

**A citoszolikus nukleinsavak által indukált IL-23
expressziójának vizsgálata keratinocitákban**

Kelemen Evelyn

PhD értekezés tézisei

Témavezető: Széll Márta és Danis Judit



Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Bőrgyógyászati-és Allergológiai Klinika

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2022

Közlemények jegyzéke:

- I. **Kelemen E.**, Ádám É., Sági S.M., Göblös A., Kemény L., Bata-Csörgő Z., Széll M. and Danis J.: Psoriasis-Associated Inflammatory Conditions Induce IL-23 mRNA Expression in Normal Human Epidermal Keratinocytes, *Int J Mol Sci* 23(1):540 (2022)

IF:5.924

- II. **Kelemen E.**, Bozó R., Groma G., Bata-Csörgő Z., Kemény L., Danis J., Széll M.: The Psoriatic Non-Lesional skin: A Battlefield between Susceptibility and Protective Factors, *J Invest Dermatol* 141(12):2785-2790 (2021)

IF:8.551

Egyéb közlemények:

- III. Danis.J, **Kelemen E.**, Rajan N., Nagy N., Széll M., Ádám É: TRAF3 and NBR1 both influence the effect of the disease-causing CYLD(Arg936X) mutation on NF-kB activity, *Exp Dermatol* 30(11):1705-1710 (2021)

IF:3.96

(Független idézetek: 0, Függő idézetek:1, Összesen:1)

- IV. **Kelemen E.**, Danis J, Göblös A., Bata-Csörgő Z., Széll M: Exosomal long non-coding RNAs as biomarkers in human diseases, *EJIFCC* 30(2):224-236 (2019)

IF:0

(Független idézetek: 27, Függő idézetek:0, Összesen: 27)

- V. Ámon J., Keisham K., Bokor E., **Kelemen E.**, Vágvölgyi C., Hamari Z: Sterigmatocystin production restricted to hyphae located in the proximity of hülle cells, *J Basic Microbiol* 58(7):590-596 (2018)

IF:2.281

(Független idézetek: 5, Függő idézetek:0, Összesen:5)

1. Bevezetés

1.1. A szabad nukleinsavak által indukált immunválaszok pikkelysömörben

A bőr a legnagyobb kiterjedésű szervünk, amely a veleszületett immunrendszer aktív résztvevőjeként az első védelmi vonalat biztosítja a környezeti, kémiai, fizikai sérülések és fertőzések ellen. A bőr felső rétege az epidermisz. Legfontosabb funkciója, hogy védőfelületet képezzen, amely elválasztja az egyént a külső környezettől. Fizikai traumát vagy fertőzést követően a keratinocitákból LL-37 szabadul fel, amely megköti a sérült hámsejtekből felszabaduló DNS- és RNS-fragmentumokat. A citoszolikus nukleinsav fragmentumok, amelyeket a sejtek patogén- és veszély-asszociált molekuláris mintázatként ismernek fel (PAMP és DAMP), nagy mennyiségben fordulnak elő a pikkelysömörös bőrben, és jelenlétük a professzionális immunsejtek krónikus aktiválásához vezet. Az LL-37 és a saját sejtekből származó nukleinsavak komplexet formálnak, amely megtalálható a pikkelysömörös léziós bőrben. Ez a komplex aktiválja a TLR7/9-et hordozó plazmacitoid dendritikus sejteket, amelyek normális esetben nem fordulnak elő az egészséges bőrben. A plazmacitoid dendritikus sejtek gyulladáskeltő citokineket (IL-1 β , IL-6 és TNF) és interferonokat (IFN) szabadítanak fel, melyeken keresztül aktiválják a keratinocitákat és a myeloid dendritikus sejteket, ezáltal fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában. A myeloid dermális dendritikus sejtek száma a pikkelysömörös bőrben megnövekszik, és az érett sejtek a bőr alatti nyirokcsomókba vándorolnak, hogy ott antigént prezentáljanak a naív T-sejteknek. A T-sejtek a betegség kiindulási fázisában is kritikus szerepet játszanak, mivel az aktivált dermális dendritikus sejtekkel való kölcsönhatásuk központi esemény a plakkok- és az ebből következő IL-23/IL-17 gyulladást előidéző környezet kialakulásában. Ebben a környezetben a dendritikus sejtekből és makrofágokból származó IL-23 elősegíti a segítő T-sejtek-17 (Th17) és a citotoxikus sejtek effektor funkcióit. Ez a folyamat az epidermisz megvastagodását és gyulladt plakkok kialakulását eredményezi.

A pikkelysömörös bőrben észlelt magasabb nukleinsav szint csökkent dezoxiribonukleáz-aktivitás és zavart ribonukleáz-aktivitás eredménye. A mitokondriális szabályozás sérüléséből származó megnövekedett szérumban mitokondriális DNS-szintek is DAMP-ként működhetnek. A pikkelysömörös bőrben található neutrofil granulocitákat és a neutrofil extracelluláris hálókat (NET-eket) az LL37 köti meg. Ezek gyulladást előidéző reakciókat aktiválnak, amelyek a pikkelysömör krónikus gyulladásához hozzájáruló öngerjesztő ciklust okozhatnak. A Th1 és Th17 sejtek által termelt interferon- γ (IFN- γ) szintén hozzájárulhat a nukleinsavak felismeréséhez, az IL-23 expresszió módosításához, valamint a nukleinsav indukált gyulladást előidéző válaszok elindításához keratinocitákban.

1.2. Az IL-23 szerepe pikkelysömörben

Számos közelmúltbeli publikáció utal arra, hogy a Th17/interleukin-23 tengely elősegíti a krónikus gyulladást, így domináns szerepet játszik a pikkelysömör kialakulásában. Az IL-23 felelős a Th17 sejtek kialakulásáért, ami a pikkelysömör patogenezisében részt vevő IL-17 és IL-22 citokinek termeléséhez vezet. A keratinociták és az aktivált antigénprezentáló sejtek (Langerhans-sejtek, makrofágok és dendritikus sejtek) is IL-23-at termelnek, amely expressziójának fokozódása a pikkelysömörös léziós bőrben a Th17 sejtek számának növekedéséhez vezet.

Az IL-23 egy két alegységből álló citokin, a p19 alegység IL-23 specifikus, míg a p40 alegység közös az IL-12-vel. Az IL-23 két alegységének és receptorának megnövekedett szintjét találták a pikkelysömörös betegek bőrében, ami arra utal, hogy az IL-23 szerepet játszik a betegség patogenezisében. A közös p40 alegység elleni monoklonális antitest, az usztekimumab igen hatékony kezelést jelent a betegség terápiájában, és a p19 alegységet célzó antitestek (guselkumab, tildrakizumab és risankizumab) is ígéretes hatást mutatnak a tünetek javítására.

1.3. A PRINS hosszú nem-kódoló RNS

A 2000-es évek elején kutatócsoportunkban egy differenciál display kísérlet során azonosítottuk a PRINS hosszú nem kódoló RNS-t, (*psoriasis susceptibility related non-coding RNA induced by stress*). A PRINS magasabb szinten fejeződik ki a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrében, mint a léziós vagy az egészséges epidermiszben, ami arra utal, hogy hozzájárulhat a pikkelysömörré való hajlamhoz. A sejtek különböző stresszorai, mint például az ultraibolya-B (UV-B) sugárzás, éhezés, transzlációs gátlás és hipoxia mind befolyásolják a PRINS expresszióját. A PRINS csendesítése stressznek kitett HaCaT sejtekben csökkentette a sejtek életképességét. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PRINS védő szerepet tölt be a sejtek stresszválaszai során.

Jelenlegi ismereteink alapján feltételezzük, hogy a PRINS evolúciósan fiatal, főemlős specifikus hosszú nem kódoló RNS, amely eltérően expresszálódik pikkelysömörben, szerepet játszik a keratinociták stresszre adott válaszában és ezáltal a betegség patogenezisében. A PRINS közvetlenül kötődik az IL-6 és a CCL-5 (RANTES) mRNS-éhez specifikus kötőhelyeken, ami destabilizálódásukhoz és felhalmozódásuk csökkenéséhez vezet. Mindezen adatok együttesen arra utalnak, hogy a PRINS-nek szabályozó szerepe van a gyulladásozó folyamatokban.

2. Célkitűzések

Kutatócsoportunk egyik fő témája a nukleinsavak által indukált veleszületett immunválasz részleteinek tisztázása keratinocitákban. Ennek a projektnek a keretében egy 84, pikkelysömörben szerepet játszó gént tartalmazó qPCR array segítségével azonosítottuk azokat a géneket, amelyek a nukleinsav-analógokkal való kezelés hatására megváltozott expressziót mutatnak. Az egyik legnagyobb transzkripciós változást mutató gén az IL-23 citokin volt. Ezért a következő célokat tűztük ki:

- a szabad nukleinsav indukált jelátviteli útvonalak és mintázatfelismerő receptorok elemzésével feltárni az IL-23 expresszió szabályozásának részleteit, és megvizsgálni, hogy ezek hogyan járulnak hozzá az IL-23 expressziójához humán keratinocitákban.
- megvizsgálni, hogy a PRINS hosszú nem kódoló RNS-nek van-e szabályozó szerepe a nukleinsav indukált IL-23 termelésben humán keratinocitákban.

3. Anyagok és módszerek

- HPV-KER sejteket és normál humán epidermális keratinocitákat transzfektáltunk 1 µg/ml poly-deoxiadenilsav és poly-deoxitimidilsav duplaszálú homopolimerrel (poly(dA:dT)), 0,666 µg/ml polyinozin-polycitidilsav (poly(I:C))-vel vagy 1 µg PRINS overexpressziós plazmid DNS-sel, X-tremeGene 9 transzfekciós reagens jelenlétében.
- A patogénfelismerő receptorok siRNS-mediált géncsendesítéséhez a TLR3, RIG-1, IFIH-1, cGAS siRNS-eket vagy a target nélküli konstrukciókat 40 nM végső koncentrációban használtuk az X-tremeGene siRNS transzfekciós reagenssel történő transzfekcióhoz.
- A gátlási kísérletekhez a sejteket a poly(dA:dT)/poly(I:C) transzfekció előtt 1 órával az NF-κB (10 µM), STAT-1, STAT-3, JNK, MEK-1 és p38 specifikus inhibitorokkal inkubáltuk.
- A transzfekciót követően adott időpontokban a sejteket TRIzol® reagensben szedtük fel, majd a sejtek teljes RNS tartalmát izoláltunk és a Turbo DNA-free Kit segítségével DNáz-kezeltük. A cDNS-szintézis során 1 µg RNS-t reverz transzkripcióval átírtunk az EvoScript Universal cDNS master mix segítségével.
- A valós idejű RT-PCR kísérleteket az Universal Probe Library vagy a TaqMan génextpressziós rendszerrel és C1000 Touch Thermal Cyclerrel végeztük. A relatív mRNS-expressziót a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltuk ki.
- Az INTARNA program segítségével elemeztük a PRINS (AK022045) és az IL-23 mRNS közötti szekvencia-komplementaritást. Az IL-23 cDNS *in silico* azonosított kötőhely szekvenciáját megszintetizáltattuk és beépítettük a pmirGLO vektorba (pmirGLO-IL23BS konstrukció). A HEK293 sejteket 0,5 µg pmirGLO-IL23BS vagy üres pmirGLO plazmiddal és PRINS vektorral kotranszfektáltuk. Minden transzfekciós kísérletben 0,025 µg Renilla-luciferázt expresszáló pGL4.75 hRluc/CMV plazmidot használtunk kontrollként. A sejteket 24 óra elteltével felvettük és lizáltuk. A luciferáz aktivitást a Firefly & Renilla Dual Luciferase Assay Kit és a SYNERGY/HTX Multi-Mode reader segítségével mértük. A pmirGLO plazmidokból származó luciferáz aktivitást a Renilla-luciferáz aktivitásra normalizáltuk.
- A kísérleteket duplikátumban, legalább három biológiai ismétléssel végeztük. A statisztikai elemzésekre egyoldalú párosított t-próbát alkalmaztunk. A szignifikancia értékét $p \leq 0,05$ állapítottuk meg. Az IL-23 mRNS-indukció és a PRINS overexpresszió által közvetített IL-23 mRNS-csökkenés közötti korreláció elemzésére Pearson-féle korrelációs számítást használtunk.

4. Eredmények

4.1. A pikkelysömörrel kapcsolatos génexpressziós mintázatot a szabad nukleinsav-analógok modulálják

A szintetikus nukleinsav-analógokkal (poly(I:C) és poly(dA:dT)) való kezelés hatására megváltozott expresszióval reagáló gének azonosítására 84, a pikkelysömörben szerepet játszó-gént tartalmazó qPCR array-t végeztünk. A vizsgált gének közül 14 gént nem fejeztek ki a sejtek, míg 15 további gén, többségében antimikrobiális peptidek expressziója nem változott sem poly(I:C), sem poly(dA:dT) kezelés hatására. Mindkét kezelés után megnövekedett expressziót tapasztaltunk 37 gén esetén, melyek között citokinek, kemokinek és mintázatfelismerő receptorok találhatóak, míg további 7 gén esetén csak a poly(I:C) kezelés okozott megnövekedett expressziót.

Megfigyeltük, hogy más gyulladásos citokinekhez, például az IL-6-hoz és a TNF- α -hoz hasonló módon az IL-23 expressziója mind a poly(dA:dT), mind a poly(I:C) kezelés hatására megnőtt. Mivel az IL-23-ról ismert, hogy fontos szerepet játszik a pikkelysömör patogenezisében, további kísérleteket terveztünk a szabad nukleinsavak által indukált IL-23 transzkripció molekuláris mechanizmusának vizsgálatára humán keratinocitákban.

A qPCR array-ben négy egészséges donorból származó mRNS-mintát használtunk, és az első validációs kísérleteket ugyanazokon a mintákon végeztük el. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a poly(I:C) az IL-23 mRNS jelentős növekedését, míg a poly(dA:dT) az expresszió emelkedő tendenciáját idézte elő. Az array validálásának kiterjesztésére további független donorokat (n=6) vontunk be, és mindkét kezelést követően szignifikánsan magasabb IL-23 expressziót figyeltünk meg, azonban a poly(I:C) kezelés ebben a kísérletben is hatásosabb volt.

4.2. A poly(I:C) és a poly(dA:dT) különböző kinetikával indukálja az IL-23 mRNS expresszióját

Mivel korábbi munkánk során különbségeket észleltünk a poly(I:C)- és a poly(dA:dT) által indukált gyulladásos válaszok lefolyásában, tisztázni akartuk, hogy az IL-23 transzkripció indukációjában is tapasztalható-e ilyen eltérés. A nukleinsav kezelést követően különböző időpontokban mértük az IL-23 mRNS szintjét, és az expresszió csúcsát a poly(I:C) transzfekció után 24 órával figyeltük meg, míg a poly(dA:dT) kezelést követően lassan emelkedő tendenciát észleltünk, és a szint alacsonyabb volt, mint a poly(I:C) kezelést követően. Eredményeink további megerősítése érdekében HPV-KER sejteket is bevontunk kísérleteinkbe. A HPV-KER sejtekben az NHEK sejtekhez hasonlóan a poly(I:C) kezelés után az IL-23 mRNS expresszió csúcsa a 24.órával a kezelés után következett be, míg a poly(dA:dT) esetében fokozatosan emelkedő tendenciát figyeltünk meg.

4.3. A pikkelysömör-specifikus ingerek IL-23 mRNS expressziót indukálnak

A pikkelysömör-specifikus citokinek és a nukleinsavak IL-23 mRNS-expresszióra gyakorolt hatásának összehasonlítására a keratinocitákat IL-17A, IL-12, TNF- α és IL-23 citokinekkal, valamint szintetikus nukleinsav-analógokkal (IMQ, poly(dA:dT) és a poly(I:C)) kezeltük. A legmagasabb IL-23 mRNS expressziót a poly(I:C) indukálta, míg a poly(dA:dT) és a TNF- α kezelés kisebb mértékű emelkedést váltott ki. A többi vizsgált citokin és az IMQ nem befolyásolták az IL-23 mRNS expresszióját.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szabad citoszolikus nukleinsavakat modellező szintetikus nukleinsavak, különösen a poly(I:C), fontos szerepet játszanak a pikkelysömör gyulladásos folyamataiban azáltal, hogy megemelik az IL-23 szintet a humán keratinocitákban.

4.4. A nukleinsav indukált IL-23 mRNS expressziót elsősorban a TLR3 közvetíti NHEK sejtekben

A pikkelysömörben nagy mennyiségben vannak jelen a sérült saját sejtekből felszabaduló nukleinsavak. Az RNS- és DNS-fragmentumokat többféle PRR ismeri fel, amelyek a keratinocitákban és a professzionális immunsejtekben fejeződnek ki, és ott gyulladásos folyamatokat indítanak el. Célunk azon receptorok azonosítása volt, amelyek fontos szerepet töltenek be a nukleinsavak által indukált IL-23 mRNS expressziójának közvetítésében keratinocitákban. A TLR3, a RIG-I, az IFIH1(MDA-5) mRNS szintjének csökkentése érdekében siRNA-mediált csendesítést végeztünk. qPCR eredményeink azt mutatták, hogy a poly(I:C) indukált IL-23 mRNS expressziót elsősorban a TLR3 közvetíti NHEK sejtekben. Egyik receptor csendesítése sem befolyásolta a poly(dA:dT) IL-23 transzkripcióra gyakorolt hatását. Ugyanezeket a kísérleteket megismételtük HPV-KER sejtekkel is, ahol a TLR3 mellett más receptorok, mint például a RIG-1, IFIH1, cGAS is szabályozzák a poly(I:C) és a poly(dA:dT) által indukált IL-23 expressziót.

4.5. A szabad nukleinsavak által indukált IL-23 mRNS expressziójának szabályozása több jelátvivő útvonalon át történik

Vizsgálatainkban hat olyan útvonalat vizsgáltunk, amelyekről korábban kimutatták, hogy nukleinsavak hatását közvetítik. Ezen útvonalak egy-egy fő komponensének aktivitását specifikus inhibitorok alkalmazásával csökkentettük: Bay 11-7085 az NF- κ B (nukleáris faktor- κ B), a PD95089 a MEK1/2 (mitogén-aktivált protein-kináz), az SB203580 a p38, az SP600125 a JNK (c-Jun N-terminális kináz), a fludarabin a STAT-1 és a Stattic a STAT-3 esetében. A keratinocitákat a poly(I:C) vagy poly(dA:dT) transzfekció előtt egy órán keresztül előinkubáltuk az inhibitorokkal. Eredményeink azt mutatták, hogy a poly(I:C)-indukált IL-23 mRNS-expressziót a JNK, ERK1/2, NF- κ B és STAT3 útvonalak közvetítik a TLR3 receptoron keresztül. Ezen útvonalak egyikének gátlása sem volt azonban hatással a poly(dA:dT)-indukált IL-23 expresszióra. Továbbá azt is megfigyeltük,

hogy az NHEK sejtekhez hasonlóan a HPV-KER sejtekben is az ERK1/2 és NF- κ B útvonalak játszanak fontos szerepet a poly(I:C) által indukált IL-23 mRNS expresszió szabályozásában.

4.6. A PRINS hosszú nem-kódoló RNS hatása nagy donoronkénti különbséget mutat a nukleinsav-analógok által indukált IL-23 mRNS expressziójában humán keratinocitákban

A PRINS által közvetített szabályozás újabb célpontjainak azonosítására egy qPCR array vizsgálatot végeztünk. Ehhez a szintetikus nukleinsav-analógokkal való kezelés mellett a PRINS-t overexpresszáló konstrukciót tranziens módon transzfektáltuk NHEK sejtekbe. A qPCR-array-ben a megváltozott expressziót mutató gének között gyulladáshoz kapcsolódó gének, köztük citokinek, kemokinek, receptorok és effektor molekulák magasabb kifejeződését figyeltük meg. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PRINS kötődik az IL-6 és a CCL-5 mRNS-éhez, ami degradációjukhoz vezet. Ezek az mRNS-ek a qPCR-array-ben is csökkent kifejeződést mutattak, ami még inkább megerősíti eredményeinket. Érdekesnek tűnt, hogy egy másik, a pikkelysömörben szintén szerepet játszó citokin, az IL-23 mRNS-e is csökkent expressziót mutatott az array-ben. Ezt az eredményt sikerült megerősítenünk az array-ben szereplő donorokból származó mintákon.

A PRINS IL-23 mRNS szabályozásában betöltött szerepének további alátámasztása érdekében megvizsgáltuk a PRINS csendesítésének vagy overexpressziójának hatását a nukleinsav indukált IL-23 mRNS expresszióra további donorokból származó mintákon. Ezek a kísérletek megerősítették, hogy a PRINS overexpressziója jelentősen csökkentette az IL-23 mRNS expresszióját poly(dA:dT) kezelés után, míg poly(I:C) kezelés után kisebb mértékű csökkenés volt megfigyelhető. A PRINS expressziójának csendesítéssel történő csökkentése ellenkező előjelű eredményt adott. Méréseink azonban sok esetben nem mutattak statisztikai szignifikanciát, mivel a független donorokból származó minták között nagy interindividuíális különbségeket figyelhetünk meg.

Mivel korábban az IL-6 és a CCL-5 bioinformatikai elemzése során azonosítani tudtunk egy mRNS-lncRNS kötőhelyet, analizáltuk, hogy az IL-23 mRNS-ben is található-e PRINS-interakciós hely. Bioinformatikai módszerrel sikerült egy feltételezett kötőhelyet azonosítanunk az IL-23 mRNS-en. Mivel az IL-23 egy rendkívül polimorf gén, feltételeztük, hogy a donorok nukleinsav kezelésre adott válaszában megfigyelt nagy interindividuíális különbségek egyik fő oka az IL-23 feltételezett kötőhelyén lévő egynukleotidos variánsok (SNP-k) jelenléte lehet, amelyek befolyásolhatják a PRINS-kötődését. Ismert, hogy az IL-23 gén SNP-i kapcsolatba hozhatók a pikkelysömörre való hajlammal. Az IL-23 gén feltételezett kötőhelyén 13 SNP-t találtunk az NCBI adatbázisában. Minden donorból megszekvenáltattuk az IL-23 gén feltételezett kötőhelyét, és összehasonlítottuk a szekvenciákat, de a szekvencia-variánsok jelenléte vagy hiánya nem hozható összefüggésbe a PRINS-overexpresszióra adott IL-23-válasszal. A PRINS és az *in silico* azonosított IL-23 mRNS kötőhely közötti kölcsönhatás megerősítésére *in vitro* kötési kísérletet végeztünk, melyhez egy

luciferáz alapú vektor felhasználásával, amely a luciferáz gén 3' végén klónozó helyeket hordoz. Ebbe a vektorba illesztettük be az IL-23 mRNS feltételezett PRINS kölcsönható szekvenciáját (pmirGLO-IL23BS). Kötőpartner hiányában a transzfektált sejtek luciferáz aktivitást mutatnak. Ha a PRINS és az IL-23 mRNS-szekvencia között kölcsönhatás alakulna ki, a luciferáz mRNS destabilizálna, és a luciferáz aktivitás nem lenne mérhető. A sejtek pmirGLO-IL23BS- és PRINS-expresszázó plazmidokkal történő együttes transzfekciója során alig tapasztaltunk különbséget a luciferáz-aktivitásban a kötődési hely jelenlétében, illetve hiányában, ami arra utal, hogy az IL-23 mRNS és a PRINS között nincs fizikai kölcsönhatás ezen a szekvencián keresztül.

Megfigyeltük azonban, hogy a PRINS overexpresszió által okozott IL-23 mRNS csökkenés azokban a donor mintákban a legkifejezettebb, ahol a legnagyobb mértékű a nukleinsavakkal kiváltott IL-23 mRNS szint növekedés. A Pearson-féle korrelációs elemzés megerősítette a szignifikáns, mérsékelten negatív korrelációt a nukleinsav indukált IL-23 mRNS expresszió növekedés és a PRINS overexpresszió hatására bekövetkező csökkenés mértéke között. Ez arra utal, hogy az IL-23 mRNS megfelelően magas indukált szintje szükséges a PRINS IL-23 mRNS expressziójára gyakorolt szabályozó hatásának érvényesüléséhez.

5. Diszkusszió

Az RNS- és DNS-fragmentumok keratinocitákban való felhalmozódása a professzionális és nem professzionális immunsejtek veleszületett immunfolyamatait indukálják, ezáltal patogén szerepet játszanak a pikkelysömör tüneteinek kialakulásában. Az IL-23 alegységeinek és receptorának fokozott expressziója a pikkelysömörös bőrben, arra utal, hogy ez a citokin is szerepet játszik a pikkelysömörös gyulladásban. A szabad nukleinsavak IL-23 expressziójára gyakorolt hatásának részletei azonban még nem tisztázottak.

A dolgozatomban leírt kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy a nukleinsav kezelés hogyan szabályozza az IL-23 mRNS expresszióját keratinocitákban. Eredményeink azt mutatták, hogy mind a poly(I:C), mind a poly(dA:dT) indukálja az IL-23 mRNS expresszióját a keratinocitákban, de eltérő mértékben és eltérő kinetikával. A keratinocitákban már több nukleinsav érzékelő specifikus PRR-t írtak le, ezek a receptorok felismerik a saját és patogén eredetű RNS- és DNS-fragmentumokat, és gyulladásos mechanizmusokat indukálnak. Ismert, hogy az RNS és a DNS fragmentumokat a PRR-ek nem azonos módon ismerik fel. A TLR3 felismeri a vírusokból származó duplaszálú (ds) RNS-eket, valamint a poly(I:C)-t, és elengedhetetlen az IL-12p40 alegység termeléséhez. A TLR3-ról azt is kimutatták, hogy az IRF6-on keresztül indukálja az IL-23p19 expresszióját. A RIG-I és az IFIH1 a RIG-szerű receptorok közé tartozik. A RIG-I túlnyomórészt rövid dsRNS-t, míg az IFIH1 a vírusokból származó hosszú dsRNS-t érzékeli. Korábban kimutatták, hogy poly(dA:dT)-t az RNS-polimeráz III dsRNS-é írja át, mielőtt a RIG-I felismerné, ami magyarázatot adhat a poly(I:C) és a poly(dA:dT) kezelés közötti kinetikai különbségekre. Nemrégiben a cGAS-t írták le, mint a citoszolikus DNS-fragmentumok felismerésének fő PRR-jét. Arra vonatkozó vizsgálatok még nem ismertek, hogy ezek a receptorok részt vesznek-e a keratinociták IL-23 termelésében. A poly(I:C)-mediált IL-23 mRNS-expresszió csökkent a TLR3 csendesítésével az NHEK és a HPV-KER sejtekben, míg egyik vizsgált receptor csendesítésének sem volt hatása a poly(dA:dT)-indukált IL-23 mRNS-expresszióra az NHEK sejtekben. Mindazonáltal hangsúlyozzuk, hogy a poly(dA:dT)-kezelést követő indukció szintje soha nem közelítette meg a poly(I:C) kezelés által indukált szintet, ami magyarázatot adhat a csendesítési kísérletek negatív eredményeire. A HPV-KER sejtekben azonban magasabb IL-23 expressziós szintet figyeltünk meg poly(dA:dT) kezelés hatására.

Kísérleteinket négy egészséges donorból izolált NHEK-sejteken végeztük, azonban még ebben a kis adathalmazban is jelentős különbségeket figyeltünk meg az egyes minták között. Ezek az eredmények felhívják a figyelmünket arra a fontos tényre, hogy az egyének milyen eltérő érzékenységgel reagálhatnak különböző ágensekre. Az NHEK- és HPV-KER-sejtek között is különbségeket figyelhettünk meg: az NHEK sejtekben a TLR3 a legfontosabb receptor a nukleinsav

indukálta IL-23 termelésben, míg a HPV-KER-sejtekben az összes vizsgált receptor csendesítése a nukleinsav indukált IL-23 transzkripció szintjének csökkenését okozta.

Az NF- κ B jelátviteli útvonal befolyásolja a limfociták és a keratinociták túlélését, proliferációját és anti-apoptotikus folyamatait, és a TNF- α ezen az útvonalon keresztül indukálja a Th17 gyulladáskeltő citokinek termelését a pikkelysömörös elváltozásokban. Eukarióta sejtekben három MAPK kaszkádot azonosítottak: ERK, JNK és p38. Az ERK jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a sejtek proliferációjában és differenciálódásában, míg a JNK és a p38 útvonalakat elsősorban a sejtek stresszre adott válaszreakcióival és apoptózisával hozták kapcsolatba. A JAK/STAT, másnéven IL-6 jelátviteli útvonal számos biológiai folyamatban, például a sejtproliferációban, differenciálódásban és apoptózisban vesz részt, és számos immun- és gyulladási betegséggel is szoros kapcsolatban áll.

Az ERK-1, JNK, NF- κ B és STAT3 útvonalak gátlása a keratinociták poly(I:C)-indukált IL-23 mRNS expressziójának csökkenését eredményezte, ami arra utal, hogy ezen útvonalak komponensek mindegyike szerepet játszhat a citoszolikus RNS fragmentek által indukált az IL-23 mRNS termelésében. Ezen útvonalak blokkolása nem eredményezte az IL-23 expresszió teljes lecsengését, ami arra utal, hogy más, például a TLR3-tól induló IRF6 útvonal is szerepet játszhat az IL-23 transzkripció szabályozásában. Összegezve, a poly(I:C) által indukált IL-23 expresszió a keratinocitákban elsősorban a TLR3 által vezérelt és több párhuzamos útvonal aktiválásával közvetített. Érdekes módon, hasonlóan a fő nukleinsav-érzékelő PRR-ek csendesítéséhez, egyik fő útvonal gátlása sem volt hatással a poly(dA:dT)-indukált IL-23 mRNS-expresszióra, ami arra utal, hogy a DNS-indukált IL-23 mRNS-expresszióban eddig még nem azonosított alternatív receptorok és útvonalak is jelentősek lehetnek.

A PRINS hosszú, nem kódoló RNS hozzájárul az epidermisz gyulladásmentes állapotához, mivel közvetlenül kötődik a gyulladáskeltő molekulák mRNS-éhez (IL-6 és CCL-5) ami azok destabilizációjához vezet. A PRINS további célmolekuláinak gyulladási körülmények között történő azonosítására nukleinsav indukciót alkalmaztunk a PRINS overexpressziója során.

A PRINS overexpressziója a nukleinsav indukált IL-23 mRNS expressziójának csökkenéséhez vezetett. A kísérletbe bevont donorok számának növelése azonban arra engedett következtetni, hogy a független donorok között nagy egyéni különbségek vannak. Az IL-23 mRNS *in silico* azonosított feltételezett kötőhelyén megvizsgáltuk a lncRNS-mRNS kölcsönhatást befolyásolható SNP-k jelenlétét. A különböző donorok feltételezett kötőhelyének szekvenálása azonban nem mutatott összefüggést a szekvencia-variánsok jelenléte és a PRINS overexpresszióra adott nukleinsav indukált IL-23 mRNS-válasz között. Az IL-23 mRNS feltételezett kötőhelye és a PRINS lncRNS-molekula közötti közvetlen kölcsönhatást a luciferáz alapú kötő-assay sem igazolta. Mivel a nagyobb donor számú vizsgálatok során úgy tűnt, hogy a nukleinsavak által indukált IL-23 mRNS expresszió szintje

befolyásolja a PRINS overexpresszió hatását, ezért korrelációs vizsgálatot végeztünk, amely megerősítette a nukleinsav indukálta IL-23 mRNS-expresszió szintje és a PRINS overexpresszió hatására bekövetkező csökkenés közötti lehetséges negatív összefüggést. Mindez arra utal, hogy a PRINS szabályozó szerepének a kimutatásához elég magas nukleinsav indukált IL-23 mRNS-szintre van szükség és a PRINS közvetett módon, nem pedig az IL-23 mRNS-sel való közvetlen kölcsönhatás révén fejtheti ki hatását.

Általánosságban az az elképzelés terjedt el, hogy pikkelysömörben az IL-23-at professzionális immunsejtek szabadítják fel, eredményeink azonban azt erősítik, hogy ez a citokin keratinocitákból is származhat. A nukleinsavak számos PRR-t aktiválnak ezekben a sejtekben, amelyek gyulladásozó molekulák, köztük az IL-23 expressziójának növekedéséhez vezet. Így a bőrben lévő keratinocitákból származó nukleinsavak is hozzájárulhatnak a pikkelysömör kialakulásához azáltal, hogy autokrin módon megemelik a keratinociták IL-23 szintjét. Adataink arra utalnak, hogy adott nukleinsav szintekre az egyének különböző érzékenységgel reagálhatnak, amely eltérő IL-23 expresszióhoz vezethet. Ezek az egyénekenkénti különbségek összefügghetnek a pikkelysömör kezelésében alkalmazott biológiai szerekekkel szembeni eltérő reakciókkal, ezért ezeknek a folyamatoknak a részletes elemzése segíthet új biomarkerek azonosításában és a betegség személyre szabott kezelésének kifejlesztéséhez.

6. Összefoglalás

Munkánk során jellemeztük a dsRNS és dsDNS által indukált IL-23 transzkripció szabályozásának részleteit humán epidermális keratinocitákban és HPV-KER sejtekben.

- Összehasonlítottuk a dsRNS és a dsDNS által indukált IL-23 mRNA expressziót humán epidermális keratinocitákban. Azt találtuk, hogy a szintetikus dsRNS és a dsDNS analóg poly(I:C)-vel és poly(dA:dT)-vel történő transziens transzfecció különböző mértékben és eltérő kinetikával indukálta az IL-23 transzkripcióját keratinocitákban.
- A mintafelismerő receptorok csendesítése azt mutatta, hogy a TLR3 a fő receptor, amely közvetíti az IL-23 mRNA expresszió szintjének poly(I:C) specifikus szabályozását mind az NHEK, mind a HPV-KER-sejtekben, azonban a HPV-KER-sejtekben más receptorok is hozzájárulnak ehhez a folyamathoz.
- Kimutattuk, hogy az ERK-1, JNK, NF- κ B és STAT3 útvonalak gátlása a nukleinsav indukált IL-23 mRNA expresszió csökkenését eredményezte a keratinocitákban.
- Eredményeink arra utalnak, hogy a szabad nukleinsavak hozzájárulnak a pikkelysömör kialakulásához azáltal, hogy specifikus receptorokon és jelátviteli útvonalakon keresztül növelik az IL-23 szintjét a keratinocitákban.
- A qPCR array alapján elmondható, hogy a nukleinsavak által indukált IL-23 mRNA expresszió mértékét a PRINS-szintjének emelése megváltoztathatja. Ezt az eredményt megerősítettük a donorok számának növelésével és a PRINS szintjének növelésével vagy csökkentésével a keratinocitákban.
- Mivel nagyon nagy eltéréseket figyeltünk meg a különböző egyénekből származó minták között, megvizsgáltuk a donorok IL-23 gén polimorfizmusait, az *in silico* azonosított PRINS kötőhelyen, de nem találtunk összefüggést a variánsok megjelenése és a PRINS overexpresszióra adott IL-23 válasz között. Az IL-23 feltételezett kötőhely és a PRINS lncRNS molekula közötti kölcsönhatást a luciferáz alapú assay-ben sem tudtuk kimutatni.

Összességében adataink arra utalnak, hogy a szövetekben lévő nukleinsavak szintje iránti egyéni érzékenységbeli különbségek eltérő IL-23-szintekhez vezethetnek, ami magyarázatot adhat a pikkelysömör kezelésében alkalmazott biológiai szerekkel szembeni eltérő reakciókra is. Ezeknek a folyamatoknak a részletes elemzése segíthet új biomarkerek azonosításában, amik a betegség személyre szabott kezelésének kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat témavezetőimnek, Dr. Széll Márta professzor asszonynak és Dr. Danis Juditnak, munkám folyamatos támogatásáért és felügyeletéért. Mindig mellettem álltak, amikor szükségem volt az útmutatásukra és támogatásukra, ugyanakkor kellő önállóságot is biztosítottak számomra a tudományos munkám során.

Szeretném megköszönni Dr. Kemény Lajosnak professzor úrnak a lehetőséget, hogy a Szegedi Tudományegyetem, Bőrgyógyászati-és Allergológiai klinikáján végezhettem a tanulmányaimat.

Ugyancsak hatalmas köszönettel tartozom Dr. Ádám Évának a munkámmal kapcsolatos ötleteiért és észrevételeiért a kéziratok elkészítése során.

Köszönöm Koósné Majzik Hedvignek a kiváló technikai segítséget.

Hálás vagyok kollégáimnak, Dr. Göblös Anikónak, Dr. Bolla Beáta Szilviának, Dr. Erdei Lillának és Dr. Bozó Renátának, hogy megismertették velem a kutatási technikákat és, hogy mindig a segítségemre álltak, ha szükségem volt rá.

Szerencsés vagyok, hogy a kutatócsoportban végzett munkám során a Szegedi Tudományegyetemről Sági Stella Márta egyetemi hallgató munkájának az irányításában is részt vehettem. Ő is hozzájárult ahhoz a munkához, amely a jelen Tézis eredményeihez vezetett.

Külön köszönöm barátaimnak és családomnak az állandó támogatást, bátorítást és végtelen szeretetet, különösen a vőlegényemnek, aki a legtürelmesebb ember a világon, és soha nem engedte, hogy feladjam.

A tanulmány elkészítését a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal több kutatási ösztöndíjjal (OTKA K128736 és OTKA FK134355), valamint az EU Horizon 2020 Kutatási és Innovációs Program 739593 támogatta.