

# **A megváltozott porc oligomer mátrix fehérje potenciális szerepe pikkelysömörben**

**Bozó Renáta**

PhD értekezés tézisei

Témavezető:

Dr. Groma Gergely



Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika  
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Szeged

2020

## KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemény

I. **Bozó R**, Szél E, Danis J, Gubán B, Bata-Csörgő Z, Szabó K, Kemény L, Groma G. Cartilage Oligomeric Matrix Protein Negatively Influences Keratinocyte Proliferation Via  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin: Potential Relevance of Altered Cartilage Oligomeric Matrix Protein Expression in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2020 Feb 11; doi: 10.1016/j.jid.2019.12.037. [Epub ahead of print]

IF: 6,290\* (Folyóirat szakterülete: Scopus – Dermatology, Helyzete: D1)

### Egyéb közlemények

II. Erdei L, Bolla BS, **Bozó R**, Tax G, Urbán E, Kemény L, Szabó K. TNIP1 Regulates Cutibacterium acnes-Induced Innate Immune Functions in Epidermal Keratinocytes. *Front Immunol.* 2018;9:2155. doi: 10.3389/fimmu.2018.02155.

IF: 4,716 (Folyóirat szakterülete: Scopus – Immunology, Helyzete: Q1)

III. Tripolszki K, Danis J, Padhi AK, Gomes J, **Bozó R**, Nagy ZF, Nagy D, Klivényi P, Engelhardt JI, Széll M. Angiogenin mutations in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis: Clinical, genetic, computational, and functional analyses. *Brain Behav.* 2019;9(6):e01293. doi: 10.1002/brb3.1293.

IF: 2,072\* (Folyóirat szakterülete: Scopus - Behavioral Neuroscience, Helyzete: Q2)

IV. Szél E, **Bozó R**, Hunyadi-Gulyás É, Manczinger M, Szabó K, Kemény L, Bata-Csörgő, Z, Groma, G. Comprehensive Proteomic Analysis Reveals Intermediate Stage of Non-Lesional Psoriatic Skin and Points out the Importance of Proteins Outside this Trend. *Sci Rep.* 2019 0;9(1):11382 doi: 10.1038/s41598-019-47774-5.

IF: 4,011\* (Folyóirat szakterülete: Scopus – Multidisciplinary, Helyzete: D1)

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. pikkelysömör, mint gyulladásos bőrbetegség jellemzői

A plakk típusú pikkelysömör (másnéven pszoriázis, *Psoriasis vulgaris*) a globális népesség 1-3%-át érintő, krónikus gyulladásos, multifaktoriális, immun-mediált bőrbetegség, amely száraz, vörös, pikkelyes fontokkal jellemezhető. A betegség patomechanizmusa csak részben ismert, és jelenleg csupán tüneti kezelés áll rendelkezésre. A pikkelysömörös plakkok fő jellemzője a keratinociták hiperproliferációja és megváltozott differenciálódása, amely masszív immunsejt-infiltrációval párosul. A szekretált citokinek és kemokinek kulcsszerepet töltenek be a betegség iniciálásában. A léziók kialakulását feltehetően az immunrendszer túlzott reakciója indítja el. Ezt követi a keratinociták citokinekre adott válasza, amely proliferációban, aktivációban, valamint proinflammatorikus mediátorok (citokinek, kemokinek, antimikrobiális peptidok) szekréciójában nyilvánul meg, erősítve ezzel a gyulladásos választ. Az életkor, valamint a genetikai és immunpatogén tulajdonságok alapján a krónikus plakk típusú pikkelysömörnek két különálló altípusa különböztethető meg: a korai és késői pszoriázis. A korai kezdetű 40 éves korban, vagy annál korábban jelentkeznek, és a betegek 75% -át érinti, míg a késői pszoriázis 40 éves kor után jelentkezik először, és a betegek 25% -át érinti.

Genetikai faktorok fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában. Legalább tizenöt úgynevezett pikkelysömörre hajlamosító lókuszt (psoriasis susceptible loci: PSORS) ismert a humán genomon. A 6. kromoszómán a fő hisztokompatibilitási komplex régiójában található PSORS1 lókuszt felelős a betegség genetikai eredetének 30-50% -áért. A PSORS1 lókuszon a HLA-Cw6 allél gyakoribb előfordulását figyelték meg korai kialakulású pikkelysömörös betegcsoportban. Emellett a teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatokkal ötven olyan ún. egyedi nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphisms: SNP) került azonosításra a humán genomon, amelyek összefüggésbe hozhatók pikkelysömörrel. A genetikai faktorok mellett környezeti hatások egyaránt befolyásolhatják a betegség kialakulását, beleértve a stresszt, a fizikai traumát, a dohányzást és az alkoholfogyasztást.

### 1.2. A pikkelysömörös tünetmentes bőr elváltozásai

Ismertek a betegek egészségesnek kinéző, tünetmentes bőrén olyan elváltozások, melyek hozzájárulhatnak a léziók kialakulásához. A dermális extracelluláris mátrix (ECM) és a bazális membrán (BM) is mutathat elváltozásokat már a betegek tünetmentes bőrén is. A betegek tünetmentes bőréből származó keratinocitákról ismert, hogy ún. „pre-aktivált” állapotban

vannak a hiperproliferációra, mivel ezek a sejtek érzékenyebbek a stresszre és a proliferációs jelekre. Az ECM fehérjék közül a sejtek megtapadását segítő fibronektinről ismert, hogy kifejeződése megváltozik a tünetmentes bőrben. Kutatócsoportunk korábbi munkája során megállapításra került, hogy a tünetmentes bőrből izolált fibroblasztok és a bazális keratinociták nagymértékben kifejezik a fibronektin splice variánsát, az extra A domént tartalmazó, ún. EDA+ fibronektint (EDA+FN). Továbbá a tünetmentes bőr dermo-epidermális junction (DEJ) területén integrinek is megnövekedett kifejeződést mutatnak, beleértve a fibronektin receptor  $\alpha 5\beta 1$ -integrint. Az EDA+FN és  $\alpha 5\beta 1$ -integrin megnövekedett kifejeződése pedig hozzájárulhat a keratinocita proliferáció indukálásához. Ezen túlmenően ismert, hogy a DEJ régióban a BM laminin rétegének folytonossága helyenként megszakad, ezáltal megváltozik a keratinociták kapcsolódása a BM-hoz.

A patomechanizmus jobb megértése érdekében kutatócsoportunk által korábban elvégzésre került egy széles spektrumú proteomikai vizsgálat, amelyben összehasonlításra került a pikkelysömörös betegek tünetmentes és tünetes proteomja egészséges kontrollokéval. Ebben a vizsgálatban a porc oligomer mátrix fehérjét (cartilage oligomeric matrix protein: COMP) emelkedett szinten azonosítottuk a pikkelysömörös tünetmentes bőrben.

### **1.3. A COMP fehérje struktúrája, funkciói és interakciós partnerei**

A COMP az ECM nem-kollagén típusú, 524-kDa-os, homopentamer szerkezetű, glikoprotein komponense. A trombospondin családkhoz tartozik, amely tagjainak fő funkciói közé tartozik az ECM organizációja és újra rendezése, átszervezése. A COMP homopentamer szerkezete az N-terminális ún. coiled-coil doménon keresztül jön létre, kialakítva így egy rugalmas csokor-szerű molekulát, amely lehetővé teszi, hogy a COMP több celluláris és extracelluláris komponenssel egyidejűleg képes legyen interakcióba lépni.

A COMP főként porcban expresszálódik, de megjelenik az inakban, ínshalagokban, szinóviomban, valamint simaizomsejtek, kardiomiociták, aktivált vérlemezkék is termelik, emellett pedig megjelenik a bőrben is.

Számos interakciós partnere közül a COMP az ECM-ben képes kapcsolatba lépni az I-es és III-as típusú kollagénnel és a fibronektinnel is. Ezen ECM fehérjéket pedig korábban már mind összefüggésbe hozták pikkelysömörrel.

Emellett a COMP sejtfelszíni fehérjékkel való közvetlen kölcsönhatások révén -mint az integrin család  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  és  $\alpha v\beta 3$  tagjai-, befolyásolhatja a sejtek viselkedését. Az  $\alpha 5\beta 1$ -

integrinről pedig ismert, hogy a pikkelysömör patogenezisében lezajló folyamatok modulálásában van szerepe, ideértve a gyulladásoos válaszokat és a keratinocita proliferációt.

#### **1.4. COMP szerepe különböző betegségekb**

Ismert, hogy a COMP gén autoszomális domináns mutációi olyan szkeletális megbetegedéseket okoznak, mint a pszeudoakondroplázia és többszörös epifízis diszplázia. A COMP fehérje jelenléte a szérumban és az ízületi folyadékban pedig biomarkerként szolgál az ízületi porcot érintő gyulladásoos betegségekb, mint reumás rendellenességek, beleértve a reumatoid és pszoriázisos artrítiszt.

#### **1.5. A COMP szerepe a bőrben**

Az egészséges bőrben a COMP fehérjét a fibroblasztok termelik, a papilláris dermiszben lokalizálódik, és úgy tartják, hogy ECM stabilizálásán túl biztosítja a kohéziót a dermisz felső rétegét rögzítő plakkok és a BM között. A COMP dermiszben történő felhalmozódása ismert különféle bőrbetegségekb, ideértve a lokalizált sclerodermát, a vénás lábfekélyben szenvedő betegek sebeit és váladékait, a bazál-sejtes karcinóma fibrotikus sztrómáját és a keloidokat. Bár a bőrben a COMP felhalmozódása számos bőrbetegség esetén fokozódik, pikkelysömörrel összefüggésben ezidáig nem állnak rendelkezésre adatok.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

A pikkelysömör olyan gyulladásoos bőrbetegség, amelyben a betegek tünetmentes bőre magában hordoz elváltozásokat, amelyek hajlamosíthatnak a léziók kialakulására. Ezek a változások érintik a DEJ régiót, ahol a fibronectin splice variánsa, az EDA+FN és az  $\alpha 5\beta 1$ -integrin megnövekedett expressziót mutat, valamint ahol a BM laminin rétege nem mutat folytonos kifejeződést.

Egészséges bőrben a COMP a DEJ régióban helyezkedik el, és köztudott, hogy biztosítja a kohéziót a dermisz felső rétegét rögzítő plakkok és a BM között. Ezen túlmenően más szövetekben kimutatták, hogy közvetlenül kapcsolódhat az  $\alpha 5\beta 1$ -integrinnel és fibronectinnel is. Korábbi proteomikai vizsgálatunkban megnövekedett COMP fehérje szintet azonosítottuk a tünetmentes bőrben szemben az egészséggel. Ezen korábbi eredmények alapján célul tűztük ki a COMP fehérje pikkelysömör patomechanizmusában betöltött potenciális szerepének vizsgálatát az alábbiak szerint:

- a COMP fehérje eloszlásának megvizsgálása, összehasonlítva az egészséges, a pikkelysömörös tünetmentes és tünetes bőrt.
- a COMP fehérje szintjének meghatározása az egészséges, a tünetmentes és tünetes bőrben.
- a COMP mRNS-szintű kifejeződésének összehasonlítása egészséges és tünetmentes donorok bőréből izolált fibroblaszt kultúrákban.
- a COMP lehetséges interakciójának vizsgálata a bazális keratinocitákkal a nem folytonos kiterjedésű BM-on keresztül, összehasonlítva az egészséges és a tünetmentes bőrt
- a DEJ régió további tanulmányozása, ezen belül a COMP lehetséges kapcsolatának vizsgálata egy potenciális interakciós partnerrel, az EDA+FN-nel -amelyről ismert, hogy befolyásolja a keratinociták viselkedését- összehasonlítva az egészséges és a tünetmentes bőrt.
- a COMP keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* és *ex vivo*.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Bőrminták gyűjtése**

Bőrbiopsziákat gyűjtöttünk egészséges önkéntesektől (n=10, kor: 18-70 év) és közepesen súlyos vagy súlyos állapotú krónikus plakk típusú pikkelysömörös betegek tünetmentes (minimum 6 cm-re a tünetes területtől) és tünetes bőrterületeiről (n=13, kor: 18-70 év). A szövetminták gyűjtését előzetes írásbeli hozzájárulást követően végeztük, összhangban a Helsinki Nyilatkozat szabályaival. A vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Kutatási Etikai Bizottsága engedélyezte (PSO-EDAFN-002, 34/2015, 3517, 2015. február 23.; PSO-ECMPR-002 IF-562-5/2016 és; 157/2015-SZTE, 3638, 2015. szeptember 21.).

#### **3.2. Fehérje izolálás és western blot analízis**

A szöveti fehérje extraktumok készítéséhez a bőr-biopsziákat (egészséges, tünetmentes és tünetes) borotvapengével apró darabokra vágtuk, majd 6M guanidin-hidroklorid-oldatban végeztük a fehérje kivonást 24 órán át 4 °C-on. A fehérje extraktumokat (25 µg) 4–20% SDS-poliakrilamid grádiens gélen szeparáltuk redukáló és nem redukáló körülmények között. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottolást követően szobahőmérsékleten 60 percig blokkoltuk 5%-os sovány tejpport tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (TBS), majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk anti-humán COMP- és aktin primer antitestekkel, majd torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel 60 percig szobahőmérsékleten. Az előhívást kemilumineszcens módon végeztük.

### **3.3. Fluoreszcens mikroszkópos analízis**

A fluoreszcens festéshez használt bőrmintákat kriogél mátrixban lefagyasztottuk vagy paraffinba ágyztuk, majd 5 µm-es metszeteket készítettünk. A fixáláshoz 4%-os paraformaldehidet, majd a permeabilizációhoz 0,25%-os TritonX-100 oldatokat vagy a kereskedelemben kapható előregyártott fixáló/permeabilizáló kitet használtuk. A paraffinos minták blokkolásához 1% szarvasmarha-szérum albumint és 1% normál kecskeszérumot tartalmazó TBS-t használtunk, a fagyasztott mintákhoz pedig -melyeket előzetesen kondroitináz ABC-vel emésztettünk-, 10% fetális borjú szérumot (FBS) és 5% kecskeszérumot tartalmazó TBS-t alkalmaztunk. A mintákat a következő anti-humán primer antitestekkel inkubáltuk: COMP, β1-integrin, aktin, Ki67, keratin-17 (KRT17), laminin alpha-1 (LAMA1), EDA+FN. Másodlagos ellenanyagként Alexa Fluor 546 és 647-tel konjugált IgG-t használtunk. A sejtmagokat 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festéssel vizualizáltuk. A vizualizációhoz Zeiss LSM 880 vagy Zeiss Axio Imager Z1 mikroszkópokat használtunk. Pearson R korrelációs együtthatóját ImageJ/Fiji szoftver alkalmazásával számoltuk ki.

### **3.4. RNS izolálás és valós idejű RT-PCR**

Egészséges donorok és pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrmintáiból származó primer fibroblaszt sejtekből az ötödik passzálást követően TRI-reagenssel RNS mintavételt végeztünk, majd RNS izolálást követően cDNS szintézist. Ezután valós idejű RT-PCR-t hajtottunk végre COMP és 18S rRNS primerekkel.

### **3.5. Sejtenyésztés és a sejtek tulajdonságainak vizsgálata**

#### **3.5.1. Sejtenyésztés**

Az egészséges és a tünetmentes bőrbioptziákból primer fibroblasztokat izoláltunk, az egészséges bőrmintákból pedig normál humán epidermális keratinocitákat (NHEK) is. A keratinocitákat az epidermális részből nyertük ki, majd a sejteket keratinocita szérumentes tápközegben tenyésztettük, kiegészítve 1% antibiotikum/antimikotikummal (AB/AM), agyi hipofízis kivonattal és epidermális növekedési faktoral. A fibroblasztokat a dermális részből nyertük ki és 1 g/l glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápoldatban tenyésztettük, kiegészítve 5% FBS-sel, 1% AB/AM-mel és 1% L-glutaminnal. Kísérleteinkben humán immortalizált keratinocita sejtvonalat, a HPV-KER-t is felhasználtuk, melynek tenyésztési körülményei megegyeznek az NHEK sejtekével. Mindegyik sejtípust 37 °C-on, nedvesített atmoszférában, 5% szén-dioxid mellett tenyésztettük.

### **3.5.2. A HPV-KER sejtek valós idejű vizsgálata xCELLigence rendszerben**

Az xCELLigence egy valós idejű, jelölést nem igénylő, impedancia-méréseken alapuló sejt-elemző rendszer, ahol ún. sejtindex érték generálódik. Ezt a rendszert alkalmaztuk a COMP fehérje keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A HPV-KER sejteket 10 000 sejt/lyuk sűrűségben osztottuk szét a 96 lyukú, speciális E-sejttenyésztő edény bevonatlan, alacsony koncentrációjú (1 µg/ml) vagy magas koncentrációjú (10 µg/ml) rekombináns humán COMP (rhCOMP) fehérjével bevont lyukakba. Az impedancia mérést 140 órán keresztül, 15 percnként végeztük, és minden időpontban kiszámításra került a sejtindex érték.

### **3.5.3. Sejtproliferációs esszé**

A COMP keratinociták proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálatára bróm-dezoxiuridin (BrdU) sejtproliferációs kolorimetriás ELISA vizsgálatot végeztünk. A HPV-KER és az NHEK sejteket 10 000 sejt/lyuk sűrűséggel osztottuk szét 96 lyukú sejttenyésztő edényre, amelyet bevonás nélkül, alacsony (1 µg/ml) vagy magas koncentrációjú (10 µg/ml) rhCOMP fehérjével bevonva használtunk. Az α5-integrin és a β1-integrin blokkolásához anti-humán α5- és β1-integrin antitesteket használtunk, a COMP fehérje blokkolására pedig anti-humán COMP antitestet alkalmaztunk. Az integrin- és a COMP-blokkolást bevonatlan, vagy 10 µg/ml rhCOMP fehérjével bevont felületen tenyésztett sejteken végeztük. A BrdU vizsgálatot a blokkolás után 24 és 72 órával végeztük el.

### **3.5.4. A keratinociták proliferációjának további vizsgálata**

A COMP NHEK sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának további vizsgálatára Ki67 immunfluoreszcens festést alkalmaztunk, az integrinek és a COMP-fehérje blokkolása mellett, melyeket a fent leírtak alapján végeztünk. A sejteket 20 000 sejt/lyuk sűrűséggel osztottuk szét 8-osztatú sejttenyésztő kamrára, amelyeket a korábbiakkal megegyező módon bevonat nélkül vagy magas koncentrációjú (10 µg/ml) rhCOMP-fehérjével bevonva alkalmaztunk. A Ki67 pozitív sejteket csoportonként három véletlenszerűen kiválasztott területen leszámoltuk és statisztikai elemzést végeztünk.

### **3.6. *Ex vivo* sebgyógyulás modell**

Az *ex vivo* organotipikus sebgyógyulás modellt egészséges bőrmintákon végeztük. Körülbelül 1 cm átmérőjű bőrmintákat használtunk, melyek közepét enyhén megsebesítettük. Ezeket a bőrmintákat és a sebzés nélküli kontroll mintákat 72 órán át tenyésztettük levegő-folyadék határfelületen az ún. transzwell sejttenyésztő betétek felső részén. A bőrmintákat a



dermális rész felől, 10% FBS-sel és 1% AB/AM oldattal kiegészített DMEM F12 tápfolyadékkal tápláltuk. A sebek középső részét 72 órán át magas koncentrációjú (10 µg/ml), foszfáttal puffereelt sóoldatban (PBS) feloldott rhCOMP-fehérjével kezeltük, kontrollként pedig PBS kezelést alkalmaztunk. 72 óra elteltével a mintákat formalinnal fixáltuk és paraffinba ágyasztuk, majd immunfluoreszcens festést végeztünk. A proliferáció mértékének meghatározásához az egyes sebek szélén 50 sejtet leszámoltunk, és meghatározzuk a Ki67 pozitív sejtek arányát. A sebzés nélküli kontroll, a kezeletlen, és a COMP-kezelt sebek re-epitelizációjának mértékét pedig területméréssel határoztuk meg, az ImageJ szoftver segítségével.

### **3.7. Hematoxin-eozin festés és fénymikroszkópos elemzés**

Az *ex vivo* sebgyógyulásmodellek szöveti szerkezetének vizsgálatára hematoxin-eozin festést alkalmaztunk Leica ST5020 multistainer készülékkel a gyártó utasításai szerint. A festett mintákat Nikon eclipse TS100 mikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.8. Statisztikai elemzés**

Két csoport összehasonlításához kétmintás t-próbát alkalmaztunk, több, mint két csoport összehasonlításához pedig egyszempontos varianciaanalízist Tukey post hoc teszttel. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$  esetén.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A COMP fehérje megemelkedett szinten van jelen a pikkelysömörös tünetmentes bőrben**

A tünetmentes bőr papilláris dermiszében korábban már számos ECM-beli eltérést azonosítottak. Korábban beszámoltak már arról is, hogy egészséges bőrben a COMP szintén jelen van a papilláris dermiszben, ezért megvizsgáltuk a COMP kifejeződését a pikkelysömörben szenvedő betegek tünetmentes és tünetes bőrterületein, összehasonlítva az egészséges egyének bőrével. A COMP fehérjét western blot vizsgálattal detektáltuk redukáló és nem redukáló körülmények között. Redukáló körülmények között megnövekedett COMP monomer- és fragment szintet detektáltunk a tünetmentes fehérjekivonatokban az egészséges bőrhöz viszonyítva.

#### **4.2. A COMP fehérje megváltozott kifejeződést mutat a pikkelysömörös betegek bőrében**

Ezt követően immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk a COMP kifejeződését a különböző bőrtípusokban (egészséges, tünetmentes és tünetes). Vizsgálatainkban -a korábbi vizsgálatoknak megfelelően- a COMP fehérjét az egészséges bőr papilláris dermiszében azonosítottuk. A tünetmentes mintákban viszont a COMP szorosan az epidermisz alatt helyezkedett el és mélyebben terjedt ki a dermiszben, szemben az egészséggel. Ezzel szemben a tünetes bőrben a COMP kifejeződése a papilláris dermiszben nem volt folytonos, és kiterjedt egészen a retikuláris dermisz felső részéig.

#### **4.3. COMP mRNS szintű kifejeződése magasabb a tünetmentes bőrből származó fibroblasztokban**

Mivel a bőrben a fibroblasztok a COMP fehérje fő termelői, ezért megvizsgáltuk egészséges és tünetmentes bőrterületekről származó primer fibroblasztok COMP mRNS kifejezését. A tünetmentes fibroblasztokban megnövekedett COMP mRNS expressziót figyeltünk meg.

#### **4.4. A tünetmentes bőrben a COMP kolokalizációja gyakoribb az EDA+FN-nel és a bazális keratinociták által kifejezett $\beta$ 1-integrinnel, és kevésbé gyakori a LAMA1-gyel**

Ismert, hogy a COMP kölcsönhatásba lép az integrin sejtfelszíni receptorcsalád több tagjával, köztük az  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrinnel, amelynek expressziója az EDA+FN-nel együtt megemelkedik a tünetmentes bőrben, feltehetően a sérült BM miatt. A COMP és a tünetmentes bőr DEJ régiójában változást mutató fehérjék közötti lehetséges kölcsönhatások vizsgálatához kettős immunfluoreszcens festést végeztünk konfokális mikroszkópos analízissel, majd elemeztük ugyanazon területek egymást követő metszeteit.

COMP –  $\beta$ 1-integrin immunfluoreszcens kettős festést alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk, hogy a COMP felhalmozódása a DEJ-régióban lehetővé teszi-e kölcsönhatást a bazális epidermális keratinocitákkal. A COMP az egészséges és tünetmentes bőr papilláris dermiszében is részleges együttes kifejeződést mutatott a bazális keratinociták által kifejezett  $\beta$ 1-integrinnel. Azonban a két fehérje kolokalizációja szignifikánsan magasabb volt a tünetmentes bőrben.

A LAMA1 a BM laminin rétegének egyik alkotóeleme, amely a tünetmentes bőrben széttöredezett mintázatot mutat és olykor hiányzik. Feltételeztük, hogy a tünetmentes bőr sérült

BM-ja lehetővé teszi-e a COMP és a  $\beta$ 1-integrin kölcsönhatását, ezért LAMA1 – COMP kettős immunfestést alkalmaztunk. A tünetmentes bőrben a COMP –  $\beta$ 1-integrin kettősen pozitív régiók szakaszos LAMA1 festési mintázatot mutattak, valamint a COMP és a LAMA1 együttes előfordulása is szignifikánsan alacsonyabb volt a tünetmentes bőrben, szemben az egészséges bőrrel.

Továbbá ismert, hogy a fibronectin kölcsönhatásba lép a COMP fehérjével, ezért COMP – EDA+FN kettős immunfluoreszcens festéssel egybekötött konfokális mikroszkópos analízist alkalmaztunk. Azokon a területeken, ahol a COMP és a  $\beta$ 1-integrin együttes lokalizációja nyilvánvaló volt, megfigyeltük, hogy a COMP és az EDA + FN részleges kolokalizációt mutat, melynek intenzitása szignifikánsan magasabb volt a tünetmentes bőrben az egészségeshez viszonyítva.

#### **4.5. A COMP negatív hatással van a keratinociták proliferációjára *in vitro***

A COMP és a  $\beta$ 1-integrin közötti kölcsönhatás keratinocitákra gyakorolt lehetséges hatásának vizsgálatára először impedancia-méréseken alapuló, valós idejű celluláris elemzést végeztünk HPV-KER sejtvonal használatával. Amikor a tenyésztőedényt előzetesen különböző koncentrációjú rhCOMP fehérjével vontuk be, a sejtek a bevonásra használt fehérje dóziséstől függően alacsonyabb sejttindex értéket mutattak a bevonatlan felületen növesztett csoporthoz képest. A sejttindex értéket a sejtek proliferációja, viabilitása, morfológiája és adhéziója is befolyásolhatja, ezért BrdU sejtproliferációs esszét alkalmaztunk, hogy megvizsgáljuk, hogy a COMP befolyással van-e a HPV-KER sejtek proliferációjára. A felület előzetes magas koncentrációjú (10  $\mu$ g/ml) rhCOMP bevonása szignifikánsan csökkentette a sejtek proliferációjának mértékét a 24. és 72. órában, összehasonlítva a bevonatlan felületen tenyésztett sejtekkel. Az NHEK sejtek proliferációja szintén csökkent, amikor a felületet 10  $\mu$ g/ml rhCOMP fehérjével vontuk be.

#### **4.6. A COMP fehérje sejtproliferációra gyakorolt hatását az $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrinen keresztül fejté ki *in vitro***

Integrin-blokkoló kísérleteket végeztünk, hogy megvizsgáljuk, hogy az integrinek lehetnek-e a közvetítők a COMP sejtproliferációra gyakorolt negatív hatásának. Az  $\alpha$ 5- vagy  $\beta$ 1-integrin alegység blokkolása a 10  $\mu$ g/ml rhCOMP fehérjével előzetesen bevont felületen növesztett sejtekben megszüntette a COMP negatív hatását a HPV-KER sejtek proliferációjára, míg az  $\alpha$ 5- vagy  $\beta$ 1-integrin blokkolása önmagában nem mutatott negatív hatást a sejtek

proliferációjára. Hasonlóképpen, ha COMP, vagy  $\alpha 5$ - vagy  $\beta 1$ -integrin blokkoló antitestet használtunk, abban az esetben is megszűnt a COMP negatív hatása a NHEK sejtek proliferációs sebességére BrdU esszével és a Ki67 immunfluoreszcens festéssel vizsgálva is.

#### **4.7. A COMP *ex vivo* sebgyógyulás modellben negatív hatást fejt ki a seb gyógyulási folyamataira, azáltal, hogy csökkenti a keratinociták proliferációját, és negatívan befolyásolja a keratinocita sejtek migrációját és aktivációját**

A COMP keratinocitákra gyakorolt hatásának további vizsgálatához *ex vivo* sebgyógyulás modellt alkalmaztunk. A sebzést követően 72 órával vizsgáltuk a rhCOMP fehérje kezeléssel vagy anélkül tenyésztett sebzett mintákat, és a sebzés nélküli kontrollokat. Immunfluoreszcens festéssel ki tudtuk mutatni a sebzett régió dermális felületén a hozzáadott rhCOMP fehérjét a COMP-kezelt sebekben. Ki67 immunfluoreszcens festést alkalmazva a proliferáló sejtek detektálására, megállapítottuk, hogy jelentősen csökkent a Ki67 pozitív sejtek száma a rhCOMP-kezelt sebekben, jelezve a proliferáció mértékének csökkenését.

A sebgyógyulási folyamatban a sérülés záródásakor a sejtmigráció a seb szélein együtt jár az aktin citoskeleton dinamikus átszerveződésével a sebhez közeli keratinocitákban. Ezen sejtek megjelenítéséhez aktin immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. Azoknál a mintáknál, ahol nem alkalmaztunk COMP kezelést, a keratinociták magas szintű aktin expressziót mutattak a seb szélein, míg a COMP-kezelt sebek széleinél az aktin kifejeződés jelentősen csökkent, ami arra utal, hogy a COMP negatívan befolyásolja az aktin kifejeződését, ezáltal pedig a sejtek migrációját.

A KRT17 kifejeződése indukálódik a seb gyógyulása során a seb szélein elhelyezkedő keratinocitákban, ezért a COMP sebgyógyulásra gyakorolt hatásának további vizsgálatára KRT17 immunfluoreszcens festést végeztünk az *ex vivo* sebgyógyulás modelleken. Az rhCOMP fehérjével kezelt sebekben a KRT17 expressziója és a re-epithelizáció mértéke csökkent és a keratinociták kisebb hányadára korlátozódott, mint a kezeletlen kontroll sebeknél. Ez arra utal, hogy a COMP jelenléte negatív hatással volt a keratinociták aktiválódására.

## **5. DISZKUSSZIÓ**

A pikkelysömörös betegek tünetmentes bőre magában hordoz olyan elváltozásokat -az egészséges bőrhöz képest-, melyek érintik az extracelluláris mátrixot. A COMP az egészséges bőrben a papilláris dermiszben lokalizálódik, és a XII-es és XIV-es típusú kollagénekkel való kölcsönhatásán keresztül hozzájárul a DEJ stabilizálásához. Munkánk során megállapítottuk,

hogy a tünetmentes bőrben a COMP a papilláris dermiszben lokalizálódik, viszont az egészséges bőrrel ellentétben folyamatosabb és kompaktabb, réteget képez a bazális keratinociták alatt. Ezen a megváltozott lokalizáción túl a tünetmentes bőrből izolált fibroblasztokban szintén emelkedett a COMP mRNA szintű kifejeződése.

A betegek tünetmentes bőre ismert, hogy stresszhatásokkal szemben érzékenyebb, valamint a DEJ-t és a BM-t érintő rendellenességek is fontos szerepet töltenek be a betegség kialakulásában. A BM folytonosságának megszakadásával lehetővé válik, hogy az ECM komponensek -amelyek közvetlenül a BM alatt helyezkednek el-, közvetlenül érintkezhessenek a bazális keratinocitákkal. Irodalmi adatok alapján a COMP közvetlenül kapcsolódhat a szív cardiomiocitái, és fibroblasztjai által kifejezett  $\beta 1$ -integrin extracelluláris doménjéhez, ezáltal részt vesz a  $\beta 1$ -integrin stabilizálásában azáltal, hogy megakadályozza annak lebomlását, így javítva a sejtek túlélését. Ismert továbbá, hogy porcszövetben a COMP befolyásolja a kondrociták letapadását és stabilizálását, részben az  $\alpha 5\beta 1$ -integrinen keresztül. Konfokális mikroszkópos elemzésünk alapján a COMP a papilláris dermiszben részleges együttes lokalizációt mutatott a bazális keratinociták által kifejezett  $\beta 1$ -integrinnel, ami jelzi a két fehérje közötti közvetlen interakció lehetőségét *in vivo*. A tünetmentes bőr bazális keratinocita rétegében az  $\alpha 5$ -integrin fokozott kifejeződést mutat, míg az egészséges bőrben tapasztalt kifejeződése alacsony, vagy teljesen hiányzik. Megállapításaink összhangban állnak ezzel a megfigyeléssel, mivel a COMP és a  $\beta 1$ -integrin együttes kifejeződése megemelkedik a tünetmentes bőrben, továbbá megemelkedik mindkét fehérje kifejeződése. Ezen túlmenően a tünetmentes bőrben részlegesen megszakad a BM, lehetővé téve a közvetlen kölcsönhatást a dermális ECM és a bazális keratinociták között. Ennek az interakciónak a lehetőségét támasztja alá az a megállapítás, hogy azokon a tünetmentes területeken, ahol a COMP és a  $\beta 1$ -integrin szoros kolokalizációt mutat, a BM-alkotó LAMA1 expressziója csökken vagy helyenként teljesen hiányzik.

Ismert, hogy a COMP kölcsönhatásba léphet az  $\alpha 7\beta 1$ - és az  $\alpha \beta 3$ -integrinekkal is. Ezek közül a fehérjék közül csak az  $\alpha 7\beta 1$  tartalmaz  $\beta 1$ -integrin alegységet. Jelenleg nincs információ az  $\alpha 7\beta 1$ -integrin expressziójáról a bazális keratinocitákban, tehát feltételeztük, hogy ha a COMP erőteljes kölcsönhatást mutat a  $\beta 1$ -integrinnel, akkor az  $\alpha$ -alegység valószínűleg nem lehet más, mint az  $\alpha 5$ -integrin. Amellett, hogy a COMP képes a fibronektin receptorával, az  $\alpha 5\beta 1$ -integrinnel interakcióba lépni, a COMP magához a fibronektin proteinhez is kötődhet. Az

$\alpha 5\beta 1$ -integrinnel asszociált EDA+FN pedig köztudott, hogy szerepet játszik a pikkelysömör patogenezisében. Egyes megközelítések szerint az  $\alpha 5\beta 1$ -integrin és az EDA+FN tünetmentes bőrben megemelkedett expresszióját a laminin réteg hiányossága okozza. Konfokális mikroszkópos elemzésünk feltárta a COMP és az EDA+FN részleges kolokalizációját a tünetmentes bőrben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy amellett, hogy a COMP kölcsönhat az EDA+FN-nel, a bazális keratinocitákat is befolyásolhatja az EDA+FN-nel és receptorával, az  $\alpha 5\beta 1$ -integrinnel való kölcsönhatása révén.

Az ECM fehérjék a különböző sejtfelszíni integrinokkal való kölcsönhatásuk révén hatással lehetnek a keratinocitákra, és ismert, hogy a bazális keratinociták kapcsolódása a megváltozott BM-hoz fokozhatja a sejtek proliferációját. Munkánk során elemeztük a COMP kölcsönhatásának jelentőségét bazális keratinociták által kifejezett  $\beta 1$ -integrin molekulával, valamint HPV-KER és NHEK sejtekkel *in vitro*. Megfigyeltük, hogy a COMP jelenléte mindkét sejttypusban csökkentette a keratinociták proliferációjának mértékét, és ez a hatás visszafordítható volt, ha a COMP fehérjét specifikus antitesttel blokkoltuk.

Továbbá megvizsgáltuk azt is, hogy a COMP negatív hatása a keratinociták proliferációjára kiterjed-e az  $\alpha 5\beta 1$ -integrinnel való kölcsönhatásra. Amennyiben specifikus antitestekkel részlegesen blokkoltuk vagy a  $\beta 1$ - vagy az  $\alpha 5$ -integrin alegységeket, úgy megszűnt a COMP negatív hatása a sejtproliferációra, ami arra enged következtetni, hogy a COMP a keratinociták proliferációjára gyakorolt negatív hatását az  $\alpha 5\beta 1$ -integrinen keresztül fejt ki.

*In vitro* megfigyeléseinket *ex vivo* sebgyógyulás modellben is teszteltük, és megfigyeltük, hogy a COMP kezelés késleltette a sebek gyógyulását, és ez a hatás csökkent keratinocita proliferációval és aktin-expresszióval járt, melyek mind fontos aspektusai a sebgyógyulás folyamatának. Ezen túlmenően a keratinociták KRT17 kifejezése, -amely a normális sebgyógyulás egyik jellemzője-, szintén csökkent COMP jelenlétében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a COMP negatív hatást fejt ki az *ex vivo* sebek gyógyulására.

Ismert, hogy az egészséges donorok gyógyuló sebeiben -ahol teljes re-epitelizáció figyelhető meg-, a COMP alig kimutatható. Hasonlóképpen a pikkelysömörös léziókban, ahol túlzott, és rendellenes keratinocita proliferáció figyelhető meg, ott a COMP kifejeződése nem folytonos, és gyakran hiányzik a papilláris dermisz régiójából. A COMP-deficiens egerek keratinocita proliferációjával vagy migrációjával kapcsolatban nem állnak rendelkezésre adatok, ellenben

az ismert, hogy a humán nem gyógyuló sebekben, mint például a vénás lábszárfekélyekben, a COMP szintje emelkedik. Megállapításaink összhangban vannak ezzel a megfigyeléssel.

Összességében vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a COMP kifejeződése megemelkedik a tünetmentes bőr papilláris dermiszében, ezáltal a COMP negatív hatást fejthet ki a keratinociták proliferációjára az  $\alpha 5\beta 1$ -integrin molekulán keresztül. A COMP ezen aspektusai pedig hozzájárulhatnak a tünetmentes epidermisz nem léziós, nem hiperproliferatív állapotának fenntartásához, annak ellenére, hogy az EDA+FN és az  $\alpha 5$ -integrin fokozott kifejeződést mutat. Hasonló interakciók előfordulhatnak más bőrbetegségekből is, amelyekben a nem gyógyuló sebeket masszív COMP felhalmozódás kíséri.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A pikkelysömörös tünetmentes bőr magában hordoz olyan elváltozásokat, amelyek érintik a DEJ régiót, ahol a BM laminin rétege nem mutat folytonos kifejeződést. Továbbá ebben a régióban a fibronektin splice-variánsa, az EDA+FN és az  $\alpha 5\beta 1$ -integrin fokozott expressziót mutat és felelős lehet a keratinocita hiperproliferáció kialakulásáért. Ismert, hogy a COMP sejtfelszíni receptorokon keresztül képes modulálni bizonyos sejtek viselkedését. Ezen túlmenően része az egészséges bőr papilláris dermiszének, viszont kifejeződését még nem vizsgálták korábban a pikkelysömörös bőrben.

Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a COMP mélyebb kiterjedést mutat a dermiszben, és kifejeződése folytonos a tünetmentes bőrben, szemben az egészséges bőrrel, míg a léziókban kifejeződése nem folytonos a DEJ régióban. Továbbá a COMP kolokalizációja a tünetmentes bőrben gyakoribb volt a bazális keratinociták által kifejezett  $\beta 1$ -integrinnel és az EDA+FN-nel, míg együttes kifejeződése csökkent a LAMA1-gyel. *In vitro* modelleinkben az exogén COMP jelenléte csökkentette a keratinociták proliferációjának mértékét. Az  $\alpha 5\beta 1$ -integrin blokkolása pedig megszüntette a COMP proliferáció csökkentő hatását.

Összességében eredményeink arra engednek következtetni, hogy a tünetmentes bőrben a COMP kölcsönhatása -a nem folytonosan kifejeződő LAMA1-en keresztül- a bazális keratinociták által kifejezett  $\alpha 5\beta 1$ -integrinnel hozzájárulhat a tünetmentes bazális keratinociták proliferációjának visszaszorításához, ezáltal fenntartva a tünetmentes epidermisz nem léziós, nem hiperproliferatív állapotát az EDA+FN és az  $\alpha 5\beta 1$ -integrin túlzott expressziója ellenére. A COMP antiproliferatív hatása pedig releváns lehet más bőrbetegségekből is, ahol a krónikus nem gyógyuló sebeket masszív COMP felhalmozódás kíséri.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Groma Gergelynek, aki javasolataival és technikai segítségével mindvégig támogatta a kutatási munkám.

Külön köszönetet szeretnék mondani Kemény Lajos Professor Úrnak és Bata-Csörgő Zsuzsanna Professor Asszonynak a lehetőségért, hogy doktori munkámat a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján végezhettem. Hálásan köszönöm segítségüket és a munkámhoz fűzött megjegyzéseikért. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabó Kornéliának a kézirat előkészítése során nyújtott segítségével.

Köszönettel tartozom Kollégáim Dr. Szél Edit, Dr. Danis Judit, Konczné Dr. Gubán Barbara, Dr. Buknicz Tünde, Dr. Göblös Anikó, Erdei Lilla és Bolla Beáta Szilvia szellemi és technikai segítségével. Köszönöm Kohajda Mónika technikai, és Dr. Manczinger Máté és Koncz Balázs statisztikai elemzésben nyújtott segítségét. Hálás vagyok Klinikánk orvosainak, Dr. Belső Nórának, Dr. Gál Brigittának, Dr. Vas Krisztinának és Dr. Kui Róbertnek a szövetminták vételéért.

Szeretnék köszönetet mondani Klinikánk összes dolgozójának, akik az évek során segítették a munkámat.

Különösen hálás vagyok Barátaim és Családtagjaim támogatásáért. Külön köszönetet szeretnék mondani Páromnak, aki mindvégig mellettem állt és folyamatosan bátorított engem.

Ez a tanulmány a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Iroda kutatási pályázatainak (OTKA PD116992, K111885 és GINOP-2.2.1-15-2016-00007) támogatásával, valamint az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával (TAMOP 4.2.4.A / 2-11-1 / 2012-0001 „Nemzeti Kiválósági Program” A2-SZGYA-FOK-13-0001) készült.

Hálás vagyok a Richter Gedeon Talentum Alapítvány (1103 Budapest, Gyömrői út. 19-21.) Ph.D ösztöndíjáért és az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválósági Programjának ösztöndíjaiért (UNKP-17- 3, UNKP-18-3), valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Programjának ösztöndíjáért (UNKP-19-3).