

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

A veleszületett immunitás szabályozásának vizsgálata
***in vitro* és *in vivo* rendszerekben**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Szász András

Témavezető: Dr. Nagy István

Szeged

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
2.1. A veleszületett immunrendszer	7
2.2. A Toll-szerű receptorok	8
2.2.1. A Toll-szerű receptorokon keresztüli jelátviteli útvonalak	11
2.3. A veleszületett immunitás effektor molekulái	13
2.3.1. Citokinek és kemokinek	13
2.3.2. Antimikrobiális peptidek	15
2.4. A veleszületett immunrendszer szabályozása	17
2.4.1. Epigenetika: kromatin módosítások	17
2.4.2. A mikroRNS-ek	19
2.4.3. A veleszületett immunitás negatív regulátorai: a TAM receptorok	21
2.5. A bőr veleszületett immunrendszere és a pikkelysömör	24
3. CÉLKITŰZÉSEK	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
4.1. A kísérletek során használt sejt kultúrák	29
4.2. Sejttenyészetek stimulálása	30
4.3. Transzfektálás	30
4.4. RNS tisztítás	30
4.5. Reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció	31
4.6. Hiszton extrakció	32
4.7. Citokinek mérése ELISA módszerrel	32
4.8. Totál fehérje extrakció	32
4.9. Fehérje meghatározás Western blot analízissel	32
4.10. Immunfluoreszcens festési eljárás a fehérjék detektálására	33
4.11. RNS extrakció bőrből származó biopszia mintákból	34
4.12. Statisztikai analízis	34
5. EREDMÉNYEK	35
5.1. Kísérleti modell	35
5.2. Gyulladás-keltő citokinek/kemokinek gén- és fehérje expressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben	36

5.3. Antimikrobiális peptidek génexpressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben	39
5.4. Hiszton fehérjék módosulásának dinamikája akut és krónikus gyulladásos modellben	41
5.5. Akut és perzisztens PGN indukció - mikroRNS-szintű - poszttranszkripcionális hatása	43
5.5.1. Keratinocitákban kifejeződő mikroRNS-ek expressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben	44
5.5.2. A miR-203 targetfehérjék, a p63 és SOCS3 gén- és fehérje expressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben	45
5.6. A veleszületett immunitás negatív szabályozóinak szerepe akut és krónikus gyulladásos modellben	47
5.6.1. A TAM receptorok gén- és fehérje expressziós mintázatának vizsgálata különböző mikrobiális ágenssel történt kezelés esetén professzionális immunsejtekben	47
5.6.2. A TAM receptorok génexpressziós mintázatának vizsgálata félprofesszionális immunsejtekben különböző mikrobiális ágenssel történt kezelés esetén	53
5.7. A veleszületett immunitást negatívan szabályozó TAM receptorok génexpressziós mintázatának vizsgálata pikkelysömör esetén	55
6. DISZKUSSZIÓ	57
6.1. A veleszületett immunfolyamatok transzkripcionális és poszttranszkripcionális szabályozása	57
6.2 A veleszületett immunitás és a TAM receptorok	64
7. ÖSSZEFOGLALÓ	70
8. SUMMARY	72
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	74
10. IRODALOMJEGYZÉK	75

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AB/AM	Antibiotic/antimycotic
AMP	Antimicrobial peptide
AP-1	Activator protein-1
APC	Antigen-presenting cell
CRC	Chromatin remodeling complex
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAS6	Growth arrest-specific 6
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HAT	Histone acetyltransferase
hBD	Human β -defensin
HDAC	Histone deacetylase
HRP	Horseradish peroxidase
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha receptor
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
mAb	Monoclonal antibody

MAL	MyD88 adaptor-like
MAP	Mitogen-activated protein
MHC	Major histocompatibly complex
miR	MicroRNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide oligomerization domain
pAb	Polyclonal antibody
PACT	Protein kinase RNA activator
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PGN	Peptidoglycan
PIC	Protease inhibitor cocktail
PMA	Phorbol-myristyl-acetate
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
poly I:C	Polyinosine-polycytidylic acid
ProS	Protein S
PRR	Pattern recognition receptor
PTK	Protein tyrosine kinase
RIG	Retionic acid-induced gene
RLR	RIG-like receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFM	Serum-free medium
SHBG	Sex hormon-binding globulin
SLE	Systemic lupus erythematosus
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAB	TAK-binding protein
TAK	Transforming growth factor (TGF)- β -activated kinase

TBS	Tris-buffered saline
TEB	Triton extraction buffer
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TLR	Toll-like receptor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRBP	Trans-activation response (TAR) RNA-binding protein
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β
TSA	Trichostatin A
UTR	Untranslated region

2. BEVEZETÉS

2.1. A veleszületett immunrendszer

Az emberi szervezetben a különböző mikroorganizmusok átmeneti vagy folyamatos jelenléte kapcsán számos olyan rendszerszintű jelátviteli mechanizmust leírtak már, melyek a kommenzalista, illetve patogén mikrobákkal való találkozáskor aktiválódnak. Noha az így kialakult kapcsolatok molekuláris természete még nem teljes egészében tisztázott, az immunrendszer működése során beindult szignalizációs utak a gazda-mikroba homeosztázis fenntartására, illetve antimikrobiális védekező mechanizmusok indukálására irányulnak.

Az alapvetően több szinten érvényesülő védelmi folyamatoknak két, egymással szorosan összefüggő része a veleszületett (természetes) és a szerzett (adaptív) immunrendszer (Janeway, 2002; Turvey, 2010). Habár a veleszületett immunitás fogalmának bevezetése Mechnikov nevéhez fűződve egészen az 1900-as évek elejéig húzódik vissza, az ezzel kapcsolatos tudományos munkák az utóbbi évtizedig háttérbe szorultak a szerzett immunrendszer folyamatainak vizsgálatával szemben. A filogenetikailag ősi, az egyedfejlődés igen korai szakaszától kezdve kifejeződő veleszületett immunitás két fontos feladatot tölt be: egyrészt a kültakaró, mint fizikai barrier után a szervezet elsődleges védelmi vonalaként egy gyors, percek, de legfeljebb néhány órán belüli választ indukál a mikrobiális fertőzésekkel szemben, másrészt pedig a kizárólag gerinces állatok körében meglévő, lassabban aktiválódó, de hosszabb és antigén specifikus szerzett immunválasz aktivációját segíti elő (Basset, 2003; Tosi, 2005; Turvey, 2010).

Ahhoz, hogy a veleszületett immunrendszer a kórokozók minél gyorsabb felismerését és eliminálását beindítsa, többféle stratégia is kialakult. Az endogén stresszt kiváltó úgynevezett veszély-asszociált molekuláris mintázatok (danger-associated molecular pattern; DAMP), valamint a 'missing self' molekulák detektálása mellett a rövid időn belüli válaszok a mikrobák patogén-asszociált molekuláris mintázatainak (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) csírávonal-kódolt mintázatot felismerő receptorok (pattern recognition receptor; PRR) segítségével történő felismerésén alapul (Bianchi, 2007; Turvey, 2010). Ezen receptorok limitált számát kompenzálja, hogy a természetes immunrendszer a kórokozók széles körében képes olyan konzervált szerkezetű PAMP-okat

észlelni, mint például a *Staphylococcus aureus*-eredetű peptidoglikán (PGN), vagy az *Escherichia coli* lipopoliszacharidja (LPS) (Akira, 2006).

A gazdaszervezet védelme mellett a természetes immunrendszer fontos regulátor szerepet tölt be a különböző gyulladásos betegségekben. Többek között veleszületett immunválaszok befolyásolják az asztma és atópia kialakulását, de számos autoimmun betegség, mint például az 1-es típusú diabétesz, gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease; IBD), szisztémás lupus erythematosus és a pikkelysömör esetén is meg lehet említeni (Cook, 2004; Ospelt, 2009).

A védekező mechanizmusokban kulcsfontosságúak azok a félprofesszionális és professzionális immunsejtek, melyek működése révén az infekcióra adott gyors immunválasz létrejöhet. Ezek közé a sejtek közé sorolhatók többek között a bőr epitelsejtjei, a hízósejtek, a dendritikus sejtek, mint antigén prezentáló sejtek (antigen-presenting cell; APC) és olyan fagocitózisa képes sejtek, mint a makrofágok és granulociták, továbbá a természetes ölősejtek és a $\gamma\delta$ T-sejtek (Basset, 2003; Nestle, 2009; Miller, 2011). Az anatómiai barriert is képező bőr keratinocitái, mint félprofesszionális immunsejtek indítják be azokat a veleszületett immunválaszokat, melyek a fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex; MHC) I-es és II-es osztályának, valamint kostimulátor molekulák (pl. CD80, CD86) kifejeződésének a megemelkedését idézik elő. Ezen túlmenően antimikrobiális ágensek termelése, illetve különböző gyulladásos effektor molekulák szekréciója révén a fertőzés helyére migrált T- és B-sejtek általi adaptív immunválaszok létrejöttét is eredményezi. Így az immunrendszer két részének aktiválásával az infekcióra adott hatékony védelem gyorsan létrejöhet (Barker, 1991; Basset, 2003; Zhao 2009).

2.2. A Toll-szerű receptorok

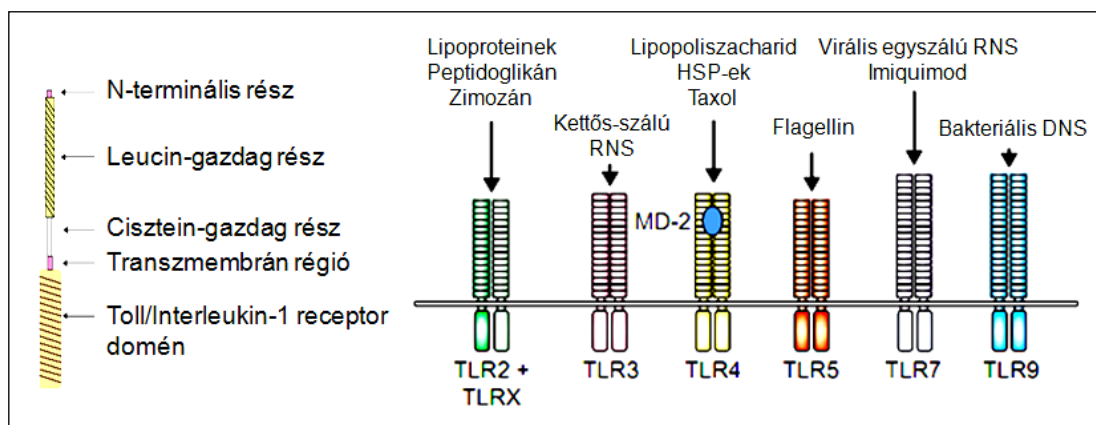
A veleszületett immunitásban szerepet játszó sejtek számos PRR-t expresszálnak, melyek a patogének különböző esszenciális mikrobiális struktúráit, a PAMP-okat ismerik fel. A virális patogénekre specifikus citoszólikus retinsav-indukált gén (RIG) -I-szerű receptorok (RLR), és a szintén intracellulárisan elhelyezkedő, stressz szignálokat érzékelő nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD) -szerű receptorok (NLR) mellett ide sorolhatóak a transzmembrán PRR-ok közül az ún. Toll-szerű receptorok (TLR) (Takeda; 2003; Akira, 2006; Turvey, 2009; Kumar, 2009).

A TLR-t először, mint a gombaellenes immunitásban és a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) ontogenezisekor a dorzoventrális polarizációban fontos szerepet játszó receptor írták le (Lemaitre, 1996). Emlősökben a TLR családnak 13 tagját azonosították, melyek számos sejttípuson - mint például makrofágok, neutrofilek, dendritikus sejtek, vagy epitélsejtek -, különböző mértékben expresszálódnak (Balaram, 2009). A TLR-oknak különböző celluláris lokalizációjuk van: a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 és TLR11 (ez utóbbi csak egerekben expresszálódik) a sejtek felszínén, a TLR3, TLR7, TLR8, valamint TLR9 intracelluláris vezikulákban (endoszóma, endoplazmatikus retikulum) elhelyezkedő csoportba sorolható (Janeway, 2002; Takeda, 2005; Kumar, 2009).

A Toll-szerű receptorok három strukturális egységből felépülő I-es típusú integrális membrán glikoproteinek (Kumar, 2009). Az extracelluláris N-terminális domén mintegy 16-28 leucin-gazdag részt tartalmaz (leucine-rich repeat; LRR) (Matsushima, 2007). Az intracelluláris C-terminális rész az interleukin-1 (IL-1) receptorral homológiát mutató Toll/Interleukin-1 receptor domén (TIR) (O'Neill, 2000; Doyle, 2006). Ez a struktúra, különböző adaptor molekulák segítségével további downstream jelátviteli utakat aktivál. A TLR-nak ligandjaikkal alkotott komplexeinek kristályszerkezeti vizsgálatai alapján elmondható, hogy mind heterodimer- (pl. TLR1-TLR2, TLR4-MD2), mind homodimer forma (pl. TLR3-TLR3) létrejöhet (Kumar, 2009).

A sokféle PRR-ek közül, melyek az opszonizációban, komplement aktivációban, és a fagocitózisban is részt vesznek, a TLR-ok kiemelkedően fontosak a patogének felismerésében, különböző gyulladások keltő mediátorok aktivációja révén a gyulladásos válaszok inicializálásában, és patogén-specifikus B- és T-sejtes adaptív válasz beindításában (Falgarone, 2005; Delgado, 2009). A TLR család tagjai a legtöbb patogént képesek detektálni, illetve egy adott kórokozó több receptorral is kölcsönhatásba léphet. Erre kitűnő példa a Gram-pozitív *Streptococcus pneumoniae*, amely a TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 és TLR9 által is felismert mikroorganizmusként számos downstream szignálmolekula aktiválódásával inflammációt idéz elő (Turvey, 2010).

A TLR által felismert PAMP-ok származhatnak vírusokból, baktériumokból, gombákból, valamint parazita protozoákból is (Akira, 2006). A sejtspecifikusan expresszálódó TLR-ok közül a sejtfelszínen lévők több esetben ún. koreceptorok közreműködésével konzervált szerkezetű mikrobiális struktúrákat ismernek fel (Akashi-Takamura, 2006).



1. ábra A Toll-szerű receptorok általános szerkezete, és az általuk felismert ligandok (Akira, 2003; módosítva)

Így például az elsőként azonosított humán Toll-szerű receptor, a TLR4 a virális F-protein és DAMP-ok, mint hő sokk proteinek vagy különböző extracelluláris mátrix proteinek - fibrinogén, fibronectin, heparin-szulfát és hialuron - mellett a Gram-negatív baktériumokból származó LPS-t, mint ligandot megkötve makrofágok potens aktivátoraként endotoxin sokkot idézhet elő. Véréramba kerülése után az LPS egy specifikus lipid transzfer fehérjéhez (LPS-binding protein; LBP) kötődik (Akira, 2003). A célsejteket elérve az LPS TLR4-en keresztül intracelluláris szignáltranszdukciós hatásához egy glikozilfoszfatidil-inozitol-kapcsolt membrán molekula, a CD14, valamint a vele komplexet alkotó MD-2 molekula jelenléte is szükséges (Shimazu, 1999; Akashi 2000). A TLR4 számos sejttípusban, mint például monocitákban, dendritikus sejtekben magas szinten expresszálódik, azonban alacsony szinten kifejeződik még B-sejteken, fibroblasztokon, asztrocitákon, keratinocitákon, miocitákon, endotél-, valamint epitélsejteken is (Frantz, 1999; Hornung, 2002; Song, 2002; Bsibsi, 2002). A TLR4 fontos szerepét kiemeli, hogy az Asp299Gly allél polimorfizmusa többek között növeli a Gram-negatív baktérium általi fertőzés és szepszis kialakulásának rizikóját (Lorenz, 2002).

Egy másik sejtfelszíni TLR, a monocitákban magas, de a limfocitákban alacsony szinten expresszálódó TLR2 többek között Gram-pozitív baktériumok struktúráit képes felismerni (Hornung, 2002). Érdekes, hogy a D3 vitamin jelenlétében megfigyelt csökkent TLR2 expresszióval szemben, sebgyógyulás alatt a keratinociták TLR2 kifejeződése 1,25-dihidroxi-D3-vitamin függő módon megemelkedik (Sadeghi, 2006; Schaubert, 2007). Aderem és munkatársai voltak az elsők, akik knockout egereken végzett kísérletek alapján leírták, hogy a TLR2 a ligandokat más TLR-okkal heterodimer formát alkotva ismeri fel

(TLR1/TLR2 és TLR2/TLR6) (Ozinsky, 2000). A TLR2 R753Q mutációt hordozó egyének az atópiás dermatitisz egy bizonyos fenotípusát mutatva, megemelkedett IgE antitest szinttel, illetve *S. aureus* kolonizációra való erősebb hajlammal jellemezhetők (Ahmad-Nejad, 2004).

Az endoszómális TLR-ok elsősorban nukleinsavat érzékelnek, mint például egyszálú RNS-t (TLR7), duplaszálú DNS-t (TLR9), illetve a TLR3 esetén kettős szálú virális RNS-t (Alexopoulou, 2001).

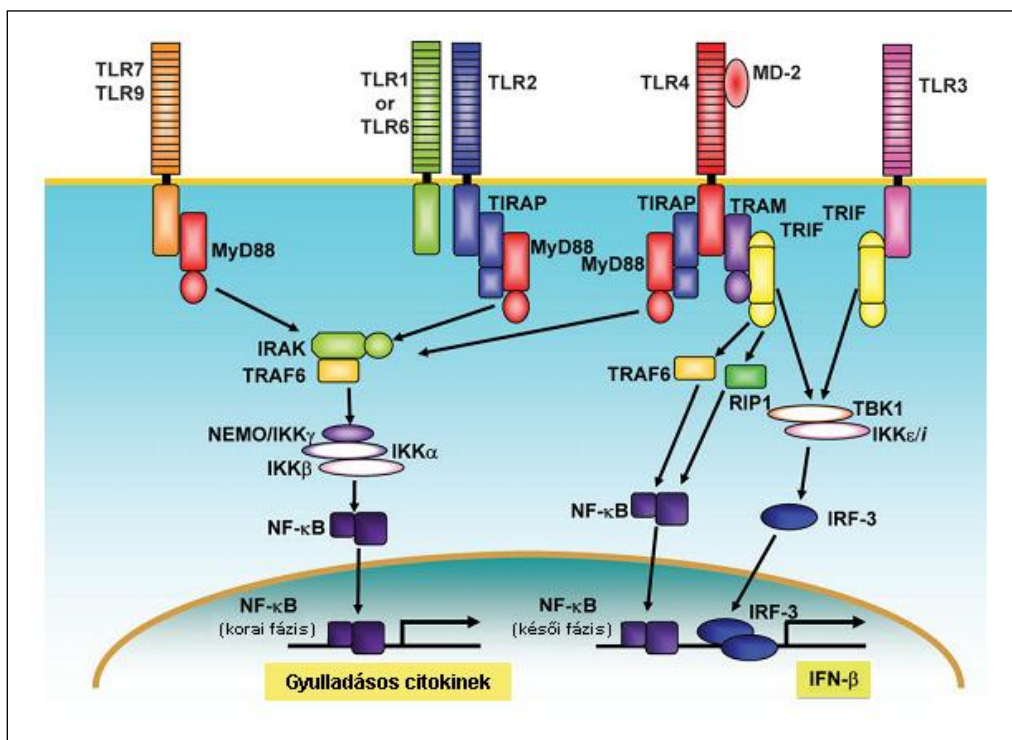
A TLR3 legnagyobb mértékben dendritikus sejtekben, makrofágokban, hízósejtekben, és természetes ölősejtekben fejeződik ki. Azonban a receptor megtalálható nem-immun sejtekben is, úgymint fibroblasztokban, keratinocitákban, asztrocitákban, oligodendrocitákban, epitel-, valamint endotélsejtekben (Brentano, 2005; Tissari, 2005; Lebre, 2007). A sejtek többségében a TLR3 endoszómálisan lokalizált, azonban például fibroblasztok esetén, sejtfelszínen is kifejeződik (Matsumoto, 2002). A TLR3 leggyakrabban használt szintetikus analóg ligandja a poly I:C (Jiang, 2003).

2.2.1. A Toll-szerű receptorokon keresztüli jelátviteli útvonalak

A Toll-szerű receptorok különböző mikrobiális ágensekkel történő stimulációja számos, az immunfolyamatokban szerepet játszó gént aktiválnak. A mikrobák TLR általi felismerése a receptorok homo- vagy heterodimerizációját eredményezi, mely által létrejött downstream mechanizmusok különböző TIR domént tartalmazó adaptor fehérjét igényelnek (O'Neill, 2000). A TLR jelátviteli mechanizmusok alapvetően két csoportra oszthatók a résztvevő adaptorok által: MyD88-függő- és MyD88-független szignalizációs útvonalakra (Akira, 2004; Akira, 2006).

A MyD88-függő útvonalat a TLR3-on kívül minden TLR használja, és olyan gyulladásos mediátorok aktivációját eredményezi, mint például a TNF- α és az IL-12 (Takeda, 2005). A TLR-ok stimulációja után az aktivált IRAK a TRAF-6 által két lehetséges szignalizációs útvonalat indíthat be. Az egyik a MAP kinázokon (p38, JNK, ERK1/2) keresztüli AP-1 transzkripciós faktor indukálását fogja eredményezni. A másik útvonal a TAK1/TAB komplexen, illetve I κ B kinázon (IKK) keresztül az NF- κ B transzkripciós faktor nukleáris transzlokációját idézi elő (Zhang, 2001; Akira, 2004; Akira, 2006). A sejtmagban az NF- κ B gyulladáskeltő citokinek, antimikrobiális peptidek, indukálható enzimek és adhézións molekulák génjeinek promóter régiójához kötődve indukálja ezeknek a veleszületett és adaptív immunfolyamatokban fontos szerepet játszó

effektoroknak és mediátoroknak a kifejeződését (Pahl, 1999; Mercurio, 1999). A MyD88-függő jelátviteli mechanizmusban, magának a MyD88-nak kiemelkedő szerepe van (Adachi, 1999). MyD88-deficiens egerek esetén a TLR aktiválása után elmarad a gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-12) termelése. Így elmondható, hogy a MyD88 esszenciális a TLR általi inflammatórikus gének aktivációja szempontjából.



2. ábra A TLR jelátviteli útvonalak a receptorok citoplazmatikus TIR doménjén keresztül aktiválódnak. Ennek során a TIR domént tartalmazó adaptor MyD88 a TLR-ok citoplazmatikus TIR doménjeivel asszociálva az IRAK receptorhoz történő kötődését segíti elő. Az IRAK a TRAF6 aktiválásán keresztül az I κ B kináz komplex (IKK; IKK α , IKK β és NEMO/IKK γ együtt) működését indítja be, melynek eredményeképpen a foszforilált I κ B az NF- κ B nukleáris transzlokációjával gyulladásos citokinek termelését indukálja. A TIRAP, mint TIR domént tartalmazó adaptor a TLR2 és TLR4 MyD88-függő jelátviteli útvonalaiban játszik szerepet. A TLR3- és TLR4-mediálta szignáltranszdukció az IRF-3-on keresztül az IFN- β képződését MyD88-független módon végzi. A harmadik TIR domént tartalmazó adaptor TRIF a MyD88-independens út lezajlásakor esszenciális. A TRAM, mint további adaptor a TLR4-mediálta MyD88-független/TRIF-függő jelátvitelben szükséges. (Takeda, 2005; módosítva)

Ugyan a MyD88-deficiens makrofágokban a TLR4-indukált inflammatórikus citokinek termelése nem figyelhető meg, azonban késleltetett kinetikával az NF- κ B aktivációja igen (Kawai, 1999). Mindezek azt bizonyítják, hogy a MyD88-függő TLR4-

mediálta citokin termelés mellett, létezik egy MyD88-független mechanizmus is a TLR4 jelátvitelben. Ez esetben a TLR4 stimuláció az IRF-3 transzkripció faktoron keresztül éri el az NF- κ B késői, MyD88-független aktivációját (Kawai, 2001). A TLR4-indukált IRF-3 aktiváció IFN- β termelését eredményezi, mely a STAT-1-en keresztül számos interferon (IFN) -indukált gént serkent (Doyle, 2002; Hoshino, 2002; Toshchakov, 2002). Virális infekció vagy kettős szálú RNS is képes az IRF-3-at aktiválni, következésképpen a TLR3-mediálta indukció is folyhat IRF-3-on keresztül, ami által az IFN- β MyD88-független indukciója következik be (Yoneyama, 1998).

A TLR jelátviteli utakban bekövetkezett károsodások többféle humán primer immundeficienciával is összefüggésbe hozhatóak (Casrouge, 2006; de Diego, 2010; Casanova, 2011). MyD88 és IRAK4 hiány esetén az érintett egyéneknél állandóan visszatérő piogén bakteriális fertőzéssel kell számolni, melyre adott inflammatórikus válaszok - elsősorban gyerekkorban - igencsak gyengék. A MyD88- és IRAK4 génmutációk fenotípusos azonosságot mutatnak: az érintettek 80%-nál *Streptococcus pneumoniae* által okozott pneumonia, míg harmaduknál súlyos *S. aureus*-eredetű bőrfertőzés jelentkezik (Picard, 2003; Ku, 2007; von Bernuth, 2008).

2.3. A veleszületett immunitás effektor molekulái

A patogén mikrobák kapcsolatba kerülve a gazdaszervezettel olyan molekulák szekrécióját eredményezik, melyek által generált vészjelek fontosak más, veleszületett immunfolyamatokban résztvevő effektorok aktiválásához, egyfajta akut gyulladásos reakció kialakulása közben. A kórokozók által kiváltott lokális változások mellett szisztémás hatások is tapasztalhatók elsősorban azoknak a kémiai modulátoroknak köszönhetően, melyek szerepet játszanak a sejtek nekrozisában, apoptózisában, a mikroba internalizációjában, illetve a különböző betegségek indukálásában (Basset, 2003).

2.3.1. Citokinek és kemokinek

A szolubilis, kisméretű polipeptid- vagy glikoprotein mediátorok heterogén csoportja, melyeket együttesen citokineknek neveznek, annak a komplex hálózatnak képezi a részét, mely az immun- és gyulladásos folyamatok szabályozását segíti elő. Ide tartoznak az interleukinok (IL), interferonok (IFN), növekedési faktorok, és a kemokinek is, melyek a citokinek egy alcsoportját képezik. A legtöbb immunsejt, de hasonlóképpen más típusú gazdasejt is képes citokinek termelésére, citokinek receptorokon keresztüli megkötésére,

vagy mindkettőre. A sejtek által termelt citokinek mennyisége, illetve az egyes citokinek hatásai közötti kapcsolat azonban nagyban befolyásolja a bonyolult, összetett immunfolyamatok kimenetelét (Tosi, 2005).

A gyulladások keltő citokinek közül kiemelt jelentőséggel bír a TNF- α és az IL-1, melyeknek pleiotróp hatásuk van az immunológiai-, gyulladásos-, metabolikus folyamatokra, és a hematopoézisre (Beutler, 1989; Oppenheim, 2001). A TNF- α -t eredetileg, mint 'cachectin', az IL-1-et, mint 'endogén pirogén' írták le, utalva arra, hogy ezek a citokinek többek között lázas állapot kialakulását idézik elő (Beutler, 1989; Oppenheim, 2001). Számos olyan fiziológiai változás, mely egy Gram-negatív mikroba okozta szepszis során létrejön, ugyanúgy reprodukálható pusztán ezeknek a citokineknek állatokba történt injektálásával. Az injektált dózistól függően a láz mellett hipotenzió, illetve neutrofilia vagy leukopénia alakulhat ki. A Gram-negatív fertőzés okozta endotoxikus sokk során a mononukleáris fagociták TNF- α és IL-1 termelése a bakteriális LPS általi TLR aktiválás után indul meg. Megemelkedett mennyiségük más citokinek és kemokinek, lipid mediátorok, stb. termelését is beindítja. Többek között mindkét citokin elősegíti az IL-6, egy kevésbé hatékony citokin termelését, amely azonban jónéhány, az IL-1-hez és TNF- α -hoz hasonló hatást idézhet elő (Oppenheim, 2001). Továbbá az endoteliális sejtek és leukociták adhéziós molekuláinak expresszálasát is indukálják, a CXCL8 (korábban IL-8) kemokin szekretálásának serkentésével a leukociták migrációját is elősegítve, valamint a neutrofilek fagocitózisos aktiválását (Beutler, 1989; Cohen, 2002).

A kemokinek, melyek kisméretű citokin-szerű polipeptidek egy alcsoportja, G fehérje-kapcsolt receptorokhoz kötődve fontos szerepet töltenek be az immunfolyamatokban, mint sejtaktivátorok, elsősorban az immun- és inflammatórikus sejtek direkt migrációját indukálva (Rossi, 2000; Baggiolini, 2001; Kim, 2004). A gyulladt szövetek sejtjei – melyek többféle kemokin receptort is expresszálnak –, a különböző baktériumokkal és vírusokkal szembeni megfelelő védekező mechanizmusok beindítása végett immunsejtekre specifikus kemokineket bocsátanak ki (Glass, 2003; Kim, 2004). Egy a kulcsfontosságú kemokinek közül, az epitélium által is termelt CXCL8, amely potens kemoattraktáns a granulociták, mint a veleszületett immunitás egyik fő effektor sejtjei számára. Más kemokinek, mint például a CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL3 és CCL4 a természetes ölüsejteknek és makrofágoknak a fertőzés helyére történő odahívását kezdeményezik (Basset, 2003).

A célzott irányú Th1- és Th2-típusú immunfolyamatok jelzik a szoros együttműködést a citokinek és kemokinek között, meghatározva ezzel a különböző kórképekben az infekciókra adott immunválaszok típusát (Bisset, 2005). A celluláris válaszok specifikussága erősen függ az adott szövetből felszabaduló kemokinektől, a vaszkuláris adhéziós molekulák jelenlététől, a különböző leukocita populációk által expresszált kemokin receptoroktól, és a leukociták specifikus adhéziós molekuláitól (Glass, 2003; Kim, 2004; Bisset, 2005). A citokinek és kemokinek a gazdaszervezet válaszában közvetlen fázisában fontosak a dendritikus sejtek érésében, így kapcsolva össze a veleszületett és szerzett folyamatokat, effektor sejteket aktiválva, az akut gyulladásos reakciót felerősítve, növelve az intracelluláris 'killing'-et és visszaszorítva a behatoló mikroorganizmusok terjedését. Mindezek alapján is elmondható, hogy a citokinek és kemokinek fontos modulátorai mind a veleszületett, mind az adaptív immunválaszoknak (Henderson, 1996; Luster, 2002).

2.3.2. Antimikrobiális peptidek

A napjainkig megismert több száz antimikrobiális peptid (AMP) különböző kisméretű, leginkább kationos jellegű polipeptid csoportot képezve a többsejtű élőlényekben baktériumok, gombák, paraziták és vírusok elleni széles spektrumú citotoxikus hatással rendelkeznek (Ganz, 1999; Lehrer, 2002; Zasloff, 2002; Ganz, 2003).

Számos tanulmány szól arról, hogy az emberi bőr által expresszált AMP-eknek szerepük van a veleszületett immunfolyamatokban (Gallo, 1998; Nizet, 2001; Ong, 2002). Ezeknek a természetes antibiotikumoknak az expressziós szintje nagyon jól korrelál a bőr infekcióval szembeni fogékonyságára. AMP-ek nagy mennyiségben vannak jelen például a gyulladt pikkelysömörös bőrben, mely a bakteriális és gombafertőzésekkel szemben ellenálló. Ezzel szemben atópiás dermatitiszes (ekcémás) betegek léziós bőrterületén nagyon alacsony a szintjük, így folyamatos bakteriális, gomba és/vagy virális patogénnel történő felülfertőzés jellemzi a betegséget (Lübbe, 2003).

Az AMP-ek mennyisége elsősorban egy patogénnel történt fertőzéskor, illetve az epidermisz sérülését követően emelkedik meg jelentősen. A PAMP-ok általi antimikrobiális gének aktiválása tovább növekedhet a gyulladás helyén a keratinociták, illetve egyéb, az immunfolyamatokban résztvevő sejtek által termelt gyulladásokeltő citokinek hatására (Harder, 1997; Frohm, 1997; Schröder, 1999; Liu, 2002; Heilborn, 2003; Harder, 2004). A legtöbb keratinocita-eredetű AMP a defenzinek, katelicidinek és az

RN-áz géncsaládjába tartozik, melyek képesek elpusztítani, vagy inaktíválni a mikroorganizmusok széles spektrumát többek között pórusokat formálva azok membránján. A normál és/vagy fertőzött epidermiszben expresszáldó S100 fehérjecsalád, valamint a szarurétegből izolált antileukoproteáz, mint további AMP-ek folyamatos jelenlétükkel szintén hozzájárulnak a kórokozók elleni hatékony küzdelemhez, illetve a normál homeosztázis fenntartásához (Pivarcsi, 2005).

Az AMP-ek patogének elleni immunfolyamatokban betöltött összetett szerepét jól tükrözi, hogy az antimikrobiális hatáson túl hízósejtek, neutrofilek, monociták és T-sejtek gyulladásos területre történő migrációjában és a bőr re-epitelializációjában is potenciális résztvevők (De Y, 2000; Dorschner, 2001; Niyonsaba, 2002; Heilborn, 2003). Fontos tény, hogy a fertőzéskor a veleszületett immunfolyamatok során termelt AMP-ek a célsejtek membránjának permeabilizálásakor szinergisztikus hatásuk révén növelik a kórokozó baktériumokkal szembeni antimikrobiális potenciált (Nagaoka, 2000).

Az AMP-ek egy igen fontos csoportját alkotják a β -defenzinek, melyeket tulajdonképpen az összes humán epiteliális sejtvonal képes expresszálni (Bals, 2000; Ganz, 2003). A humán β -defenzin-1 (hBD-1) volt az első izolált hBD, melyet az epidermális keratinociták konstitutívan termelnek, és elsősorban Gram-negatív baktériumok (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ellen hatásos (Fulton, 1997; Ali, 2001). A keratinocitákból klónozott hBD-3 és hBD-4 széles spektrumú antimikrobiális hatást mutat a multirezisztens Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokkal szemben (Harder, 2001; Harder, 2004).

A defenzinek közül a hBD-2-t (DEFB4) eredetileg pikkelysömörös léziós bőrből izolálták, mely vizsgálatok alapján ez a defenzin a bőr védelmében és a gyulladásban is érintett (Harder, 1997). A hBD-2 génkifejeződés egy fontos szabályozója az NF- κ B transzkripció faktor, ami a keratinocitákban a mikrobák TLR-mediálta felismerés után aktiválódik (Pivarcsi, 2003; Mempel, 2003). Valójában a hBD-2 expressziója mind Gram-pozitív patogének (például *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*), mind Gram-negatív baktériumok (például *P. aeruginosa*, *E. coli*) által indukálódik (Harder, 1997; Chadebech, 2003; Dinulos, 2003; Chung, 2004; Harder, 2004). A Gram-negatív baktérium indukálta erős hBD-2 kifejeződés a mikroba elpusztítását vonja maga után, így ritka a Gram-negatív mikroorganizmusok által okozott bőrfertőzés. A Gram-pozitív baktériummal való találkozás utáni jelentős hBD-2 expresszió - figyelembe véve, hogy a hBD-2 főleg Gram-negatív kórokozók ellen hatásos, viszont Gram-pozitív mikrobákkal szemben nem - azt mutatja, hogy a hBD-2-nek más szerepe lehet a Gram-pozitív baktériumok elleni

immunválaszban, mint a direkt elpusztítás. A hBD-2 dendritikus sejtek és T-limfociták kemotaxisát mediálja, melyeknek fontos szerepük van az adaptív immunválaszban (Yang, 1999; Yang, 2000). A kemotaktikus hatáson túl, a hBD-2 a dendritikus sejtek érését is indukálja TLR4-függő módon (Biragyn, 2002). *In vivo*, dendritikus sejtek hBD-2-n keresztüli aktiválása a kórokozók keratinocitákon lévő TLR indukcióját követően a dendritikus sejteknek a bőrből lokális limfoid szervekbe történő migrációját váltja ki, mely végeredményben az antigén-specifikus T-sejtes celluláris immunválasz generálását eredményezi (Kopp, 2002). Ezekből is kitűnik, hogy a hBD-2-nek igen összetett szerepe van a bőrben zajló védekezési mechanizmusokban, ami által a hBD-2 kapocs a veleszületett és adaptív immunrendszer között.

2.4. A veleszületett immunrendszer szabályozása

Az infekció után beindított kezdeti válaszreakciók fontosak és rendszerint előnyösek a gazdaszervezet számára. Azonban egy túlzott mértékű válasz a fertőzésre patofiziológiás hatásokat eredményezhet, melyek között említhető a vaszkuláris instabilitás, a miokardiális kontraktilitás csökkenése, kapilláris szivárgás, szöveti hipoperfúzió, koagulopátia és összetett szervi károsodások (Cohen, 2002).

Mindazonáltal, hogy a TLR-mediálta gyulladás esszenciális a kórokozóval szembeni védelemben, az inflammáció folyamatának lezajlását szigorú kontroll alatt kell tartani, mert a kontrollálatlan TLR aktiváció eredményeként a gyulladás akut fázisból krónikusba lépve súlyos szövődményeket okozhat (Kawai, 2010).

Egy fertőzésre adott, TLR szignalizáción keresztül megvalósuló válasz szabályozása az alábbi poszttranszkripcionális és poszttranszlációs szinteken is érvényesülhet:

2.4.1. Epigenetika: kromatin módosítások

Az utóbbi időben előtérbe kerültek az olyan jellegű biomedicinális kutatások, melyekben a normális, – de ugyanúgy az abnormális, rákos elfajuláshoz vezető – celluláris folyamatok szabályozásában szerepet játszó, ún. epigenetikai eseményeket tanulmányozzák. Ez érthető is, hiszen a különböző típusú epigenetikai folyamatok – melyek révén a génexpresszió a DNS szekvenciában történt változás nélkül módosul –, számos biológiai mechanizmusban esszenciálisak. Szerepük nélkülözhetetlen például a fejlődésben, sejt differenciációban, a virális fertőzéssel szembeni védelemben, valamint az

endogén és környezeti jelek sejt-, illetve szervezetszintű integrálásában (Jaenisch, 2003; Feinberg, 2006; Herceg, 2007).

A transzkripció specifikus kontrollja többek között a kromatin szerkezetének módosításával történhet (Chi, 2004). Eukarióta sejtekben a genomi DNS hiszton fehérjékre való tekeredésével jön létre a nukleoszóma egységekből felépülő kromatinállomány. A nukleoszómák a kromatin felépítésekor olyan térbeli heterokromatikus elrendeződést alkotnak, amelyek hatékonyan megvédik a genomot a lehetséges károsodásoktól, illetve befolyásolják a génekről történő átíródást. Ahhoz, hogy az örökítőanyagról az információ átírása megvalósuljon, a kromatinnak ki kell csomagolódnia és a DNS-nek hozzáférhetővé kell válnia (eukromatin). Ennél fogva eukariótákban a kromatin szerkezete a legalapvetőbb szabályozója a génexpresszióknak – ha a gén körüli struktúra nem megközelíthető, a transzkripciós faktorok nem tudnak bekötődni, a gén nem íródik át.

Azonban a kromatin önmagában nem elegendő, általában transzkripciós faktorok és kromatin módosító enzimek együttműködése révén történik a transzkripció regulációja (Narlikar, 2002; Chi, 2004). A transzkripciós faktorok a DNS specifikus szekvenciáihoz kötődve, kromatin módosító enzimek bevonásával fenntartják a kromatin állapotát (hetero- vagy eukromatin), és direkt indukálják a gének kifejeződését (Chi, 2004.). A kromatin módosító enzimek két csoportja, a kromatin remodeling/átalakító komplexek (chromatin remodeling complex; CRC) és a hiszton módosító enzimek gyakran együtt változtatják meg a kromatin szerkezetét (Chi, 2004). Míg a CRC-ek a nukleoszómák formálásával a DNS-t hozzáférhetővé teszik a transzkripcióhoz, addig a hiszton módosító enzimek kovalens módosításokat hajtanak végre a hisztonok N-terminális farki régióiban. Ezen hiszton módosulások közé sorolható többek között az acetiláció, metiláció, foszforiláció, szumoiláció, illetve ubikvitináció (Strahl, 2000; Iizuka, 2003).

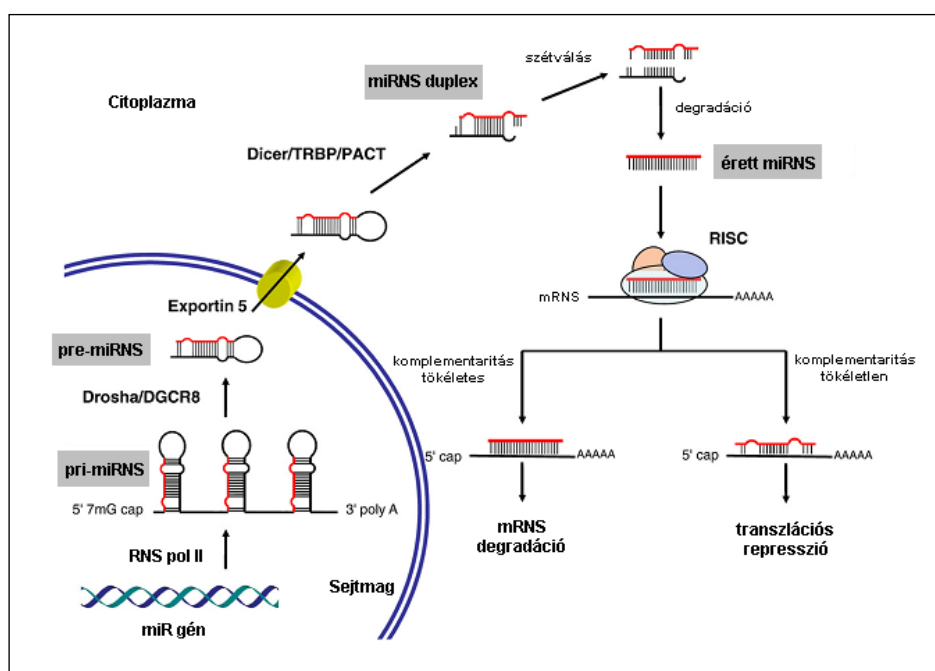
A hiszton acetiláció az egyik leggyakrabban tanulmányozott hiszton módosulás, mivel deregulációja aberráns génexpresszióhoz és tumorigenezishez vezethet (Cairns, 2001; Wolffe, 2001). A hiszton fehérjék adott pozíciójú lizin acetilációjával egy nyitott, a transzkripciós faktorok, aktivátorok, valamint az RNS polimeráz számára hozzáférhető kromatin jön létre. Ezzel szemben a hisztonok deacetilációjával a DNS templáthoz való hozzáférés akadályozódik (Kurdistani, 2003). A hiszton fehérjék N-terminális farki régiójában található lizinek reverzibilis acetilációs-deacetilációs folyamata a hiszton acetil-transzferázok (HAT) és hiszton deacetilázok (HDAC) segítségével történik (Ito, 2002). A HAT-ok, mint transzkripcionális koaktivátorok, illetve a HDAC-ok, mint korepresszorok a

hiszton fehérjék globális módosításával az általános transzkripció aktivitást befolyásolják (Sterner, 2000).

2.4.2. A mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek (miRNS) 21-22 nukleotid (nt) hosszúságú egyszálú nem-kódoló RNS-ek, melyek egy hajtú (hairpin) struktúrát tartalmazó endogén transzkriptból RN-áz III típusú Drosha és Dicer enzimek segítségével képződnek (Ambros, 2001; Kim, 2005).

Az első miRNS-eket az 1990-es évek elején fedezték fel, azonban csak a 2000-es évek elején kezdték biológiai szabályozó szerepüket – többek között az immunrendszerrel kapcsolatban – felismerni. Napjainkig több mint kétezer miRNS-t regisztráltak a humán miRBase 19.0 adatbázisban. A 2000-es évek eleje óta napvilágot látott tanulmányok rávilágítottak a miRNS-ek különböző fiziológiai és patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepére például a fejlődés-, differenciáció-, apoptózis-, zsírmetabolizmus-, virális infekció- és tumor mechanizmusaiban (Miska, 2005).



3. ábra Az érett miRNS biogenezeise. A miR génről RNS polimeráz II-vel történt átírás következtében létrejött pri-miRNS a sejtmagban a Drosha/DGCR8 fehérjét tartalmazó komplex segítségével pre-miRNS-sé alakul. A pre-miRNS-ből citoplazmába szállítódását követően a Dicer/TRBP/PACT fehérjekomplex miRNS duplexet hoz létre. A Dicer komplex hasítása után a miRNS duplex szálai szétválnak és az egyik szál degradálódik. Az érett miRNS a RISC részét képezve a mRNS-hez kötődik. Ha a komplementaritás a mRNS

3'UTR régiója és a miRNS között megfelelő, akkor a mRNS degradálódik, ha a komplementaritás részleges, akkor a target mRNS translációja represszált. (Faraoni, 2009; módosítva)

Általában a miRNS-ek a mikroRNS-indukált csendesítő komplexnek (microRNA-induced silencing complex; miRISC) a mRNS 3' UTR régiójához történt kötődésével két lehetséges poszttranszkripcionális mechanizmussal szabályozza a génexpressziót: mRNS hasítás vagy translációs represszió útján. Hasítás akkor következik be, ha a mRNS és a miRNS között a komplementaritás közel teljes. Ha ez a komplementaritás nem tökéletes, de a miRNS komplement részének szerkezete megfelelő, a transláció represszálása fog bekövetkezni többek között azért, hogy a riboszómális 60S alegység kapcsolódása az iniciáció folyamán a miRISC által akadályozott lesz (Hutvagner, 2002; Zeng 2002; Doench, 2003, Bartel, 2004). A miRNS 5' végén egy 2-8 nt hosszú részt mag régióknak hívnak. Ez a miRNS régió játszik fontos szerepet abban, hogy a mRNS mintegy 7 nt-nyi részével a hibridizáció kialakuljon, és ezáltal a mRNS degradációja a miRNS közbenjárásával bekövetkezzen. Az eddigi vizsgálatok alapján öt olyan tulajdonság van, melyek elősegítik a miRNS és mRNS közötti kapcsolatot: 1. AU-gazdag nukleotid összetétel a régió közelében; 2. a mRNS helyének közelsége a miRNS-sel történt koexpresszállásra; 3. a mRNS közelsége a miRNS 13-16 nt-jaival történő hibridizációra; 4. pozicionálás a 3' UTR-en belül legalább 15 nt távolságra a stop kódotól; 5. pozicionálás a hosszú UTR-ek centrumától messzebb (Grimson, 2007).

A bőrnek, mint az emberi szervezet legnagyobb összefüggő szervének morfogenezisében a mikroRNS-ek fontos szerepet játszanak. Yi és mtsai kimutatták, hogy az epidermiszben valamint a szőrtüszőkben számos miRNS magas expressziója szükséges a normál bőrfejlődéshez (Yi, 2006). Az egyik, kísérleteinkben is vizsgált bőr-specifikus miRNS a miR-203 (Sonkoly, 2008). Az embrionális időszak 13,5 - 15,5 napja között az egerek bőrében a szuprabazális sejtek miR-203 szintje 25-szörösére emelkedik az alapi régióban elhelyezkedő sejtekkel összehasonlítva. A miR-203 többek között a p63-nak, mint az epidermális sejtek proliferációjában és differenciációjában fontos faktornak a poszttranszkripcionális represszállását végzi (Lena, 2008; Yi, 2008). A p63 az embriogenezis alatt beindítja az epiteliális rétegződést, és fenntartja az érett keratinociták proliferatív potenciálját az epidermisz bazális rétegében (Koster, 2004). Amikor a differenciálatlan őssejtek elkezdenek differenciálódni a szaruréteg felé haladva – egyfajta védelmi vonalat kialakítva a bőrben –, a miR-203 expressziójának növekedése révén a p63

fehérje kifejeződését csökkenti. Az alacsonyabb p63 expresszió viszont lehetővé teszi a terminális differenciáció lezajlását (Koster, 2004).

A miRNS-ek immunrendszerrel, azon belül is a veleszületett immunitással való kapcsolatát mutatja az a 2006-ban napvilágot látott tanulmány, mely szerint a keratinocitákban is expresszáldó miR-146a, valamint miR-155 humán THP-1 monocitákban az LPS indukciót követően nagyobb mértékben fejeződik ki (Taganov, 2006). A miR-146a expressziója TNF- α -val és IL-1 β -val is kiváltható, NF- κ B-függő módon (Taganov, 2006; Perry, 2008). A miR-146a két targetje, a TNF receptor-asszociált faktor-6 (TNF receptor-associated factor-6; TRAF6) és az Interleukin-1 receptor-asszociált kináz-1 (IL-1 receptor-associated kinase-1; IRAK-1) a TLR4 jelátviteli út kulcsfontosságú eleme (Taganov, 2006). Az, hogy a miR-146a expressziója csak sejtfelszíni TLR-ok által indukálható jelzi, hogy a miR-146a például bakteriális kórokozók esetén szabályozza a veleszületett immunrendszert, virális fertőzéskor viszont nem (Taganov, 2006). Ezzel szemben egér makrofágokkal végzett kísérletek bizonyítják, hogy a miR-155 nagyobb mértékű kifejeződése mind sejtfelszíni, mind intracelluláris TLR-ok aktivációján keresztül végbemegy, ezáltal a miR-155 a bakteriális infekciókon túl virális kórokozók által aktivált veleszületett immunfolyamatokat is szabályoz (O'Connell, 2007; Tili, 2007).

2.4.3. A veleszületett immunitás negatív regulátorai: a TAM receptorok

A gazdaszervezet fertőzésre adott, inflammációval járó válaszának szabályozása sarkallatos pontja a veleszületett immunitásnak (Marshak-Rothstein, 2006). Abban, hogy krónikus gyulladás ne alakuljon ki, fontos szerepet tulajdonítanak annak a csak gerinces állatokban kifejeződő receptor protein tirozin kináz (PTK) családnak, melyet a veleszületett immunitással, mint negatív regulátor csak az utóbbi időben hoztak szorosabb összefüggésbe (Rothlin, 2007). Ez a PTK család, melynek három tagját (TYRO3, AXL és MER) azonosították, a TAM receptorok családja (Lai, 1991; O'Bryan, 1991). Szerkezetét tekintve a TAM-ok extracelluláris ligandkötő régiója egy kettős immunglobulin-kapcsolt doménból és III-as típusú fibronectin részből álló struktúra, melyet egy transzmembrán régió, valamint a citoplazmatikus, katalitikus PTK domén követ (Sasaki, 2006; Lemke, 2008).

A TAM receptorok eddig ismert két ligandja a GAS6 (growth-arrest-specific-6) és a ProS (proteinS), melyek expressziós mintázata és bioaktivitása a különböző emlős szövetekben eltérő (Stitt, 1995; Lemke, 2008). Mindkét szekretált szolubilis fehérjének egy

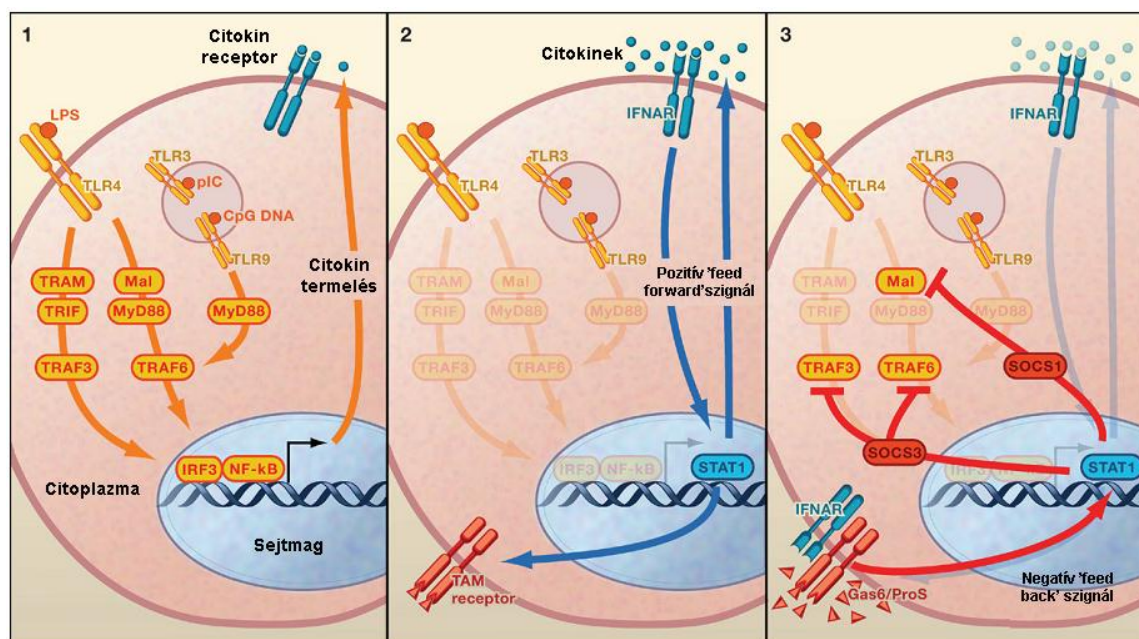
kb. 60 aminosavnyi ún. Gla domén található az N-terminálisán, melyen keresztül foszfolipidek foszfatidilszerinjéhez kötődve a GAS6 és ProS fontos szerepet tölt be a TAM-mediálta fagocitózis folyamatokban (Huang, 2003). A Gla domént négy epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor; EGF) -szerű modul követi, mely után két laminin G domén található (sex hormone binding globulin; SHBG). Ez az SHBG-szerű rész szükséges a TAM receptorokkal való kapcsolat kialakításában, illetve azok aktivációjában (Sasaki, 2002; Sasaki, 2006).

A GAS6 kötődése a homo- vagy heterodimer formában is előforduló receptorokhoz – habár jelentős affinitásbeli különbségek vannak –, elősegíti mindhárom receptor tirozin autofoszforylációját (Nagata, 1996). A vésérúmban viszonylag nagy mennyiségben jelenlévő, antikoagulánsként is leírt ProS-t kezdetben, mint specifikus TYRO3 agonista tartották számon, azonban számos újonnan végzett kísérlet azt mutatja, hogy a ProS a TYRO3-at MER-rel együtt expresszáló sejtek esetén potens MER agonista is (Rezende, 2004; Prasad, 2006).

A TAM receptorok az idegi-, reprodukív-, vaszkuláris-, valamint immunrendszer sejtjein is expresszálódnak, ahol többek között szabályozzák a hímvarsejtek érését, a vaszkuláris simaizom homeosztázisát, az oligodendrociták életképességét, a dendritikus sejtek infekcióra adott válaszát, valamint az eritropoézist (Lu, 1999; Melaragno, 2004; Shankar, 2006; Shimojima, 2006; Angelillo-Scherrer, 2008). Továbbá bizonyított, hogy az apoptótikus sejtek eltakarításában ezek a receptorok befolyásolják a fagocitáló sejtek aktivitását, hozzájárulva ezzel a normális szöveti környezet kialakulásához. A TAM jelátviteli útvonalban bekövetkezett bármiféle zavar a szöveti egyensúlyi állandóság felborulásához, ezáltal például sterilitáshoz vagy vaksághoz vezethet (Lu, 1999; Prasad, 2006). Rendszerint egy adott sejt típuson egyidejűleg többféle TAM is kifejeződik, továbbá számos TAM-pozitív sejt típus magukat a ligandokat is expresszálja (Lemke, 2008.). Noha a TAM receptorokat – elsősorban az AXL-t –, összefüggésbe hozták a rákos megbetegedések progressziójával, a biológiai szerepükről a legtöbb információ a TYRO3, AXL, MER vagy GAS6 knockout egereken végzett kísérletekből származik (Lu, 2001; Caraux, 2006; Greenman, 2007; Rothlin, 2007).

Az eddigi megfigyelésekből kitűnik, hogy a TAM gének expressziójában bekövetkező változások a legsúlyosabb problémákat az immunrendszerben okozzák. A kórokozókkal szembeni védelemben a TLR aktivációt követő gyors, hatékony gyulladásos válasz elengedhetetlen. Azonban ha a fertőzés által létrejött inflammáció eléri a megfelelő

hatást, a TLR jelátviteli utak leszabályozása szükséges, elkerülve egy krónikus gyulladásos miliő kialakulását (Rothlin, 2007).



4. ábra A TLR jelátvitel TAM receptorok általi gátlása Rothlin és mtsai szerint. (1) A Toll-szerű receptorokon, továbbá adaptor fehérjéken keresztüli kezdeti válaszok során a TRAF3 és TRAF6 az IRF3 és NF-κB transzkripciós faktorok aktiválásával citokinek – nevezetesen I-es típusú interferonok – termelését indítják be, ami szükséges a gazdaszervezet védelméhez, illetve a gyulladásához. (2) Az interferon szignál pozitív 'feed forward' hatása révén további interferon termelés következik be a STAT1 transzkripciós faktoron keresztül, felerősítve a választ. (3) Azonban az interferonok a STAT1 révén a gátló TAM receptorokat is indukálják, aminek következménye egy negatív 'feed back' hatás lesz. A TAM receptor ligandok (Gas6 és ProS) szintén aktiválják a STAT1-et, melynek eredményeképpen SOCS1 és SOCS3 képződik. A SOCS1 a Mal, a SOCS3 pedig a TRAF3 és TRAF6 működését befolyásolva a TLR jelátviteli út gátolt lesz. Így, noha lehetővé válik a veszélyezett immunválasz beindulása, végül leszabályozva saját magát nem károsítja a gazdaszervezetet. (O'Neill, 2007; módosítva)

A TLR szignalizáció negatív regulációjában dendritikus sejteken és más professzionális immunsejteken végzett kísérletek alapján a TAM receptoroknak jelentősége abban rejlik, hogy működésük következtében a proinflammatorikus citokinek – pl. TNF-α, IL-6, IFN-ok – termelése erőteljesen csökken. Ez a TAM-mediálta inhibíciós folyamat – többek között – a citokín jelátvitelt szuppresszáló fehérjék (suppressor of cytokine signaling; SOCS) révén valósul meg. A SOCS1 és SOCS3 fehérjék egyfelől az I-es típusú IFN receptor (IFNAR) aktivációját követően a JAK (Janus kinase) - STAT

(signal transducer and activator of transcription) downstream szignalizáció gátlását, másrészt a TAM receptorokon keresztül a TLR utak negatív regulációját eredményezik (Rothlin, 2007).

2.5. A bőr veleszületett immunrendszere és a pikkelysömör

Az egészséges emberi bőrön nagyszámú kommenzalista mikroorganizmus található, mint például a *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, és *Malassezia furfur*. A normál flórán túl, a bőrt folyamatosan számos kórokozó kolonizálja (pl. *S. aureus*) többségük azonban nem vált ki klinikai tüneteket. Normális esetben a bőr mélyebb rétegei folyamatosan fertőzésmentesek maradnak, utalva arra, hogy az egészséges bőr sikeresen veszi fel a harcot a kórokozók ellen (Pivarcsi, 2005).

Szervezetünk patogén mikrobákkal szembeni védelmének első vonalát – részben elhelyezkedésükből adódóan – a keratinociták adják. Hosszú éveken át tartotta magát az a nézet, hogy a keratinocitáknak – amelyek az epidermisz 95%-át képezik –, mindössze két funkciójuk van: az egyik, hogy citokeratinokat termelnek, ezáltal fenntartják az epidermisz szerkezetét, valamint az emberi szervezet fizikai barrierjét képezve számos exogén mikroorganizmus bejutását gátolják (Elias, 2005). Az utóbbi évtized eredményei egyértelműen bizonyítják azonban, hogy a keratinociták aktívan részt vesznek az epidermiszben zajló immunfolyamatokban PRR-ok expresszálása, effektor fehérjék (citokinek, kemokinek és AMP-ek) szekretálása, illetve MHC II antigének expresszálása révén. Mivel mind a veleszületett, mind a szerzett immunitásban fontos szerepet játszanak, ezért a keratinocitákat immáron félprofesszionális immunsejtekként kell számon tartani. Ezek a sejtek a professzionális immunsejtektől (dendritikus sejtek, T-sejtek, makrofágok) legfőképpen abban különböznek, hogy az immunválaszuk lassúbb és lényegesen kevesebb effektor fehérjét képesek termelni (Barker, 1991; Basset, 2003).

Mintázatfelismerő receptoraik segítségével a keratinociták számos mikroorganizmust képesek felismerni, továbbá – még nem teljesen ismert mechanizmus által – meg tudják különböztetni a kommenzalistákat a kórokozóktól (Philpott, 2001; Pivarcsi, 2005). A keratinociták immunválaszának a specifikusságáért a különböző PRR kombinációkon keresztül aktiválódó jelátvivő útvonalak a felelősek. Ennek eredményeképpen a keratinociták különböző AMP-eket valamint gyulladáskeltő citokineket és kemokineket termelnek (Song, 2002; Baker, 2003; Pivarcsi, 2003; Mempel, 2003). Az AMP-ek termelését illetően egyértelmű, hogy az alacsonyszintű AMP-et

tartalmazó léziók jóval érzékenyebbek a fertőzésekkel szemben (Lübbe, 2003). Mivel a keratinociták által termelt effektor fehérjék túlnyomó többsége biokémiai hívójel funkcióval is rendelkezik, a fertőzések helyére nagyszámú professzionális immunsejt érkezik (Pivarcsi, 2005). Utóbbi sejtek jóval nagyobb mennyiségű effektor fehérjét képesek termelni, mint a keratinociták így a kórokozókat nagyobb hatékonysággal képesek elpusztítani. Ezek a folyamatok is bizonyítják a keratinociták és a professzionális immunsejtek között fennálló kapcsolatot, valamint a veleszületett és szerzett immunitás közötti érzékeny egyensúlyt (Nestle, 2009).

A rendszerben bekövetkező bármiféle zavar, mint például a gyulladások keltő fehérjék abnormális kifejeződése, deregulációja, epigenetikai módosulás gyulladásos bőrbetegség kialakulásához vezethet. Ezek közé a bőrt érintő, krónikus gyulladással járó betegségek közé tartozik a pikkelysömör (pszoriázis), melynek kialakulásában genetikai és környezeti tényezők, továbbá az immunfolyamatokban bekövetkező abnormalitások is szerepet játszanak. A pikkelysömör kapcsán a bőrben található számos sejttípus (keratinocita, fibroblaszt, monocita-eredetű immunsejt, T-sejtek, hízósejt) érintett (Nestle, 2009; Monteleone, 2011). A betegség többek között fokozott keratinocita proliferációval, csökkent apoptózissal, valamint az inflammációt elősegítő sejtek epidermális infiltrációjával jár, ami a bőr felszínén plakkok létrejöttét eredményezi. Noha tudjuk, hogy a pikkelysömörös léziók kialakulása a bőr keratinocitái és az infiltrálódó immunsejtek kölcsönhatása nyomán jön létre, melynek során több száz gén és fehérje kifejeződése megváltozik, a rezidens bőrsejtekben, mint félprofesszionális immunsejtekben és a professzionális immunsejtekben lezajló konkrét szabályozó mechanizmusokról kevés ismeretünk van (Nomura, 2003; Carlén, 2005; Nestle, 2009).

A pikkelysömör patogenezisében a PRR-ok közül a TLR-oknak kitüntetett szerepe van. Ahhoz, hogy a bőr immunrendszerének mikroflóra általi folyamatos aktivációja ne következzen be, többek között a kültakaróban jelenlévő dendritikus sejtek alacsony TLR expressziója szükséges (Takeuchi, 2003). Azon túl, hogy a keratinocitákon számos TLR kifejeződik (kivéve a TLR7 és TLR8), a lokalizációt illetően egészen eltérő kép figyelhető meg: amíg egészséges bőrben például a TLR2 a bazálisan elhelyezkedő keratinociták által fejeződik ki, addig a pikkelysömörös léziós területen az epidermisz felszínhez közelebbi régiójában expresszálódik (Baker, 2003; Lebre, 2007). Az, hogy az eltérő TLR2 kifejeződés hogyan kapcsolódik az epidermális hiperproliferációhoz és a keratinocita differenciáció károsodásához pszoriázisos bőrben, még nem teljesen ismert.

Hasonlóképpen a TLR2-nél megfigyeltekhez, a TLR1 is a felsőbb epidermális rétegekben mutat nagyobb mértékű expressziót. Azonban a TLR5 szintje a pikkelysömörös léziós területen alacsonyabb, mint ami a nem-léziós epidermisz esetén elmondható. Számos tanulmány szól arról, hogy a TLR7 agonista imiquimod (IMQ) egerekben pszoriázisos plakkok kialakulását eredményezi, ebből kifolyólag az IMQ-ot előszeretettel használják a pikkelysömör egér modelljében a tünetek kiváltására (Gilliet, 2004; Wu, 2004; Fanti, 2006; Rajan, 2006).

A pikkelysömör, mint krónikus gyulladásos betegség kapcsán a bőr sejtjei által termelt effektor molekulák (citokinek, kemokinek) mennyisége is jelentősen megváltozik az egészséges állapothoz képest. A betegség patogenezisében a TNF- α -nak, mint gyulladásos citokinnek kitüntetett szerepe van (Ettehadí, 1994). A TNF- α -n túl azonban számos más, a léziós területek kialakításában résztvevő gyulladáskeltő citokin és kemokin – mint például az IL-6, CXCL8, IL-17, IFN- γ – kifejeződésének növekedése is bekövetkezik (Nickoloff, 2007). Ezen felül pikkelysömörös betegek léziós bőrén az AMP-ek abnormális expressziója (a legtöbb AMP-et pszoriátikus bőrben azonosították) is megfigyelhető (Ong, 2002; Büchau, 2007; Hollox, 2008). A cathelicidinek emelkedett szintje mellett például a hBD-2 is nagyobb mértékben van jelen a pszoriátikus területeken, melyből kifolyólag a pikkelysömörös betegek gyulladt bőrterületei sokkal ellenállóbbak a különböző fertőzésekkel szemben (Ong, 2002).

Az epigenetikai jellegű vizsgálatok a pszoriázis kapcsán mind a HAT-ok, mind a HDAC-ok abnormális expresszióját kimutatták. Egészséges emberek bőrével összehasonlítva a pszoriátikus léziós bőr HDAC-1 mRNS szintje jelentős emelkedést mutat (Tovar-Castillo, 2007). További megfigyelés pikkelysömörös betegekből izolált perifériális mononukleáris sejtek (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) esetén a H4 hiszton fehérjék globális hipoacetilációja a kontroll mintákhoz képest (Zhang, 2011).

Az emberi bőrben kifejeződő miRNS-ek funkciója egyelőre még nem teljesen feltérképezett. A pszoriázissal, illetve ezen keresztül a veleszületett immunfolyamatokkal és a TNF- α jelátviteli útvonallal azonban több miRNS is összefüggésbe hozható (Sonkoly, 2008). A pikkelysömör, eltérően az egészséges bőrnél, vagy más krónikus gyulladásos bőrbetegségnél (ekcéma) látottal szemben, egy sajátos miRNS expressziós profillal jellemezhető. A miR-203 volt az első olyan miRNS, melynek szignifikáns overexpresszióját találták pikkelysömörös betegekből (Sonkoly, 2007). Ráadásul ellentétben az egészséges bőrrel, ahol csak az epidermisz szuprabazális régiójában

fejeződik ki a miR-203, a pikkelysömörös léziós bőr összes epidermális rétegében megnő az expressziója. A léziós plakkokban a miR-203 megemelkedett kifejeződésével egyidejűleg az evolúciósan konzervált miR-203 target SOCS3, mint a gyulladásos folyamatok negatív regulátora és keratinocita funkciók aktív szereplője szuppresszálódik. A SOCS3 annak a STAT3 transzkripció faktoron keresztüli útvonalnak a gátlását végzi, mely számos növekedést szabályozó szignál, valamint gyulladásokeltő citokin (pl. IL-6, IFN- γ) kapcsán érintett (Sonkoly, 2008). A SOCS3 kapcsán azonban nem szabad megfeledkeznünk az előző fejezetben már említett, a veleszületett immunfolyamatok negatív szabályozásáért felelős TAM receptorokról sem, melyek pikkelysömörös bőrben történő expressziója teljesen ismeretlen.

A pikkelysömörös bőrléziók esetén egy másik miRNS, a leukocita-eredetű, NF- κ B-függő miR-146a megemelkedett kifejeződését is megfigyelték (Sonkoly, 2008). A miR-146a a TRAF6 és IRAK-1 fehérjék – mint a TLR/IL-1 β útvonal két fontos elemének – expresszióját negatívan szabályozva a TNF- α -indukált apoptózis gátlását segíti elő, ami hozzájárulhat a pikkelysömör patogeneziséhez (Taganov, 2007).

Azonban nemcsak megemelkedett, hanem downregulált miRNS-eket is azonosítottak ezzel a bőrbetegséggel kapcsolatban. Többek között a miR-125b expressziójának csökkenése figyelhető meg (Sonkoly, 2008), ami a TNF- α poszttranszkripcionális repressziójáért felelős. Abban az esetben, mikor a miR-125b downregulálódik, a TNF- α -ra gyakorolt gátló hatás csökkenésével egy emelkedett TNF- α szint jelentkezik a léziós bőrterületeken (Zhang, 2011).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az emberi szervezet patogén mikrobával történő találkozásakor rendszerint gyulladásos reakcióval válaszol. Azonban ezek a válaszreakciók – melyek dramatikus változásokat okozhatnak a homeosztázisban – szigorúan szabályozott keretek között kell, hogy végbemenjenek, hisz bármiféle, a veleszületett immunfolyamatokat érintő zavar esetén az akut gyulladás krónikussá válhat, különböző betegséget előidézve. Noha egyre bővül az ismeretünk a veleszületett immunitás különböző szintű szabályozásával kapcsolatban, további mélyreható vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy a krónikus gyulladással járó betegségek esetén hatékony terápiás megoldások álljanak rendelkezésre.

Mindezek tükrében munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. A veleszületett immunfolyamatok gén-specifikus kontrollálásáért felelős szabályozó mechanizmusok vizsgálatához egy olyan *in vitro* kísérleti modell felállítása, amely segítségével mind az akut, mind a perzisztens gyulladás jól modellezhető.
2. A kialakított modellben megvizsgálni, hogy a veleszületett immunrendszer félprofesszionális immunsejtjeiként számon tartott keratinociták esetén a PGN indukció hogyan változtatja meg a gyulladáskeltő citokinek/kemokinek, valamint az antimikrobiális peptidek gén- és fehérje expressziós mintázatát.
3. Feltérképezni, hogy PGN indukciót követően hogyan változik a transzkripciót nagymértékben módosító hiszton fehérjék globális acetilációs szintjeinek dinamikája keratinocitákban.
4. Kísérleti modellünket alapul véve következő lépésben keratinocitákban tanulmányozni a poszttranszkripcionális szabályozásban résztvevő miRNS-ek – elsősorban a miR-203 –, illetve targetjeinek (p63, SOCS3) kifejeződését.
5. A veleszületett immunfolyamatokban kiemelkedően fontos szerepe van a negatív regulációnak. Ebből kifolyólag a veleszületett immunitást fékentartó, a gyulladás mértékét negatívan szabályozó TAM receptorok és ligandjuk (GAS6) gén- és fehérjeszintű expresszióját vizsgálni különböző mikrobiális ágensekkel való indukciót követően mind professzionális, mind félprofesszionális immunsejtekben.
6. A TAM receptorok és ligandjuk (GAS6) kifejeződését tanulmányozni krónikus gyulladásos betegség, a pikkelysömör esetén.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A kísérletek során használt sejt kultúrák

Fél-professzionális immunsejtek

HaCaT sejtek

Az immortalizált HaCaT humán keratinocitákat 10% (v/v) FBS-t (fetal bovine serum; Gibco) és 1% (v/v) antibiotikumot/antimikotikumot (AB/AM; penicillin, streptomycin/amfotericin B; Sigma) tartalmazó DMEM (Gibco) médiumban tenyésztettük.

PK E6/E7 (vaginális epitélsejt) és primer keratinocita (pKC) sejtenyészetek

A sejteket Keratinocyte SFM (serum-free) médiumban (Gibco) tenyésztettük, 5 ng/ml rekombináns EGF (epidermal growth factor; Gibco), 50 µg/ml BPE (bovine pituitary extract; Gibco), 20 mM L-glutamin és 1% AB/AM (Sigma) kiegészítéssel.

Professzionális immunsejtek

Dendritikus sejtek (DC)

Égészséges donorok perifériás véréből mononukleáris sejteket (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) izoláltunk Ficoll Paque Plus sűrűség grádiens centrifugálással. Az izolált monocitákat kitapadós műanyag lemezekben tenyésztettük. Éretlen dendritikus sejtek differenciálása esetén a sejteket 5 napon keresztül 1000 U/ml rekombináns humán granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktorról (GM-CSF; Sigma) és 1000 U/ml rekombináns humán interferon- α -val (IFN- α ; Sigma), továbbá 10% (v/v) hőinaktivált FBS-sel (Gibco) és 1% (v/v) AB/AM-mel (Sigma) kiegészített RPMI 1640 médiumban (Gibco) tenyésztettük. Ahhoz, hogy érett dendritikus sejteket hozzunk létre, további egy napig 10 ng/ml rekombináns humán TNF- α -t (R&D Systems) adtunk a médiumhoz.

THP-1 sejtenyészet (humán akut leukémia monocita sejtvonal)

A sejteket RPMI 1640 médiumban (Gibco), 10% (v/v) hőinaktivált FBS (Gibco) és 1% (v/v) AB/AM (Sigma) hozzáadásával tenyésztettük. Az aktiválatlan THP-1 sejtek aktiválása végett 48 órán keresztül 5 ng/ml végkoncentrációban forbol-mirisztol-acetátot (PMA; Sigma) adtunk a sejtekhez.

A sejteket minden esetben standard sejtkultúra kondíciók között tartottuk, 37 °C-on 5% CO₂ tartalom mellett. A sejtek felhasználása a különböző kísérletekben 60-70%-os konfluencia esetén történt.

4.2. Sejttenyészetek stimulálása

A kísérletek során a következő mikrobiális ágensekkel történtek a sejtek stimulálásai:

- PGN: *Staphylococcus aureus*-eredetű peptidoglikán (TLR2 ligand) (Fluka), 10 µg/ml végkoncentrációban.
- LPS: *Escherichia coli*-eredetű lipopoliszacharid (TLR4 ligand) (Sigma), 1 µg/ml végkoncentrációban.
- Poly I:C: virális kettős szálú RNS szintetikus analógja (TLR3 ligand) (Enzo Life Sciences), 10 µg/ml végkoncentrációban.

A PGN-indukált kromatin módosulások tanulmányozásakor a HaCaT sejtek egy részét a mikrobiális stimuláció előtt 2 órával, illetve a PGN fertőzés után 24 órával Trichostatin A (TSA; 200 ng/ml; Sigma) hiszton deacetiláz inhibitorral (HDACi) kezeltük.

4.3. Transzfektálás

A HaCaT sejtek transzfektálása specifikus anti-miR-203 miRNS inhibitor, illetve anti-miR negatív kontroll konstrukttal, a siPORT™ Polyamine-Based Transfection Agent (Applied Biosystems) alkalmazásával történt. A transzfektálást a gyártó által előírt 'pre-plated' transzekciós protokoll szerint végeztük. A megfelelően hígított siPORT Amine transzekciós ágenszt és az anti-miR-203 inhibitor/anti-miR negatív kontrollt Opti-MEM médiumban (Gibco) összekeverve 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt a nukleinsav/siPORT Amine transzekciós komplexet adtuk a HaCaT sejtekhez. A transzfektált sejtek normál sejtkultúra kondíciós körülmények között, 37 °C-on voltak tartva. 24 órával az első kezelés után a transzfektálást megismételtük, így biztosítva a miRNS inhibitor folyamatos jelenlétét.

4.4. RNS tisztítás

A sejtek stimulációja után meghatározott időpontokban totál RNS-t tisztítottunk. Az RNS kivonáshoz RNeasy Mini Plus Kit-et (Qiagen) használtunk. A tisztítást a gyártó által ajánlott protokoll alapján végeztük. Röviden: a sejtek összegyűjtése után, β-

mercaptoetanolt tartalmazó RLT pufferben lizáltuk a sejteket, majd a genomi DNS-t oszlopos tisztítási módszerrel távolítottuk el. Etanol hozzáadása után RW1 és RPE puffer segítségével RNeasy oszlopon történt az RNS megkötése, majd az oszlopról RNáz-mentes vízzel mostuk le az RNS-t. Az RNS minőségét és mennyiségét NanoDroppal, Qubit-tal és Bioanalyzerrel állapítottuk meg.

4.5. Reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (kvantitatív RT-PCR)

Az RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzése után High Capacity RNA to cDNA Kit-tel (Applied Biosystems) cDNS-t készítettünk az Applied Biosystems Veriti Thermal Cyclor készülék segítségével a gyártó által megadott protokoll szerint. A kvantitatív RT-PCR reakciókat ABI StepOne Plus Real-Time PCR System készüléken végeztük. A génexpressziós szintek meghatározásához TaqMan Gene Expression Assay-eket és TaqMan Gene Expression Master Mix-et (Applied Biosystems) használtunk.

A miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit és TaqMan MicroRNA Assay-ek (Applied Biosystems) felhasználásával történtek a gyártó által megadott protokoll alapján.

A kapott expressziós értékeket génexpresszió mérésekor 18S rRNS-re, illetve a miRNS-ek expressziójának meghatározása esetén RNU48-ra normalizáltuk. Minden kísérletet legalább 3 biológiai replikátummal, két technikai párhuzamossal végeztünk el, melyekből az expresszió változásait a $2^{\Delta\Delta C_T}$ módszerrel értékeltük ki.

A kísérletek során használt primerek:

Target	Assay szám
18S rRNS	Hs999999901
IL-6	Hs00174131
CXCL8	Hs00174103
TNF- α	Hs00174128
DEFB4	Hs00175474
CAMP	Hs00189038
SOCS3	Hs01000485
p63	Hs00978340

Target	Assay szám
TYRO3	Hs00170723
AXL	Hs00242357
MERTK	Hs00179024
GAS6	Hs00181323
RNU48	001006
miR-146a	000468
miR-155	002623
miR-203	000507

4.6. Hiszton extrakció

A különböző mikrobiális ágensek hatására történt hiszton acetilációs szintek módosításának vizsgálatához az Abcam hiszton extrakciós protokollját használtuk. A sejteket összegyűjtésük után kétszer, 5 mM Na-butirátot tartalmazó jéghideg PBS-sel mostuk. 10 perc 1250 x g centrifugálás után a sejteket Triton extrakciós pufferben (TEB) szuszpendáltuk fel (PBS kiegészítve a következőkkel: 0,5% (v/v) Triton X-100, 2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) és 0,02% (v/v) NaN₃). A 10 perces lizálás jégen, enyhe mechanikai rázatás mellett történt. Ezt a minta 4 °C-on 10 percig tartó 2500 x g centrifugálása, majd a felülúszó eltávolítása követte, végül a pelletet 0,2 N HCl-ben újra felfuszpendáltuk. Az éjszakán át, 4 °C-on történő savas extrakció után a mintát 10 percig 2500 x g-n centrifugáltuk, majd a felülúszóból NanoDrop segítségével meghatároztuk a hiszton fehérjék koncentrációját.

4.7. Citokinek mérése ELISA módszerrel

A sejttenyészet felülúszóból a citokinek (IL-6, CXCL8) szintjének mérése Quantikine Single Analyte ELISArray Kit (R&D Systems) felhasználásával a gyártó által előírt protokoll szerint történt. A standard görbe felvételéhez rekombináns humán IL-6 és CXCL8 hígítási sort készítettünk. A minták optikai denzitásának meghatározása Microtiter Plate Reader-rel (FluoStar Optima, BMG Labtech), 450 nm-en történt, 570 nm-es hullámhosszon mért korrekcióval.

4.8. Totál fehérje extrakció

A sejteket összegyűjtésük (felkaparás vagy Tryple (Invitrogen) kezelés) után kétszer jéghideg PBS-sel mostuk, majd proteáz inhibítort (PIC; Sigma) és 1 mM PMSF-t tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, ezután jégen lassan, enyhe rázatás mellett felolvasztottuk, mely műveletet 3-4-szer egymást követően elvégeztük. Mindezek után 4 °C-on egy 10 perces 13000 x g centrifugálás következett, majd a fehérjéket tartalmazó felülúszót megtartva a minták totál fehérje koncentrációját NanoDrop műszerrel meghatároztuk.

4.9. Fehérje meghatározás Western blot analízissel

A fehérjék kvantitatív analíziséhez a totál fehérje-, illetve hiszton fehérje mintákból egyenlő mennyiségeket 10, illetve 15% Tris-SDS-PAGE-n futtattunk, majd Pure Trans-

Blot Transfer Medium nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blottoltuk. A blottolás sikerességét Ponceau festékekkel igazoltuk, majd a membránt 1 órán keresztül 5% tejporos 1xTBS - 0,1% (v/v) Tween-nel blokkoltuk. A blokkolást követően a membránt a vizsgálni kívánt fehérjékkel szemben, megfelelő arányban hígított specifikus ellenanyagokkal 1-1,5 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. A hiszton fehérjék dinamikájának módosulását illetően az alábbi antitesteket használtuk: nyúl anti-H3K4Ac pAb (Upstate), nyúl anti-H3K9Ac pAb (Upstate), nyúl anti-H3K14Ac pAb (Millipore), nyúl anti-H4panAc pAb (Upstate), valamint nyúl anti-H4K8Ac pAb (Abcam). Totál fehérje minták esetén a specifikus elsődleges ellenanyagok a nyúl anti-p63 pAb és egér anti-SOCS3 mAb (mindkettő Santa Cruz) voltak. Belső kontrollnak nyúl anti-H3 pAb (Diagenode), egér anti-H4 mAb (Abcam), illetve anti- β -aktin pAb (Sigma) elsődleges ellenanyagokat alkalmaztunk.

Másodlagos antitestként HRP-vel konjugált kecske anti-nyúl, illetve anti-egér IgG-t (Bio-Rad) használtunk, szobahőmérsékleten 1-1,5 óra inkubációs idővel. Az egyes lépések között 5% tejport tartalmazó 1xTBS - 0,1% (v/v) Tween oldattal mostuk a membránt. A kemilumineszcens jelek detektálása Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrates (Millipore) felhasználásával történt. A fehérjék %-ban kifejezett mennyiségét denzitometriás kiértékelés alapján adtuk meg.

4.10. Immunfluoreszcens festési eljárás a fehérjék detektálására

A vizsgálni kívánt fehérjék immunfluoreszcens detektálásához a HaCaT sejteket 8 lyukú flexiPERM térelválasztó szilikonos tárgylemezen (Sarstedt) tenyésztettük.

A sejteket 15 percig 4% (w/v) paraformaldehidet és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben fixáltuk és permeabilizáltuk szobahőmérsékleten, majd PBS + 0,1% Triton X-100 (PBT) + 5% FBS (Gibco) oldattal blokkoltuk. Ezután a sejteket szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, vagy 4 °C-on egy éjszakán át az előző fejezetben felsorolt elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A háromszori PBT-vel való mosást követően a sejteket 1 órán át TRITC/FITC -konjugált kecske anti-nyúl Ig vagy anti-egér Ig (Bio-Rad) másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Ismét háromszori PBT mosás, majd 5 perc DAPI festés következett. A mintákat mosás után Citifluor-ral (Citifluor Ltd.) fedtük - meggátolva ezzel az idő előtti fluoreszcens jel kioltódását -, majd Zeiss Axio Observer Z1 típusú fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

4.11. RNS extrakció bőrből származó biopszia mintákból

Pikkelysömörös betegek léziós és nem-léziós bőrterületeiről, valamint egészséges emberek bőréből 'shave' biopsziával mintavételezésre került sor a már korábban leírt módszer szerint (Belső, 2008). A bőraljai szövetrész eltávolítása után a mintákat diszpázzal (Roche Diagnostics) egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Másnap az epidermális és dermális részek szétválasztását követően a szeparált bőrmintákhoz 1-1 ml TRIzol Reagenst (Life Technologies) adtunk, amelyeket 400 µl kloroform (Sigma) hozzáadása után erőteljesen összevortexeltünk. Ezután a mintákat 10 percig 16600 x g-n centrifugáltuk, majd a kapott felülúszóból a genomi DNS-t oszlop segítségével eltávolítottuk (RNeasy Plus Mini Kit; Qiagen). A továbbiakban az RNS tisztítás, kvantitálás, valamint a reverz transzkripció és a kvantitatív RT-PCR a fentebb leírtak alapján lett elvégezve.

A mintavételezések a páciensek informálásával, illetve beleegyezésével, valamint a regionális etikai bizottság jóváhagyásával a Helsinki Egyezmény alapelveit szem előtt tartva történtek.

4.12. Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok minden esetben legalább három független biológiai mintán mért értékek átlagai és szórásai. A statisztikai analízishez SPSS 19 adatfeldolgozó szoftvert használtunk. Az adatok feldolgozása, a szignifikancia megállapítása ANOVA program segítségével történt LSD-, Tukey-, valamint Bonferroni-tesztek alkalmazásával. Az egyes értékek közötti különbséget szignifikánsnak a $p < 0,05$ teljesülése esetén tekintettük.

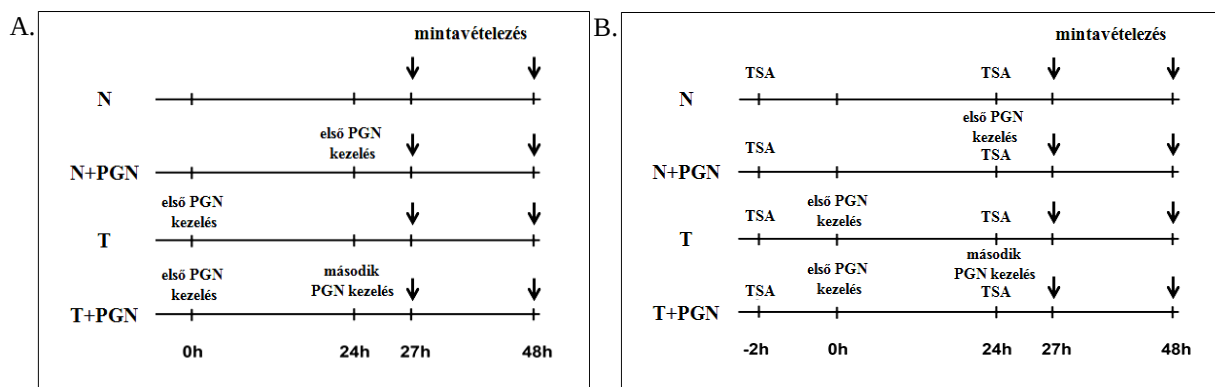
5. EREDMÉNYEK

5.1. Kísérleti modell

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk azokat a szabályozó mechanizmusokat, melyek a bőr veleszületett immunfolyamatainak gén-specifikus szabályozásáért felelősek, kezdeti lépésként egy modellt hoztunk létre.

A modell kialakításához első körben HaCaT immortalizált keratinocitákat, mint félprofesszionális immunsejteket használtunk, melyeket *S. aureus*-eredetű peptidoglikánnal (PGN) kezeltünk egyszer, vagy kétszer, ezáltal akut, illetve perzisztens fertőzést modellezve (5. A ábra). A sejtek egy része kontroll csoportot képezve csak médiumot kapott az egyes kezelésekkor (naiv sejtek; N). A sejtek egy másik csoportját 24 órán keresztül 10 µg/ml (w/v) végkoncentrációban PGN-nel indukáltuk (tolerizált sejtek; T). A 24 órás inkubáció letelte után a sejtekről a médiumot eltávolítottuk, majd kétszer PBS-sel mostuk. Mosás után a naiv (N) és tolerizált (T) sejtekhez csak médiumot adtunk, azonban további két sejttenyészetet PGN-nel indukáltunk, illetve újakezeltünk (N+PGN; T+PGN). A mintavételezés a második kezelés után 3, valamint 24 órával (vagyis az első PGN indukció után 27, illetve 48 órával; a dolgozatban 27h és 48h jelöléssel feltüntetve a mintavételezés időpontja) később történt.

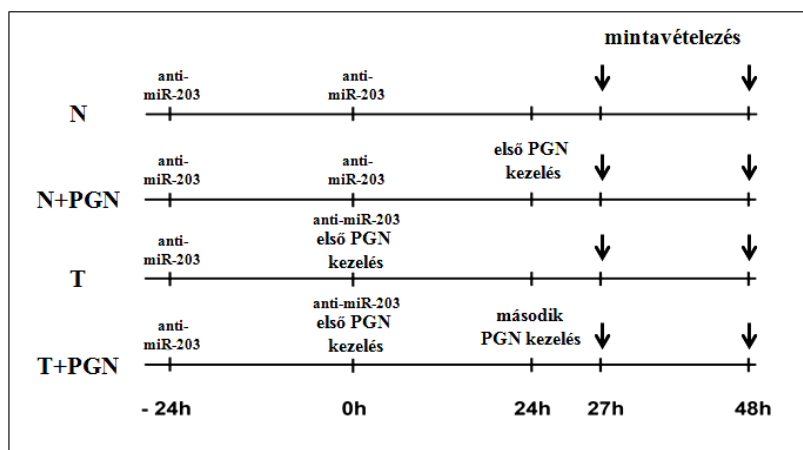
Párhuzamosan mindezzel annak érdekében, hogy az epigenetikai változásokat is vizsgálni tudjuk, a fenti kísérleti beállításokat alapul véve HaCaT sejteket a PGN indukció előtt 200 ng/ml végkoncentrációban a HDAC-ok működését gátló Trichostatin A-val (TSA) 2 órán át előkezeltük (5. B ábra). A TSA kezeléssel – befolyásolva a hisztonok acetiláltsági szintjét –, megnő azoknak a géneknek az expressziója, amelyek transzkripciójára a hiszton nagyobb fokú acetiláltsága pozitív hatással van.



5. ábra A kísérleti modell során történt kezelés és mintavételezés (A). N: naiv, kezeltlen sejtek; N+PGN és

T: egyszeri PGN kezelés a jelzett időpontban; T+PGN: kétszeri PGN indukció a jelzett időpontokban. A HDACi TSA-val történt előkezeléssel módosított kísérleti modell (B).

A keratinocitákban, mint félprofesszionális immunsejtekben előforduló, a poszttranszkripcionális szabályozásban résztvevő miRNS, a miR-203-nak, valamint targetjeinek szerepét a PRR aktivációt követő vizsgálatához a HaCaT sejteket PGN kezelésük előtt anti-miR-203 miRNS inhibítorral, illetve kontrollként üres vektorral transzfektáltuk (6. ábra).



6. ábra Kísérleti modell a keratinocita-specifikus miR-203 tanulmányozására. N: naiv, kezeletlen sejtek; N+PGN és T: egyszeri PGN kezelés; T+PGN: kétszeri PGN indukció. A transzfektálás, valamint az RNS és/vagy fehérje mintavételezése a jelzett időpontokban történtek.

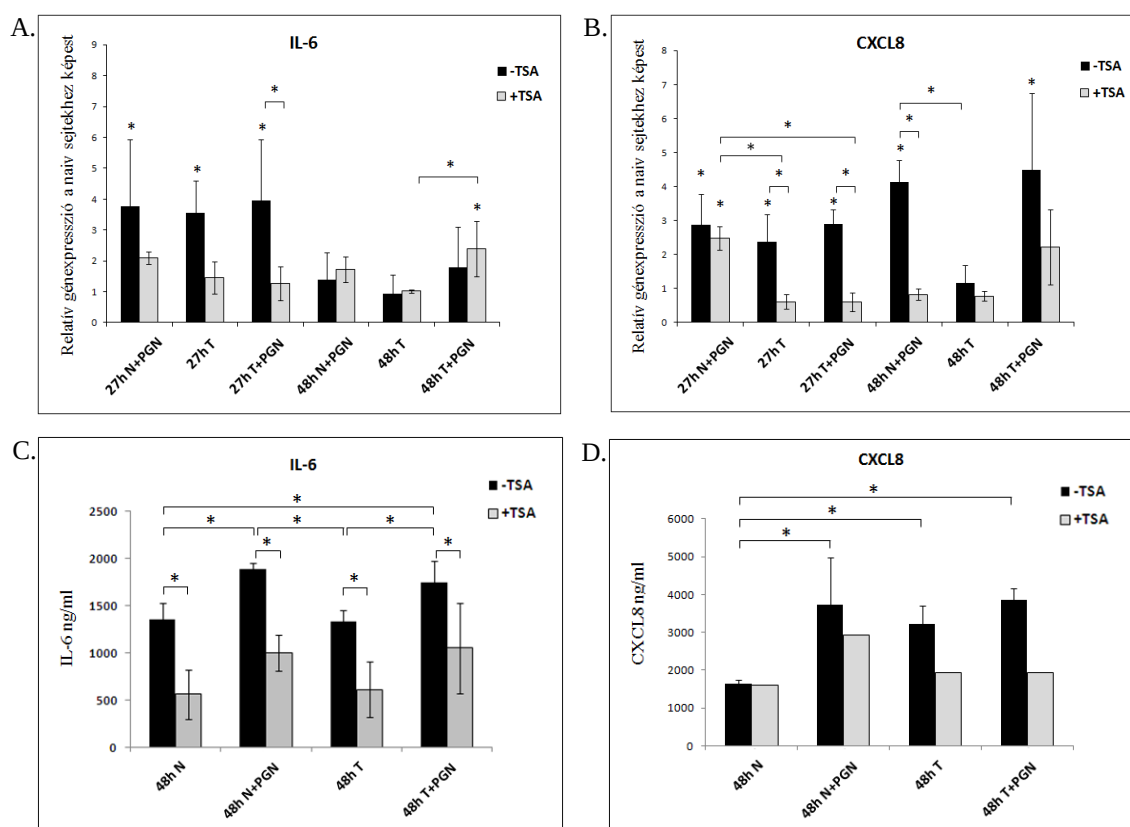
Az alább bemutatásra kerülő eredmények többsége esetén kísérleteinkben ezeket a modelleket alkalmaztuk, melyek segítségével *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a bőrben akut és krónikus mikrobiális infekciók alatt lezajló veleszületett immunfolyamatok kromatin-, gén-, és fehérje expresszió-, illetve miRNS-szintű változásait.

5.2. Gyulladáskeltő citokinek/kemokinek gén- és fehérje expressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben

A gazdaszervezet patogén mikrobával való találkozásakor különböző citokin/kemokin molekulák termelődnek, melyek nagymértékben befolyásolják az akut gyulladásos folyamatokat többek között információtovábbító-, vagy az immunválasz intenzitását és tartamát szabályozó szerepüknél fogva. Éppen ezért a megfelelő PGN kezelés után számos pro- és anti-inflammatorikus citokin/kemokin gén- és fehérje

expressziós profilját követtük nyomon keratinocitákban, melyek közül jelen dolgozatban két, a gyulladásos folyamatokban kulcsszerepet játszó mediátornak, az IL-6-nak, illetve a CXCL8-nak az akut és perzisztens PGN indukciót követő kifejeződésének vizsgálati eredményei kerülnek bemutatásra.

Megfigyelésünk alapján elmondható, hogy az egyszeri, 3 órás PGN kezelés (27h N+PGN) szignifikánsan megemelte mind az IL-6, mind a CXCL8 mRNS szintjét a kontrollhoz (27h N) képest, mely markáns génaktivitás hosszab távon (27h T) is megmaradt (7. A és B ábra, fekete oszlopok). Abban az esetben, mikor egy újbóli PGN kezelésnek tettük ki a sejteket, szintén szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a két gyulladásokeltő mediátor génkifejeződésében (27h T+PGN).



7. ábra A gyulladáskeltő IL-6 (A) és CXCL8 (B) génexpressziós mintázata keratinocitákban és a keratinociták által szekretált IL-6 (C) és CXCL8 (D) (TSA előkezelés esetén egy reprezentatív adatsor) fehérje mennyisége akut és perzisztens gyulladásos modellben (* $p < 0,05$).

A későbbi, az első PGN indukció után 48 óra elteltével vett mintákat elemezve a két effektor molekula génexpressziós mintázata már eltérést mutatott. Amíg az IL-6 esetén sem az akut, sem a perzisztens PGN kezelés sem váltott ki számottevő különbséget a

kontroll (48h N) csoporthoz képest, addig a CXCL8 mRNS-nek szignifikánsan megemelkedett szintje volt megfigyelhető a 48 órás N+PGN csoportnál. Habár ez a változás lecsengett a 48 órás T mintákban, a másodszori PGN kezelés esetén (48h T+PGN) ismételten szignifikáns génexpresszió növekedést tapasztaltunk a kontrollhoz (48h N) viszonyítva, vagyis a megfigyelt génexpresszió emelkedés nem az időben korábban bekövetkezett PGN kezelés, hanem az újakezelés direkt hatása.

A HDAC inhibitor TSA-val történt előkezelés azonban megváltoztatta azt a képet, amit önmagában a PGN indukció/reindukció okozott az IL-6 és CXCL8 gének kifejeződésében (7. A és B ábra, szürke oszlopok). Noha a TSA jelenlétében végzett 3 órás PGN kezelés (27h N+PGN) mindkét mediátor esetén fokozta a génexpressziós aktivitást - a CXCL8-nál szignifikáns mértékben - összehasonlítva a naiv, kezeletlen sejtekkel (27h N), ez az idő előrehaladtával (27h T) jelentősen mérséklődött. Ezen a helyzeten nem változtatott a PGN-nel történt másodszori kezelés (27h T+PGN) sem az IL-6, sem a CXCL8 mRNS mennyiségét tekintve.

A bőrben lezajló veleszületett immunfolyamatokban a keratinociták által termelt gyulladáskeltő mediátoroknak rendkívül fontos szerepe van a professzionális immunsejtek aktiválásában. Mivel a transzkripció és transzláció folyamatai között még számos olyan – például miRNS-szintű – szabályozó mechanizmus van, melyek befolyásolják a különböző fehérjék kifejeződését, ezért poszttranszkripcionálisan is nyomon követtük a HaCaT sejtek által termelt gyulladáskeltő fehérjék PGN indukció/reindukció utáni mennyiségét. Így, párhuzamosan a kvantitatív RT-PCR kísérletekkel, megmértük a PGN-kezelt keratinocita sejtenyészetek felülúszóiból vett mintákban a sejtek által szekretált gyulladáskeltő fehérjék mennyiségét is, melyek közül a 48 órás minták eredményei kerülnek bemutatásra, mivel ekkorra már nagy valószínűséggel lejátszódtak a PGN kezelés következtében aktiválódott transzlációs folyamatok.

A PGN indukció után (48h N+PGN) mindkét effektor molekula esetén szignifikánsan megemelkedett szekretált fehérjeszintet detektáltunk, mint ami a naiv, kezeletlen sejteknél (48h N) mérhető volt, mely fehérjemennyiség az idő előrehaladtával (48h T) az IL-6 esetén szignifikánsan, a CXCL8-nál csak enyhe mértékben csökkent (7. C és D ábra, fekete oszlopok). Azonban a második PGN kezelést követően (48h T+PGN) ez a tendencia megfordult, és ismét nagyobb koncentrációban volt jelen a felülúszóban a keratinociták által termelt IL-6 és CXCL8 fehérje.

Természetesen kíváncsiak voltunk arra is, hogy a HDAC inhibitor jelenléte hogyan befolyásolja a szekretált IL-6 és CXCL8 fehérjék mennyiségét a modellünkben. A mérések alapján összességében elmondhatjuk, hogy habár hasonló kinetikával jellemezhető, de minden esetben jelentős/szignifikáns mértékben csökkent a TSA-előkezelt keratinociták által a PGN indukciót követően szekretált IL-6 és CXCL8 fehérje mennyisége a TSA-kezeletlen sejtekhez képest (7. C és D ábra, szürke oszlopok).

Ezen transzlációs szintű, a PGN akut és perzisztens jelenlétében a gyulladáskeltő citokinek/kemokinek tanulmányozására irányuló megfigyeléseink teljes mértékben összhangban állnak a génexpressziós vizsgálatainkban kapott eredményekkel.

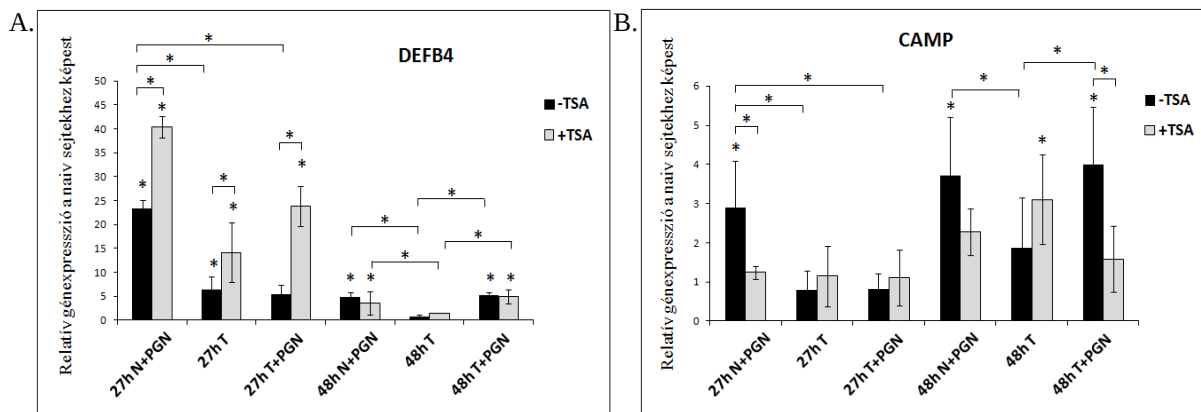
Összegezve a kapott eredményeket tehát elmondható, hogy egy rövidebb távú ismételt PGN indukció esetén a gyulladáskeltő IL-6 és CXCL8 gének továbbra is aktívak maradnak, vagyis *nem-tolerizálható* géneknek tekinthetők, melyek viszont TSA előkezeléssel *elcsendesíthetők*. Ellentétben az akut PGN indukció okozta génaktivitásbeli változásokkal, a hosszabb idejű PGN kezelés/újrakezelés kapcsán a két gyulladáskeltő mediátor génexpressziós mintázatában kialakult jelentős eltérés háttérében már másodlagos – transzlációs-, poszttranszlációs-szintű – hatások állhatnak.

5.3. Antimikrobiális peptidek génexpressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben

A citokinek/kemokinek, mint effektor molekulák mellett a veleszületett immunitásban az AMP-ek szintén kulcsfontosságúak, hiszen a direkt antimikrobiális hatásukon túl, mint kemoattraktánsok az immunsejtek gyulladásos területre történő migrációjához is elengedhetetlenek. Éppen ezért keratinocitákon végzett kísérleteinkben az akut, illetve perzisztens PGN indukció AMP-ekre gyakorolt génexpressziós hatását is nyomon követtük. Jelen dolgozatban a DEFB4 és CAMP vizsgálatának eredményei kerülnek bemutatásra.

A rövid idejű, 3 órás PGN kezelés (27h N+PGN) szignifikánsan megemelte a DEFB4 és CAMP mRNS szintjét - a DEFB4 esetén sokkal drasztikusabb mértékben - a kontroll csoporthoz (27h N) képest, ami a később történt mintavételezés időpontjára (27h T) mindkét esetben szignifikánsan lecsökkent (8. A és B ábra, fekete oszlopok). Fontos megfigyelés, hogy egy újbóli PGN kezelés sem volt képes újra fokozni sem a DEFB4, sem a CAMP gén működését (27h T+PGN). A hosszabb idejű, 48 órás PGN indukció is szignifikáns emelkedést eredményezett a DEFB4 és CAMP génexpressziójában (48h

N+PGN). Ez a jelentős változás a 48 órás T mintákban mérséklődött, azonban a PGN perzisztens jelenlétekor (48h T+PGN) a génaktivitásban ismét szignifikáns növekedés következett be a naív sejtekhez (48h N) viszonyítva.



8. ábra A DEFB4 (A) és CAMP (B) antimikrobiális peptidek génexpressziós mintázata keratinocitákban akut és perzisztens gyulladásos modellben (* $p < 0,05$).

Ahogy a gyulladásokeltő mediátorok esetében, a HDACi-os előkezelés megváltoztatta a DEFB4 és CAMP génexpressziós mintázatát is. A TSA jelenléte tovább növelte - az önmagában is szignifikáns mértékű - akut PGN indukciót követő DEFB4 mRNS szintet (27h N+PGN), amely az idő előrehaladtával jelentős mértékben lecsökkent (8. A és B ábra, szürke oszlopok). Ezt a tendenciáit azonban az ismételt PGN kezelés megfordította, újraaktiválva a DEFB4 gént (27h T+PGN). Továbbá elmondható, hogy a hosszabb idejű, 48 órás egyszeri, illetve ismételt PGN indukciókor is, noha jóval kisebb mértékű, de hasonló kinetikájú génexpressziós mintázat volt megfigyelhető. Ezzel szemben a TSA-előkezelte keratinociták akut és perzisztens PGN kezelését követő CAMP génexpressziós mintázata eltért a DEFB4-nél látottaktól. A TSA előkezelés szignifikánsan csökkentette a CAMP mRNS szintjét a 3 órás PGN indukció során (27h N+PGN), ami nem változott sem az idő előrehaladtával (27h T), sem a PGN-nel történt másodszori kezeléskor sem (27h T+PGN).

A kapott eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a keratinociták, mint félprofesszionális immunsejtek az AMP-ek esetén képesek a tolerancia jelenségét mutatni, mivel a rövidtávú, ismételt PGN indukció *elcsendesíti/tolerizálja* a DEFB4 és CAMP gén működését, ami viszont TSA előkezeléssel - a DEFB4 esetén - *reaktíválható*.

5.4. Hiszton fehérjék módosulásának dinamikája akut és krónikus gyulladásos modellben

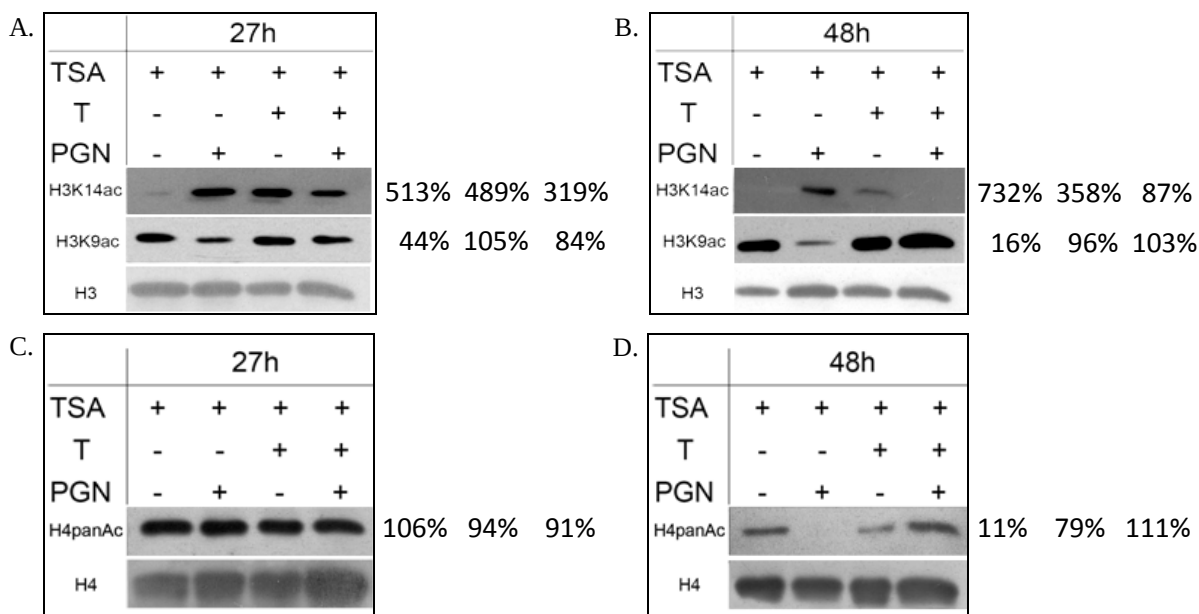
A fehérjék, így a hisztonok poszttranszlációs módosítása befolyásolja a fertőzéskor kialakuló gyulladásos reakciók kimenetelét. A kromatin struktúrája, illetve annak dinamikus változása - például az acetiláció következtében - számos gyulladásos gén aktivitását megnöveli bakteriális infekciót követően. Annak érdekében, hogy azonosítani tudjuk azokat a szabályozó mechanizmusokat, melyek a keratinociták, mint a bőr félprofesszionális immunsejtjei esetén tapasztalt *tolerizálható/nem-tolerizálható* fenotípust okozzák, a hiszton fehérjék globális acetilációs szintjeit is vizsgáltuk. Ismerve a hiszton acetiláció transzkripció aktivációt nagymértékben módosító hatását, modellünkben a H3 és H4 hiszton fehérjék acetilációjának tanulmányozásához a szakirodalomra támaszkodva választottuk ki a konzervált N-terminális farki régió egyes pozícióiban lévő lizin aminosavakat. HaCaT keratinocitákban az akut és perzisztens PGN indukciót követő epigenetikai változásokra irányuló vizsgálataink immunfluoreszcens festési eljárással, illetve Western blot technika segítségével történtek. Jelen dolgozatban a Western blot eredmények - melyek során minden alkalommal TSA előkezelés történt - kerülnek bemutatásra egy-egy reprezentatív kísérleten keresztül.

A HDACi előkezelést követő 3 órás PGN indukció erőteljesen lecsökkentette a H3K9 acetilációs szintjét a 27h N+PGN mintában a kontroll, csak TSA-előkezelte sejtekhez (27h N) képest (9. A ábra). Az idő előrehaladtával (27h T) ez a csökkenés az acetilációban eltűnt, és ismét visszaállt arra a szintre, ami a naiv sejtek (27h N) esetén volt tapasztalható. Mikor egy második PGN kezelésnek is kitettük a sejteket (27h T+PGN), olyan markáns csökkenés a H3K9 acetilációjában, mint amit az akut PGN indukciókor láttunk, nem volt megfigyelhető.

Mikor a H3 14-es helyzetű lizin acetiláció mértékének az akut PGN indukció utáni változását tanulmányoztuk – szemben a H3K9-nél látottakkal – a TSA-előkezelte, majd egyszeri PGN kezelésnek kitett keratinociták (27h N+PGN) esetén a kapott jel intenzitásának markáns kifejeződése a H3K14 globális acetiláltságának erőteljes növekedésére, ezáltal fokozott transzkripció aktivitásra utalt a PGN-kezeletlen, naiv sejtekhez (27h N) képest (9. A ábra). Ez a nagymértékű változás hosszútávon is (27h 2T), és a PGN perzisztens jelenlétekor is megmaradt (27h T+PGN).

Érdekes megfigyelésünk a nukleoszómát felépítő másik hiszton fehérje, a H4 hiszton össz-acetiláltsági fokának (H4panAc) változását vizsgálva modellünkben, hogy a

TSA-előkezelt keratinociták PGN-nel történt indukciója/reindukciója sem változtatta meg a 27 órás mintákban (27h N+PGN, 27h T+PGN) a H4panAc szint nagyságát a kontrollhoz (27h N) képest (5. C ábra). Hasonló jelenséget tapasztaltunk az időben elnyújtott mintavételezéskor is (27h T).



9. ábra A H3 hiszton K9 és K14 acetilációs szintjeinek (A, B) és a H4 hiszton össz-acetilációs szintjének módosulása (C, D) keratinocitákban akut és perzisztens gyulladásos modellben TSA előkezelést követően.

A hosszútávú, tehát az első PGN indukció után 48 órával történt mintavételezéskor a H3K9 acetiláltsági fokának vizsgálata hasonló képet mutatott, mint amit a 27 órás mintáknál is láttunk. Nevezetesen, a 48 órás N+PGN minta esetén az acetiláltsági szint drasztikusan lecsökkent a kontrollhoz (48h N) képest, ami az idő előrehaladtával (48h T) ismét a kiindulási állapottal volt megegyező, és szintén a kontrollhoz (48h N) hasonló H3K9 acetiláltsági fokot tapasztaltunk a PGN-nel történt újbóli kezeléskor (48h T+PGN) is (9. B ábra).

Ahogy a 27 órás minták esetén már megfigyeltük, úgy a 48 órás mintáknál is az egyszeri PGN indukció után (48h N+PGN) ellentétes irányban változott a H3K14 acetiláltsága a 9-es pozíciójú lizinhez képest (9. B ábra). Az idő előrehaladtával, noha még mindig magasabb acetiláltsági szint volt detektálható, mint a PGN-kezeletlen sejteknél (48h N), az acetiláció foka jelentősen lecsökkent a 48h T mintában. Az egyszeri PGN indukciókor fokozódó H3K14 acetiláltság - mely globálisan elősegíti a génkifejeződést -, a

második PGN kezelés (48h T+PGN) következtében teljesen megszűnve, a kontrolléval (48h N) megegyező eredményt mutatott.

Érdekes fordulat következett be a H4 hiszton fehérje panAc szintjét a későbbi, 48 órás időpontban tanulmányozva. Amíg a 27 órás mintákban a PGN indukció/reindukció nem hozott változást a H4 hiszton össz-acetiláltságában (9. C ábra), addig a hosszútávú, egyszeri PGN kezelés (48h N+PGN) esetén drámai csökkenést tapasztaltunk, ami az idő előrehaladtával (48h T) mérséklődött (9. D ábra). A második PGN indukciót követően (48h T+PGN) a H4-es hiszton fehérje N-terminálisán lévő lizinek acetiláltsága közel a kontrolléval (48h N) volt megegyező.

	27h		48h	
+ TSA	N+PGN	T+PGN	N+PGN	T+PGN
H3K9	↘	↗	↘	↗
H3K14	↗	↘	↗	↘
H4panAc	—	—	↘	↗

10. ábra A H3 és H4 hiszton fehérjék acetilációs szintjeinek változása akut és perzisztens gyulladásos modellben. ↗ : acetilációs szint növekedés, ↘ : acetilációs szint csökkenés, → : azonos acetilációs szint, — : nincs változás az acetilációs szintben (a változás a naív-, vagy az egyszer PGN-kezelt sejtekhez képest értendő).

Összegezve eddigi megfigyeléseinket elmondható, hogy a PGN indukció/reindukció eltérő módon befolyásolta a H3 és H4 hiszton fehérjék adott pozíciójú lizin aminosavainak acetiláltsági fokát (10. ábra). Ezen globális szintű epigenetikai változások – melyek módosítják a gén-specifikus szabályozó mechanizmusokat – többek között a veleszületett immunrendszer tolerizálhatósági kapacitásának magyarázatául szolgálhatnak.

5.5. Akut és perzisztens PGN indukció – mikroRNS-szintű – poszttranszkripcionális hatása

Mivel az eddigi eredményeink arra utaltak, hogy a TLR2 mikrobiális ágenssel történő aktivációja transzkripcionálisan, illetve transzlációs szinten is változást eredményez – melyben epigenetikai hatások is szerepet játszanak –, kíváncsiak voltunk

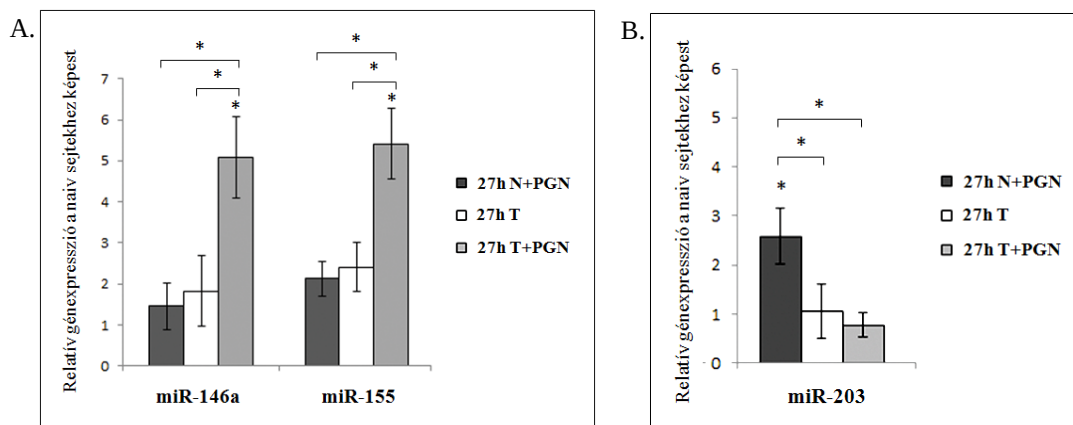
arra, hogy az akut és perzisztens PGN kezelés befolyásolja-e a félprofesszionális immunsejtekben lezajló, miRNS-ek által szabályozott poszttranszkripcionális folyamatokat. Tettük mindezt azért, mert amíg a miRNS-ek sejtnövekedésben, apoptózisban, differenciációban és morfológiai fejlődésben betöltött szabályozó szerepe már ismert, addig a különböző gyulladásos betegségek – mint a bőrt érintő pikkelysömör – esetén történt kifejeződésük, funkciójuk kevésbé tanulmányozott. Hogy választ kapjunk erre a kérdésünkre, a megfelelő PGN indukciók után keratinocitákban kifejeződő 3 miRNS-nek az expressziós profilját tanulmányoztuk. Nevezetesen annak a miR-146a-nak és miR-155-nek a kifejeződését, melyek számos szövet- és sejttípusban expresszálandó hatékonyan részt vesznek a különböző immunfolyamatokban, összehasonlítva a miR-203, mint keratinocita-specifikus, pikkelysömörös bőrben jelentős mértékben kifejeződő miRNS expressziós mintázatával (Sonkoly, 2007).

5.5.1. Keratinocitákban kifejeződő miRNS-ek expressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben

A miR-146a, valamint a miR-155 esetén megállapítottuk, hogy az egyszeri, rövid idejű PGN kezelés (27h N+PGN) nem okozott változást az expressziós aktivitásban, és hasonló eredményt kaptunk a későbbi időpontban történt mintavételezéskor (27h T) is (11. A ábra). Ezzel szemben, mikor egy második PGN kezelésnek tettük ki a sejteket (27h T+PGN), az expresszió szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető mind a miR-146a, mind a miR-155 esetén.

Ezen – keratinocitákban elsőként tett – megfigyelésünk alapján a miR-146a-t és a miR-155-öt *nem-tolerizálható* miRNS-ként kategorizáltuk, mely összhangban áll ezen miRNS-ek más kutatócsoportok által professzionális immunsejtekben leírt TLR ligandok jelenlétében történt indukálhatóságával (Taganov, 2006).

A miR-203 expressziós mintázata a PGN kezelést/újrakezelést követően azonban fordított képet mutatott, mint amit az előző két miRNS esetén tapasztaltunk. Az egyszeri, 3 órás PGN indukció (27h N+PGN) szignifikáns növekedést eredményezett a miR-203 expressziójában, azonban ez a megemelkedett aktivitás az idő előrehaladtával szignifikánsan lecsökkent (27h T), visszaállva a kezeltlen csoportnál (27h N) kapott értékre (11. B ábra). Ráadásul – szemben a miR-146a-val és a miR-155-tel –, egy újbóli PGN kezeléskor (27h T+PGN) sem volt újra aktiválható a miR-203, így a miR-203-at, mint *tolerizálható* miRNS-t definiáltuk.



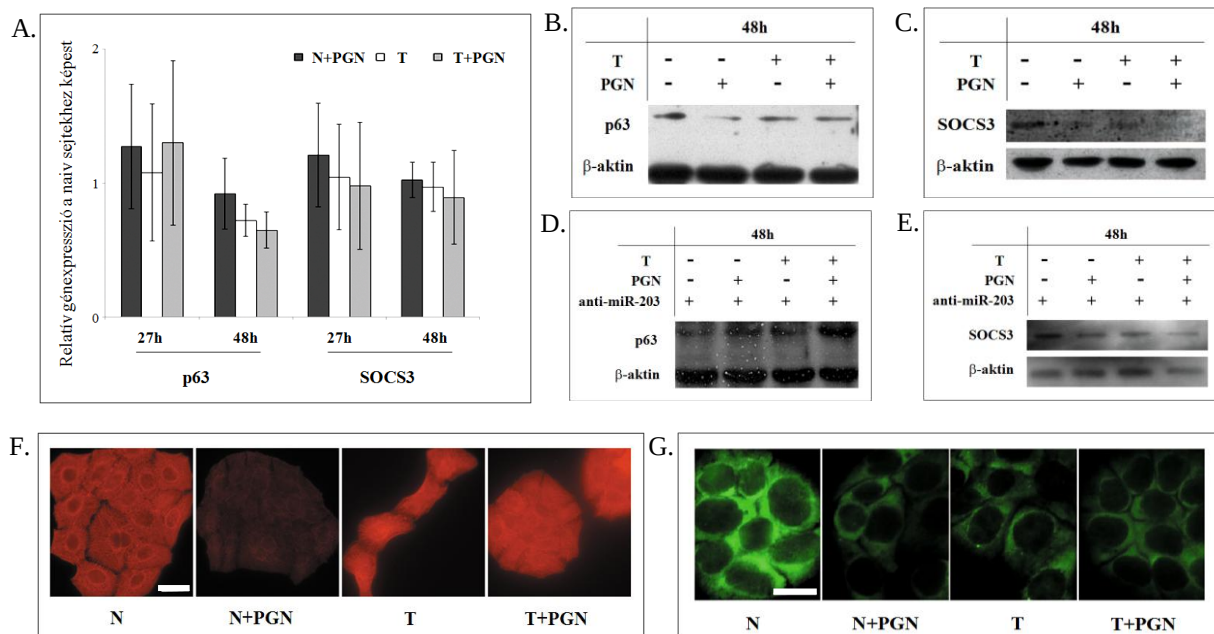
11. ábra A miR-146a és miR-155 (A), valamint a miR-203 (B) miRNS-ek expressziós mintázata keratinocitákban akut és perzisztens gyulladásos modellben (* $p < 0,05$).

Noha epidermális sejtek mikrobával történő találkozása után a miR-203 indukciójára már van adat (Moffatt, 2011), az általunk kapott eredmények az első bizonyíték arra, hogy perzisztens infekciót modellezve a keratinocita-specifikus miR-203 szuppresszálódik.

5.5.2. A miR-203 targetfehérjék, a p63 és SOCS3 gén- és fehérje expressziós mintázatának változása akut és krónikus gyulladásos modellben

Miután kísérleti modellünkben azt találtuk, hogy a keratinocita-specifikus miR-203 a PGN perzisztens jelenlétében tolerizálható, kíváncsiak voltunk, hogyan változik két ismert targetjének, a p63-nak, valamint a SOCS3-nak a gén-, illetve fehérje expressziós mintázata.

Kvantitatív RT-PCR kísérleteinkben először a 3 és 24 órás PGN kezelés/újrakezelés p63 és SOCS3 génexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy sem a 3 órás, sem a 24 órás PGN indukció/reindukció nem okozott változást ezen gének expressziójában (12. A ábra). Párhuzamosan a génexpressziós mintázatok vizsgálatára irányuló kísérletekkel, a keratinociták PGN kezelését/újrakezelését követően a p63 és SOCS3 fehérjék mennyiségét Western blot technika segítségével tanulmányozva – és immunfluoreszcens festési eljárás felhasználásával is alátámasztva – azt tapasztaltuk, hogy a rövid, 3 órás kezelés (27h N+PGN) nem befolyásolta ezen miR-203 célfehérjék kifejeződését a kontrollhoz képest (adat nincs mutatva). További megfigyelés, hogy az időben elnyújtott PGN indukció (27h T), illetve az újrakezelés (27h T+PGN) sem okozott különösebb változást a p63 és SOCS3 fehérje expressziójában.



12. ábra A miR-203 targetfehérjéinek - p63 és SOCS3 - génexpressziós mintázata (A) keratinocitákban akut és perzisztens gyulladásos modellben. A p63 (B, F) és SOCS3 (C, G) fehérjék expressziójának dinamikája keratinocitákban, illetve ugyanez anti-miR-203 konstrukt transzfektálását követően (D, E) akut és perzisztens gyulladásos modellben. Skála: 20 μm.

A hosszabb idejű PGN kezelés után – mikorra az indukciót követő translációs folyamatok már biztosan lezajlottak – gyűjtött minták p63 és SOCS3 fehérjemennyiségeit analizálva viszont már egészen más képet kaptunk, mint amit egy rövid, 3 órás indukció esetén megfigyeltünk. Eszerint 24 órával a mikrobiális ágens sejtekhez való hozzáadását követően drasztikus fehérje expresszió csökkenést tapasztaltunk a kontroll minta p63 fehérjeszintjéhez képest, mely változás a másik miR-203 target, a SOCS3 fehérje esetén is megfigyelhető volt (12. B, C, F, G ábra). Ezt a jelentős expresszió csökkenést sem a 48h T mintában, sem az újbóli PGN kezelésnek kitett sejtekben (48h T+PGN) nem láttuk.

Ahhoz, hogy a PGN kezelés/újrakezelés után az ellentétes irányú kifejeződést mutató keratinocita-specifikus miR-203, valamint a p63 és SOCS3 fehérjék között a direkt kapcsolatot kimutassuk, a PGN kezelést megelőzően egy anti-miR-203 konstruktot transzfektáltunk a HaCaT sejtekbe. 24 órával a második PGN indukció után a sejtekből kivont totál fehérjéből Western blot eljárással meghatározott p63 és SOCS3 fehérjék mennyiségeit elemezve jól látható, hogy a keratinociták PGN indukció előtti transzfekciója az anti-miR-203 konstruktal teljes mértékben megszüntette a p63 és SOCS3 fehérjék alacsonyabb expressziós szintjét (12. D, E ábra). A miR-203 és p63, illetve SOCS3 közötti

direkt kapcsolatot a kontroll üres vektorral végzett transzfektálás – ahol a célfehérjék csökkent mértékű kifejeződése továbbra is megfigyelhető volt – csak megerősítette (adat nincs mutatva). Ezek az eredmények egyértelműen rámutatnak a miR-203 p63, valamint SOCS3 fehérjék PGN-indukált poszttranszkripcionális szabályozásában betöltött direkt szerepére.

5.6. A veleszületett immunitás negatív szabályozóinak szerepe akut és krónikus gyulladásos modellben

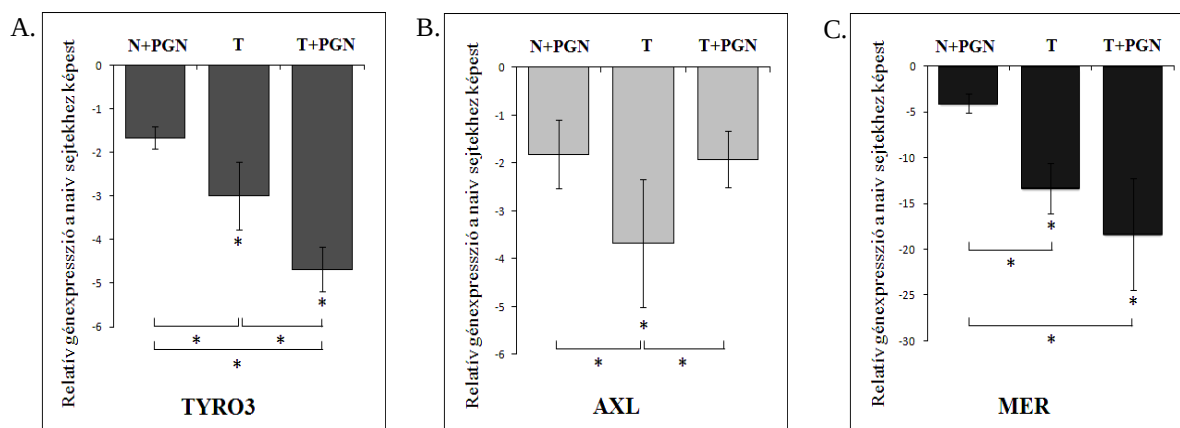
A patogén mikrobával való találkozáskor a gazdaszervezet különböző típusú sejtjei – epitélsejtek, hízósejtek, dendritikus sejtek, makrofágok, granulociták, stb. – együttműködésük révén megteremtik annak a lehetőségét, hogy a fertőzésre egy gyors és hatékony válasz jöjjön létre. A betolakodó kórokozók eliminálásakor kialakult gyulladás intenzitása és időtartama nagymértékben függ az inflammációt serkentő mechanizmusok megfelelő kontrollálásától. Miután HaCaT immortalizált keratinocitákon beállított modellünkben tanulmányoztuk az akut és krónikus gyulladás különböző – transzkripciós-, poszttranszkripciós-, valamint transzlációs szintű – hatásait, érdekelt bennünket, hogy az utóbbi időben a veleszületett immunitással kapcsolatba hozott, egyfajta fékentartó szereppel bíró, a gyulladás mértékét negatívan szabályozó TAM receptorok (TYRO3, AXL, MER) gén-, illetve fehérjeszintű expressziója hogyan változik különféle mikrobiális ágens jelenlétében. Mivel a veleszületett immunfolyamatokban sokféle sejtípus vesz részt, kiterjesztettük azon – félprofesszionális és professzionális – sejtek körét is, melyek szerepe az emberi szervezetben lezajló, gyulladással járó folyamatokban elengedhetetlen.

5.6.1. A TAM receptorok gén- és fehérje expressziós mintázatának vizsgálata különböző mikrobiális ágenssel történt kezelés esetén professzionális immunsejtekben

A bőrben a keratinociták mellett a dendritikus sejtek, mint antigén prezentáló sejtek (APC) szintén fontos szerepet töltenek be a veleszületett immunfolyamatokban. Éppen ezért a professzionális immunsejtek közül a TLR2 aktiválásakor/reaktíválásakor a TAM receptorok egyes tagjainak – TYRO3, AXL, MER – génexpresszióját érintő változásokat először PBMC-ből differenciáltatott éretlen dendritikus sejtekben vizsgáltuk.

Megfigyelésünk, hogy az egyszeri, 3 órás PGN kezelés (27h N+PGN) csökkenést hozott a TAM-ok génexpressziós aktivitásában a kontrollhoz képest (13. A, B, C ábra), mely csökkenés a MER esetében volt a legmarkánsabb. A későbbi időpontban történt

mintavételezéskor már mindhárom receptornál szignifikánsnak mutatkozott az alacsonyabb szintű kifejeződés (27h T). Mikor az éretlen dendritikus sejteket egy újbóli PGN kezelésnek (27h T+PGN) tettük ki, azt találtuk, hogy noha az AXL receptornál szignifikánsan mérséklődött, a TYRO3 és MER esetén tovább folytatódott ez a csökkenő tendencia a génexpressziót illetően.



13. ábra A TAM receptorok - TYRO3 (A), AXL (B), MER (C) - génexpressziós mintázata éretlen dendritikus sejtekben akut és perzisztens gyulladásos modellben (* $p < 0,05$).

Érett dendritikus sejteken végzett kísérleteink - habár a változás mértékét tekintve eltért attól, amit az éretlen dendritikus sejteknél láttunk - alátámasztották a PGN kezelésnek a TAM receptorok génexpressziójára gyakorolt gátló hatását (adat nincs mutatva).

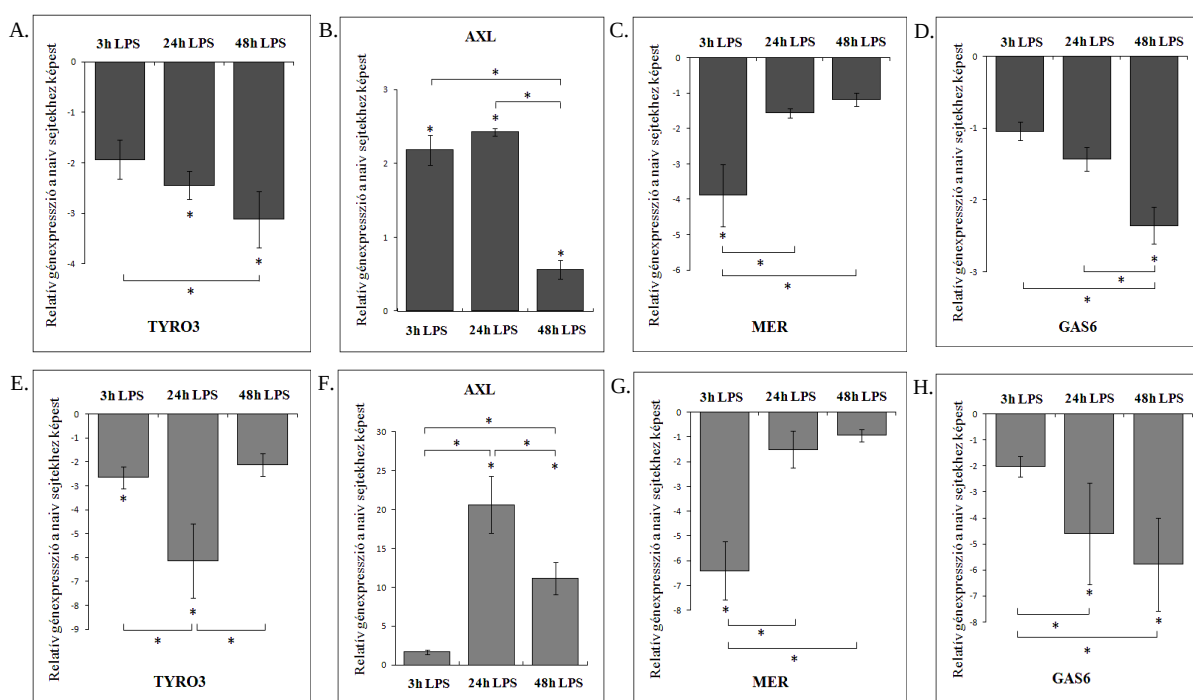
A TAM receptorok csökkent kifejeződésére – azaz a gyulladás negatív szabályozásának gyengülésére – tett megfigyeléseink összhangban állnak azokkal a laboratóriumunkban éretlen és érett dendritikus sejteken végzett kísérletek eredményeivel, melyekben az akut és perzisztens PGN kezelést követően a gyulladáskeltő citokin/kemokin effektor molekulák expressziója erőteljesen megnövekedett (Filkor, 2013).

Miután azt tapasztaltuk, hogy a rövid ideig tartó PGN kezelés/újratezelés hatására dendritikus sejtekben, mint APC sejtekben megváltozik a TAM-ok génexpressziós aktivitása, kíváncsiak voltunk, hogy más típusú, és *in vitro* körülmények között könnyebben tanulmányozható professzionális immunsejt esetén is tapasztalható-e változás a negatív regulátorok kifejeződésében.

Választásunk a THP-1 monocita sejtekre esett, mivel a monociták számos veleszületett immunfolyamatnak aktív résztvevői. Miután az előzetes kísérletekben a rövid

ideig tartó PGN indukció/reindukció hasonló génexpressziós változásokat okozott a THP-1 monocitákban (adat nincs mutatva), mint ami a dendritikus sejteknél is megfigyelhető volt, – változtatva az alap kísérleti modellünkön – megvizsgáltuk, hogy milyen kinetikával jellemezhető, illetve mutat-e eltérést a TAM receptorok expressziós mintázata különböző mikrobiális ágenssel történt hosszabtávú kezelés után.

Jelen dolgozatban az LPS kezelés hatására a TAM receptorok génaktivitásában bekövetkező változások kerülnek bemutatásra aktiválatlan-, vagyis antigénnel még nem találkozott, valamint PMA-val makrofággá differenciált THP-1 sejtek esetén. Eredményeink alapján elmondható, hogy az aktiválatlan THP-1 sejtek TYRO3 génexpressziós szintje az LPS indukció után az idő előrehaladtával folyamatosan csökkent (14. A ábra). Aktivált THP-1 sejtek TYRO3 mRNS-e 24 órával az LPS kezelést követően mutatta a szignifikánsan legalacsonyabb mennyiséget a kezletlen sejtekhez képest, amely nagyfokú expresszió csökkenés a későbbi, 48 órás időpontban történt mintavételezéskor már teljes mértékben lecsengett (14. E ábra).



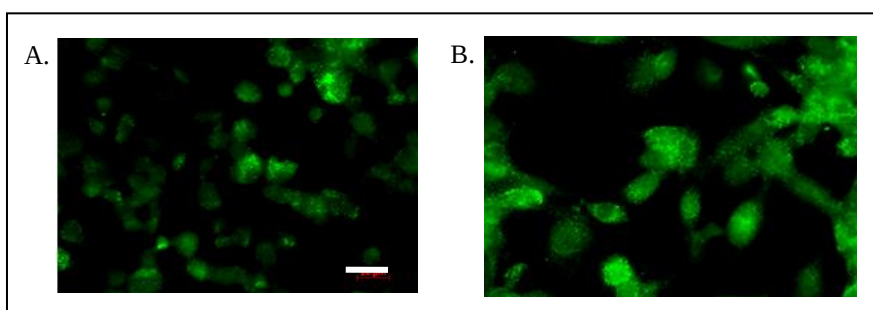
14. ábra A TAM receptorok - TYRO3, AXL, MER -, valamint a TAM ligand GAS6 génexpressziós mintázatának kinetikája LPS kezelés hatására aktiválatlan- (A, B, C, D) és PMA-aktivált THP-1 monocitákban (E, F, G, H) (* p<0,05).

Érdekes megfigyelés, hogy a másik TAM receptor, az AXL génexpressziós aktivitása – szemben a TYRO3-nál látottakkal – az LPS indukciót követően a 3 illetve 24 órás mintákban szignifikánsan megemelkedett az aktiválatlan THP-1 sejtekben, azonban 48 órával a kezelés után már a génexpresszió markáns csökkenése volt megfigyelhető (14. B ábra). Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy az LPS kezelés az aktivált THP-1 sejtekben jóval nagyobb mértékű szignifikáns növekedést hozott az AXL gén aktivitásában az adott mintavételezési időpontokban, mint amit az aktiválatlan THP-1 monocitáknál láttunk (14. F ábra)

A TAM receptorcsalád harmadik tagjának, a MER-nek az LPS jelenlétében bekövetkező génszintű kifejeződése egészen más kinetikát mutatott, mint amit az előző két receptornál megfigyeltünk. Mind az aktiválatlan, mind a PMA-aktivált THP-1 monocitákban 3 órával az LPS kezelést követő mintavételezéskor tapasztaltuk a MER mRNS szintjében a legnagyobb mértékű, szignifikáns csökkenést a kontrollhoz képest (14. C, G ábra). Ez az alacsonyabb génaktivitás az idő előrehaladtával mérséklődött, és a 24, valamint 48 órás minták génexpressziós értékei már a kezeletlen sejteknél mérttel voltak megegyezők.

Természetesen a TAM receptorok ligandjának LPS indukciót követő génexpresszió változását is nyomon követtük. Ezek szerint az LPS az aktiválatlan THP-1 sejtekben a GAS6 expressziójának folyamatos csökkenését váltotta ki, mely csökkent génaktivitás a 48 órás minták esetében már szignifikánsnak mutatkozott (14. D ábra). Ez az alacsonyabb génkifejeződés az aktivált THP-1 sejteknél tovább fokozódott (14. H ábra).

Mivel a translációs folyamatok poszttranszkripcionálisan még módosulhatnak a TAM receptorok génexpressziós mintázatának tanulmányozásán túl a fehérjeszintű kifejeződést is vizsgáltuk a különböző mikrobiális ágenssel történt indukció után.

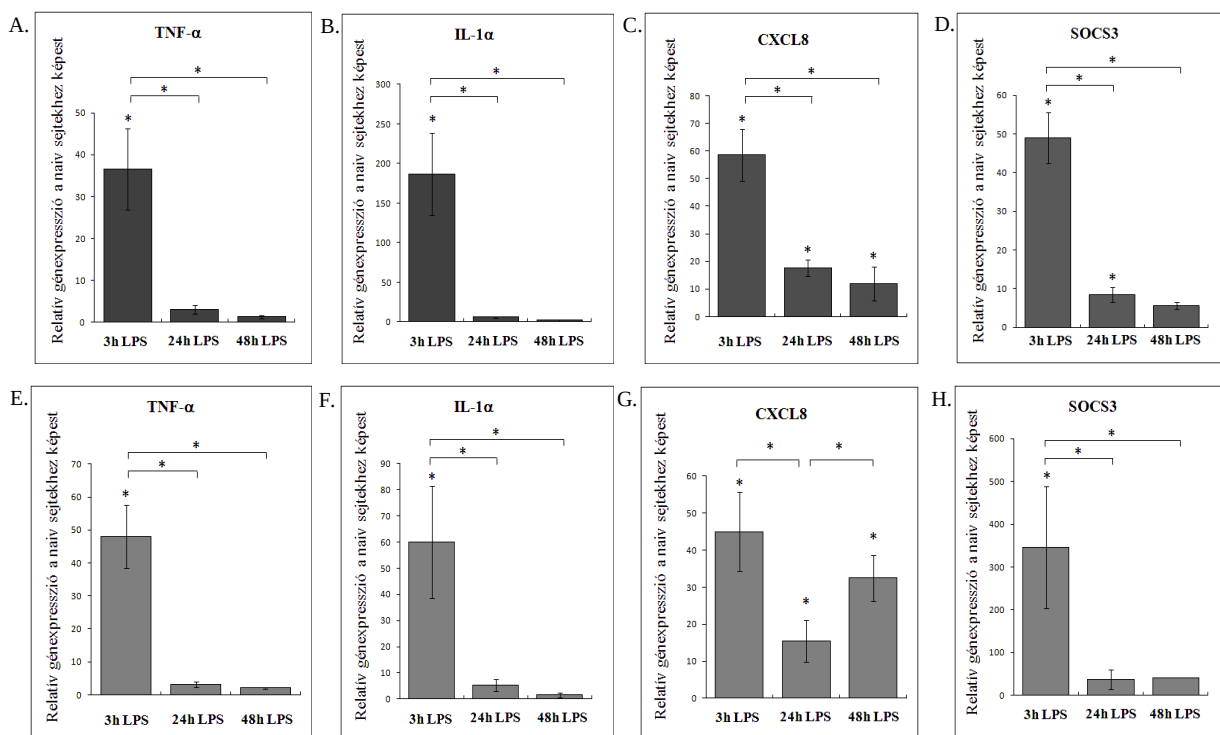


15. ábra AXL fehérje expressziója kontroll (A) és 24 órás LPS-kezelt PMA-aktivált THP-1 monocitákban (B). Skála: 20 μ m.

Az immunfluoreszcens festési eljárással kapott eredmények megerősítették a génszintű változásokat, amit jelen esetben az LPS kezelés okozta megnövekedett AXL fehérje expresszió is bizonyít (15. A, B ábra).

A TAM receptorok gén-, és fehérjeszintű vizsgálatával párhuzamosan – ahol az AXL kivételével erőteljes kifejeződésbeli csökkenést tapasztaltunk – a veleszületett immunfolyamatokban fontos szerepet játszó pro- és anti-inflammatorikus mediátorok génexpressziós mintázatát is figyelemmel kísértük különböző mikrobiális ágenssel történt kezelés után, melyek a THP-1 sejteknél az LPS indukciót követő TNF- α , CXCL8, IL-1 α , valamint SOCS3 génaktivitásbeli változásain keresztül kerülnek bemutatásra.

Már 3 órával az LPS kezelés után szignifikánsan megemelkedett a gyulladáskeltő TNF- α és IL-1 α génexpressziója mind aktiválatlan mind aktivált THP-1 sejtekben a kontrollhoz képest (16. A, B, E, F) ábra. Ez a szignifikánsan fokozott génkifejeződés azonban az idő múlásával drasztikusan csökkent, ami 48 órával a kezelést követően már a kezeletlen sejtekével egyezett meg.



16. ábra A TNF- α , IL-1 α , CXCL8 és SOCS3 génexpressziós mintázatának kinetikája LPS kezelés hatására aktiválatlan- (A, B, C, D) és PMA-aktivált THP-1 monocitákban (E, F, G, H) (* $p < 0,05$).

Hasonlóan a TNF- α -hoz és IL-1 α -hoz, a gyulladáskeltő CXCL8-nál is röviddel az LPS kezelés után volt megfigyelhető a legnagyobb mértékű, szignifikáns génaktivitás, ami a későbbi időpontokban, habár még mindig szignifikánsan magasabb génexpressziós értéket mutatott a kontrollhoz képest, de – elsősorban az aktiválatlan THP-1 sejtek esetén – jelentősen csökkent (16. C, G ábra).

Az LPS kezelésre a THP-1 monociták gyulladáskeltő citokinek/kemokinek gyors aktiválásával válaszoltak. Mivel a gyulladásos folyamat kontrollálása, finom hangolása szintén fontos mozzanata a veleszületett immunitásnak, az inflammációt elősegítő effektor molekulák génszintű kifejeződésével párhuzamosan többek között a citokin szignalizációt szuppresszálo fehérjék (SOCS) – melyek a negatívan szabályozó TAM szignalizációnak is részesei – génexpressziós mintázatát is nyomon követtük az LPS indukciót követően.

Konkrétan a SOCS3 esetén a gén aktivitása hasonló kinetikával volt jellemezhető, mint amit a gyulladáskeltő mediátoroknál láttunk. A TLR4 aktiváció után párhuzamosan a gyulladást előidéző effektor molekulák megemelkedett génaktivitásával egy nagyon gyors, szignifikáns SOCS3 génexpresszió növekedés következett be – az aktivált THP-1 monocitáknál sokkal erőteljesebben –, ami a későbbi mintavételezési időpontokban szignifikánsan lecsökkent (16. D, H ábra).

Összegezve a THP-1 monocitákon végzett, LPS indukció utáni génexpressziós kinetikai vizsgálataink eredményeit elmondhatjuk, hogy a gyulladásos folyamatokat negatívan szabályozó TYRO3 és MER receptoroknál tapasztalt néhány órán belüli, gyors génaktivitásbeli csökkenés – ami a harmadik TAM receptor, az AXL kissé emelkedett expressziójával társul –, jól párhuzamba hozható az LPS kezelést követően a gyulladáskeltő effektor molekuláknál (TNF- α , IL-1 α , CXCL8) látott gyors, drasztikus mértékben megnőtt génkifejeződésével. Megint csak magyarázható a későbbi – 24 és 48 óras – időpontban történt mintavételezéskor a TAM-ok és a gyulladáskeltő mediátorok génexpressziós aktivitásának összehasonlítása, mikor is az AXL szignifikánsan megnőtt génexpressziójával, valamint a MER downreguláltságának mérséklődésével – tehát a negatív reguláció felerősödésével – egyidejűleg a gyulladást elősegítő effektorok génkifejeződése szignifikáns mértékben lecsökkent.

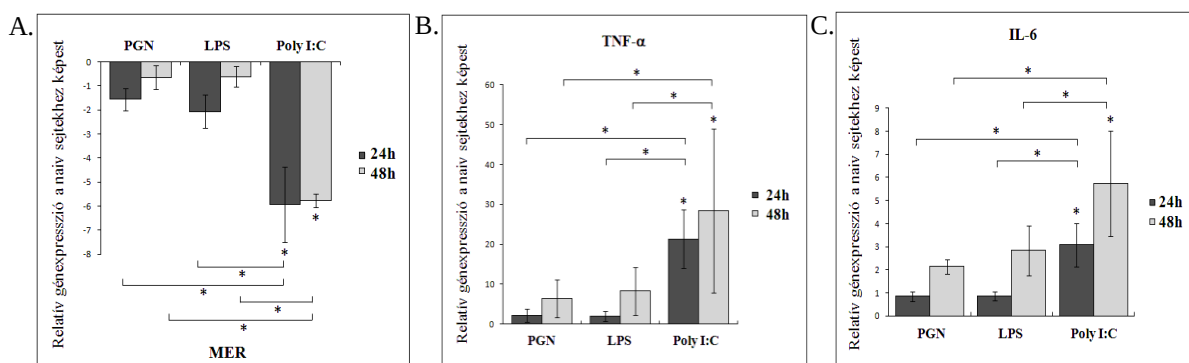
Érdekes megfigyelés viszont, hogy az anti-inflammatórikus hatású molekulák közül, a TAM receptorok által aktivált SOCS3 génexpressziója szintén rövid időn belül drámai módon megemelkedett az LPS indukciót követően, holott a TAM receptorok

expressziója csökkenést mutatott. Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy a SOCS3 LPS kezelést követő génszintű kifejeződésében bekövetkező változásokért nemcsak a TAM receptorok a felelősek.

5.6.2. A TAM receptorok génexpressziós mintázatának vizsgálata félprofesszionális immunsejtekben különböző mikrobiális ágenssel történt kezelés esetén

Miután megfigyeltük, hogy dendritikus sejteknél és THP-1 monocitáknál, mint professzionális immunsejteknél a mikrobiális ágenssel (PGN vagy LPS) történt kezelést követően a TAM receptorok (LPS esetén az AXL kivétel) és a ligandjuk génexpressziója is csökken, amivel párhuzamosan a gyulladásokeltő citokinek/kemokinek transzkripciós szintű kifejeződésének növekedését tapasztaltuk, kiterjesztettük a vizsgálatokat további, a veleszületett immunitás kapcsán ún. félprofesszionális immunsejtekre is. Ezen túlmenően a PGN és LPS, mint TLR2 és TLR4 ligandok mellett a TLR3 agonista poly I:C-vel, mint kettős szálú RNS analóggal is kezeltük a sejteket annak érdekében, hogy a bakteriális fertőzések modellezése mellett megállapítsuk egy virális infekció TAM receptorok expressziójára gyakorolt hatását.

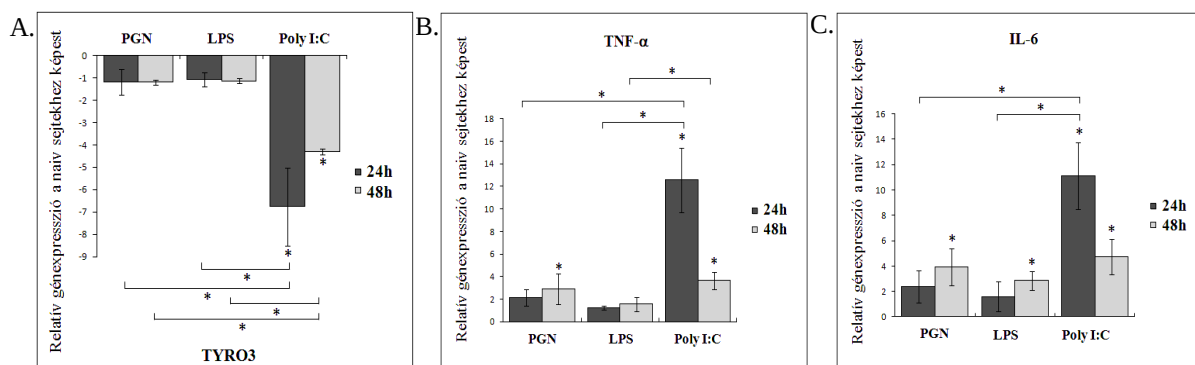
Kísérleteink egy részében éppen ezért PK E6/E7 vaginális epitelsejteket használtunk, hiszen a női nemi szerv bakteriális és virális fertőzésnek egyaránt kitett szerv. A PK E6/E7 sejtek PGN, LPS, valamint poly I:C kezelése után a TAM receptorok közül kizárólag a MER esetében tapasztaltunk génexpresszióbeli változást (17. A ábra). Fontos megfigyelés, hogy a MER kifejeződésére a poly I:C gyakorolta a legjelentősebb, szignifikáns gátló hatást, amely a PGN-től és az LPS-től eltérően nemcsak 24, hanem 48 órával az indukciót követően is megmaradt.



17. ábra PK E6/E7 sejtek MER (A), TNF-α (B) és IL-6 (C) génexpressziójának változása PGN, LPS, illetve poly I:C ágensekkel történő kezelések hatására (* p<0,05).

A MER-nél látottakkal ellentétben mindhárom mikrobiális ágens megemelte a gyulladásokeltő fehérjék - jelen vizsgálatban a TNF- α és az IL-6 - génexpresszióját (17. B, C ábra). A kapott eredményekből is kitűnik, hogy a legnagyobb mértékű, szignifikáns TNF- α és IL-6 mRNS szint növekedés a poly I:C jelenlétében történt, ami fordítottan korrelál a MER esetén tapasztalt legnagyobb mértékű expresszió csökkenéssel.

Érdekes megfigyelés, hogy a másik, általunk választott félprofesszionális immunsejt – a primer keratinociták – PGN, LPS, illetve poly I:C kezelését követően a TAM receptorok közül egy másik családtagnak, a TYRO3-nak változott a génexpressziója (18. A ábra). Azonban elmondható, hogy ismét a poly I:C kezelés okozta a legjelentősebb, szignifikáns gátló hatást mindkét mintavételezési időpontban, mellyel – a PK E6/E7 sejtekhez hasonlóan – párhuzamosan itt volt a legnagyobb, szignifikáns növekedés a gyulladásokeltő fehérjék (TNF- α és IL-6) génexpressziójában (18. B, C ábra).



18. ábra Primer keratinociták TYRO3 (A), TNF- α (B) és IL-6 (C) génexpressziójának változása PGN, LPS, illetve poly I:C ágensekkel történő kezelésekre (* $p < 0,05$).

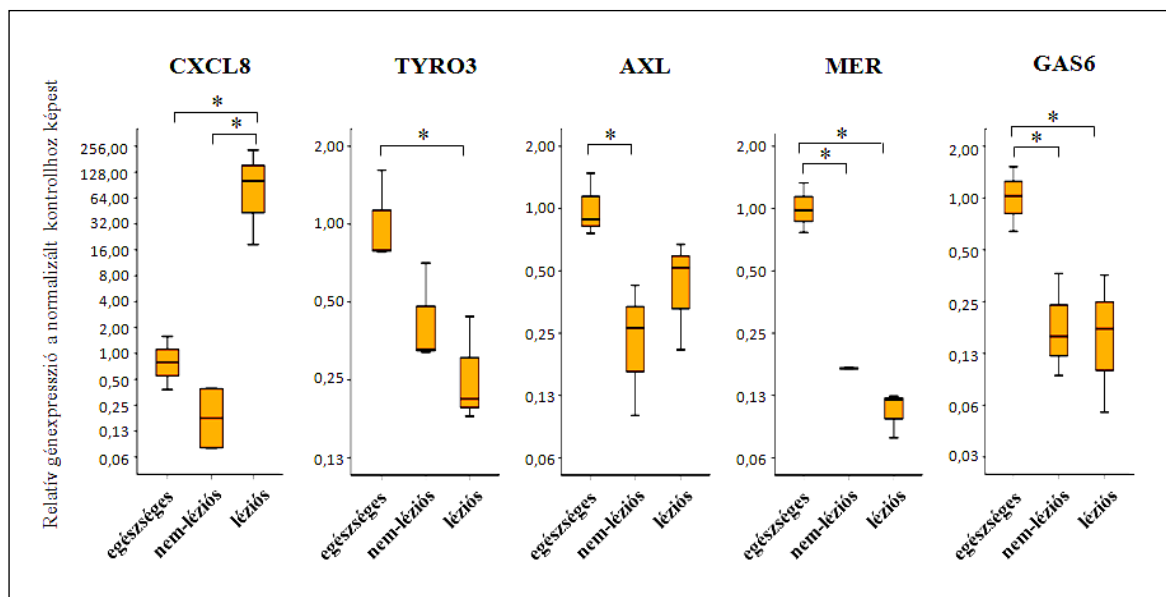
PK E6/E7 vaginális epitelsejteken, valamint primer keratinocitákon különböző mikrobiális ágenssel (PGN, LPS, poly I:C) történt indukció után a TAM receptorok, illetve ezzel párhuzamosan gyulladásokeltő effektorok (TNF- α , IL-6) génexpressziós aktivitására irányuló vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a félprofesszionális immunsejtek eltérő módon reagálnak az egyes – bakteriális, illetve virális fertőzést modellező – kezelésekre. Kísérleteinkből kitűnik, hogy ezen sejtek a poly I:C kezelésre, tehát egy virális fertőzésre adták a legnagyobb, szignifikáns mértékű csökkenést a TAM receptorcsalád egyes tagjainak génexpresszióját illetően, ami kellő összhangban állt a gyulladást elősegítő mediátorok génszintű kifejeződésével. Érdekes jelenség a két sejttípus

esetén a génexpresszió csökkenését elszenvedő TAM-ok különbözősége is, utalva az egyes sejtféleségekben a TAM receptorcsalád tagjainak eltérő szerepére.

5.7. A veleszületett immunitást negatívan szabályozó TAM receptorok génexpressziós mintázatának vizsgálata pikkelysömör esetén

Sejtenyészetekben, *in vitro* körülmények között professzionális és félprofesszionális immunsejteken végzett, akut és perzisztens mikrobiális fertőzést modellező kísérleteink során megállapítottuk, hogy egyidőben a gyulladásokeltető mediátorok markáns génexpresszió emelkedésével a TAM receptorok kifejeződésében – a legtöbb esetben – szignifikáns csökkenés történt. Ezen megfigyeléseinkből alkotott kép alapján kíváncsiak voltunk, hogy vajon a gyulladásos folyamatokat fékentartó, negatívan reguláló TAM receptorok, valamint ligandjuk milyen mértékben fejeződnek ki *in vivo* egy, a bőrt érintő krónikus gyulladással járó betegség, a pikkelysömör esetén.

Amíg a dermiszből származó pikkelysömörös és egészséges bőrminták között nem tapasztaltunk jelentős különbséget a TAM-ok génexpressziójában (adat nincs mutatva), addig az epidermisz esetén már lényeges, szignifikáns különbségek adódtak nemcsak az egészséges és pikkelysömörös minták, hanem a nem-léziós és léziós területek viszonylatában is.



19. ábra A CXCL8, a TAM receptorok - TYRO3, AXL, MER -, valamint a GAS6 génszintű kifejeződése pikkelysömörös betegek nem-léziós és léziós epidermiszében az egészséges epidermiszhez viszonyítva (* $p < 0,05$).

A 19. ábrán feltüntetett génexpressziós értékek egyértelműen mutatják, hogy az általunk kiválasztott CXCL8, mint a gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszó kemokin szignifikánsan megemelkedett génaktivitásával szemben a léziós, gyulladt területen mind a TAM-ok, mind a GAS6, mint ligand markáns, a legtöbb esetben szignifikáns transzkripcionális expresszió csökkenése áll. A CXCL8 esetén tapasztalt drasztikus mértékű génexpresszió növekedés mellett hasonló mértékű génexpressziós növekedést azonosítottunk más gyulladáskeltő gén (pl. TNF- α , TNFAIP6, stb.) esetében is (Filkor, 2013). További érdekes adat, hogy a léziós, folyamatos gyulladás alatt álló epidermisz régióból származó minták mellett a nem-léziós, tehát fenotípusosan gyulladást nem mutató epidermális területekről származó mintákban is hasonló csökkent génaktivitás figyelhető meg mind a TAM receptorok, mind a GAS6 esetén. Ezen megfigyeléseinket a pikkelysömör állatkísérletes modelljében is igazoltuk, mikor is az IMQ-kezelt egerek bőréből vett mintákban a gyulladásos markerek szignifikánsan megemelkedett mRNS szintjével egy időben a TAM receptorok és a GAS6 extrém mértékű transzkripció inaktivitását tapasztaltuk.

Így, a TAM-ok és a GAS6 nem-léziós területen is megfigyelt kifejeződésbeli csökkenése – tehát az inflammációt fékentartó szabályozó mechanizmus hiánya – esetlegesen előrevetítheti annak a lehetőségét, hogy a gyulladt terület nagysága növekedhet, illetve eddig intakt, nem gyulladt bőrterületen is kialakulhat krónikus gyulladás.

6. DISZKUSSZIÓ

6.1 A veleszületett immunfolyamatok transzkripcionális és poszttranszkripcionális szabályozása

A kültakaró, mint az emberi szervezet védelmi stratégiájának első, önmagában is komplex eleme, a mikrobákkal közvetlen érintkezve kiemelkedően fontos szerepet játszik az immunológiai folyamatokban. A bőr a kórokozók felismerésére és elpusztítására többszintű – strukturális-, celluláris-, illetve szisztémás – védekezési mechanizmussal rendelkezik, ahol az immunfolyamatokban számos sejttípus jelenléte, és aktív közreműködése szükséges. A fizikai barriert is képező epidermisz keratinocitái félprofesszionális immunsejtekként antimikrobiális peptidek termelésével, valamint különböző citokinek/kemokinek szekréciójával beindítják azokat a veleszületett immunfolyamatokat, aminek következtében a fertőzés helyére migráló antigén prezentáló sejtek (dendritikus sejtek, makrofágok) további professzionális immunsejtek (T-sejtek) aktiválásával adaptív immunválaszok létrejöttét fogják eredményezni. Így elmondható, hogy a keratinociták a professzionális immunsejtekkel közösen hatékonyan kiveszik a részüket azokból a folyamatokból, melyek segítenek eliminálni a kórokozó mikrobákat, ezáltal megőrizni a gazdaszervezet belső egyensúlyi állandóságát. Ezen védekezési mechanizmusokban a fentebb említett sejtek által expresszált mintázatfelismerő receptorok (PRR) a különböző patogén-asszociált molekula mintázatok (PAMP) felismerése révén kulcsfontosságúak. A PRR-ok közül a TLR-ok aktivációja többek között gyulladáskeltő mediátorok szekréciójával lokális gyulladást eredményez. Azonban az inflammációval járó válaszreakció bonyolult szabályozása nagy kihívás a kültakaró különböző effektor- és immunsejtjeinek, melynek során a gyulladós folyamatok időbeli lefutásának és mértékének kontrollálása kritikus pontja a hatékony védekezésnek. Ha például a gyulladás lassan alakul ki és időben elnyújtott, akkor könnyen krónikussá válhat. Ilyen perzisztens kondíciójú gyulladás az alapja számos betegségnek, többek között a bőrt érintő pikkelysömörnek is (Monteleone, 2011).

A gyulladós válaszreakciók összetettségét figyelembe véve a veleszületett immunrendszer szabályozó folyamatainak vizsgálata több szinten is történhet, melynek kapcsán a mikrobák elleni védelemben specifikus gének aktivációja, egyedi immunválaszok, a kromatint érintő 'remodeling' folyamatok indulnak be (Medzhitov, 2008). A veleszületett immunitás transzkripcionális-, epigenetikai-, illetve

poszttranszkripcionális szintű regulációjáról alkotott képünk azonban még elég hiányos. Ebből kifolyólag jelen dolgozatban többek között azon szabályozó mechanizmusok azonosítását tűztük ki célul, melyek a bőr veleszületett immunfolyamatainak gén-specifikus kontrollálásáért felelősek.

Első körben a kültakaróban nagy számban jelenlévő keratinocitákat alapul véve egy gyors és érzékeny kísérleti rendszert hoztunk létre, melyben *S. aureus*-eredetű PGN-nel történt akut és perzisztens indukció után számos gyulladásokeltető citokin/kemokin és AMP génexpresszióját vizsgáltuk. A monitorozott gének expressziós profilja alapján a gének két csoportját azonosítottuk: *nem-tolerizálható* gének (például IL-6, CXCL8) és *tolerizálható* gének (például DEFB4, CAMP). A különbség a két csoport között a második PGN kezelés után jelentkezik: amíg a nem-tolerizálható géneknél 3 órával a második indukciót követően sincs változás a génexpresszió szintjében, addig a tolerizálható gének expressziójában szignifikáns csökkenés figyelhető meg. Nakayama és mtsai hasonló TLR2 aktivációt követő tolerancia jelenséget írtak le RAW264.7 egér makrofág sejtek esetén, ahol a magas koncentrációjú PGN előkezelést követő újbóli PGN indukció a szekretált TNF- α mennyiségének csökkenését eredményezte (Nakayama, 2004). Ennek hátterében többek között az IRAK-M, mint TLR szignalizációt negatívan szabályozó jelátviteli molekula indukciója, valamint az IRAK-1 kináz aktivitásának gátlása áll.

A TLR aktiváció következtében létrejövő tolerizálhatósági képesség kiemelt fontosságú mechanizmus a veleszületett immunfolyamatok szabályozásában, ezáltal a szervezet homeosztázisának fenntartásában (Foster, 2009). Megfigyelték ugyanis, hogy szepszises betegek monocitái jóval kevesebb mennyiségben képesek citokineket (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) termelni, mint az egészségeseké (Munoz, 1991; van Deuren, 1994; Ertel, 1997). A szervezet részéről létrejött ezen adaptív válasz egyfelől esszenciális a Gram-negatív kórokozó okozta fertőzés alatt, másrészt viszont elősegítheti/előrevetítheti további infekciók kialakulását. *In vitro* körülmények között is az endotoxikus toleranciának egyik legfőbb jellemzője a gyulladásokeltető gének expressziós mintázatának a megváltozása myeloid sejt vonalakban (Henricson, 1991). A kórokozó mikrobák a TLR fehérjéken – például TLR4-en – keresztül a korai szignalizációs folyamatokban az IL-1R-asszociált kináz (IRAK) működését fokozzák, melynek eredményeképpen a potenciálisan autotoxikus TNF- α és IL-1 gyulladásokeltető effektorok expressziója megnő (Li, 2000). A többszöri LPS endotoxinnal történő kezeléskor bekövetkező adaptív immunválaszok esetén azonban a gyulladást elősegítő gének repressziója figyelhető meg leukocitákban (McCall,

1993). A gyulladásokeltő citokinek transzkripcionális gátlása az IRAK aktivitásának szuppresszálása, ezáltal az IRAK-MyD88 kapcsolat hiányának következtében csökkenti a gyulladásos mediátor fehérjék mennyiségét az LPS-toleráns sejtekben (Li, 2000; Mueller, 2001). A tolerizáció viszont csak részleges, mivel az LPS-tolerizált sejtek számos anti-inflammatorikus fehérje – például a szekretált IL-1R antagonist (sIL-1RA) – termelését folytatják (Learn, 2001). Így a TLR4 jelátviteli út szelektív és specifikus gátlása nagymértékben hozzájárul az LPS-indukált tolerizáltsághoz. Ennek a megváltozott körülménynek a kialakulását már önmagában a TLR4 receptor, valamint a TLR4/MD-2 komplex sejt felszíni kifejeződésének a csökkenése is előmozdítja, amelyet egér makrofágok esetén tapasztaltak (Nomura, 2000; Jacinto, 2002). Ezekből a megfigyelésekből is kitűnik, hogy a gyulladásokeltő molekulák termelésének csökkentése révén a tolerancia mechanizmusával a szisztémás gyulladás korlátozható és a homeosztázis fenntartható, amely mechanizmus a keratinocitákban is aktív (Dobrovolskaia, 2002).

Keratinocitákon végzett kísérleteink eredményét összevetve más munkacsoportok által monocitákon, valamint makrofágokon végrehajtott vizsgálatokkal megállapítható, hogy a fertőzésre adott válasz TLR-, illetve sejtspecifikus módon következik be. Érdekes jelenség, hogy amíg a szakirodalomban fellelhető adatok alapján a professzionális immunsejtek LPS, továbbá PGN perzisztens jelenlétében, ezáltal a TLR4 vagy TLR2 folyamatos aktivációjakor a gyulladásokeltő citokinek/kemokinek kifejeződésében mutat tolerizáltságot, addig a keratinocitáknál a TLR2 szignalizációs út aktiválása hasonló helyzetet nem alakít ki: a proinflammatorikus gének expressziójának szintje a sejtek újbóli PGN kezelésekor sem csökken. Ezzel szemben az AMP-ek expressziós mintázatát vizsgálva, míg monocitákban az LPS indukciót/reindukciót követően az AMP-ek génexpressziója nem változik, addig keratinocitákban a perzisztens PGN jelenlétében az AMP-ek génkifejeződése elcsendesedik.

Az emlős gének transzkripcionális aktivációja kromatin módosításokkal jár (Aung, 2006; Hamon, 2008; Adhya, 2010). McCall és munkacsoportja LPS-toleráns makrofágok IL-1 β és TNF- α elcsendesítésekor géneik promóter régióiban kromatin módosításokat figyelt meg (Chan, 2005; Yoza, 2006). Hasonló eredményre jutottak Foster és mtsai, akik kimutatták, hogy makrofágok perzisztens LPS kezelésekor a megnövekedett gyulladásos válasz epigenetikai változásokat idéz elő. Habár a gyulladást elősegítő citokinek elcsendesíthetők, az antimikrobiális fehérjéket kódoló gének indukálhatóak maradnak a tolerizált makrofágokban, védve azokat a fertőzéstől (Foster, 2007). Abban, hogy egy

második LPS indukció után a gének bizonyos csoportja nem reaktiválható, nagy szerepe van a hiszton fehérjék módosulásának, többek között az acetilációnak, illetve a metilációnak (Bäckdahl, 2009). A hiszton acetiláltságának – mint az egyik leggyakrabban tanulmányozott módosulásnak – a steady-state állapota a HAT-ok és HDAC-ok ellentétes hatása következtében alakul ki: az átmeneti hiszton acetiláció elősegíti a génexpressziót, a deacetiláció viszont a génrepressziót (Turner, 2000). A veleszületett immunitás tolerizálhatósági kapacitásának magyarázatakor tehát figyelembe kell vennünk a kromatint érintő ezen változásokat is, mivel a hiszton fehérjék HAT-ok és HDAC-ok általi poszttranszlációs módosulása az inflammatorikus folyamatok intenzitásának, tartamának és specificitásának szabályozásában is kiemelkedően fontos (Ghizzoni, 2011). Annak érdekében, hogy meghatározzuk a hiszton acetiláció tolerizálhatóságot befolyásoló szerepét a keratinociták perzisztens PGN kezelésekor, a HDAC-ok működését gátló TSA előkezelést alkalmaztunk. Érdekes megfigyelés, hogy a HDAC-ok inhibíciója represszálja azon gének expresszióját, melyeket nem-tolerizálható géneknek kategorizáltunk (CXCL8, IL-6), szemben a DEFB4, mint tolerizálható gén TSA előkezelés utáni szignifikáns mértékű indukálhatóságával. A gyulladások mediátorokkal kapcsolatos megfigyelésünk – miszerint TSA-val a PGN reindukciót követően ezen gének elcsendesíthetők – teljesen összhangban áll azzal, hogy számos inflammációval járó betegség kísérletes modelljében a HDAC inhibitorok anti-inflammatorikus hatásának bizonyulnak, így bizonyos krónikus gyulladásos betegségek hatékony terápiás eszközei (Lin, 2007). Azonban az előbb említett példa ellenkezője is igaz: a TSA, mint HDACi megemeli az NF- κ B által expresszáldó gyulladások gének kifejeződését (Ito, 2000). Tehát a HDAC-ok a kromatin acetiláltságának módosításával a TLR jelátviteli utak negatív szabályozásában is szerepet játszva a TLR4 gyulladások célgén (TNF- α , IL-6, IFN- β) csendesítését végzik (Foster, 2007). Ezt erősíti az a megállapítás is, hogy a HDAC gátlók fokozzák a T-sejtek által kontrollált válaszfolyamatokat egér colitis modellben (Li, 2007). Összegezve, a HDAC-ok mind pozitív, mind negatív regulátorai lehetnek a TLR szignalizációnak, mely folyamatok kimenetele HDAC inhibitorok jelenlétében ellentétes irányú génkifejeződést eredményezhetnek (Shakespeare, 2011).

Mivel tudott, hogy az RNS transzkripció nem mindig nyilvánul meg megemelkedett fehérjeszintben, mert poszttranszkripcionális mechanizmusok módosíthatják a transzlációt, keratinocitákon végzett kísérleteinkben a CXCL8 és IL-6 szekretált fehérje mennyiségeket is meghatároztuk 24 órával a második PGN kezelést

követően. A felülúszóból mért emelkedett fehérjeszint arra enged következtetni, hogy nincs transzlációs gátlás. Azonban a PGN indukciót megelőző TSA kezeléskor a sejtek által kibocsátott fehérje mennyiségek módosulása azt sugallja, hogy a hiszton acetilációnak szerepe van a transzkripció szabályozásában perzisztens infekciókor. Így annak érdekében, hogy jobban megértsük azokat a molekuláris mechanizmusokat, melyek keratinociták PGN kezelése/újrakezelése esetén a génexpresszió szabályozásáért felelősek, szűkítve a kört, a H3 és H4 hisztonok adott pozíciójú lizinjeinek globális szintű acetilációs dinamikáját követtük nyomon. Megfigyelésünk, hogy a H3 és H4 hiszton fehérjék vizsgált lizinjeinek acetiláció mértéke 3 és 24 órával a második PGN indukció után teljesen eltérő módon változik meg. A hisztonok acetilációjában bekövetkező ezen változások adhatnak többek között magyarázatot a perzisztens PGN jelenlétekor a gyulladáskeltő mediátoroknál (IL-6, CXCL8) és az AMP-eknél (DEFB4, CAMP) tapasztalt eltérő expressziós mintázatokra. Keratinocitákon végzett, a hiszton fehérjék globális acetilációs szintjében bekövetkező változásokra irányuló vizsgálataink alátámasztják azokat az eredményeket, melyek a fertőzésre adott válaszok esetén az epigenetikai módosulásokat, azon belül is a kromatin szerkezetének megváltozását, mint kulcsfontosságú mechanizmust említik. Smale és mtsai munkájából kiderül, hogy a nukleoszóma újrarendeződésének szerepe van a TLR-indukálta gének (mind elsődlegesen, mind másodlagosan aktiválódó) különböző kinetikájú kifejeződésében (Ramirez-Carrozzi, 2006). Eredményeik egybevágnak a Saccani és mtsai által leírtakkal, miszerint makrofágok LPS stimulációja két hullámban indít NF- κ B aktivitást a gének promótereiben, mikor is a későbbi válaszok esetén a kromatin átrendeződése figyelhető meg (Saccani, 2001). A fehérjék, így a hisztonok poszttranszlációs módosítása meghatározza a fertőzéskor kialakuló gyulladással kapcsolatos reakciók intenzitását, tartamát, illetve specifikusságát. A kromatin struktúrája, illetve annak dinamikus változása számos gyulladással kapcsolatos gén kifejeződésének szabályozásában esszenciális. A hisztonok acetilációja számos gyulladáskeltő gén – mint az IL-6, CXCL8 – aktivitását megnöveli bakteriális infekciót követően. A TLR aktivációt követő gyors inflammatorikus válaszok esetén a hiszton fehérjék acetiláltsági fokának megváltozását írták le a 3-as hiszton fehérje 9-es és 14-es pozícióban lévő lizinjén (Qin, 2005; Schmeck, 2008). A később indukálódó gének esetén a hisztonok módosulása a gyors válaszok általi géntermékektől, valamint a hiszton-módosító enzimek jelenlététől függ (Kayama, 2008). A CXCL8 expressziójának növekedése *Legionella pneumophylia*-fertőzött tüdő epitélsejtekben a HAT-ok működése révén a H3 és H4 hiszton fehérjék acetilációs

szintjének CXCL8 gén promóter régiójában történő emelkedésével párosul (Schmeck, 2008). Ehhez hasonlóan az intracelluláris *Listeria monocytogenes* infekció esetén a H3 és H4 hisztonok acetilációs szintjének növekedésével a CXCL8 expressziója is fokozódik. További megfigyelés, hogy ezen fertőzéskor az IFN- γ gén kifejeződése is együtt jár a hiszton fehérjék acetilációjának változásával az IFN- γ promóter régióban. Azonban érdekesség, hogy amíg a TSA a *L. monocytogenes*-indukált CXCL8 expressziót megemeli, addig az IFN- γ -indukált CXCL8 kifejeződést nem. Ez is jól mutatja, hogy a hiszton acetiláció a génexpressziós mintázatokat a konkrét stimulus alapján szabályozza (Schmeck, 2005). Így, például LPS esetén is megfigyelhető a CXCL8 expressziójának növekedése, ami a H4 hiszton acetilációs szintjének emelkedésével jár együtt (Tsaprouni, 2007).

Az eddigi megfigyelésekből – amit saját vizsgálataink eredményei megerősítenek – a gén-specifikus regulátor mechanizmusok, a TLR-indukált gének funkcionális diverzitását szem előtt tartva, az immunválaszok kifinomult szabályozását, ezzel együtt mikroba-specifikus immunfolyamatok létrejöttét teszik lehetővé. Ezek alapján elmondható, hogy a TLR-indukált kromatin módosítások molekuláris alapját adják a mikrobával történő találkozás transzkripcionális memóriájának.

Miután arra a következtetésre jutottunk, hogy a professzionális immunsejtek mellett a keratinociták, mint félprofesszionális immunsejtek is képesek a tolerancia jelenségét mutatni, feltettük azt az eddig senki által nem vizsgált kérdést, hogy az akut és perzisztens PGN indukció befolyásolja-e a keratinocitákban lezajló miRNS-ek által szabályozott poszttranszkripcionális folyamatokat. Kísérleti modellünkben szeretnénk volna igazolni hipotézisünket, miszerint a miRNS-ek is tolerizálhatóak, így a megváltozott génexpresszió mellett a TLR ligand-indukálta miRNS expresszió tolerancia jelenségét befolyásoló szerepére rámutatva.

A miRNS-ek kisméretű nem-kódoló RNS-ek, melyek poszttranszkripcionálisan szupresszálják a fehérje-kódoló gének kifejeződését, például direkt translációs represszió útján (Bartel, 2004). A miRNS-ek szövet-, fejlődésállapotbeli-, és betegség-specifikus expressziós mintázatot mutatnak, és kiemelkedően fontos szerepet játszanak a homeosztázis fenntartásában, valamint az LPS-indukált toleranciában (Nahid, 2011). Az LPS-sel kiváltott tolerancia kialakulásához többek között a miR-146a aktivációja is szükséges, mely miRNS a MyD88 jelátviteli út kulcselemeit célozza meg (Nahid, 2011). Habár az LPS indukciót követő miR szabályozási folyamatokról bővebb ismeretekkel rendelkezünk, csekély a kézzelfogható adat a PGN stimuláció miRNS-ekre gyakorolt

hatásával kapcsolatban. Nahid és mtsai leírták, hogy a miR-146a folyamatos overexpressziót mutat PGN-tolerizált THP-1 monocitákban (Nahid, 2011). HaCaT keratinocitákon végzett kísérleteinkben hasonlóképpen a THP-1 monociták esetén tapasztaltakhoz azt találtuk, hogy a PGN újramezelést követően a miR-146a expressziója indukálható, mely alapján a miR-146a a miRNS-ek nem-tolerizálható csoportjába sorolható. További, immunfolyamatokban szerepet játszó miRNS-eket vizsgálva a miR-155 hasonló, nem-tolerizálható fenotípust mutatott. Ezzel szemben, amíg az egyszeri PGN indukció aktiválta, egy újbóli PGN kezelés csökkentette a miR-203, mint keratinocita-specifikus miRNS expresszióját. Ezen eredmények tükrében elmondható, hogy a miRNS-ek a PGN perzisztens jelenléte esetén különbözőképpen reguláltak: hasonlóan a mRNS-ekhez a miRNS-ek is *tolerizálható*, illetve *nem-tolerizálható* csoportra oszthatóak.

A miR-203, mint tolerizálható miRNS azonosításán túl, eredményeink reverzibilis korrelációt mutatnak a miR-203 és target fehérjéinek expressziója között, a miRNS tolerizáció egy lehetséges funkcionális szerepére mutatva. Az egyik ismert miR-203 target a p63 fehérje, ami a keratinociták proliferációját szabályozza (Sonkoly, 2008). A másik miR-203 target a SOCS3, mint a citokin szignalizációt negatívan reguláló fehérje a gyulladásos folyamatokban kiemelt jelentőségű (Rothlin, 2007). Keratinocitákon végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy az egyszeri PGN kezelés miR-203 expressziót indukál, ami a p63 és SOCS3 génexpresszióját nem befolyásolja, ám transzlációs szinten mindkét fehérje kisebb mértékű kifejeződését okozza. Ezen megfigyelésünk egybevág más kutatók kvantitatív valós-idejű PCR analízises vizsgálatainak eredményével, miszerint a SOCS3 mRNS expressziója nem mutat szignifikáns eltérést az egészséges és léziós bőrben, így pikkelysömör esetén a SOCS3 csökkent kifejeződése poszttranszkripcionális szinten történik (Sonkoly, 2007). Ez a fenotípus specifikus anti-miR-203 konstrukttal megszüntethető, utalva a miR-203 megemelkedett mennyiségének direkt p63 és SOCS3 fehérje csökkentésére irányuló szerepére. A második PGN kezeléskor azonban a miR-203 szupresszálása a célfehérjék expressziós mintázatát megfordítja. Ezek a folyamatok a PGN tolerancia szabályozásának komplexitását mutatják. A TLR szignalizáció iniciálta gyulladásakor a különböző sejtek által szekretált számos citokin a válaszfolyamatok felerősítését idézi elő, beleértve a saját indukciójukat is. Ezzel egyidejűleg azonban a veleszületett immunrendszer negatív regulátorai – mint például a TAM receptorok – a citokinek által szintén aktiválódnak (Rothlin, 2007), melynek következtében a SOCS3 expressziójának növekedése a TLR jelátviteli utak gátlását fogja eredményezni.

Párhuzamosan mindezzel, a korai PGN-indukálta immunválaszok során az egyszeri PGN kezeléskor a miR-203 megemelkedett expressziója downregulálva a SOCS3 kifejeződését akadályozza a negatív szabályozást. Később, mikor a miR-203 szintje csökken, a SOCS3 fehérje expressziójának helyreállításával az immunfolyamatok leszabályozása beindulhat.

6.2 A veleszületett immunitás és a TAM receptorok

A veleszületett immunrendszer aktivációjakor beinduló gyulladásos folyamatok hatékony védelmet biztosítanak a behatoló kórokozókkal szemben. A mikrobával fertőzött területen lévő félprofesszionális immunsejtek többek között citokinek/kemokinek termelése révén professzionális immunsejteket aktiválnak, melyek – további gyulladáskeltő effektor molekulák szekréciójával – együttesen egy akut gyulladásos miliót hoznak létre. Azonban a kórokozó ellen létrejött gyulladás magára a gazdaszervezetre is káros hatással lehet. Éppen ezért a veleszületett immunitás szigorú szabályozása, például a TLR-indukálta inflammatórikus mechanizmusok állandó kontrollálása, elengedhetetlen részét képezi a védekezésnek, illetve a homeosztázis fenntartásának. A kórokozók ellen termelt gyulladást elősegítő citokinek/kemokinek mellett a negatív reguláció fontos elemeinek, különböző endogén gyulladásgátló mediátoroknak (anti-inflammatórikus effektorok) az expressziója is beindul. Bármilyen zavar az inflammációt fékentartó jelátviteli mechanizmusokban krónikus gyulladás kialakulásához vezethet (Rothlin, 2007). Az utóbbi egy-két évben egyre több kutatócsoport kezdett el mélyrehatóbban foglalkozni a veleszületett immunfolyamatok negatív szabályozásával, mely mechanizmusok celluláris és molekuláris szintű feltérképezése hozzájárulhat a krónikus gyulladásos betegségek hatékonyabb terápiás eljárásainak kifejlesztéséhez.

Noha már többféle, a TLR szignalizációt szuppresszáló mechanizmust leírtak immunsejtekben, a sejtfelszínen kifejeződő TAM receptor családnak (TYRO3, AXL, MER) – ligandjaik (GAS6, ProS) révén – a TLR-mediálta, gyulladással járó válaszfolyamatok féken tartásában betöltött szerepe csak nemrég került előtérbe (Rothlin, 2007). Azonban annak ellenére, hogy a TAM-GAS6/ProS rendszer veleszületett immunitást negatívan szabályozó feladatára fény derült, a különböző mikrobafertőzéseket követően végbemenő pontos regulátor mechanizmusokra még csak kevés adat áll rendelkezésre.

Mivel a TLR2 szignalizáció kapcsán a TAM receptorok szerepe még tisztázatlan, kísérleti modellünket alapul véve első körben humán dendritikus sejteken tanulmányoztuk az akut és perzisztens PGN kezelés hatását a TAM-ok génexpressziós mintázatára.

Megállapítottuk, hogy a PGN indukciót követően a TAM receptorok génexpressziója jelentős mértékben megváltozik. Az akut, egyszeri TLR2 aktiváció csökkenti mindhárom TAM receptor génszintű kifejeződését, mely tendencia egy újbóli PGN kezelést követően - a TYRO3 és MER esetén - tovább fokozódik. Az eddig közölt eredmények – melyek alapján a TAM-ok a gyulladással járó veleszületett immunfolyamatokat negatívan szabályozzák – fényében az általunk a TAM receptorok génkifejeződésében tapasztalt változások teljesen egybevágnak munkacsoportunk azon megfigyelésével, miszerint a gyulladáskeltő citokinek/kemokinek génexpressziója egyidőben a TAM receptorok erőteljes génaktivitásbeli csökkenésével drasztikus mértékben megnövekszik (Filkor, 2013). Ez a kapcsolat arra utal, hogy ha nem működik kellő hatékonysággal a negatív szabályozás – azaz nincs kontroll –, a gyulladással mediátorok termelése egyértelműen megemelkedik.

A TAM receptorok expresszióját tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy aktiválatlan- és aktivált THP-1 monociták LPS kezelése szintén befolyásolja a TAM receptorok gén-, valamint fehérje expressziós mintázatát. Érdekes megfigyelés ugyanakkor, hogy a THP-1 sejteknél a TLR4 aktiváció eltérő változásokat eredményez a TAM receptorok génkifejeződésében, mint amit dendritikus sejteknél a PGN indukciót követően tapasztaltunk. Mind aktiválatlan-, mind aktivált THP-1 monocitáknál az LPS rövid, illetve hosszabb ideig tartó jelenléte – noha eltérő kinetikával –, de csökkenti a TYRO3 és MER génexpresszióját. Ezzel szemben az AXL génszintű kifejeződése az LPS kezelést követően már néhány órán belül fokozódik, ami a 24 órás indukciónál tetőzve a későbbi időpontban történt mintavételezéskor viszont már jelentősen mérséklődik. Az általunk megfigyelt, THP-1 sejtek esetén LPS kezelés után bekövetkező AXL gén-, és fehérje expresszió növekedéséhez hasonló eredményeket kaptak egér dendritikus sejteken végzett kísérleteikben Rothlin és mtsai, amelyekben a TLR4 indukciót követően a TAM receptorok közül az AXL kifejeződése fokozódik (Rothlin, 2007). Munkacsoportjuk többek között ezzel az AXL expresszió növekedéssel magyarázza a TAM receptorok TLR-indukálta gyulladáskeltő citokin/kemokin termelésre gyakorolt gátló hatását. Ezen megállapításuk egybeesik azzal a megfigyelésünkkel, hogy habár röviddel az LPS indukciót követően a gyulladást elősegítő TNF- α , CXCL8 és IL-1 α génexpressziója drasztikus mértékben megemelkedik, a kezelés után 24 órával már jelentősen mérséklődik. Deng és mtsai hasonló gyors gyulladáskeltő TNF- α , IL-6, valamint IL-1 β expresszió növekedést tapasztaltak makrofágok TLR liganddal történő indukálásakor, ami a kezelés

után 24 órával már jelentősen lecsökken (Deng, 2012). A gyulladásokeltető mediátorok megemelkedett expressziójának hátterében többek között a GAS6 és ProS kifejeződésének TLR indukciót követő inhibíciója áll (Deng, 2012).

A TLR aktiváció a negatív regulátorok termelésének beindításával a TLR jelátvitel gátlását eredményezi, amely folyamatban a SOCS fehérjék szerepe kiemelten fontos (Krebs, 2001; Inagaki-Ohara, 2003; Dalpke, 2008). A TAM receptorok aktivációja az I-es típusú interferon receptor (IFNAR)/STAT1 transzkripciós faktor jelátviteli úton keresztül SOCS1 és SOCS3 fehérje expressziót indukál (Rothlin, 2007). A SOCS1 elősegíti a TLR4 adaptor protein MAL degradációját, a SOCS3 pedig gátolja a TRAF6 ubikvitinációját (Mansell, 2006; Frobose, 2006). Kísérleteink során azonban egy érdekes jelenséget is tapasztaltunk: az LPS-indukált THP-1 monocitákban a gyulladásokeltető mediátorok gyors génexpresszió növekedésével egyidőben a gyulladásos folyamatokat negatívan szabályozó SOCS3 gén aktivitása szignifikáns mértékben megnövekszik, még mielőtt az AXL kifejeződése fokozódna. Ez valószínűsíti, hogy a TLR4 aktivációt követően a SOCS3 génszintű kifejeződésében bekövetkező változásokért nemcsak a TAM receptorok felelősek, mutatva a mikrobiális fertőzésre adott immunválaszok összetettségét, finom szabályozását.

A gyulladásos válaszreakciók lefolyása, illetve szabályozása pro- és anti-inflammatorikus effektorok együttes jelenlétében zajlik. Habár a TAM receptorok TLR-indukálta gyulladásokeltető mediátorok termelésére gyakorolt negatív hatását - melyben az AXL érintett elsősorban - leírták dendritikus sejtekben, Rothlin és mtsai nem vizsgálták az LPS kezelést követően a GAS6 és ProS, mint ligandok expresszióját. Az LPS általi TLR4 aktiváció utáni génkifejeződésére irányuló kísérleteink eredményei alapján elmondható, hogy mind aktiválatlan-, mind aktivált THP-1 monociták esetén az általunk vizsgált időpontokban az idő előrehaladtával szignifikáns mértékben csökken a GAS6 génexpressziója. Ezen megfigyelésünk összhangban áll más kutatócsoportok makrofágokon végzett kísérleteinek eredményével, miszerint a TLR jelátviteli útvonal aktivációja gátolja a GAS6 és ProS expresszióját, ami viszont a gyulladásokeltető citokinek termelésének emelkedését eredményezi (Deng, 2012). *In vivo*, a legtöbb migráló dendritikus sejt csak egyszer megy keresztül egy gyulladásos cikluson az apoptotikus elimináció előtt. A ciklus végső fázisában az AXL indukálása a TLR jelátvitel gátlása révén befolyásolja az inflammációt. Ezzel szemben a makrofágok gyulladásos cikluson való átmenete ismétlődhet, amihez a GAS6 és a ProS alacsonyabb szintű expresszálása

szükséges, mert így a második hullámban jelentkező, de enyhébb mértékű gyulladásos citokinszint emelkedés nagymértékben hozzájárulhat a patogén hatékony eliminálásához (Rothlin, 2007). A TAM ligandok gyulladással járó fertőzések alatti jelenlétének szükségességét, és kulcsfontosságú szerepét támasztja alá az a tény is, hogy primer egér makrofágokban kifejeződve a GAS6 és a ProS, szinergisztikusan és autokrin módon negatívan befolyásolja az alapkondíciós körülmények közötti, illetve a TLR-mediálta gyulladáskeltő citokin expressziót (Deng, 2012). Ugyanez mondható el rekombináns GAS6 és ProS jelenlétében is, mikor a TLR aktivációja teljesen gátolt (Rothlin, 2007). Mikrobiális fertőzéskor vagy gyulladásos stimulus esetén számos hematopoietikus és nem-hematopoietikus eredetű differenciált sejttípus termel I-es típusú IFN-t, így többek között a dendritikus sejtek is (Cella, 1999; Siegal, 1999). Az I-es típusú IFN-ok a dendritikus sejtek biológiáját különböző szinteken módosíthatják. Az IFN- α GM-CSF jelenlétében a monociták differenciálódását indukálja potens, funkcionáló dendritikus sejtté (Paquette, 1998; Santini, 2000). Az IFN/DC-k a sejtfelületen az AXL kifejeződését igénylik a differenciációkor. Azonban TLR-függő érési stimulusok (pl. LPS, poly I:C) proteolitikus hasítás révén szignifikánsan downregulálják az IFN/DC-k AXL expresszióját (Scutera, 2009). Egér dendritikus sejtekben számos citokin, többek között az I-es típusú IFN-ok termelése szuppresszáható a TAM ligandokkal, sőt a dendritikus sejtek GAS6-tal történő IFN gátlása már humán DC-k esetén is bizonyított (Scutera, 2009). Mindezek alapján elmondható, hogy a két TAM ligand anti-inflammatorikus faktornak tekintve jelentős szerepet játszik a normál fiziológias kondíciók közötti immun homeosztázis fenntartásában. Így a veleszületett immunfolyamatok lezajlását a pro- és anti-inflammatorikus effektor molekulák egyfajta interreguláló szabályozása együttesen szabja meg. Ezek alapján nem meglepő, hogy a TAM szignalizáció alacsony - vagy éppen túlzott mértékű - GAS6, illetve ProS kifejeződés következtében létrejött helytelen működése súlyos következményekkel járva szisztémás lupus erythematosus (SLE), vagy szeptikus sokk kialakulásához vezethet (Borgel, 2006; Suh, 2010).

A TAM receptorok gyulladásos folyamatokban betöltött szerepére irányuló megfigyelések mindeddig csak professzionális immunsejteken végzett kísérletekből származnak. Azonban arra vonatkozóan semmilyen adattal nem rendelkezünk, hogy félprofesszionális immunsejtek különböző mikrobiális ágenssel történő kezelése milyen hatással van a TAM receptoroknak, mint az inflammáció negatív szabályozóinak a kifejeződésére. Éppen ezért kísérleteinket kiterjesztettük keratinocitákra, illetve vaginális

epítelsejtekre, mely sejtek *in vivo* körülmények között a bakteriális fertőzés mellett virális infekciónak is kitett helyen fordulnak elő. A kapott eredmények azt mutatják, hogy mind a keratinociták, mind a vaginális epítelsejtek mikrobiális ágensekkel (PGN, LPS, illetve poly I:C) történő kezelését követően a TAM receptorok génaktivitását legmarkánsabban a poly I:C, mint szintetikus virális analóg változtatja meg, szignifikáns génexpresszió csökkenést eredményezve. Továbbá elmondható az is, hogy a poly I:C-vel történt indukció a TAM receptorcsalád tagjai közül csak bizonyos receptorok (keratinocitáknál a TYRO3, vaginális epítelsejteknel a MER) génkifejeződésére gyakorolja a legjelentősebb gátló hatást. Egér retinális pigment epítelsejtek esetén már leírták a MER és TYRO3 hiánya következtében kialakult abnormális folyamatok kapcsán ezen TAM receptorok homeosztázisban betöltött fontosságát (Prasad, 2006; Ye, 2011). Azonban az általunk – elsőként – megfigyelt, a mikrobiális ágensek közül a poly I:C kezelés után létrejött TYRO3 és MER génexpresszió csökkenések valószínűsítik, hogy ezek a receptorok a félprofesszionális immunsejtként számon tartott keratinocitákban a veleszületett immunfolyamatokban is szerepet játszanak. A TAM receptorok – melyek az inflammáció leszabályozását hivatottak végezni – esetén megfigyelt downregulált génexpresszió jól korrelál a vizsgált gyulladást elősegítő mediátorok (TNF- α , IL-6) különböző kezelések utáni génexpressziós mintázatbeli változásával, miszerint a gyulladáskeltő fehérjék legnagyobb, szignifikáns mértékben megemelkedett kifejeződése szintén a poly I:C-vel történt indukciókor következik be. Így azon biokémiai vizsgálatok alapján tett megállapítás, miszerint dendritikus sejtekben a TAM receptorok negatív szabályozói a TLR3 jelátviteli útvonalnak (Rothlin, 2007), kísérleteink alapján keratinociták esetén is beigazolódni látszik.

A TAM receptorok közül a MER fontosságát mutatja Alciato és mtsai megfigyelése, miszerint a TAM-ok közül csak a MER GAS6 általi aktivációja felelős közvetlenül az LPS-stimulált makrofágokban a citokinek (TNF- α , IL-6, IL-1 β) expressziójának csökkenéséért (Alciato, 2010). Ráadásul makrofágokban a MER útvonal a PI3K/Akt-on és NF- κ B-n keresztül – függetlenül új fehérjék szintézisétől – felelős a gyulladáskeltő mediátorok mérsékeltebb kifejeződéséért. Továbbá LPS kezelést követően fokozottabb TNF- α termelés és erőteljesebb LPS-indukált endotoxikus sokk figyelhető meg MER-hiányos egerekben (Alciato, 2010).

Ezen *in vitro* kísérletek eredményei rávilágítanak arra, hogy bakteriális, illetve virális fertőzések során a különböző félprofesszionális immunsejtek a rajtuk kifejeződő TAM receptorcsaládból sejttípusonként eltérő tagok génexpresszióbeli csökkenésével járul

hozzá a gyulladásokeltő mediátorok erőteljesebb kifejeződéséhez, ezáltal a hatékony válaszfolyamatok kialakításához.

Azonban a gyulladásos folyamatokat előbb-utóbb meg kell szüntetni, hiszen a hosszú ideig tartó inflammáció krónikussá válva súlyos problémákat, szövődményeket okozhat. Normális esetben a TAM receptorok az IFNAR közreműködésével a SOCS fehérjék expresszióját elősegítve a TLR szignalizációs utak gátlását, ezáltal a gyulladás csökkenését eredményezik. Megfigyelésünk, miszerint a különböző mikrobiális ágensek akut, illetve perzisztens jelenlétében a – bőrben is jelenlévő – dendritikus sejtek, makrofágok, keratinociták által expresszált TAM receptorok és a gyulladásokeltő citokinek/kemokinek (sejttípusonként eltérő, ligandfüggő módon) kifejeződése fordítottan korrelál egymással, *in vivo* körülmények között a bőr krónikus gyulladásos betegsége, a pikkelysömör esetén is beigazolódott. Összehasonlítva a pikkelysömörös epidermális bőr léziós, illetve nem-léziós területeit az egészséges emberek epidermiszéből származó mintákkal elmondható, hogy a pikkelysömörös léziós mintákban mindhárom TAM receptornak, valamint a GAS6 ligandnak a génexpressziója drasztikus mértékben downregulált, mellyel szemben a gyulladásokeltő gének (CXCL8, TNF- α , TNFAIP6, stb.) aktivitása szignifikánsan magasabb. További érdekes megfigyelés, hogy a nem-léziós pikkelysömörös mintákban is jóval kisebb génkifejeződés tapasztalható a gyulladást negatívan szabályozó TAM receptorok és ligandjuk esetében, habár ezzel párhuzamosan a gyulladást elősegítő citokinek/kemokinek génexpressziójában a kontroll mintákhoz képest nem tapasztalunk emelkedett aktivitást. A TAM-ok és a GAS6 nem-léziós területen is jelenlévő génexpresszióbeli csökkenése nemcsak annak vetíti előre a lehetőségét, hogy az inflammációt fékentartó szabályozó mechanizmus hiánya következtében a gyulladás mértéke, tehát a léziós terület nagysága növekedni fog, hanem annak is, hogy bárhol - eddig teljesen intakt bőrterületen is - kialakulhat krónikus gyulladás.

A pikkelysömör, mint krónikus bőrgyulladás esetén tett megfigyeléseink inspiráltak minket arra, hogy további - például a tápcsatornát érintő - gyulladásos betegségek kapcsán is vizsgáljuk a TAM receptorok, valamint ligandjaik gén-, illetve fehérjeszintű kifejeződését. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a gyulladás negatív regulátorainak megváltozott kifejeződése más krónikus gyulladásos betegségekkel is összefüggésbe hozható.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A bőr a kórokozó mikrobákkal szembeni hatékony védelem első vonala. Az epiteliális sejtek – mint félprofesszionális immunsejtek – számos mintázatfelismerő receptort (PRR) expresszálnak, melyek különböző patogén-asszociált molekula mintázatot (PAMP) ismernek fel. A PRR-ek aktiválása különböző antimikrobiális peptidek (AMP) és gyulladás-keltő mediátorok szekretálását beindítva lokális inflammációt idéz elő. Azonban a veleszületett immunfolyamatok szigorú szabályozás alatt kell, hogy álljanak, hiszen a folyamatos aktiváció krónikus gyulladásos bőrbetegségek kialakulásához vezethet. Mivel a veleszületett immunitás transzkripcionális szabályozásáról alkotott eddigi kép még hiányos, jelen munkában a bőrben lezajló veleszületett immunfolyamatok gén-specifikus kontrollálásáért felelős szabályozó mechanizmusok azonosítását tűztük ki célul.

Összefoglalva a kapott eredményeket elmondhatjuk, hogy az általunk felállított *in vitro* kísérleti modell alkalmas az akut és perzisztens mikrobafertőzés gén-specifikus kontrollálásáért felelős szabályozó mechanizmusok tanulmányozására.

Ennek kapcsán megállapítottuk, hogy a veleszületett immunrendszer félprofesszionális immunsejtjeiként számon tartott keratinociták *S. aureus*-eredetű PGN-nel való egyszeri, illetve ismételt találkozása eltérő módon változtatja meg a gyulladás-keltő citokinek/kemokinek, valamint antimikrobiális peptidek génexpressziós mintázatát. Amíg az ismételt PGN indukció a gyulladás-keltő mediátorok (pl. IL-6, CXCL8) expresszióját nem befolyásolja – amely megfigyelés alapján *nem-tolerizálható* géneknek tekinthetők –, addig az antimikrobiális peptidek (pl. DEFB4, CAMP) kifejeződését meggátolja – így ezek *tolerizálható* gének. Ez a *nem-tolerizálható/tolerizálható* fenotípus azonban hiszton deacetiláz gátló (TSA) előkezeléssel megváltoztatható: a gyulladás-keltő mediátorok *elcsendesíthetők*, az AMP-ek viszont *reaktiválhatók*.

A kísérleti modellt ezután arra használtuk, hogy megállapítsuk az epigenetikai faktoroknak (pl. hiszton acetiláció), mikroRNS expresszióknak, valamint negatív szabályozó molekuláknak a veleszületett immunitás szabályozásában betöltött szerepét. Ehhez első lépésben a hiszton fehérjék globális acetilációs szintjeit vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a PGN akut és perzisztens jelenléte különböző módon befolyásolja a H3 és H4 hisztonok adott pozíciójú lizin aminosavainak acetiláltsági fokát. Ezen globális szintű epigenetikai változások – melyek módosíthatják a gén-specifikus szabályozó mechanizmusokat – a veleszületett immunrendszer tolerizálhatóságának egyik magyarázatául szolgálnak.

Keratinocitákban az akut és perzisztens PGN indukció – mikroRNS-szintű – poszttranszkripcionális hatását tanulmányozva arra az elsőként általunk tett megfigyelésre jutottunk, hogy expressziójukat tekintve a miR-146a és a miR-155 *nem-tolerizálható* miRNS-ek; ezzel szemben a keratinocita-specifikus miR-203 expressziója *tolerizálható* fenotípust mutat. Megállapítottuk továbbá, hogy modellünkben a miR-203, valamint targetjeinek (p63, SOCS3) expressziója ellentétes mintázatot mutat, ezzel megerősítettük a miR-203-nak a p63 és SOCS3 targetek poszttranszkripcionális szabályozásában betöltött direkt szerepét.

A veleszületett immunfolyamatokban a gyulladáskeltő mediátorok kifejeződését negatívan szabályozó TAM receptorcsalád expresszióját vizsgálva megállapítottuk, hogy különböző mikrobiális ágensekkel való indukciót követően számos sejttípusban (pl. dendritikus sejtek, monociták, vaginális epitel sejtek, keratinociták) megváltozik ezen receptorok kifejeződése. Megállapítottuk, hogy a TAM-ok megváltozott expressziója – mely sejt-, illetve mikroba-specifitást mutat – jól korrelál a pro- és anti-inflammatorikus mediátorok génkifejeződésével: a TAM-ok expressziójának csökkenése minden esetben a gyulladáskeltő fehérjék (pl. TNF- α , IL-6) megemelkedett kifejeződésével párosul.

Annak érdekében, hogy az *in vitro* modellben tett megállapításokat *in vivo* is teszteljük, megvizsgáltuk a TAM receptorcsalád kifejeződését pikkelysömörben. Megállapítottuk, hogy a modellben tapasztaltakhoz hasonlóan a TAM-ok kifejeződése az epidermiszben jelentősen lecsökken. Fontos megfigyelésünk, hogy ez a génexpressziós csökkenés a pikkelysömörös betegek nemcsak tünetes, hanem tünetmentes epidermiszére is jellemző. A gyulladás folyamatát negatívan szabályozó receptorok és ligandjuk csökkent kifejeződéséhez a gyulladáskeltő mediátorok (pl. TNF- α , CXCL8) szignifikánsan megemelkedett szintje társul, utalva a bőrben lezajló immunfolyamatokban a TAM receptorok lehetséges kulcsfontosságú szerepére.

8. SUMMARY

The skin represents the first line of defence against invading microorganisms. Epithelial cells, considered as semi-professional immune cells, express a series of receptors known as Pattern Recognition Receptors (PRRs), which recognize distinct pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Activation of PRRs induces the secretion of different antimicrobial peptides (AMPs) and proinflammatory mediators resulting in local inflammation. Importantly, innate immunity must be properly controlled, as its continuous activation leads to the development of chronic inflammatory skin diseases. Yet, our knowledge regarding transcriptional regulation of innate immunity is still fragmentary. Thus, the aim of this study was the identification of regulatory mechanisms responsible for gene-specific control of skin innate immunity.

First, we found in our *in vitro* experimental model, that the gene expression profile of different proinflammatory cytokines/chemokines and AMPs is differently altered when keratinocytes are treated with *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan (PGN) once or repeatedly. The expression of cytokines/chemokines (e.g. IL-6, CXCL8) remains unchanged upon PGN re-stimulation – therefore these genes are considered *non-tolerizable* –; in contrast, repeated PGN treatment significantly decreases AMP expression (e.g. DEFB4, CAMP) – these genes are considered *tolerizable*. However this *non-tolerizable/tolerizable* phenotype is altered when Trichostatin A (TSA), a specific histone deacetylase (HDAC) inhibitor pretreatment is applied: the expression of proinflammatory mediators is silenced and AMPs are reactivated.

These observations prompted us to investigate the role of epigenetic factors (e.g. histone acetylation), microRNAs (miRNAs), and negative regulatory molecules in the regulation of innate immunity by using our *in vitro* model. In order to identify mechanisms underlying *non-tolerizable/tolerizable* phenotype, first we examined the global level of histone acetylation, a modification associated with transcriptional activation. We found that acute or persistent PGN treatments influence the acetylation levels of H3 and H4 histone proteins in different manner. These global epigenetic changes – which can specifically modify the gene expression – are presumably responsible for the tolerization of innate immune system.

Investigating the posttranscriptional effect of acute and persistent PGN induction in keratinocytes we found that miR-146a and miR-155 are *non-tolerizable* miRNAs; however

the keratinocyte-specific miR-203 shows *tolerizable* phenotype. Furthermore, the expression profiles of miR-203 and its target proteins (p63, SOCS3) change in opposite directions, showing the immediate role of miR-203 in the posttranscription of its targets.

Studying the expression profile of TAM receptor family, which is a negative regulator of inflammation in innate immune processes, we found that the expression of these receptors changes in several cell types (e.g. dendritic cells, monocytes, vaginal epithelial cells, keratinocytes) as a response to treatment with different microbial agents. Our data are showing that the cell- and microbe-specific expression of TAMs negatively correlates with the gene expression profile of pro- and anti-inflammatory mediators: in parallel with the downregulation of TAM expression the expression of proinflammatory genes (e.g. TNF- α , IL-6) are upregulated.

In order to test our observations made in the *in vitro* experimental model, we studied the expression profile of TAM receptor family *in vivo* in samples from psoriatic patients. We found that the expression of TAM receptors remarkably decreases in epidermis. Importantly, this downregulated gene expression is present both in lesional and non-lesional epidermis of psoriatic patients. Furthermore, downregulated expression of TAMs and their ligand (GAS6) associates with significant upregulation of proinflammatory mediators (e.g. TNF- α , CXCL8), showing the possibility of regulatory key role of TAM receptors in skin immune processes.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Nagy Istvánnak, hogy megosztván velem széleskörű elméleti és gyakorlati tudását mindvégig támogatott, és minden segítséget megadott munkám sikeres elvégzéséhez.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Kondorosi Éva intézetvezető asszonynak, hogy lehetőséget és helyet biztosított számomra a kísérletes munkához.

Mélyszéges hálával és köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Vörös Andreának, Strifler Gerdának és Filkor Katának az évek alatt nyújtott áldozatos segítőkészségükért, a közösen elért eredményekért, melyek nélkül dolgozatom nem készülhetett volna el.

Köszönet a volt BayGen Intézet valamennyi dolgozójának, hogy ha kellett, a felmerülő problémák megoldásában rögtön segítettek.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kemény Lajosnak, Dr. Belső Nórának, Dr. Tubak Vilmosnak, Prof. Dr. Puskás Lászlónak, valamint Váczi Balázsnak, hogy a kísérletes munkáimhoz szükséges biopszia mintákat rendelkezésemre bocsátották.

És végezetül, de nem utolsó sorban szeretném családomnak megköszönni, hogy ilyen sokáig kitartottak, és munkám végzéséhez mindvégig biztos háttérrel nyújtottak.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., Akira, S., Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, 1998. Vol. 9 (1): p. 143-50.

Adhya, D., Basu, A., Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. *Journal of Biosciences*, 2010. Vol. 35 (4): p. 647-63.

Ahmad-Nejad, P., Mrabet-Dahbi, S., Breuer, K., Klotz, M., Werfel, T., Heeg, K., Neumaier, M., Renz, H., The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004. Vol. 113: p. 565-7.

Ali, R.S., Falconer, A., Ikram, M., Bissett, C.E., Cerio, R., Quinn, A.G., Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001. Vol. 117 (1): p. 106-11.

Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M., Miyake, K., Regulatory Roles for CD14 and Phosphatidylinositol in the Signaling via Toll-like Receptor 4-MD-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. Vol. 268 (1): p. 172-177

Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2006. Vol. 12 (5): p. 233-40.

Akira, S., Hemmi, H., Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters*, 2003. Vol. 85 (2): p. 85-95.

Akira, S., Takeda, K., Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 2004. Vol. 4 (7): p. 499-511.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006. Vol. 124 (4): p. 783-801.

Alciato, F., Sainaghi, P.P., Sola, D., Castello, L., Avanzi, G.C., TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010. Vol. 87 (5): p. 869-75.

- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001. Vol. 413: p. 732-738.
- Ambros, V., MicroRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 2001. Vol. 107 (7): p. 823-6.
- Angelillo-Scherrer, A., Burnier, L., Lambrechts, D., Fish, R.J., Tjwa, M., Plaisance, S., Sugamele, R., DeMol, M., Martinez-Soria, E., Maxwell, P.H., Lemke, G., Goff, S.P., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Chanson, M., Collen, D., Izui, S., Schapira, M., Conway, E.M., Carmeliet, P., Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 2008. Vol. 118 (2): p. 583-596.
- Aung, H.T., Schroder, K., Himes, S.R., Brion, K., van Zuylen, W., Trieu, A., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Hume, D.A., Sweet, M.J., Ravasi, T., LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB Journal*, 2006. Vol. 20 (9): p. 1315-27.
- Bäckdahl, L., Bushell, A., Beck, S., Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2009. Vol. 41 (1): p. 176-84.
- Baggiolini, M., Chemokines in pathology and medicine. *Journal of International Medicine*, 2001. Vol. 250: p. 91-104.
- Balaram, P., Kien, P.K., Ismail, A., Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 2009. Vol. 299 (3): p. 177-185.
- Bals, R., Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, 2000. Vol. 1 (3): p. 141-50.
- Baker, B.S., Ovigne, J.M., Powles, A.V., Corcoran, S., Fry, L., Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 2003. Vol. 148 (4): p. 670-9.
- Barker, J.N., Mitra, R.S., Griffiths, C.E., Dixit, V.M., Nickoloff, B.J., Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*, 1991. Vol. 337 (8735): p. 211-4.

- Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. Vol. 116 (2): p. 281-97.
- Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., Roitt, I., Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*, 2003. Vol. 21 (2): p. 12-23.
- Belső, N., Széll, M., Pivarcsi, A., Kis, K., Kormos, B., Kenderessy, A.S., Dobozy, A., Kemény, L., Bata-Csörgő, Z., Differential expression of D-type cyclins in HaCaT keratinocytes and in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008. Vol. 128 (3): p. 634-42.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J.3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 2005. 120 (2): p. 169-81.
- Beutler, B.A., Orchestration of septic shock by cytokines: the role of cachectin (tumor necrosis factor). *Progress in Clinical and Biological Research*, 1989. Vol. 286: p. 219-35.
- Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A.K., Farber, J.M., Segal, D.M., Oppenheim, J.J., Kwak, L.W., Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, 2002. Vol. 298 (5595): p. 1025-9.
- Bisset, L.R., Schmid-Grendelmeier, P., Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Current Opinion in Pulmonology Medicine*, 2005. Vol. 11: p. 35-42.
- Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R., Gay, S., The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cellular Immunology*, 2005. Vol. 233 (2): p. 90-96.
- Borgel, D., Clauser, S., Bornstain, C., Bièche, I., Bissery, A., Remones, V., Fagon, J.Y., Aiach, M., Diehl, J.L., Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 2006. Vol. 34 (1): p. 219-22.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2002. Vol. 61 (11): p. 1013-21.

Büchau, A.S., Gallo, R.L., Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clinics in Dermatology*, 2007. Vol. 25 (6): p. 616-24.

Cairns, B.R., Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. *Trends in Cell Biology*, 2001. Vol. 11 (11): p. 15-21.

Caraux, A., Lu Q, Fernandez N, Riou S, Di Santo JP, Raulet DH, Lemke G, Roth C., Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nature Immunology*, 2006. Vol. 7 (7): p. 747-754.

Carlén, L.M., Sánchez, F., Bergman, A.C., Becker, S., Hirschberg, D., Franzén, B., Coffey, J., Jörnvall, H., Auer, G., Alaiya, A.A., Ståhle, M., Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005. Vol. 124 (1): p. 63-9.

Casanova, J.L., Abel, L., Quintana-Murci, L., Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual Review of Immunology*, 2011. Vol. 29: p. 447-91.

Casrouge, A., Zhang, S.Y., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., Puel, A., Yang, K., Alcais, A., Picard, C., Mahfoufi, N., Nicolas, N., Lorenzo, L., Plancoulaine, S., Sénéchal, B., Geissmann, F., Tabeta, K., Hoebe, K., Du, X., Miller, R.L., Héron, B., Mignot, C., de Villemeur, T.B., Lebon, P., Dulac, O., Rozenberg, F., Beutler, B., Tardieu, M., Abel, L., Casanova, J.L., Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science*, 2006. Vol. 314 (5797): p. 308-12.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M., Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*, 1999. Vol. 5 (8): p. 919-23.

Chadebech, P., Goidin, D., Jacquet, C., Viac, J., Schmitt, D., Staquet, M.J., Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS. *Cell Biology and Toxicology*, 2003. Vol. 19 (5): p. 313-24.

Chan, C., Li, L., McCall, C.E., Yoza, B.K., Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1beta promoter. *Journal of Immunology*, 2005. Vol. 175 (1): p. 461-8.

- Chi, T., Yan, Z., Xue, Y., Wang, W., Purification and functional analysis of the mammalian SWI/SNF-family of chromatin-remodeling complexes. *Methods in Enzymology*, 2004. Vol. 377: p. 299-316.
- Chung, W.O., Hansen, S.R., Rao, D., Dale, B.A., Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *Journal of Immunology*, 2004. Vol. 173 (8): p. 5165-70.
- Cohen, J., The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002. Vol. 420 (6917): p. 885-91.
- Cook, D.N., Pisetsky, D.S., Schwartz, D.A., Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*, 2004. Vol. 5 (10): p. 975-9.
- Dalpke, A., Heeg, K., Bartz, H., Baetz, A., Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology*, 2008. Vol. 213 (3-4): p. 225-35.
- De, Y., Chen, Q., Schmidt, A.P., et al., LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. Vol. 192 (7): p. 1069-74.
- De Diego, R.P., Sancho-Shimizu, V., Lorenzo, L., Puel, A., Plancoulaine, S., Picard, C., Herman, M., Cardon, A., Durandy, A., Bustamante, J., Vallabhapurapu, S., Bravo, J., Warnatz, K., Chaix, Y., Cascarrigny, F., Lebon, P., Rozenberg, F., Karin, M., Tardieu, M., Al-Muhsen, S., et al., Human TRAF3 Adaptor Molecule Deficiency Leads to Impaired Toll-like Receptor 3 Response and Susceptibility to Herpes Simplex Encephalitis. *Immunity*, 2010. Vol. 33 (3): p. 400-411.
- Delgado, M., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., Dinkins, C., Ornatowski, W., Vergne, I., Deretic, V., Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunological Reviews*, 2009. Vol. 227 (1): p. 189-202.
- Deng, T., Zhang, Y., Chen, Q., Yan, K., Han, D., Toll-like receptor-mediated inhibition of Gas6 and ProS expression facilitates inflammatory cytokine production in mouse macrophages. *Immunology*, 2012. Vol. 135 (1): p. 40-50.
- Dinulos, J.G., Mentele, L., Fredericks, L.P., Dale, B.A., Darmstadt, G.L., Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003. Vol. 10 (1): p. 161-6.

- Doench, J.G., Petersen, C.P., Sharp, P.A., siRNAs can function as miRNAs. *Genes and Development*, 2003. Vol. 17 (4): p. 438-42.
- Dorschner, R.A., Pestonjamas, V.K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., Agerberth, B., Gudmundsson, G.H., Gallo, R.L., Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001. Vol. 117 (1): p. 91-7.
- Doyle, S.E., Vaidya, S.A., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P.W., Wu, T.-T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M.E., Modlin, R.L., Cheng, G., IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity*, 2002. Vol. 17 (3): p. 251-263.
- Doyle, S.L., O'Neill, L.A., Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology*, 2006. Vol. 72 (9): p. 1102-13.
- Elias, P.M., Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005. Vol. 125 (2): p. 183-200.
- Ertel, W., Keel, M., Neidhardt, R., Steckholzer, U., Kremer, J.P., Ungethuem, U., Trentz O., Inhibition of the defense system stimulating interleukin-12 interferon-gamma pathway during critical illness. *Blood*, 1997. Vol. 89 (5): p. 1612-20.
- Ettehadi, P., Greaves, M.W., Wallach, D., Aderka, D., Camp, R.D., Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clinical and Experimental Immunology*, 1994. Vol. 96 (1): p. 146-51.
- Falgarone, G., Jaen, O., Boissier, M.C., Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2005. Vol. 72 (1): p. 17-25.
- Fanti, P.A., Dika, E., Vaccari, S., Miscial, C., Varotti, C., Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod. *International Journal of Dermatology*, 2006. Vol. 45 (12): p. 1464-5.
- Faraoni, I., Antonetti, F.R., Cardone, J., Bonmassar, E., miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009. Vol. 1792 (6): p. 497-505.

- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews. Genetics*, 2006. Vol. 7 (1): p. 21-33.
- Filkor, K., Hegedűs, Z., Tubak, V., Kemény, L., Kondorosi, É., Nagy, I., Genome wide transcriptome analysis of dendritic cells identifies genes with altered expression in psoriasis. *PLoS ONE*, 2013. (közlés alatt)
- Foster, S.L., Hargreaves, D.C., Medzhitov, R., Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 2007. Vol. 447 (7147): p. 972-8.
- Foster, S.L., Medzhitov, R., Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*, 2009. Vol. 130 (1): p. 7-15.
- Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y.D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R.T., Kelly, R.A., Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *Journal of Clinical Investigation*, 1999. Vol. 104 (3): p. 271-80.
- Froböse, H., Rønn, S.G., Heding, P.E., Mendoza, H., Cohen, P., Mandrup-Poulsen, T., Billestrup, N., Suppressor of cytokine Signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex. *Molecular Endocrinology*, 2006. Vol. 20 (7): p. 1587-96.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Ståhle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H., Gudmundsson, G.H., The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. Vol. 272 (24): p. 15258-63.
- Fulton, C., Anderson, G.M., Zasloff, M., Bull, R., Quinn, A.G., Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet*, 1997. Vol. 350 (9093): p. 1750-1.
- Gallo, R.L., Huttner, K.M., Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 1998. Vol. 111 (5): p. 739-43.
- Ganz, T., Lehrer, R.I., Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 1999. Vol. 5 (7): p. 292-297.
- Ganz, T., Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 2003. Vol. 3 (9): p. 710-20.
- Gay, N.J., Gangloff, M., Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 2007. Vol. 76: p. 141-65.

- Ghizzoni M, Haisma HJ, Maarsingh H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- κ B mediated inflammation. *Drug Discovery Today*, 2011. Vol. 16 (11-12): p. 504-11.
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thürlimann, W., Burg, G., Nestle, F.O., Dummer, R., Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Archives of Dermatology*, 2004. Vol. 140 (12): p. 1490-5.
- Glass, W.G., Rosenberg, H.F., Murphy, P.M., Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2003. Vol. 3: p. 467-73.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E.E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., et al., Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 2007. Vol. 446 (7132): p. 153-158.
- Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., Bartel, D.P., MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 2007. Vol. 27 (1): p. 91-105.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M., A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 1997. Vol. 387 (6636): p. 861.
- Hamon, M.A., Cossart, P., Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host and Microbe*, 2008. Vol. 4 (2): p. 100-9.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.M., Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. Vol. 276 (8): p. 5707-13.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J.M., Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *Journal of Investigative Dermatology*, 2004. Vol. 123 (3): p. 522-9.

Heilborn, J.D., Nilsson, M.F., Kratz, G., Weber, G., Sørensen, O., Borregaard, N., Ståhle-Bäckdahl, M., The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *Journal of Investigative Dermatology*, 2003. Vol. 120 (3): p. 379-89.

Henderson, B., Poole, S., Wilson, M., Microbial/host interactions in health and disease: Who controls the cytokine network? *Immunopharmacology*, 1996. Vol 35 (1): p. 1-21.

Henricson BE, Neta R, Vogel SN. An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony-stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infection and Immunity*, 1991. Vol. 59 (3): p. 1188-91.

Herceg, Z., Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis*, 2007. Vol. 22 (2): p. 91-103.

Hollox, E.J., Huffmeier, U., Zeeuwen, P.L., Palla, R., Lascorz, J., Rodijk-Olthuis, D., van de Kerkhof, P.C., Traupe, H., de Jongh, G., den Heijer, M., Reis. A., Armour, J.A., Schalkwijk, J., Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nature Genetics*, 2008. Vol. 40 (1): p. 23-5.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G., Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*, 2002. Vol. 168 (9): p. 4531-7.

Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S., *International Immunology*, 2002. Vol. 14 (10): p. 1225-1231.

Huang, M., Rigby, A.C., Morelli, X., Grant, M.A., Huang, G., Furie, B., Seaton, B., Furie, B.C., Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nature Structural Biology*, 2003. Vol.10 (9): p. 751-6.

Hutvagner, G., Zamore, P.D., A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002. Vol. 297 (5589): p. 2056-60.

Iizuka, M., Smith, M.M., Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003. Vol. 13 (2): p. 154-60.

Inagaki-Ohara, K., Hanada, T., Yoshimura, A., Negative regulation of cytokine signaling and inflammatory diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 2003. Vol. 3 (4): p. 435-42.

- Ito, K., Barnes, P.J., Adcock, I.M., Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Molecular Cell Biology*, 2000. Vol. 20 (18): p. 6891-903.
- Ito, K., Adcock, I.M., Histone acetylation and histone deacetylation. *Molecular Biotechnology*, 2002. Vol. 20: p. 99-106.
- Jacinto, R., Hartung, T., McCall, C., Li, L., Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *Journal of Immunology*, 2002. Vol. 168 (12): p. 6136-41.
- Jaenisch, R., Bird, A., Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 2003. Vol. 33 p. 245-54.
- Janeway, C.A. Jr., Medzhitov, R., Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 2002. Vol 20: p. 197-216.
- Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A.M., Williams, B.R., Li, X., Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF κ B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. Vol. 278 (19): p. 16713-9.
- Jin, M.S., Lee, J.O., Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 2008. Vol. 29 (2): p. 182-91.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity*, 1999. Vol. 11 (1): p. 115-122.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J.-I., Mühlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K., Akira, S., Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of Immunology*, 2001. Vol. 167: p. 5887-5894.
- Kawai, T., Akira, S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 2010. Vol. 11 (5): p. 373-84.
- Kayama, H., Ramirez-Carrozzi, V.R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S.T., Takeda, K., Class-specific regulation of pro-

inflammatory genes by MyD88 pathways and IkappaBzeta. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. Vol. 283 (18): p. 12468-77.

Kim, C.H., Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 2004. Vol. 4 (4): p. 343-61.

Kim, V.N., MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2005. Vol. 6 (5): p. 376-85.

Kopp, E., Medzhitov, R., Skin antibiotics get into the loop. *Nature Medicine*, 2002. Vol. 8 (12): p. 1359-60.

Koster, M.I., Roop, D.R., The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 2004. Vol. 34 (1): 3-9.

Krebs, D.L., Hilton, D.J., SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 2001. Vol. 19 (5): 378-87.

Ku, C.L., von Bernuth, H., Picard, C., Zhang, S.Y., Chang, H.H., Yang, K., Chrabieh, M., Issekutz, A.C., Cunningham, C.K., Gallin, J., Holland, S.M., Roifman, C., Ehl, S., Smart, J., Tang, M., Barrat, F.J., Levy, O., McDonald, D., et al., Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 2007. Vol. 204 (10): p. 2407-22.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. Vol. 388 (4): p. 621-625.

Kurdistani, S.K., Grunstein, M., Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2003. Vol. 4 (4): p. 276-84.

Lai, C., Lemke, G., An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*, 1991. Vol. 6 (5): p. 691-704.

Learn, C.A., Boger, M.S., Li, L., McCall, C.E., The phosphatidylinositol 3-kinase pathway selectively controls sIL-1RA not interleukin-1beta production in the septic leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. Vol. 276 (23): p. 20234-9.

Lebre, M.C., van der Aar, A.M., van Baarsen, L., van Capel, T.M., Schuitemaker, J.H., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., Human keratinocytes express functional Toll-like

receptor 3, 4, 5, and 9. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. Vol. 127 (2): p. 331-41.

Lehrer, R., Ganz, T., Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology*, 2002. Vol. 14 (1): p. 96-102.

Lemke, G., Rothlin, C.V., Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews. Immunology*, 2008. Vol. 8 (5): p. 327-36.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996. Vol. 86 (6): p. 973-83.

Lena, A.M., Shalom-Feuerstein, R., Rivetti di Val Cervo, P., Aberdam, D., Knight, R.A., Melino, G., Candi, E., miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death and Differentiation*, 2008. Vol. 15 (7): p. 1187-95.

Li, L., Cousart, S., Hu, J., McCall, C.E., Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. Vol. 275 (30): p. 23340-5.

Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K.T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J.L., Hancock, W.W., Shen, Y., Saouaf, S.J., Greene, M.I., FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *PNAS*, 2007. Vol. 104 (11): p. 4571-6.

Lin, T., Chen, H., Koustova, E., Sailhamer, E.A., Li, Y., Shults, C., Liu, B., Rhee, P., Kirkpatrick, J., Alam, H.B., Histone deacetylase as therapeutic target in a rodent model of hemorrhagic shock: effect of different resuscitation strategies on lung and liver. *Surgery*, 2007. Vol. 141 (6): p. 784-94.

Liu, A.Y., Destoumieux, D., Wong, A.V., Park, C.H., Valore, E.V., Liu, L., Ganz, T., Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002. Vol. 118 (2): p. 275-281.

Lorenz, E., Mira, J.P., Frees, K., Schwartz, D.A., Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Archives of Internal Medicine*, 2002. Vol. 162: p. 1028-32.

- Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagrande, F., Lai, C., Skinner, M.K., Klein, R., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Goff, S.P., Lemke, G., Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*, 1999. Vol. 398 (6729): p. 723-728.
- Lu, Q., Lemke, G., Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*, 2001. Vol. 293 (5528): p. 306-311.
- Luster, A.D., The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 2002. Vol. 14 (1): p. 129-135.
- Lübbe, J., Secondary infections in patients with atopic dermatitis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2003. Vol. 4 (9): p. 641-54.
- Lübbe, J., Stucky, L., Saurat, J.H., Rosaceiform dermatitis with follicular Demodex after treatment of facial atopic dermatitis with 1% pimecrolimus cream. *Dermatology*, 2003. Vol. 207 (2): p. 204-5.
- Mansell, A., Smith, R., Doyle, S.L., Gray, P., Fenner, J.E., Crack, P.J., Nicholson, S.E., Hilton, D.J., O'Neill, L.A., Hertzog, P.J., Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nature Immunology*, 2006. Vol. 7 (2): p. 148-55.
- Marshak-Rothstein, A., Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews. Immunology*, 2006. Vol. 6 (11): p. 823-35.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., Seya, T., Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002. Vol. 293 (5): p. 1364-1369.
- Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., Kuroki, Y., Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, 2007. Vol. 8: p. 124.
- McCall, C.E., Grosso-Wilmoth, L.M., LaRue, K., Guzman, R.N., Cousart, S.L., Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin-1 beta gene in blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 1993. Vol. 91 (3): p. 853-61.

- Melaragno, M.G., Cavet, M.E., Yan, C., Tai, L.K., Jin, Z.G., Haendeler, J., Berk, B.C., Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2004. Vol. 37 (4): p. 881-887.
- Mercurio, F., Manning, A.M., Multiple signals converging on NF-kappaB. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999. Vol. 11 (2): p. 226-32.
- Mempel, M., Voelcker, V., Köllisch, G., Plank, C., Rad, R., Gerhard, M., Schnopp, C., Fraunberger, P., Walli, A.K., Ring, J., Abeck, D., Ollert, M., Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *Journal of Investigative Dermatology*, 2003. Vol. 121 (6): p. 1389-96.
- Miller, L.S., Cho, J.S., Immunity against Staphylococcus aureus cutaneous infections. *Nature Reviews. Immunology*, 2011. Vol. 11 (8): p. 505-18.
- Miska, E.A., How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2005. Vol. 15 (5): p. 563-8.
- Moffatt, C.E., Lamont, R.J., Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infection and Immunology*, 2011. Vol. 79 (7): p. 2632-7.
- Monteleone, G., Pallone, F., MacDonald, T.T., Chimenti, S., Costanzo, A., Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clinical Science*, 2011. Vol. 120 (1): p. 1-11.
- Mueller, L.P., Yoza, B.K., Neuhaus, K., Loeser, C.S., Cousart, S., Chang, M.C., Meredith, J.W., Li, L., McCall, C.E., Endotoxin-adapted septic shock leukocytes selectively alter production of sIL-1RA and IL-1beta. *Shock*, 2001. Vol. 16 (6): p. 430-7.
- Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Misset, B., Blériot, J.P., Cavaillon, J.M., Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *Journal of Clinical Investigation*, 1991. Vol. 88 (5): p. 1747-54.
- Nagaoka, I., Hirota, S., Yomogida, S., Ohwada, A., Hirata, M., Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflammation Research*, 2000. Vol. 49 (2): p. 73-9.

- Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H., Mizuno, K., Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. Vol. 271 (47): p. 30022-7.
- Nahid, M.A., Satoh, M., Chan, E.K., MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cellular and Molecular Immunology*, 2011. Vol. 8 (5): p. 388-403.
- Nakayama, K., Okugawa, S., Yanagimoto, S., Kitazawa, T., Tsukada, K., Kawada, M., Kimura, S., Hirai, K., Takagaki, Y., Ota, Y., Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. Vol. 279 (8): p. 6629-34.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., Kingston, R.E., Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 2002. Vol. 108 (4): p. 475-87.
- Nestle, F.O., Di, Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J., Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 2009. Vol. 9 (10): p. 679-91.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H., Barker, J., Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 2009. Vol. 361 (5): p. 496-509.
- Nickoloff, B.J., Xin, H., Nestle, F.O., Qin, J.Z., The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clinics in Dermatology*, 2007. Vol. 25 (6): p. 568-73.
- Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Someya, A., Hirata, M., Matsuda, H., Ogawa, H., Nagaoka, I., A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology*, 2002. Vol. 106 (1): p. 20-6.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamasp, V., Piraino, J., Huttner, K., Gallo, R.L., Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*, 2001. Vol. 414 (6862): p. 454-7.
- Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., Akira, S., Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *Journal of Immunology*, 2000. Vol. 164 (7): p. 3476-9.

- Nomura, I., Gao, B., Boguniewicz, M., Darst, M.A., Travers, J.B., Leung, D.Y., Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003. Vol. 112 (6): p. 1195-202.
- O'Bryan, J.P., Frye, R.A., Cogswell, P.C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R. 3rd, Le Beau, M.M., Earp, H.S., Liu, E.T., Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 1991. Vol. 11 (10): p. 5016-31.
- O'Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., Baltimore, D., MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *PNAS*, 2007. Vol. 104 (5): p. 1604-9.
- O'Neill, L.A., Dinarello, C.A., The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology Today*, 2000. Vol. 21 (5): 206-9.
- O'Neill, L.A.J., TAMpering with Toll-like receptor signaling. *Cell*, 2007. Vol. 131: p. 1039-41.
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L., Leung, D.Y., Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*. 2002. Vol. 347 (15): p. 1151-60.
- Oppenheim, J.J., Cytokines: past, present, and future. *International Journal of Hematology*, 2001. Vol. 74 (1): p. 3-8.
- Ospelt, C., Gay, S., TLRs and chronic inflammation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2010. Vol. 42 (4): p. 495-505.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A., The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *PNAS*, 2000. Vol. 97 (25): p. 13766-71.
- Pahl, H.L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999. Vol. 18 (49): p. 6853-66.

- Paquette, R.L., Hsu, N.C., Kiertscher, S.M., Park, A.N., Tran, L., Roth, M.D., Glaspy, J.A., Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 1998. Vol. 64 (3): p. 358-67.
- Perry, M.M., Moschos, S.A., Williams, A.E., Shepherd, N.J., Larner-Svensson, H.M., Lindsay, M.A., Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of Immunology*, 2008. Vol. 180 (8): p. 5689-5698.
- Philpott, D.J., Girardin, S.E., Sansonetti, P.J., Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Current Opinion in Immunology*, 2001. Vol. 13 (4): p. 410-6.
- Picard, C., Puel, A., Bustamante, J., Ku, C.L., Casanova, J.L., Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2003. Vol. 3 (6): 451-9.
- Pivarcsi, A., Bodai, L., Réthi, B., Kenderessy-Szabó, A., Koreck, A., Széll, M., Beer, Z., Bata-Csörgő, Z., Magócsi, M., Rajnavölgyi, E., Dobozy, A., Kemény, L., Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *International Immunology*, 2003. Vol. 15 (6): p. 721-30.
- Pivarcsi, A., Nagy, I., Kemeny, L., Innate immunity in the skin: How keratinocytes fight against pathogens. *Current Immunology Reviews*, 2005. Vol. 1 (1): p. 29-42.
- Prasad, D., Rothlin, C.V., Burrola, P., Burstyn-Cohen, T., Lu, Q., Garcia de Frutos, P., Lemke, G., TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2006. Vol. 33 (1): p. 96-108.
- Qin, H., Wilson, C.A., Lee, S.J., Zhao, X., Benveniste, E.N., LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*, 2005. Vol. 106 (9): p. 3114-22.
- Rajan, N., Langtry, J.A., Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2006. Vol. 31 (1): p. 140-1.

- Ramirez-Carrozzi, V.R., Nazarian, A.A., Li, C.C., Gore, S.L., Sridharan, R., Imbalzano, A.N., Smale, S.T., Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2beta nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response. *Genes and Development*, 2006. Vol. 20 (3): p. 282-96.
- Rezende, S.M., Simmonds, R.E., Lane, D.A., Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for proteinS and the proteinS-C4b binding protein complex. *Blood*, 2004. Vol. 103 (4): p. 1192-201.
- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Zhao, K., Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes and Development*, 2005. Vol. 19 (5): p. 542-52.
- Rossi, D., Zlotnik, A., The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*, 2000. Vol. 18: p. 217-42.
- Rothlin, C.V., Ghosh, S., Zuniga, E.I., Oldstone, M.B., Lemke, G., TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 2007. Vol. 131 (6): p. 1124-36.
- Saccani, S., Pantano, S., Natoli, G., Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *Journal of Experimental Medicine*, 2001. Vol. 193 (12): p. 1351-9.
- Sadeghi, K., Wessner, B., Laggner, U., Ploder, M., Tamandl, D., Friedl, J., Zügel, U., Steinmeyer, A., Pollak, A., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G., Spittler, A., Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *European Journal of Immunology*, 2006. Vol. Vol. 36 (2): p. 361-70.
- Santini, S.M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., Belardelli, F., Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. Vol. 191 (10): p. 1777-88.
- Sasaki, T., Knyazev, P.G., Cheburkin, Y., Göhring, W., Tisi, D., Ullrich, A., Timpl, R., Hohenester, E., Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. Vol. 277 (46): p. 44164-70.

Sasaki, T., Knyazev, P.G., Clout, N.J., Cheburkin, Y., Göhring, W., Ullrich, A., Timpl, R., Hohenester, E., Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO Journal*, 2006. Vol. 25 (1): p. 80-7.

Schauber, J., Dorschner, R.A., Coda, A.B., Büchau, A.S., Liu, P.T., Kiken, D., Helfrich, Y.R., Kang, S., Elalieh, H.Z., Steinmeyer, A., Zügel, U., Bikle, D.D., Modlin, R.L., Gallo, R.L., Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, 2007. Vol. 117 (3): p. 803-11.

Schmeck, B., Beermann, W., van Laak, V., Zahlten, J., Opitz, B., Witzernath, M., Hocke, A.C., Chakraborty, T., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S., Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification. *Journal of Immunology*, 2005. Vol. 175 (5): p. 2843-50.

Schmeck, B., Lorenz, J., N'guessan, P.D., Opitz, B., van Laak, V., Zahlten, J., Slevogt, H., Witzernath, M., Flieger, A., Suttorp, N., Hippenstiel, S., Histone acetylation and flagellin are essential for *Legionella pneumophila*-induced cytokine expression. *Journal of Immunology*, 2008. Vol. 181 (2): p. 940-7.

Schröder, J.M., Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 1999. Vol. 57 (2): p. 121-34.

Scutera, S., Fraone, T., Musso, T., Cappello, P., Rossi, S., Pierobon, D., Orinska, Z., Paus, R., Bulfone-Paus, S., Giovarelli, M., Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN- α -inducible Axl/Gas6 pathway. *Journal of Immunology*, 2009. Vol. 183 (5): p. 3004-13.

Shankar, S.L., O'Guin, K., Kim, M., Varnum, B., Lemke, G., Brosnan, C.F., Shafit-Zagardo, B., Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 2006. Vol. 26 (21): p. 5638-5648.

Shakespeare, M.R., Halili, M.A., Irvine, K.M., Fairlie, D.P., Sweet, M.J., Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends in Immunology*, 2011. Vol. 32 (7): p. 335-43.

- Shimojima, M., Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y., Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *Journal of Virology*, 2006. Vol. 80 (20): p. 10109-10116.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 1999. Vol. 284 (5421): p. 1835-7.
- Song, P.I., Park, Y.M., Abraham, T., Harten, B., Zivony, A., Neparidze, N., Armstrong, C.A., Ansel, J.C., Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002. Vol. 119 (2): p. 424-32.
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P.C., Sääf, A., Lundeberg, L., Tengvall-Linder, M., Norstedt, G., Alenius, H., Homey, B., Scheynius, A., Ståhle, M., Pivarcsi, A., MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS ONE*, 2007. Vol. 2 (7): e610.
- Sonkoly, E., Ståhle, M., Pivarcsi, A., MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2008. Vol. 33 (3): p. 312-5.
- Sterner, D.E., Berger, S.L., Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000. Vol. 64 (2): p. 435-459.
- Stitt, T.N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D.R., Jones, P.F., et al., The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*, 1995. Vol. 80 (4): p. 661-70.
- Strahl, B.D., Allis, C.D., The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000. Vol. 403 (6765): p. 41-5.
- Struhl, K., Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes and Developmental*, 1998. Vol. 12: 599-606.
- Suh, C.H., Hilliard, B., Li, S., Merrill, J.T., Cohen, P.L., TAM receptor ligands in lupus: protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, 2010. Vol. 12 (4): R146.
- Sun, B., Qi, N., Shang, T., Wu, H., Deng, T., Han, D., Sertoli cell-initiated testicular innate immune response through toll-like receptor-3 activation is negatively regulated by Tyro3, Axl, and mer receptors. *Endocrinology*, 2010. Vol. 151 (6): 2886-97.

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., Baltimore, D., NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS*, 2006. Vol. 103 (33): p. 12481-6.

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Baltimore D., MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity*, 2007. Vol. 26 (2): p. 133-7.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 2003. Vol. 21: p. 335-76.

Takeda, K., Akira, S., Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 2005. Vol. 17 (1): p. 1-14.

Takeuchi, J., Watari, E., Shinya, E., Norose, Y., Matsumoto, M., Seya, T., Sugita, M., Kawana, S., Takahashi, H., Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. Vol. 306 (3): p. 674-9.

Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of Immunology*, 2007. Vol. 179 (8): p. 5082-9.

Tissari, J., Sirén, J., Meri, S., Julkunen, I., Matikainen, S., IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *Journal of Immunology*, 2005. Vol. 174 (7): p. 4289-94.

Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., Vogel, S.N., TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nature Immunology*, 2002. Vol. 3 (4): p. 392-8.

Tosi, M.F., Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005. Vol. 116 (2): p. 241-249

Tovar-Castillo, L.E., Cancino-Díaz, J.C., García-Vázquez, F., Cancino-Gómez, F.G., León-Dorantes, G., Blancas-González, F., Jiménez-Zamudio, L., García-Latorre, E.,

Cancino-Díaz, M.E., Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1alpha, LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. *International Journal of Dermatology*, 2007. Vol. 46 (3): p. 239-46.

Tsaprouni, L.G., Ito, K., Adcock, I.M., Punchard, N., Suppression of lipopolysaccharide- and tumour necrosis factor-alpha-induced interleukin (IL)-8 expression by glucocorticoids involves changes in IL-8 promoter acetylation. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007. Vol. 150 (1): p. 151-7.

Turner, B.M., Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 2000. Vol. 22 (9): p. 836-45.

Turvey S.E., Broide D.H., Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010. Vol. 125 (2): p. 24-32.
109.

Van Deuren, M., van der Ven-Jongekrijg, J., Demacker, P.N., Bartelink, A.K., van Dalen, R., Sauerwein, R.W., Gallati, H., Vannice, J.L., van der Meer, J.W., Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *Journal of Infectious Diseases*, 1994. Vol. 169 (1): p. 157-61.

Von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.L., Chrabieh, M., Mustapha, I.B., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., et al., Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*, 2008. Vol. 321: p. 691-696.

Wolffe, A.P., Chromatin remodeling: why it is important in cancer. *Oncogene*, 2001. Vol. 20 (24): p. 2988-90.

Wu, J.K., Siller, G., Strutton, G., Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australasian Journal of Dermatology*, 2004. Vol. 45 (1): p. 47-50.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 1999. Vol. 286 (5439): p. 525-8.

Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., Oppenheim, J.J., Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000. Vol. 68 (1): p. 9-14.

- Ye, F., Li, Q., Ke, Y., Lu, Q., Han, L., Kaplan, H.J., Shao, H., Lu, Q., TAM receptor knockout mice are susceptible to retinal autoimmune induction. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2011. Vol. 52 (7): 4239-46.
- Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovsky, A., Fuchs, E., Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature Genetics*, 2006. Vol. 38 (3): p. 356-62.
- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M., Fuchs, E., A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*, 2008. Vol. 452 (7184): p. 225-9.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., Fujita, T., Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO Journal*, 1998. Vol. 17 (4): p. 1087-95.
- Yoza, B.K., Hu, J.Y., Cousart, S.L., Forrest, L.M., McCall, C.E., Induction of RelB participates in endotoxin tolerance. *Journal of Immunology*, 2006. Vol. 177 (6): p. 4080-5.
- Zasloff, M., Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*, 2002. Vol. 360 (9340): p. 1116-1117.
- Zeng, Y., Wagner, E.J., Cullen, B.R., Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular Cell*, 2002. Vol. 9 (6): p. 1327-33.
- Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Mancinelli, R., Xu, X.P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M., Arditi, M., Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. Vol. 274 (12): p. 7611-4.
- Zhang, P., Su, Y., Zhao, M., Huang, W., Lu, Q., Abnormal histone modifications in PBMCs from patients with psoriasis vulgaris. *European Journal of Dermatology*, 2011. Vol. 21 (4): p. 552-7.
- Zhao, J., Yang, X., Auh, S.L., Kim, K.D., Tang, H., Fu, Y.X., Do adaptive immune cells suppress or activate innate immunity? *Trends in Immunology*, 2009. Vol. 30 (1): p. 8-12.