbrnými „šupinami“ viz obr. 5 [52]. První příznaky se obvykle vyskytují ve třetím desetiletí života a prevalence psoriasis je celosvětově mezi 1 a 3 %. Psoriasis může být v 10-30 % doprovázeno také psoriatickou artritidou. Podobně jako u AD je pro psoriasis patrná multifaktoriální patogeneze. Nicméně mechanismy zánětu kůže u těchto dvou běžných kožních onemocnění jsou zcela odlišná. Imunitní odpověď u psoriasis převládá tvorbou cytokinů T helper 1 (Th1) (např. IL-12 či interferon- γ) oproti AD, kde je imunitní odezva založena na tvorbě Th2 [47].

Ve srovnání s AD byla u psoriasis nalezena nadměrná exprese mnoha antimikrobiálních proteinů v keratinocytech. Chronické léze pacientů s psoriázou a AD jsou pozoruhodně podobné s ohledem na buněčnou proliferaci. V průběhu studií se došlo k závěru, že psoriatická epidermis vyjadřuje vysoké hladiny hostitelských obranných proteinů v porovnání s AD epidermis a tento fenomén se jeví jako specifický pro tyto proteiny [53].



Obrázek 5: Červený plak krytý bělavo-stříbrnou šupinou typický pro typ: psoriasis vulgaris [52].

Byla potvrzena rozdílná exprese pěti antimikrobiálních proteinů - hBD-1, hBD-2, elafin, calgranulin C a iNOS. Nejdůležitějším proteinem se ve spojitosti s tímto kožním onemocněním jeví hBD-2, který se zdá být nejsilnějším a nejvíce známým proteinem specifickým pro psoriasis. hBD-2 v normální epidermis chybí, i když v některých oblastech

se nachází (např. tvář). Ovšem u psoriatické epidermis je hBD-2 vysoce indukován na úrovni mRNA, ve srovnání s normální kůží. Pro porovnání v epidermis AD je hBD-2 také značně indukován na úrovni mRNA ve srovnání s normální kůží, ale na úrovni proteinu se jen občas nalézá ve vrstvě *stratum granulosum*. Byla odhalena ale i řada dalších antimikrobiálních proteinů, které jsou nadměrně exprimovány v psoriatické epidermis, jako je psoriasin, SLPI, kalgranulin A a B, cystatinA a chitinasa [53].

Kromě antimikrobiálních proteinů hrají důležitou roli i proteiny rodiny SPRR. Konkrétně *S100A7* a *S100A11*, které jsou ve zdravé epidermis přítomny ve *stratum basale* a *stratum spinosum*. U postižených psoriatických tkání zůstanou hladiny *S100A10* a *S100A11* nezměněné, zatímco *S100A*, *S100A8* a *S100A9* jsou značně nadměrně exprimovány. Vzor exprese a subcelulární lokalizace *S100A7* je podobný v normální a psoriatické tkáni. *S100A8* a *S100A9* jsou silně exprimovány v bazálních a spinosních vrstvách v tkáních postižených psoriázou. Kromě toho je prokázáno, že *S100A*, *S100A10* a *S100A11* jsou začleněny do multimerů odolných vůči detergentu a redukčnímu činidlu, což naznačuje, že jsou *in vivo* transglutaminasové substráty. *S100A8* a *S100A9* netvořily tyto větší komplexy. Tyto výsledky ukazují, že proteiny *S100* se lokalizují na plazmatickou membránu v diferencovaných keratinocytech, což naznačuje úlohu při regulaci událostí spojených s vápníkem, spojených s membránou. Tyto výsledky rovněž naznačují, jak bylo uvedeno výše, že exprese *S100A7*, *S100A8* a *S100A9* je výrazně změněna u psoriázy, což naznačuje úlohu těchto proteinů v patogenezi onemocnění [54].

3.3. ICHTHYOSIS VULGARIS

Ichthyosis vulgaris je autozomálně dominantní porucha keratinizace charakterizována histologicky absentními nebo redukovanými granulemi keratohyalinu v epidermis a mírnou hyperkeratózou [55]. Jinými slovy se jedná o běžné genetické kožní onemocnění, charakterizované jemným šupinatěním viz obr. 6 [56], které je zejména v dolní části břicha, paží a nohou a obvykle se projevuje během několik prvních měsíců života [47]. Základní biochemická abnormalita v ichthyosis vulgaris není známa [55]. Z histologického hlediska jsou keratohyalinní granula buď snížena, nebo v epidermis zcela chybí. Co se týká výskytu ichthyosis vulgaris, byly prováděny výzkumy u zdravých školních dětí a přibližně 1 z 250 jedinců trpí touto poruchou a konkrétně 20 s různou mírou závažnosti. Před několika lety se objevily první důkazy, že protein *FLG* by mohl hrát důležitou roli v patogenezi ichthyosis vulgaris. *FLG* chybí v epidermis u těžce postižených jedinců a snížená hladina *FLG* byla i u

méně závažných stavů ve srovnání s kontrolní skupinou. Novější studie ukázaly, že hladiny profilaggrinu v mRNA byly významně sníženy v epidermis ichthyosis vulgaris, pravděpodobně v důsledku poruchy posttranskripční kontroly [47].



Obrázek 6: Ruka pacienta s typickým šupinatěním [56].

Další studie poukázala na vazbu klinického podtypu ichthyosis vulgaris s chybějící granulární epidermální vrstvou do chromozomální oblasti obsahující EDC. Takže variace v genu *FLG* je již dlouho podezřívána jako hlavní důvod pro ichthyosis vulgaris. Přesto neobvyklá a složitá struktura EDC obecně a zvláště lidského *FLG* genu již dlouho zabraňovala identifikaci příčinných mutací [47].

Bylo přesvědčivě prokázáno, že právě mutace v genu *FLG* jsou podkladem pro ichthyosis vulgaris [47].

3.4.DALŠÍ KOŽNÍ ONEMOCNĚNÍ

Existuje samozřejmě celá řada dalších kožních onemocnění v souvislosti s mutacemi dalších epidermálních proteinů. Jedním z příkladů je **Vohwinkelův syndrom**, neboli loricrin keratoderma. Jedná se o dominantně zděděné onemocnění, způsobené mutací v lidském genu loricrinu a je považována za vzácnou genetickou poruchu [47]. Klinicky keratoderma vykazuje charakteristickou plástovou, palmo-plantární keratodermu, která je nejčastěji lokalizována na hřbetním povrchu prstů [57]. Mezi další onemocnění patří i ta, která jsou vlivem zvýšené exprese *SPRR1* a *SPRR2*, která byla naměřena v ortokeratotické a parakeratotické hyperkeratóze, např. u již popsané psoriasis, či u tzv. **Lichen planus** [47].

3.5.STÁRNUTÍ KŮŽE

Stárnutí kůže může být rozděleno na tzv. vnější (*photoageing*) a vnitřní (chronologické) stárnutí. Vnější stárnutí je vyvoláno poškozením lidské pokožky při opakovaném vystavení UV záření, které je součástí elektromagnetického spektra a jeho biologické účinky se liší vlnovou délkou a UV spektrum je proto rozděleno do tří oblastí: UVA (315nm – 400nm), UVB (280nm – 315nm) a UVC (190nm -280nm) [58,59]. Jak UVB, tak i UVA záření mohou vyvolat bodové mutace související s reaktivními druhy kyslíku (ROS) a hrubé genomové změny (např. delece). UVC záření na Zemi nedopadá a je zachycováno ozonovou vrstvou [60]. Naopak vnitřní stárnutí se objevuje s rostoucím věkem a je silně spojeno s genetickými faktory. Vnější stárnutí je charakterizováno morfologickými změnami, které zahrnují hluboké vrásky a ztrátu elasticity, stejně jako histologické změny, jako jsou změny pojivové tkáně. Tyto změny jsou považovány za výsledek destrukce kolagenu pomocí UV-indukovaných matricových metaloproteináz vylučovaných z epidermálních keratinocytů a dermálních fibroblastů [58].

Stárnutí může způsobit změněné permeability na léky, zvýšené náchylnosti k dráždivé kontaktní dermatitidě a často závažné xeróze [61].

3.5.1. Vliv na epidermální proteiny

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, hlavní komponenty při tvorbě CE jsou proteiny. Počáteční struktura CE sestávající z envoplakinu, periplakinu a involucrinu je téměř beze změny na úrovni RNA, zatímco zesíťovací enzym TGase1 vykazuje mírně zvýšenou úroveň transkripce [57]. Zároveň byla zjištěna i snížená aktivita SMase ve staré, suché kůži [35]. Nicméně hladiny transkripce genů kódující proteiny připojené k této „konstrukci“ se v pozdějším časovém bodě výrazně mění. Bylo prokázáno, že loricrin spolu s *FLG* v průběhu stárnutí kůže podléhá snížené regulaci. Pokles loricrinu se zdá být kompenzován zvýšenou hladinou rodiny SPRRs proteinů, které fungují jako malé mosty, které zajišťují spojení loricrinu s SPRRs. Všichni členové rodiny SPRR s výjimkou SPRR2G vykazují naopak poté zvýšenou expresi. Zdá se, že mnoho z pozorovaných změn dodržuje přísná pravidla (snížená regulace *FLG*, loricrinu a zvýšená regulace S100 rodiny jakož i SPRR2 rodina), zatímco jiné změny se zdají být libovolné. Ale existuje určitý trend, že všechny SPRR proteiny mají zvýšenou regulaci (někdy až 100x). Ačkoliv všechny geny CE jsou seskupeny, společná regulace může být vyloučena: jak loricrin, tak i SPRR3 jsou kódovány v 1q21 regionu, ale jsou upraveny zcela v opačných směrech během stárnutí [62].

Pro syntézu CE je také velice důležitý vápník. Interakce periplakinu, involucrinu i envoplakinu je přísně závislá na Ca^{2+} iontech. Také TGase1, který je zodpovědný za zesíťení těchto tří proteinů se aktivuje způsobem závislým na vápníku. Je předpokládáno, že hladina vápníku klesá v lidské kůži s věkem, což odkazuje na skutečnost, že hladina vápníku klesá se zvyšujícím se věkem v lidském séru. I přes to, že jsou ionty vápníku předpokladem pro epidermální diferenciaci, syntézu lipidů, tvorbu CE a dokonce i pro vytváření lamelárních orgánů, tak se o jeho hladině jak v mládí, středním věku tak i ve stáří ví velice málo [62].

4. Závěr

Epidermis lidské kůže představuje rozsáhlý sub-proteom, ovšem pouze specializované proteiny se podílí na integritě kožní bariéry. Proteiny lokalizované v nejsvrchnější vrstvě epidermis tvoří lešení pro lipidovou extracelulární matrix, zajišťují hydrataci nebo představují anti-mikrobiální složku kůže. Ačkoliv je kůže velice houževnatý a rychle regenerující orgán schopný celé řady kompenzačních mechanismů, dysfunkce některých proteinů, ať již vlivem mutace příslušných genů či vlivem stárnutí, může způsobit závažné fenotypy, jejichž společným znakem je zásadní narušení kožní bariéry. U některých fenotypů potom není zcela objasněna příčina, a proto základním předpokladem pro léčbu či kompenzaci kožních onemocnění je vývoj spolehlivých analytických metod, které jsou schopné odhalit nejenom kvantitativní odchylky, ale také strukturální a lokalizační difference. Vzhledem k variabilitě patogenezí tak k přesnému určení diagnózy či příčiny problému není vždy dostačující pouze jediná metoda. Otázkou je, vzhledem k časové a finanční náročnosti, jestli by komplexní multi-analýzy našly prostor v klinické praxi. Dosavadní léčba nejrozšířenějších kožních onemocnění, AD a psoriasis, je většinou omezena na aplikaci lokálních kortikosteroidů nebo topických krémů podporující bariérovou funkci kůže. Recentní studie dále ukazují, že proces stárnutí kůže zhoršuje bariérovou funkci a že mimo jiné dochází k deregulaci integrálních proteinů či zpomalení enzymatické aktivity v epidermis. Vzhledem k narůstajícímu průměrnému věku lidské populace se otázka vlivu stárnutí na fyziologii kůže stává aktuálním tématem.

5. Reference

1. ELIAS P. M. Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View. *Journal of General Internal Medicine*. 2005, **20**; 183–200.
2. SILVERBERG N., L. SILVERBERG. Aging and the Skin. *Postgraduate Medicine*. 2016, **86**; 131-144.
3. NAVARINI A. A., L. VALEYRIE-ALLANORE, N. SETTA-KAFETZI, J. N. BARKER, F. CAPON, D. CREAMER, et al. Skin Is Not the Largest Organ. *Journal of Investigative Dermatology* 2014, **134**; 581-582.
4. PAUL A. J., M. A. KOLARSICK, C. GOODWYN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Specific Cancer Series: Skin Cancer*. Muehlbauer, P & McGowan, Copyright 2009, Oncology Nursing Society.
5. McLAFFERTY E., et al. The Integumentary System: Anatomy, Physiology and Function of Skin. *Nursing Standard*. 2010, **27**; 3, 35-42.
6. OPENSTAX. Anatomy and Physiology. [online]. 2013. [cit. 2017-06-27]. ISBN-13: 978-1938168130. Dostupné z: <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>
7. ŠTORK, Jiří. Dermatovenerologie. 2. vyd. Praha: Galén, c2013, 502 s. ISBN 978-80-7262-898-8.
8. SANDBY-MØLLER J., T. POULSEN, and H. Ch. WULF. Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Act Derm Venereol*. 2003, **83**; 410-413.
9. WATT F. M. Epidermal Stem Cells: Markers, Patterning and the Control of Stem Cell Fate. *The Royal Society*. 1998, **353**; 831-837.
10. ZHU Y. T., Y. HAYASHIDA, A. KHEIRKHAH, H. HE, S. Y. CHEN, C. G. SCHEFFER. Characterization and Comparison of Intercellular Adherent Junctions Expressed by Human Corneal Endothelial Cells In Vivo and In Vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008, **49**; 3879-3886.

11. SCOTT C. A., D. P. KELSELL. Key Functions for Gap Junctions in Skin and Hearing. *Biochemical Journal*. 2011, **438**; 245-254.
12. SVOBODA M., Z. BÍLKOVÁ, T. MUTHNÝ. Could Tight Junctions Regulate the Barrier Function of the Aged Skin? *Journal of Dermatological Science*. 2016, **81**; 147-152.
13. POUILLOT A., N. DAYAN, A. S. POLLA, and B. S. POLLA. The Stratum Corneum: a Double Paradox. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2008, **7**; 143-148.
14. PROKSCH E., J. M. BRANDNER, and J. M. JENSEN. The Skin: an Indispensable Barrier. *Experimental Dermatology*. 2008, **17**; 1063-1072.
15. MADISON KATHI C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Etre” of the Epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2003, **121**; 231-241.
16. LANDMANN L. The Epidermal Permeability Barrier. *Anatomy and Embryology*. 1998, **178**; 1 -13.
17. BOULAIS N., L. MISERY. The Epidermis: a Sensory Tissue. *European Journal of Dermatology*. 2008, **18**; 119-127.
18. WHITFORD D. Proteins: Structure and Function. *The American Association for Clinical Chemistry*. 2005,**51**; 2220-2221.
19. KLOUDA, Pavel. Základy biochemie. 3. vyd. Ostrava: Pavko, 2013, 220 s. ISBN 978-80-86369-16-7.
20. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. Biochemie pro studující medicíny I. Díl. Praha: Karolinum, 2009, 269 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-1416-8.
21. HOHL D, T. MEHREL, U. LICHTI, M. L. TURNER, D. R. ROOP, and P. M. STEINERT. Characterization of Human Loricrin - Structure and Function of a New Class of Epidermal Cell Envelope. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991, **266**; 6626-6636.
22. HOHL D., P. A. de VIRAGH, F. AMIGUET-BARRAS, S. GIBBS, C. BACKENDORF. The Small Proline-Rich Proteins Constitute a Multigene Family of Differentially Regulated, Cornified Cell Envelope Precursor Proteins. *Journal Investigative of Dermatology*. 1995, **104**; 902-909.

23. ECKERT R. L., M. B. YAFFE, J. F. CRISH, S. MURTHY, E. A. RORKE, J. F. WELTER. Involucrin - Structure and Role in Envelope Assembly. *Journal of Investigative Dermatology*. 1993, **100**; 613-617.
24. CABRAL A., A. SAYIN, S. de WINTER, D. F. FISCHER, S. PAVEL, C. BACKENDORF. SPRR4, a Novel Cornified Envelope Precursor: UV-Dependent Epidermal Expression and Selective Incorporation Into Fragile Envelopes. *Journal of Cell Science*. 2011, **114**; 3837-3843.
25. RUHRBERG Ch., M. A. NASSER HAJIBAGHERI, M. SIMON, T. P. DOOLEY, and F. M. WATT. Envoplakin, a Novel Precursor of the Cornified Envelope That Has Homology to Desmoplakin. *The Journal of Cell Biology*. 1996, **134**; 715-729.
26. SANDILANDS A., C. SUTHERLAND, A. D. IRVINE, W. H. IRWIN McLEAN. Filaggrin in the Frontline: Role in Skin Barrier Function and Disease. *Journal of Cell Science*. 2009, **122**; 1285-1294.
27. CANDI E., R. SCHMIDT, G. MELINO. The Cornified Envelope: a Model of Cell Death in the Skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, **6**; 328-340.
28. DALE B. A., K. A. HOLBROOK, J. R. KIMBALL, M. HOFF, T. T. SUN. Expression of Epidermal Keratins and Filaggrin during Human Fetal Skin Development. *The Journal of Cell Biology*. 1985, **101**; 1257-1269.
29. SUN T., R. EICHNER, W. G. NELSON, C. G. SCHEFFER TSENG, R. A. WEISS, M. JARVINEN, et al. Keratin Classes: Molecular Markers for Different Types of Epithelial Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983, **81**; 109-115.
30. WOODCOCK-MITCHELL J., R. EICHNER, W. G. NELSON, and T. SUN. Immunolocalization of Keratin Polypeptides Epidermis Using Monoclonal Antibodies. *The Journal of Cell Biology*. 1982, **95**; 580-588.
31. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-7262-324-9 .
32. KLOUDA, Pavel. *Biochemie zblízka*. 2. vyd. Ostrava: Pavko, 2016, 163 s. ISBN 978-80-86369-20-4 .

33. ECKERT R. L., M. T. STURNIOLO, A. BROOME, M. RUSE, E. A. RORKE. Transglutaminase Function in Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005, **124**; 481-492.
34. MEHTA K., R. ECKERT, R. A. STAHEL, S. PETERS. Transglutaminases, Family of Enzymes with Diverse Functions. Karger, 2005, 254 s. ISBN-10: 3805579012.
35. JIANG H., R. JANS, W. XU, E. A. RORKE, Ch. LIN, Y. CHEN, et al. Type I Transglutaminase Accumulation in the Endoplasmic Reticulum May Be an Underlying Cause of Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. *Journal of Biological chemistry*. 2010, **285**; 31634-31646.
36. KUSUDA S., C. CHANG-YI, M. TAKAHASHI, T. TEZUKA. Localization of Sphingomyelinase in Lesional Skin of Atopic Dermatitis Patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998, **111**; 733-738.
37. NIYONSABA F., H. USHIO, N. NAKANO, W. NG, K. SAYAMA, K. HASHIMOTO, et al. Antimicrobial Peptides Human β -Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007, **127**; 594-604.
38. MAHMOOD T., P. YANG. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Science*. 2012, **9**; 429-434.
39. *Labguide: Průvodce laboratoří*. [online]. 2014. [cit. 2017-6-25]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>
40. RAMOS-VARA J. A., M. A. MILLER. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry - The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary pathology*. 2013, **51**; 42-87.
41. RAJADHYAKSHA M., S. GONZÁLEZ, J. M. ZAVISLAN, R. ANDERSON, R. H. WEBB. *In Vivo* Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin II: Advances in Instrumentation and Comparison With Histology. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999, **113**; 293-303.
42. HOLČAPEK M., P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, **92**; 278-286.

43. MATUSZEWSKI B. K., M. L. CONSTARZER, and C. M. CHAVEZ-ENG. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Analytical chemistry*. 2003, **75**; 3019-3030.
44. ADAMS L. D., S. R. GALLAGHER. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2004, **67**; 10.4.1 -10.4.23.
45. LEQUIN R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005, **51**; 2415-2418.
46. VanGUILDER H. D., K. E. VRANA, W. M. FREEMAN. Twenty-five Years of Quantitative PCR for Gene Expression Analysis. *Biotechniques 25th Anniversary*. 2008, **44**; 619-626.
47. HOFFJAN S., S. STEMMLER. On the Role of the Epidermal Differentiation Complex in Ichthyosis Vulgaris, Atopic Dermatitis and Psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 2007, **157**; 441-449.
48. LEUNG D. Y. M., M. BOGUNIEWICZ, M. D. HOWELL, I. NOMURA, and Q. A. HAMID. New Insights Into Atopic Dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004, **113**; 651-657.
49. WEIDINGER S., N. NOVAK. Atopic Dermatitis. *The Lancet*. 2015, **387**; 1109-1122.
50. AGRAWAL R., and J. A. WOODFOLK. Skin Barrier Defects in Atopic Dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2014, **14**; 433.
51. BOGUNIEWICZ M., and D. Y. M. LEUNG. Atopic Dermatitis: A Disease of Altered Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Immunological reviews*. 2011, **242**; 233-246.
52. van de KERKHOF P. Apremilast: a Step Forward in the Treatment of Psoriasis? *The Lancet*. 2012, **380**; 708-709.
53. de JONGH G. J., P. L. J. M. ZEEUWEN, M. KUCHARKOVA, R. PFUNDT, W. BLOKX, A. DOGAN, et al. High Expression Levels of Keratinocyte Antimicrobial Proteins in Psoriasis Compared with Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005, **125**; 1163-1173.

54. BROOME A. M., D. RYAN, R. L. ECKERT. S100 Protein Subcellular Localization During Epidermal Differentiation and Psoriasis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2016, **51**; 675-685.
55. VIRGINIA SYBERT M. D., D BEVERLY, K. HOLBROOK. Ichthyosis Vulgaris: Identification of a Defect in Synthesis of Filaggrin Correlated with an Absence of Keratohyaline Granules. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985, **84**; 191-194.
56. *American Academy of Dermatology*. Ichthyosis vulgarit. [online]. 2016. [cit. 2017-6-27]. Dostupné z: <https://www.aad.org/public/diseases/scaly-skin/ichthyosis-vulgaris>
57. SCHMUTH M., J. W. FLUHR, D. C. CRUMRINE, Y. UCHIDA, M. BEHNE, D. G. MOSKOWITZ, et al. Structural and Functional Consequences of Loricrin Mutations in Human Loricrin Keratoderma (Vohwinkel Syndrome with Ichthyosis). *Journal of Investigative Dermatology*. 2004, **122**; 909-922.
58. KIM J. E., M. KIM, X. JIN, J. OH, J. EUN KIM, and J. H. CHUNG. Skin Aging and Photoaging Alter Fatty Acids Composition, Including 11, 14, 17 - eicosatrienoic Acid, in the Epidermis of Human Skin. *Journal of Korean Medical Science*. 2010, **25**; 980-983.
59. DIFFEY B. L., Sources and Measurement of Ultraviolet Radiation. *Methods*. 2002, **28**; 4 - 13.
60. de GRUIJL F. R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB Radiation. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2002, **15**; 316-320.
61. GHADIALLY R., B. E. BROWN, S. M. SEQUEIRA-MARTIN, K. R. FEINGOLD, and P. M. ELIAS. The Aged Epidermal Permeability Barrier. Structural, Functional, and Lipid Biochemical Abnormalities in Humans and a Senescent Murine Model. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995, **95**; 2281-2290.
62. RINNERTHALER M., J. DUSCHL, P. STEINBACHER, M. SALZMAN, J. BISCHOF, M. SCHULLER, et al. Age-related Changes in the Composition of the Cornified Envelope in Human Skin. *Experimental Dermatology*. 2013, **22**; 329-335.