

A pikkelysömörös hámban eltérő kifejeződést mutató molekulák szöveti- és sejtszintű jellemzése

Ph.D. értekezés tézisei

Göblös Anikó, M.Sc.



Szeged

2016

A pikkelysömörös hámban eltérő kifejeződést mutató molekulák szöveti- és sejtszintű jellemzése

Ph.D. értekezés tézisei

Göblös Anikó, M.Sc.

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Prof. Dr. Széll Márta

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, Szegedi Tudományegyetem

Orvosi Genetikai Intézet, Szegedi Tudományegyetem

MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport, Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2016

KÖVETELMÉNYEK

A dolgozat témakörébe tartozó közlemények

- I. Szegedi K*, **Göblös A***, Bacsa S, Antal M, Németh IB, Bata-Csörgő Zs, Kemény L, Dobozy A, Széll M. Expression and Functional Studies on the Noncoding RNA, PRINS. International Journal of Molecular Sciences, 14(1):205-25, 2012

IF: 2.339

* Megosztott elsőszerező

- II. **Göblös A**, Danis J, Krisztina V, Bata-Csörgő Zs, Kemény L, Széll M. Keratinocytes express functional CARD18, a negative regulator of inflammasome activation, and its altered expression in psoriasis may contribute to disease pathogenesis. Molecular Immunology, 73:10-18, 2016

IF: 2.973

Egyéb közlemények

- I. Gellért L, Fuzik J, **Göblös A**, Sárközi K, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Toldi J. Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. European Journal of Pharmacology 667(1-3): 182-7, 2011

IF: 2.516

- II. Szabó EZ, Manczinger M, **Göblös A**, Kemény L, Lakatos L. Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring Argonaute binding to a viral protein. Journal of Virology 86(15):8324-7, 2012

IF: 5.402

BEVEZETÉS

1. Pikkelysömör

A pikkelysömör egy igen gyakori bőrbetegség, mely hozzávetőlegesen a populáció 2%-át érinti; leggyakrabban a kaukázusi populációban fordul elő, azonos arányban jelentkezik a nők és férfiak körében. A pikkelysömör egy immun-mediált krónikus gyulladásos megbetegedés, mely számos sejt- és molekuláris folyamatot érint. A megbetegedés során a tünetek dinamikus változást mutatnak, a súlyosbodás és az enyhülés fázisai váltakoznak, de a betegség maga élethosszig tart. A pikkelysömör pathogenezisében mind az öröklött, mind pedig az adaptív immunrendszer elemei részt vesznek; a betegség és számos komplex jelátviteli molekula hálózat kapcsolatát széles irodalom támasztja alá. A betegség kialakulásának oka igen összetett, számos genetikai- és környezeti faktor, így az életmódból fakadó tényezők is hozzájárulnak a tünetek kialakulásához.

A pikkelysömör leggyakoribb tünete a különböző bőrterületeken megjelenő, jól körülhatárolható, a bőr felszínén kiemelkedő, ovális, hámló felszínű vörös plakkok. A tünetek háttérben a hámsejtek felgyorsult osztódása és abnormális differenciálódása áll. A pikkelysömört nagyfokú morbiditás jellemzi, ezen felül az érintettek csökkent életminőségről számolnak be. A bőrtünetek mellett társ-betegségek is megjelenhetnek, mint például ízületi gyulladás, érelmeszesedés, gyulladásos bélbetegség, cukorbetegség és depresszió. A betegség jelenleg véglegesen nem gyógyítható, gyógyszeres kezeléssel a tüneteket enyhíthetőek, átmenetileg akár megszüntethetőek.

A pikkelysömörös egyének látszólag egészséges bőrterülete (tünetmentes bőr) eltérő szöveti homeosztázist mutat az egészséges bőrhöz képest. A tünetmentes hámban található keratinociták nagyfokú érzékenységet mutatnak a proliferatív szignálokra. Ez a túlérzékenység alapvető szerepet játszik a tünetek kialakulásában. Kutatócsoportunk célja olyan molekulák azonosítása és jellemzése, melyek a tünetmentes bőr hámsejtjeiben a normálistól eltérő kifejeződési mintázatot mutatnak, ezáltal hozzájárulnak a beteg fenotípus kialakulásához; valamint olyan faktorok megismerése, melyek kialakíthatják a hámsejtek fokozott érzékenységét. Ennek érdekében kutatócsoportunk korábban elvégzett két nagyskálájú génexpressziós vizsgálatot, melyek során azonosításra került egy hosszú,

nem-kódoló RNS (ncRNS) molekula, a PRINS (psoriasis susceptibility-related RNA gene induced by stress), és egy kisméretű fehérje, a CARD18 (caspase recruitment domain family member 18, Iceberg) molekula; melyek magasabb szintű expressziót mutatnak a pikkelysömörös tünetmentes hámban az egészséges hámbhoz viszonyítva.

2. Egy újonnan azonosított hosszú, nem-kódoló RNS: PRINS

A PRINS egy a kutatócsoportunk által azonosított, 3681 nukleotid hosszú, RNS polimeráz-II által átíródó hosszú, nem-kódoló RNS molekula. A BLAST keresések alapján (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a PRINS kifejeződése a főemlősök rendjének emberszabásúak öregcsaládjára specifikus, ortológja a rágcsálókban nem mutatható ki. Korábbi kísérleteinkben igazolódott, hogy a PRINS ncRNS magasabb kifejeződést mutat a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben mind az egészséges, mind a tünetes epidermiszhez képest. Ez arra enged következtetni, hogy a PRINS túlzott expressziója a tünetmentes epidermiszben a pikkelysömörre való hajlam kialakulásában játszhat szerepet, mintsem a plakkok kialakulásában. Az megfigyelt eltérő expresszió alátámasztja, hogy a keratinociták tünetmentes epidermiszben eltérést mutatnak az egészséges bőr hámsejtjeihez képest. A valós-idejű RT-PCR vizsgálataink kimutatták, hogy különböző stressz-szignálok, mint például UV-sugárzás, vírusfertőzés (herpes simplex), és a transláció gátlása megnövelik a PRINS ncRNS expresszióját. A PRINS gén-specifikus csendesítése csökkentette a hámsejtek életképességét a szérum-éheztetetés során, a kezeletlen sejtek esetében azonban nem okozott változást. Mindez arra utal, hogy a PRINS ncRNS szabályozó funkcióval bír, védő szerepet tölt be a káros hatásoknak kitett sejtek esetében. Az irodalomból ismert, hogy a hosszú ncRNS-ek képesek a fehérjékkel specifikusan kapcsolódni, ily módon szabályozva számos sejtfolymatot. Az esetleges PRINS ncRNS interakciós partnerek azonosítása céljából *in vitro* kötődési vizsgálat került elvégzésre. A kísérlet eredménye szerint a PRINS ncRNS direkt fizikai kapcsolatot képes kialakítani a nucleophosmin (NPM, B23) fehérjével. Ezen interakció kimutatható volt mind HaCaT, mind pedig normál humán epidermális keratinocita (NHEK) lizátumban. Ezt követően kutatócsoportunk a fehérje emelkedett szintű kifejeződését mutatta ki pikkelysömörben.

A NPM egy többfunkciós, a sejtmagvacskában elhelyezkedő foszfoprotein. Ismert, hogy alapvető szerepet tölt be a sejtosztódás pozitív szabályozásában, az mRNS-ek érési folymatában, ezen felül az emlős sejtek DNS-károsodást követő stresszválaszában, ahol

a DNS-repairt és az apoptózis gátlását szabályozza. Számos kísérlet során kimutatták, hogy fibroblasztokban és tumor sejtekben UV-sugárzás hatására az alapvetően a sejtmagvacskában lokalizálódó NPM fehérje a magplazmába vándorol. Az irodalom arról is beszámol, hogy a NPM számos szerepet tölthet be, aktuális funkciója a fehérje sejten belüli elhelyezkedésének függvénye.

3. Inflammaszóma-mediált folyamatok pikkelysömörben

Hosszú ideje ismert, hogy a veleszületett immunrendszer hibás szabályozása fontos szerepet tölt be a pikkelysömör kialakulásában. Az inflammaszómák és gyulladáscaspase-ok a veleszületett immunrendszer részét képezik, kontakt hiperszenzitivitásban és pikkelysömörben is leírták potenciális indukáló-, illetve szabályozó szerepüket a bőrben zajló gyulladáscaspase folyamatokban. Az inflammaszómák a citoplazmában elhelyezkedő multiprotein komplexek, melyek tartalmaznak valamilyen mintázat felismerő receptort, mely képes felismerni a szervezetbe jutó patogéneket és a szervezetben keletkező káros szignálokat egyaránt és a mintázat felismerését követően az inflammaszóma aktiváció természetes immunválaszt indukál. Az inflammaszómák aktiválják a caspase-1 molekulát, mely az IL-1 β és IL-18 gyulladáscaspase citokinek érését és elválasztását szabályozza. Jól ismert, hogy az IL-1 β és IL-18 fontos szerepet tölt be a pikkelysömör pathomechanizmusában, nevezetesen, mediálják az immunsejtek hámba való beszűrődését és stimulálják a hámsejtek osztódását. A gyulladt bőrterületeken észlelt emelkedett IL-1 β citokint legnagyobb részben a keratinocita sejtek választják el.

A citoplazmában található szabad DNS, mint ártó szignál, képes kiváltani a természetes immunválaszt. A DNS-szenzort tartalmazó AIM2 (absence in melanoma 2) inflammaszóma esetében agonistaként szolgál mind a szervezetből-, mind a patogénekből származó citoszolikus dupla szálú DNS (cdsDNS). Egy kutatócsoport nemrégiben emelkedett cdsDNS-ről és AIM2 kifejeződésről számolt be a pikkelysömörös tünetes hámokban, és feltételezték, hogy a kóros mennyiségű cdsDNS és AIM2 hozzájárulhat a gyulladt hám keratinocitáinak emelkedett IL-1 β szekréciójához.

Egy korábbi széles spektrumú génexpressziós vizsgálat során összehasonlítottuk az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermiszt. A vizsgálat során azonosításra került a CARD18 molekula, mely a COP (CARD only protein) fehérjecsalád tagja; egyetlen CARD domainból áll, mely nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat a caspase-

1 CARD domainjével. A CARD18 fehérje, mint „decoy” molekula, képes módosítani az inflammaszóma aktivációt oly módon, hogy direkt hozzákapszolódik a caspase-1 fehérjéhez, meggátolva aktivációját és ezen keresztül az IL-1 β és IL-18 érését és elválasztását. A CARD18-ról leírták, hogy kifejeződése LPS és TNF hatására emelkedik THP-1 monocitákban; valamint, hogy a CARD18 hatékonyan csökkentette az LPS vagy TNF indukált IL-1 β elválasztást. Ezen adatok azt sugallják, hogy a CARD18 egy negatív visszacsatolási útvonal része.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Célul tűztük ki a PRINS ncRNS fizikai és funkcionális jellemzését, valamint a PRINS ncRNS és a nucleophosmin (NPM) fehérje interakció szerepének vizsgálatát

- A PRINS ncRNS szöveti- és sejtszintű eloszlásának vizsgálata különböző humán szövetmintában
- A NPM primer keratinocita sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata kontroll körülmények között és UV-sugárzás hatására
- A PRINS ncRNS génspecifikus csendesítés hatásának vizsgálata a NPM UV-indukált sejten belüli transzlokációjára primer keratinocita sejtekben

2. Célunk volt a CARD18 molekula jellemzése és funkcionális vizsgálata primer keratinocitákban és humán bőrben

- A CARD18 kifejeződésének tanulmányozása kontroll körülmények között és T-sejt limfokin indukció hatására egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben
- A CARD18 szöveti kifejeződésének és eloszlásának monitorozása kezeletlen körülmények között és enyhe sérülést követően (tape stripping = ragasztószalagos hámfosztás) egészséges és pikkelysömörös bőrben
- A CARD18 sejtszintű kifejeződésének vizsgálata spontán differenciálódó humán keratinocitákban
- Az inflammaszóma szignalizációban részt vevő molekulák sejtszintű kifejeződésének vizsgálata dupla szálú DNS kezelés hatására
- A CARD18 génspecifikus csendesítésének hatása a keratinociták természetes immunfolyamataira

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Az organotipikus kultúra elkészítéséhez „shave” (vékonybőr) biopszia vétel történt 5 pikkelysömörös és 5 egészséges önkéntestől
- Immunhisztokémiai festések alapjául 2 egészséges önkéntes és 2 pikkelysömörös egyén mintája szolgált. A „tape stripping” vizsgálatokhoz további 2 egészséges és 2 pikkelysömörös önkéntes mintáját használtuk fel. Festések során kecskében termelt poliklonális anti-CARD18 elsődleges ellenanyagot, biotinilált másodlagos ellenanyagot, extravidin peroxidázt és AEC előhívást alkalmaztunk paraffinba ágyazott metszeteken.
- Humán immortalizált keratinocita sejtvonalat (HPV-KER) és normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket használtunk a keratinociták sejtbiológiai folyamatainak *in vitro* modellezésére.
- T-sejt limfokin kezelés: 0.3 ng/ml IL-3, 1 ng/ml granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) és 1 ng/ml IFN- γ együttes alkalmazása
- Inflammaszóma aktiváció: 5 ng/ml tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) és 5 ng/ml interferon- γ (IFN- γ) előkezelés, majd 1 μ g/ml polydeoxyadenylic acid–polydeoxythymidylic acid dupla szálú homopolimer (poly(dA:dT)) transzfekció
- UV-B kezelés: PBS-ben lévő sejtek sugarazása; 40 mJ/cm², 312 nm
- *In situ* hibridizáció: Digoxigenin-jelölt LNA mRNS próba alkalmazása PRINS és scrambled kontroll szekvenciára. Hat pikkelysömörös és tíz egészséges önkéntes mintán, valamint két szöveti chipen vizsgáltuk a PRINS nem-kódoló RNS kifejeződését
- Valós idejű RT-PCR vizsgálatok: totál RNS izolálást követően cDNS-t szintetizáltunk 1 μ g RNS-ből. A PCR kísérletek során az Univerzális Próba könyvtár (UPL), vagy Cy5-jelölt próbát használtunk. Minden vizsgált gén esetében 18S riboszómális RNS-re normalizáltunk. Relatív mRNS expressziót $\Delta\Delta$ Ct módszerrel számoltunk. Statisztikai analízis során egy oldalú t próbát számoltunk, a különbségeket $P \leq 0.05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.
- Immunfluoreszcens festés: egérben termelt monoklonális anti-NPM (1:500) és kecskében termelt poliklonális anti-CARD18 (1:250) elsődleges ellenanyagokat, valamint anti-egér Alexa Fluor 546 kecske IgG (1:500) és anti-kecske Alexa Fluor 546 számár IgG (1:500) másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk. A sejtmagok festése DAPI-val (1:100) történt. A NPM sejten belüli elhelyezkedésének szemikvantitatív analízise metszetenként 25 mező leszámolásával történt.

- Génspecifikus csendesítés: a PRINS nem-kódoló RNS expressziójának csendesítése vektor-alapú módszerrel történt; HPV-Ker sejtek tranziens transzfektálása során *in vivo* pSilencer™ 2.1-U6 hygro vektort alkalmaztunk. A CARD18 csendesítés siRNA duplex transzfekciós módszerrel történt NHEK sejtekben.
- IL-1 β szekréció mérése: a sejtek felülúszóját vizsgáltuk ELISA módszerrel

EREDMÉNYEK

1. A PRINS ncRNS változatos szöveti és sejtszintű elrendeződést mutat

A PRINS nem-kódoló RNS expressziójának részletes szöveti analízise során ISH technikát alkalmaztunk szöveti chipen, mely 13 különböző humán szövetet tartalmazott egyetlen metszeten. A sejtszintű PRINS eloszlást úgyszintén nyomon követtük NHEK sejtekben. Az eredmények nagyfokú variációt mutattak a különböző mintákban: erős festődés látható a tüdő-, nyirokcsomó-, bél-, méh- és hereszövetben, amíg a kis-, és nagyagyszövetben nem tapasztaltunk festődést. Enyhe mértékű PRINS kifejeződés mutatkozott a vese-, gyomor-, húgyhólyag és emlőszövetben.

A bőrszövetben, azon belül pedig a hámban igen magas PRINS expressziót tapasztaltunk, ahol nem volt eltérés a különböző sejtrétegekben. A PRINS dermális expressziója nem, vagy csak kis mértékben volt detektálható. Az *in vitro* keratinociták festése során erős nukleoláris és perinukleáris festődés igazolódott egy enyhébb homogén citoplazmás jelölődés kíséretében.

További összehasonlító ISH festést végeztünk egészséges (n=10) és pikkelysömörös (n=6) bőrön, és enyhe expresszió emelkedést tapasztaltunk a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes epidermiszben az egészséges epidermiszhez képest.

2. A PRINS ncRNS módosító hatása a NPM UV-indukált sejten belüli elhelyezkedésére

Korábbiakban Szegedi Krisztina azonosította a nucleophosmin (NPM) fehérjét, mint a PRINS interakciós partnerét. A NPM elsősorban a magvacskában helyezkedik el, azonban citotoxikus és genotoxikus anyagok hatására lokalizációs változáson megy keresztül. Fibroblasztokban és tumor sejtekben leírták a NPM UV-sugárzás hatására történő, magvacskából magplazmába való vándorlását.

Immuncitológiai módszert alkalmaztunk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, vajon a HPV-Ker és NHEK sejtekben megfigyelhető-e a NPM intracelluláris transzlokációja UV-sugárzást követően. Eredményeink azt mutatták, hogy már 3 órával a sugárzást követően a NPM fehérje bizonyos mértékben a magvacskából a magplazmába vándorolt; a legnagyobb mennyiségű magplazmás NPM jelölődés 12 és 24 órával volt detektálható az UV-kezelést követően. A NPM intracelluláris transzlokáció tranziensnek mutatkozott, 48 órával az UV besugárzás után a NPM fehérje visszavándorolt a magvacskába.

Annak eldöntésére, hogy a PRINS ncRNS-nek van-e bármilyen hatása a NPM sejten belüli elhelyezkedésére, génspecifikusan csendesítettük a PRINS génexpressziót kezeletlen körülmények közt tenyésztett és UV-sugárzásnak kitett HPV-Ker sejtekben. A PRINS csendesített HPV-Ker sejteket a „scrambled” szekvenciával transzfektált kontroll sejtekkel hasonlítottuk össze. Kezeletlen körülmények között a NPM főként a magvacskában helyezkedett el mind a PRINS csendesített, mind pedig a „scrambled” kontroll sejtekben. Az UV-sugarazott sejtek esetében a kontroll szekvenciával transzfektált sejtekben nagyon hasonló NPM intracelluláris mintázatot tapasztaltunk, mint korábban a nem transzfektált HPV-Ker sejtek esetében. A PRINS csendesített sejtekben csökkent NPM transzlokáció volt megfigyelhető az UV-sugárzás hatására. Az immuncitológiai eredmények validálása szemikvantitatív analízissel történt, mely során minden minta esetében 25 látómezőben számoltuk meg a sejteket és különítettük el az alapján, hogy a NPM hol helyezkedik el sejten belül. A számítások megerősítették azt az eredményt, miszerint a PRINS csendesítése akadályozza a NPM intracelluláris transzlokációját az UV-kezelt sejtekben.

3. A CARD18 génkifejeződésének vizsgálata keratinocitákban és bőrben

Kutatócsoportunk a közelmúltban elvégzett egy cDNS microarray vizsgálatot, mely során 61 gén került azonosításra, többek között a CARD18, mint eltérő mértékben expresszálódó transzkriptek az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes bőrben. A CARD18 egy negatív szabályozó molekula, az inflammaszóma aktivációt gátolja oly módon, hogy közvetlenül hozzákapcsolódik a pro-caspase-1 molekulához és végeredményként az IL-1 β elválasztást csökkenti. A cDNS microarray validálása során valós idejű RT-PCR analízist végeztünk, melynek eredménye szerint a CARD18 relatív nagymértékben fejeződik ki a pikkelysömörös tünetmentes bőrben (kétszeres mennyiség az egészséges mintákhoz képest), de az expresszió nem volt tovább indukálható T-sejt limfokin kezelés hatására. Ezzel szemben az egészséges bőrben tapasztalt relatív alacsony CARD18 kifejeződés 1,65-szeresére növekedett a kezelést követően.

A CARD18 sejtszintű jellemzése során megvizsgáltuk a molekula mRNS és fehérje kifejeződését spontán differenciálódó keratinocitákban. Az *in vitro* génexpressziós vizsgálat során alacsony szintű CARD18 mRNS expressziót tapasztaltunk az intenzívebben osztódó sejtek esetében, mely kifejeződés folyamatosan emelkedett a differenciáció előrehaladtával (43,2-szeres emelkedés a 0-ik napos mintához képest). Immunfluoreszcens módszer alkalmazásával nyomon követtük a CARD18 fehérje

kifejeződését a fent említett sejteken. A 0-4 napos mintákban enyhe, majd a 6-10 napos mintákban fokozatosan erősödő citoplazmás festődés volt detektálható. A 10 napos követési időben végzett vizsgálatok alapján a fehérje szintű eredményeink jól korreláltak az mRNS szintű eredményekkel.

A CARD18 fehérje szintű kifejeződésének összehasonlítását immunhisztokémiai módszer alkalmazásával végeztük egészséges és pikkelysömörös bőrben. A CARD18 minden általunk vizsgált mintában epidermisz specifikus festődést mutatott, azon belül a hámsejtek citoplazmájában volt található. Festéseink alapján elmondható, hogy a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes epidermiszben erősebb CARD18 kifejeződés tapasztaltunk az egészséges epidermiszhez képest. Az epidermisz rétegei között nem láttunk különbséget. Ezen eredmények megerősítik a korábbi organotipikus chip kísérlet validálása során végzett valós idejű RT-PCR eredményeinket.

Az irodalomból ismert, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermisz keratinocitáinak alap osztódási képessége nem különbözik az egészséges bőr keratinocitáitól, mindazonáltal a mechanikai stressz hatására (TS, „tape stripping”) adott proliferatív válasz eltér a két bőrtípusban: a tünetmentes epidermisz keratinocitái szignifikánsan magasabb osztódási készséget mutatnak az egészséges epidermisz hámsejtjeihez képest. Megvizsgáltuk a CARD18 fehérje kifejeződését egészséges és pikkelysömörös bőrben kezeletlen körülmények között, valamint 24 és 48 órával a „tape stripping”-et követően. Minden vizsgált mintában észlelhető volt egy bizonyos mértékű CARD18 expresszió emelkedés, azonban az emelkedés mértéke eltérést mutatott a különböző bőrmintákban. A pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben kisebb mértékű fehérje indukciót detektáltunk, szemben az egészséges és pikkelysömörös tünetes epidermiszsel, ahol erőteljesebb CARD18 indukció követte a mechanikai beavatkozást.

4. A CARD18 szabályozó szerepe a sejtszintű gyulladási folyamatokban

A keratinocita sejtek az immunrendszer részét képezik, képesek érzékelni a káros ingereket és válaszreakcióként immunválaszt kiváltani. A keratinocita immunválasz során gyulladási szignál útvonalak aktiválódnak, ami inflammaszóma komponensek kifejeződését és gyulladási citokinek elválasztását eredményezi.

Annak eldöntésére, vajon mely sejtszintű folyamatokban vesz részt a CARD18, illetve, hogy milyen módon játszik szerepet a CARD18 a pikkelysömör pathomechanizmusában, kísérleteink során a hámsejteket olyan faktorokkal kezeltük, melyek kapcsolatba hozhatók a pikkelysömörrel. A duplaszálú DNS-ről ismert, hogy képes aktiválni az AIM2

inflammaszómát-, és kóros mértékben van jelen a pikkelysömörös gyulladt epidermiszben. A citoszolikus szabad DNS modellezésére szintetikus dupla szálú DNS analóg molekulát (poly(dA:dT)) transzfektáltunk a hámsejtekbe, ami szignifikáns emelkedést eredményezett az IL-1 β elválasztásban (50 pg/ml), valamint az AIM2 (200-szoros emelkedés) és caspase-1 (3-5-szörös emelkedés) expresszióban, de a kezelés a CARD18 kifejeződésére nem volt hatással.

Ezt követően egy robosztusabb gyulladási választ indukáló kísérleti felállást alkalmaztunk, ami IFN- γ és TNF- α előkezelésből és poly(dA:dT) transzfekcióból állt. Az IFN- γ növeli az AIM2 génextpresszióját, a TNF- α pedig a pro-IL-1 β transzkripcióját mediálja. A fent említett citokinekről jól ismert, hogy kórosan magas mennyiségben vannak jelen pikkelysömörben. A kombinált kezelés fokozottabb emelkedést eredményezett mind az IL-1 β elválasztásban (100 pg/ml), mind pedig az AIM2 (250-szeres emelkedés) és caspase-1 (13-szoros emelkedés) expresszióban. Ezen felül a kombinált kezelés a CARD18 kifejeződését is indukálta (6-szoros emelkedés).

Tovább vizsgálva a CARD18 gyulladási folyamatokban betöltött hatását, a kombinált kezelést megelőzően (24 órával az IFN- γ és TNF- α kezelés előtt) génspecifikusan csendesítettük a CARD18 molekulát siRNS módszerrel. A kísérlet során 50%-os hatékonysággal csendesedett a CARD18. A CARD18 csendesítés hatására szignifikánsan csökkent az AIM2 és caspase-1 génextpresszió. A CARD18 csendesítés hatását vizsgálva a keratinocita sejtek IL-1 β szekréciójára azt tapasztaltuk, hogy a gyulladási citokin elválasztása szignifikánsan megnőtt a csendesített sejtekben.

Vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy a CARD18 részt vesz a sejtszintű gyulladási folyamatok finomhangolásában, illetve - hasonlóan a specifikus immunsejtekben tapasztaltakhoz – az inflammaszóma negatív szabályozójaként funkcionál.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során két molekula, a PRINS nem-kódoló RNS és a CARD18 jellemzőit és funkcióját vizsgáltam. Kutatócsoportunk mindkét molekuláról bizonyította korábban, hogy eltérő kifejeződést mutat az egészséges és pikkelysömörös bőrben, vélhetően részt vesznek a hámsejtek stressz válaszában kialakításában és szerepet játszhatnak a pikkelysömör kialakulásában.

A PRINS ncRNS-ről ismert, hogy a pikkelysömörös tünetmentes bőrben jelentősen emelkedett kifejeződést mutat, és számos stressz-faktor (széruméheztetés, mikrobiális ágensek, UV-sugarazás) képes indukálni sejtszintű expresszióját. Munkám során tizenhárom különböző szövetmintában vizsgáltam a PRINS kifejeződését *in situ* hibridizációs technikával. Eredményeink szerint a festési mintázat igen eltérő a különböző szöveti mintákban, ráadásul a bőr esetében szövet-specifikus kifejeződést detektáltunk a PRINS esetében: az epidermiszben erős festődés volt látható szemben a dermisszel, ahol legfeljebb enyhe PRINS expresszió mutatkozott. Ezt követően az egészséges és pikkelysömörös bőrszövetet hasonlítottuk össze, és azt tapasztaltuk, hogy a PRINS kifejeződés enyhe emelkedést mutat a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes epidermiszben az egészséges mintákhoz képest. Kutatócsoportunk egy korábbi analízise során azonosításra került a NPM fehérje, mint a PRINS ncRNS interakciós partnere. Megvizsgáltuk a NPM sejten belüli elhelyezkedésének alakulást UV-sugarazás hatására, és azt tapasztaltuk, hogy UV hatására a fehérje a sejtmagvacskából a magplazmába vándorol. Az UV-kezelt keratinocitákban a PRINS génspecifikus csendesítése akadályozta a NPM transzlokációját, ami arra utal, hogy a PRINS ncRNS nemcsak fizikailag, de funkcionálisan is kötődik a NPM fehérjéhez és szerepet játszik a NPM-mediált celluláris stressz-válaszban.

A CARD18 egy negatív szabályozó molekula, mely közvetlenül kötődik a caspase-1-hez, akadályozza annak aktiválódását, ily módon gátolja az inflammaszóma aktivációját. A keratinocitákban zajló, pikkelysömörrel kapcsolatba hozható molekuláris mechanizmusok vizsgálata során kimutattuk, hogy a CARD18 eltérő kifejeződést és válaszkészséget mutat a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben az egészséges mintákhoz képest. Az egészséges bőrben tapasztalt alacsony CARD18 kifejeződés megemelkedett gyulladásozó stimulusok (T-sejt limfokin kezelés, tape stripping) hatására, ezzel szemben a tünetmentes epidermiszben magasabb alapkifejeződést detektáltunk, amely nem, vagy csak kis mértékben volt indukálható gyulladást indukáló noxák hatására.

A sejtszintű gyulladási folyamatok vizsgálata során a pikkelysömörrel kapcsolatba hozható szignálok megnövelték inflammaszóma komponensek (AIM2, caspase-1) és CARD18 expresszióját, valamint serkentették a sejtek IL-1 β elválasztását. Ezen felül a citoszolikus DNS-kezelt sejtekben a CARD18 génspecifikus csendesítése az IL-1 β szekréció növekedését és csökkent AIM2 és caspase-1 mRNS expressziót eredményezett, utalva a CARD18 negatív szabályozásban betöltött szerepére a sejtszintű gyulladási folyamatokban. A CARD18 eltérő szabályozása az egészséges és pikkelysömörös epidermiszben hozzájárulhat a betegségre való hajlam kialakulásában, továbbá *in vitro* eredményeink arra engednek következtetni, hogy a CARD18 részt vesz a keratinociták természetes immunválaszának finomhangolásában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Kemény Lajos Professzor Úrnak a PhD programban való részvétel lehetőségért, valamint amiért lehetővé tette kísérleteim elvégzését a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laboratóriumában.

Őszinte hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Széll Mártának (Szegedi Tudományegyetem, MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport, Orvosi Genetika Intézet), aki széleskörű tudásával ösztönzött, hasznos tanácsokkal és ötletekkel látott el és végtelen türelemmel támogatott a PhD tanulmányaim során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsannának, Dr. Szabó Kornéliának és Dr. Groma Gergelynek, akik kiváló javaslataikkal és felbecsülhetetlen értékű tanácsaikkal segítették tudományos munkámat.

Hálás vagyok kollégáimnak, Dr. Vas Krisztinának, Dr. Tax Gábornak, Dr. Bebes Attilának, és Danis Juditnak, akik egyrészt bevezettek a kutatási technikák rejtelmeibe, valamint gondoskodó támogatást nyújtottak a Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laborjában töltött éveim során. Hálás köszönettel tartozom minden egyes kollégámnak segítségükért, valamint a lehetőségért, hogy velük dolgozhattam.

Rendkívül hálás vagyok családom minden tagjának, és barátaimnak, akik végtelen szeretetükkel, kitartó támogatásukkal és bátorításukkal szüntelen támaszként álltak mellettem.

Jelen munka az OTKA NK77434, OTKA K83277OTKA K105985, OTKA K111885 és TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-001, TÁMOP-4.2.1/B-10/1-2010-0012, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 pályázatok finanszírozásával valósult meg. Doktori képzésem során Apáczai Csere János doktoranduszi ösztöndíjban részesültem (TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program).