

**A veleszületett immunitás szabályozásának vizsgálata**

*in vitro* és *in vivo* rendszerekben

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Szász András**

**Témavezető: Dr. Nagy István**

**Biológia Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

**Szeged**

**2013.**

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

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-ok közé tartozó Toll-szerű receptorok (TLR) aktiválása antimikrobiális peptidek (AMP) és gyulladáskeltő mediátorok szekretálását beindítva lokális inflammációt, illetve a fertőzés helyére migrált professzionális immunsejtek (pl. dendritikus sejtek, makrofágok, T-sejtek) általi adaptív immunválaszokat idéz elő. Azonban a veleszületett immunfolyamatok szigorú kontrollálása nagyon fontos, hiszen a folyamatos aktiváció krónikus gyulladással járó bőrbetegségek kialakulásához vezethet. 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 a veleszületett immunrendszer félprofesszionális immunsejtjeiként számon tartott keratinociták esetén a TLR2 aktiváció/reaktiváció hatására gyulladáskeltő citokinek/kemokinek, valamint AMP-ek gén- és fehérjeszintű expressziós mintázatának tanulmányozása.
3. TLR2 aktivációt/reaktivációt követően a transzkripciót nagymértékben módosító hiszton fehérjék globális acetilációs szintjeinek feltérképezése keratinocitákban.
4. Kísérleti modellünket alapul véve következő lépésben keratinocitákban a poszttranszkripcionális szabályozásban résztvevő mikroRNS-ek – elsősorban a miR-203 –, illetve targetjeinek (p63, SOCS3) kifejeződésének tanulmányozása.
5. A veleszületett immunfolyamatok kapcsán kialakult gyulladást negatívan szabályozó TAM receptorok (TYRO3, AXL, MER) és ligandjuk (GAS6) gén- és fehérjeszintű expressziójának vizsgálata különböző mikrobiális ágensekkel való indukciót követően mind professzionális-, mind félprofesszionális immunsejtekben.

6. A TAM receptorok és ligandjuk (GAS6) kifejeződésének tanulmányozása krónikus gyulladáson alapuló betegség, a pikkelysömör esetén.

## **ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### **A kísérletek során használt sejt kultúrák**

Vizsgálatainkban - mint félp professzionális immunsejtek - immortalizált HaCaT humán keratinocitákat, PK E6/E7 sejteket (vaginális epitélisejt), és primer keratinocitákat (pKC) használtunk.

Professzionális immunsejtes kísérleteinkben egyrészt dendritikus sejteket (DC) alkalmaztunk, melyeket buffy coat-ból izolált monociták 5 napig granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktorról (GM-CSF; Sigma) és rekombináns humán interferon- $\alpha$ -val (IFN- $\alpha$ ; Sigma) történő differenciálása során nyertünk. Az éretlen DC-ből érett DC létrehozásához további egy napig rekombináns humán TNF- $\alpha$ -val (R&D Systems) kezeltük a sejteket. A másik, általunk vizsgált professzionális immunsejt a THP-1 (humán akut leukémia monocita) sejt volt. Az aktiválatlan THP-1 sejtek aktiválása végett 48 órán keresztül forbol-mirisztol-acetátot (PMA; Sigma) adtuk a sejtekhez.

A sejteket minden esetben standard sejt kultúra körülmények között tartottuk, 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A sejtek felhasználása a különböző kísérletekben 60-70%-os konfluencia esetén történt.

### **Sejtenyészetek stimulálása**

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

- PGN: *Staphylococcus aureus*-eredetű peptidoglikán (TLR2 ligand; Fluka)
- LPS: *Escherichia coli*-eredetű lipopoliszacharid (TLR4 ligand; Sigma)
- Poly I:C: virális kettős szálú RNS szintetikus analógja (TLR3 ligand; Enzo Life Sciences)

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; Sigma) hiszton deacetiláz inhibitorral kezeltük.

### **Transzfektálás**

A HaCaT sejtek transzfektálása specifikus anti-miR203 mikroRNS 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' transzfekciós protokoll szerint végeztük. A transzfektált sejtek normál sejt kultúra kondíciós körülmények között, 37 °C-on voltak tartva. 24 órával az első kezelés után a transzfektálást megismételtük, így biztosítva a mikroRNS inhibitor folyamatos jelenlétét.

### **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. Az RNS minőségét és mennyiségét NanoDroppal, Qubit-tal és Bioanalyzerrel állapítottuk meg.

### **Reverz transzkripció és 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 Cycler 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 mikroRNS-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 mikroRNS-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.

## **Hisztion extrakció**

A különböző mikrobiális ágensek hatására történt hiszton acetilációs szintek módosításának vizsgálatához az Abcam hiszton extrakciós protokollját használtuk. A sejtek egy éjszakán át, 4 °C-on történő savas extrakciója után a felülúszóból NanoDrop segítségével határoztuk meg a hiszton fehérjék koncentrációját.

## **ELISA módszer**

A sejttenyészet felülúszóból a citokinek (IL-6, CXCL8) szintjének mérése Quantikine Single Analyte ELISArray Kit (R&D Systems) felhasználásával a gyártó által leírtak 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.

## **Totál fehérje extrakció**

A sejteket összegyűjtésük után proteáz inhibitor (PIC) és fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, majd jégen lassan, enyhe rázatás mellett felolvasztottuk, mely műveletet 3-4-szer egymást követően elvégeztük. Centrifugálás után a fehérjéket tartalmazó felülúszót megtartva a minták totál fehérje koncentrációját NanoDrop műszerrel határoztuk meg.

## **Western blot analízis**

A fehérjék kvantitatív analíziséhez a totál fehérje-, illetve hiszton fehérje mintákból egyenlő mennyiségeket Tris-SDS-PAGE-n futtattunk, majd Pure Trans-Blot Transfer Medium nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blottoltunk. A blottolás sikerességének Ponceau festékekkel történt igazolása után a membránt 1 órán keresztül tejporos TBS-Tween-nel blokkoltuk. A blokkolást követően a membránt a vizsgálni kívánt fehérjékkel szemben megfelelő arányban hígított specifikus elsődleges, majd torna-peroxidáz (HRP) -konjugált másodlagos ellenanyagokkal 1-1,5 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. A

kemilumineszcens jelek detektálása Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrates (Millipore) felhasználásával történt.

### **Immunfluoreszcens festés**

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

A sejtek paraformaldehides fixálása, permeabilizálása és blokkolása után a mintákat egy éjszakán át 4 °C-on a megfelelő elsődleges antitestekkel, majd másnap 1 órát fluoreszcein-izotiocianát (FITC)/ tetrametil-rodamin-izotiocianát (TRITC) -konjugált specifikus másodlagos antitestekkel inkubáltuk, amit 4',6-diaminidino-2-fenilindolos (DAPI) festés követett. A mintákat ezután Citifluor-ral (Citifluor Ltd.) fedtük – meggátolva ezzel az idő előtti fluoreszcens jel kioltódását –, majd Zeiss Axio Observer Z1 típusú fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### **RNS extrakció bőrből származó biopszia mintákból**

Pikkelysömörös betegek léziós és nem-léziós bőrterületeiről, valamint egészséges emberek bőrből shave biopsziával mintavételezésre került sor a már korábban leírt módszer szerint (Belső, 2008). A bőralsó 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 bőrmintákat kloroformot (Sigma) tartalmazó TRIzol Reagens-ben (Life Technologies) erőteljesen összevortexeltük. A minták centrifugálása után 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 RealTime-qPCR 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.

## EREDMÉNYEK

A kapott eredményeket összefoglalva 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 gyulladáskeltő citokinek/kemokinek, valamint antimikrobiális peptidek génexpressziós mintázatát. Amíg az ismételt PGN indukció a gyulladáskeltő 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 TSA előkezeléssel megváltoztatható: a gyulladáskeltő mediátorok *elcsendesíthetők*, az AMP-ek viszont *reaktíválhatók*.

A kísérleti modellt ezután arra használtuk, hogy megállapítsuk az epigenetikai faktoroknak (pl. hiszton acetiláció), mikroRNS expresszióinak, 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* mikroRNS-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 tanulmányozva megállapítottuk, hogy különböző mikrobiális ágensekkel való indukciót követően az általunk vizsgált

sejttípusokban (dendritikus sejtek, monociták, vaginális epitélisejtek, keratinociták) megváltozik ezen receptorok kifejeződése. Megállapítottuk, hogy a TAM-ok megváltozott expressziója – mely sejt-, illetve mikroba-specifitást mutat – jól korrelál a pro- és antiinflammatorikus mediátorok génkifejeződésével: a TAM receptorok expressziójának csökkenése minden esetben a gyulladáskeltő fehérjék (pl. TNF- $\alpha$ , 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 proinflammatorikus mediátorok (pl. TNF- $\alpha$ , CXCL8) szignifikánsan megemelkedett szintje társul, utalva a bőrben lezajló immunfolyamatokban a TAM receptorok lehetséges kulcsfontosságú szerepére.



## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

**András Szász**, Gerda Strifler, Andrea Vörös, Balázs Váczi, Vilmos Tubak, László G. Puskás, Nóra Belső, Lajos Kemény, István Nagy, The expression of TAM receptors and their ligand Gas6 is downregulated in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 2013. (közlésre elfogadva) IF: **3,718**

**András Szász**, Kata Filkor, Andrea Vörös, Lajos Kemény, István Nagy, *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan-induced tolerance suppresses the expression of miR-203 in keratinocytes. *BioMed Research Interational*, 2013. (bírálat alatt)

## AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB MEGJELENÉSEK

Zita Szalai, **András Szász**, István Nagy, László Puskás, Adél Király, Anikó Berkó, Anikó Pósa, Brendan J.R. Whittle, Gerda Strifler, Krisztina Kupai, Lajos Nagy, Renáta Szabó, Rudolf Ménesi, Zsolt Murlasits, Csaba Varga, Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013. (szerkesztés alatt)

Strifler Gerda, Boros Éva, **Szász András**, Varga Csaba, Nagy István, A fizikai aktivitás hatása patkány bélgyulladásos modellben. *Immunológiai Szemle*, IV. évf. 3. szám, 34 o., 2012.

**Szász András**, Strifler Gerda, Dorka Péter, Varga Csaba, Nagy István, Gén- és fehérjeszintű expressziós mintázatok vizsgálata a fizikai aktivitás függvényében patkány bélgyulladásos modellben. *Magyar Sporttudományi Szemle*, 13. évf. 50. szám, 68. o., 2012/2.

**Szász András**, Strifler Gerda, Varga Csaba, László Ferenc, Nagy István, RekreálódTAM? - Avagy a fizikai aktivitás hatása a veleszületett immunitás negatív szabályozó rendszerének génexpressziós mintázatára patkány bélgyulladásos modellben. *Immunológiai Szemle*, III. évf. 3. szám, 36-37 o., 2011.

**András Szász**, Gerda Strifler, Andrea Vörös, Lajos Kemény, István Nagy, Negative regulation of TLR-induced innate immune response. *European Journal of Microbiology and Immunology* 1 2, p. 117., 2011.

**András Szász**, Kata Filkor, Andrea Vörös, Lajos Kemény, István Nagy, Gene-specific control of innate immunity by PGN-induced chromatin modifications. *The EMBO Meeting Abstracts Book*, p. 15., 2010.

**Szász András**, Strifler Gerda, Vörös Andrea, Kemény Lajos, Nagy István, VigyázTAM! - Avagy a veleszületett immunrendszer negatív regulátora. *Immunológiai Szemle*, II. évf. 4. szám, 4. o., 2010.

**A. Szász**, K. Filkor, A. Vörös, L. Kemény, I. Nagy, Gene-specific control of innate immunity by PGN-induced chromatin modifications. *European Journal of Immunology* Vol. 39. No. S1, S630, 2009.

I. Nagy, K. Filkor, A. Vörös, L. Kemény, **A. Szász**, Repeated encountering with Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan suppresses the expression of MIR-203 in HaCaT cells. *European Journal of Immunology* Vol. 39. No. S1, S132, 2009.

**Szász A.**, Kemény L., Nagy I., A veleszületett immunitás génspecifikus szabályozása TLR-indukált kromatinmódosításokkal. *Magyar Immunológia* 7 (3), 2008.

**Szász A.**, Nagy I., Kromatin: a veleszületett immunitás memóriája? *Biokémia* XXXII/3. 2008.

## **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK**

Z. Pintér, E. Molnár, G. Kiss, F. László, A. Molnár, K. Orbán, **A. Szász**, Cs. Varga, Gy. Pálfi, Predictive abilities of anthropometric parameters for the assessment of visceral fat area among adult women. *Anthropologiai Közlemények*, 53: pp. 115-132, 2012.

**A. Szasz**, B. Barna, Z. Gajda, Z. Galbacs, M. Kirsch-Volders, M. Sente, Effects of continuous low-dose exposure to mercury on the epileptogenicity of developing rats. *NeuroToxicology*, 23 (2): 197-206 Jul, 2002. IF: **1,659**

Barna B., **Szasz A.**, Asztalos T., Szupera Z., Vecsei L., Houtzager H., Sente M., Concentration- and time-dependent effect of aminooxyacetic acid on cortical epileptogenicity. *Acta Biologica Hungarica*, 53 (3): 245-256, 2002. IF: **0,416**

Z. Somogyvari, B. Barna, **A. Szasz**, M. Sente, P. Erdi, Slow dynamic of epileptic seizure: Analysis and model. *Neurocomputing*, 38: 921-926, 2001. IF: **0,534**

B. Barna, **A. Szasz**, I. Vilagi, M. Sente, Anticonvulsive effect of AMPA receptor antagonist GYKI 52466 on 4-aminopyridine-induced cortical ictal activity in rat. *Brain Research Bulletin*, 51:3, 241-248, 2000. IF: **1,758**

Barna B., **Szasz A.**, Gajda Z., Galbacs Z., Kirsch-Volders M., Sente M., Effects of chronic, intrauterine organic and inorganic mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. *Central European Journal of Public Health*, 73-75, 2000.

**Szasz A.**, Barna B., Galbacs Z., Kirsch-Volders M., Sente M., Chronic low-dose maternal exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rats. *Central European Journal of Public Health*, 75-77, 2000.

B. Barna, **A. Szasz** and M. Sente, The anticonvulsive effect of non-NMDA antagonist GYKI 52466 on 3-aminopyridine-induced primary and secondary cortical ictal activity in rat. *Acta Biologica Hungarica*, 50: 257-267, 1999. IF: **0,219**

**A. Szasz**, B. Barna, M. Sente, M. Kirsch-Volders, Effects of chronic intrauterine mercury intoxication on the epileptogenicity of developing rat. *Epilepsia*, 40 (2): 142-143, 1999.

**A. Szasz**, B. Barna, Z. Szupera, G. DeVisscher, Z. Galbacs, M. Kirsch-Volders, M. Sente, Chronic low-dose maternal exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 17:7, 733-742, 1999. IF: **1,425**

B. Barna, M. Sente, **A. Szasz**, G. DeVisscher, Z. Galbacs and M. Kirsch-Volders, Chronic intrauterine exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rats. *Proceedings of Analytical and Environmental Problems*, 4: 85-89, 1998.