

**A gyulladássos bélbetegségek patogenezisében szerepet  
játszó gének és mikroRNS-ek azonosítása módosított  
mintagyűjtéssel**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Boros Éva**

**Témavezető: Dr. Nagy István  
tudományos munkatárs**

Biológia Doktori Iskola  
MTA SZBK Biokémiai Intézet  
SZTE TTIK

2018.

Szeged

## I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A tápcsatornát érintő krónikus gyulladással járó gyulladós bélbetegségek (Inflammatory Bowel Disease, IBD) multifaktoriális eredetű betegségek, melyek pontos patomechanizmusa mindezülig ismeretlen. Az IBD kialakulásának hátterében számtalan genetikai kockázati tényezőt azonosítottak, azonban az ikertanulmányok viszonylag alacsony konkordanciát állapítottak meg a genetikai faktorok megléte és a betegség manifesztálódása között (Bernstein és Shanahan 2008). A teljes genom asszociációs vizsgálatok talán legfontosabb mondanivalója éppen az, hogy a legtöbb genetikai rizikó faktorként elfogadott mutáció, olyan géneket érint melyek a szervezet és a külső- valamint mikrobiális környezet közötti interakciók fenntartásában és szabályozásában fontosak (pl.: NOD2, FUT2). Az IBD patomechanizmusában tehát vitathatatlan a mikrobiom összetételének és az életmódnak a jelentősége, de ezek a tényezők csak genetikailag fogékony egyéneknél eredményezik a betegség megnyilvánulását (Bernstein és Shanahan 2008).

Az IBD egy élethosszig tartó betegség, melynek tünetei jelentősen csökkentik az életminőséget és növelik a vastagbélrák kialakulásának kockázatát; előfordulása világszerte növekvő tendenciát mutat. A betegség kezelését és a tünetek enyhítését célzó új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez elengedhetetlen a betegség molekuláris hátterének minél pontosabb megértése *in vivo* és *in vitro* rendszerek, valamint IBD-s páciensekből származó minták vizsgálatán keresztül. A fentieket szem előtt tartva, munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A gyulladós bélbetegségek tanulmányozására alkalmas *in vivo* rendszer finomhangolását, melyben az IBD-s betegeknél tapasztalt állapot minél pontosabb modellezése a cél.
2. Az *in vivo* modellből származó mintacsoportok teljes transzkriptóma vizsgálatát, majd az azonosított megváltozott kifejeződésű és az IBD patogenezisében releváns fehérje kódoló mRNS-ek és miRNS prekursorok validálását QPCR módszerrel; valamint fehérje szinten immunfluoreszcens festéssel.
3. A transzkriptóma analízis során azonosított transzkriptumok között funkcionális kapcsolatok vizsgálatát, a gyulladásra jellemző molekuláris mintázatok és jelátviteli útvonalak meghatározását útvonal elemző szoftver segítségével.
4. A patológiás folyamatokban potenciálisan szerepet játszó gének és az azokat szabályozó miRNS-ek azonosítását és vizsgálatát IBD-s betegekben.

## **II. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### ***In vivo* kísérleti modell és mintagyűjtés**

Az IBD-s betegek vastagbelében fennálló gyulladás modellezésére hím Wistar patkányok egyik csoportjának vastagbelében gyulladást indukáltunk trinitrobenzén szulfon sav (TNBS) rektális befecskendezése által, míg a kontroll csoporthoz tartozó állatok semmilyen kezelésben nem részesültek. 72 órával a kezelés után a patkányokat feláldoztuk, a disztális vastagbél szakaszokat eltávolítottuk. A belek jéghideg fiziológiás sóoldattal történt átmosása után, a TNBS kezelt állatok esetében mintát gyűjtöttünk a gyulladt (léziós) és az attól legalább 1 cm távolságra elhelyezkedő nem-gyulladt területekből; míg a kontroll állatok esetében véletlenszerűen történt a mintavétel a vastagbélből. A mintákat TRIzol (Thermo Fischer) reagensbe helyeztük és a további feldolgozásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### **IBD-s betegek**

A humán minták begyűjtése az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB) által kiadott 427-1/2012/EKU (13/PI/12.) ügyiratszámú szakmai-etikai engedélyben foglaltak szerint történt. A humán vastagbél biopsziákat a Pécsi Tudományegyetemen, a Klinikai Központ I.sz. Belgyógyászati Klinikáján tapasztalt gasztroenterológusok gyűjtötték be a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács iránymutatásainak megfelelően és a további feldolgozásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták. A vastagbél minták 15 IBD-s páciensből származnak (átlag  $\pm$  SD életkor  $41 \pm 10$ ; 10 nő, 5 férfi). A minták gyűjtése és csoportosítása a betegség aktuális státusza, vagyis aktív/relapszáló vagy inaktív/remissziós fázis szerint történt. A szövet állapotának megfelelően, az aktív fázisban lévő betegek esetén a gyulladt/léziós és a nem-gyulladt/ép vastagbél régiókból is származnak minták.

### **RNS tisztítás**

A TRIzol reagensben tárolt patkány vastagbél mintákat ULTRA-TURRAX T-18 (IKA) homogenizátor segítségével homogenizáltuk. A patkány vastagbél homogenizátumokból kloroformos kicsapást követően a felső, vizes fázisból RNeasy Plus Mini (Qiagen) kit, míg a humán mintákból Macherey-Nagel NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel GmbH) kit felhasználásával totál RNS-t izoláltunk a gyártói leírásoknak megfelelően. Az RNS-ek mennyiségének és minőségének meghatározása 2 eszközzel történt: a) TapeStation 2200-as berendezéssel RNA Screen Tape-ek és reagensok használatával (mind Agilent) illetve b) Qubit Fluorometer készülékkel a Quant-iT RNA Assay kit (mind Thermo Fisher) használatával.

## **Reverz transzkripció és valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció**

A cDNS szintézist reverz transzkripció során SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher) segítségével hajtottuk végre a gyártó által javasolt protokollt betartva. Az mRNS-ek és pri-miRNS-ek kifejeződését valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (real-time/quantitative polymerase chain reaction, QPCR) mértük StepOne és StepOnePlus PCR Systems (Thermo Fisher) berendezések segítségével. SybrGreen technológia alapú QPCR reakciók esetén SYBR Select Master Mix-et (Thermo Fisher) alkalmaztunk exon-exon határra tervezett specifikus primer párok használatával. TaqMan alapú reakciók esetén TaqMan Fast Advanced Master Mix-et (Thermo Fisher) és TaqMan Gene Expression Assay-eket alkalmaztunk. A génexpresszió változását a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszerrel állapítottuk meg, a 18S rRNS-hez mint normalizáló kontrollhoz viszonyítva.

## **miRNS QPCR**

A miRNS-ek reverz transzkripciója TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit és miRNS specifikus primerekkel (mind Thermo Fisher) történt a gyártói protokoll szerint, majd a miRNS-ek kifejeződését TaqMan Universal PCR Master Mix és TaqMan Small RNA Assays-ekkel mértük StepOne és StepOnePlus PCR Systems (Thermo Fisher) berendezések segítségével. A miRNS expresszió változását  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszerrel számítottuk ki, az U6 vagy RNU48 snRNS-ekhez mint normalizáló kontrollokhoz viszonyítva.

## **Teljes transzkriptóma szekvenálás (RNS szekvenálás; RNS-Seq) és bioinformatikai kiértékelése**

Az RNS-Seq SOLiD Total RNA-Seq Kit (Thermo Fisher) felhasználásával SOLiD 5500 XL System szekvenáló berendezésen történt a gyártói utasítások betartásával, 50 bp szekvenálási kémiát követve. A nyers szekvencia adatok méret szelekciója során az 50 bp-nál rövidebb leolvasásokat elhagytuk. CLC Genomic Workbench (Qiagen) program használatával a génexpressziós értékek kiszámítása érdekében, meghatároztuk minden mintában az egyes annotált génekre térképeződő leolvasások számát. A gének szűrése során csak azokat tartottuk meg, melyekbe legalább 5 leolvasás térképeződött a vizsgált minták legalább 25 %-ában. Az adatok normalizálását követően a legalább kétszeres expressziós különbséget mutató és 0,05-nél alacsonyabb FDR (False Discovery Rate) értékkel rendelkező génexpressziós adatokat tekintettük szignifikáns változásnak. A többdimenziós skálázás használatával ("plotMDS" funkció az edgeR-ben) az egyes minták közötti transzkripciós hasonlóságok és különbségek vizuális megjelenítését hajtottuk végre, majd klaszter analízist követően hőterképen ábrázoltuk a szignifikánsan változó normalizált adatok eloszlását.

## **Az RNS-Seq funkcionális analízise Ingenuity Pathway analysis (IPA) alkalmazással**

A transzkriptóma szekvenálás során meghatározott génexpressziós adathalmazban a molekulák közötti funkcionális kapcsolatok azonosítására az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) webes alkalmazást használtuk (<http://www.ingenuity.com>), melynek *Knowledge Base* nevű adatbázisa a szakirodalomban publikált eredményeken alapul. A bioinformatikai feldolgozás során azonosított, a változás mértékét mutató *log fold change* és a statisztikai relevanciát tükröző *FDR* értékek használatával a „core” analízis során meghatároztuk a jelentősen aktiválódott kanonikus szignalizációs útvonalakat a patkány vastagbél minták mindhárom csoportjának összehasonlítása esetén.

### **Metszetkészítés és immunfluoreszcens festés**

A patkány vastagbelek beágyazása Technovit 7100 protokoll alapján történt. A blokkokból Reichert Jung 1140 Autocut mikrotómmal 7 µm-es metszeteket készítettünk. A patkány vastagbél metszetek 200 µl 0,1% TritonX-et (Sigma) és 5% szérumot (Fetal bovine serum (FBS); Thermo Fisher) tartalmazó PBS-el (egységesen PBT) blokkoltuk 20 percig, szobahőmérsékleten. A blokkolást követően a mintákat egér anti-Axl (1:100; Santa Cruz) ellenanyagot tartalmazó PBT oldattal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Ezután a metszeteket háromszor 5 percig PBT-vel mostuk, majd 90 percig sötétben inkubáltuk FITC-el konjugált anti-egér IgG (1:250; Sigma) másodlagos ellenanyaggal. Háromszor 5 perces PBT-s mosás után, a metszeteket 5 percig inkubáltuk DAPI-t (1:10000; 4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó PBT-vel. 5 perces PBT-s mosást követően a metszeteket Citifluor-ral (Citifluor) fedtük, amely megakadályozza a fluoreszcens jel kioltását. Az így elkészített mintákat Zeiss Axio Observer Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal elemeztük.

## **III. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

1. Az IBD tanulmányozására általánosan elfogadott *in vivo* TNBS indukált patkány vastagbélgyulladás modellben, a TNBS a nyálkahártya integritását megbontva szórványosan elhelyezkedő léziókat hoz létre a vastagbél mentén, melyeket makroszkópicusan ép szöveti régiók váltanak. Ez a tagoltság jellemző az IBD-s betegek tápcsatornájára is, ahol a fekélyes részeket fenotípusosan normális szövetszakaszok tagolják. A patkány modell használatakor alkalmazott hagyományos mintavétel a vastagbélből hosszanti irányba történik, ennek eredményeképpen a különböző állatokból -

melyekben eltérő mértékben és pozícióban található gyulladt és nem-gyulladt szövetrégiók – származó mintákban eltérő arányban lesznek jelen a léziós és ép részek. Ebből adódóan a gyulladt/nem-gyulladt részek közötti feltételezett génexpressziós különbségek miatt a valódi változások elmosódhatnak, kiegyenlítődhetnek, tehát a gyulladt vagy a nem-gyulladt területekre jellemző valós génexpressziós mintázatok egyikét sem tükrözik majd az eredmények. A TNBS indukált patkány vastagbélgyulladás modell használatakor hagyományosan alkalmazott hosszanti irányba történő mintavételt követően a biológiai párhuzamosokból származó mintákban eltérő arányban lesznek jelen a léziós és ép részek. Az ebből adódó bizonytalanságok kiküszöbölése érdekében módosítottuk a mintavétel módját a TNBS által kiváltott vastagbélgyulladás patkány modelljének alkalmazásakor: a TNBS kezelt állatok makroszkópiusan jól megkülönböztethető gyulladt és nem-gyulladt szövetrégióiból is izoláltunk mintákat, míg a kontroll patkányok vastagbeleiből véletlenszerűen gyűjtöttük be a mintákat. A mintacsoportok, azaz a kontroll, TNBS kezelt nem-gyulladt és TNBS kezelt gyulladt minták közötti globális génexpressziós különbségek feltérképezésére RNS-Seq alkalmazásával teljes transzkriptóma vizsgálatot végeztünk. A transzkriptóma analízis bioinformatikai feldolgozása után létrejövő adathalmaz teljes körű értelmezése érdekében többdimenziós skálázással (MDS) csoportosítottuk az egyéni mintákat a köztük lévő transzkripcionális különbségek és hasonlóságok alapján. Az MDS egyértelműen igazolta azon feltevésünket miszerint a TNBS kezelt nem-gyulladt és gyulladt vastagbél régiók között jelentős a génexpressziós különbség. A korábban csak makroszkópikus megfigyelések alapján besorolt izolátumok génexpressziós mintázatuk szintjén is egy-egy csoportba klasztereződtek, továbbá a három csoport egymástól teljesen elkülönült. A szignifikánsan változó transzkriptek hő térképen való ábrázolása is alátámasztotta az MDS során megfigyelt eredményeket: a különböző csoportok közötti génexpressziós különbséget, illetve az egy csoportba sorolt minták közötti globális transzkripció hasonlóságot. Mivel két független módszerrel is arra a következtetésre jutottunk, hogy a nem-gyulladt és gyulladt szakaszok transzkripcionális szinten teljesen különbözőek, ezért a módosított mintagyűjtési eljárást a TNBS által kiváltott vastagbélgyulladás vizsgálata során indokoltnak és relevánsnak találjuk a hagyományos módszerrel szemben.

2. Eredményeink számszerűsítése érdekében összehasonlítottuk az egyes mintákat/mintacsoportokat. Az összes azonosított transzkriptum közül megközelítőleg

3800 változott szignifikánsan valamely két mintacsoport között. A szignifikánsan változó expressziójú gének közötti lehetséges funkcionális kapcsolatok egyszerűbb értelmezése céljából *in silico* útvonal elemzést végeztünk. Megállapítottuk, hogy a legszignifikánsabban változó kanonikus útvonalak a gyulladt területeken az immunsejtek közötti kommunikációval, az immunsejtek toborzásával, a veszély jelek felismerésével, a gyulladáshoz való válasz szabályozásával, valamint a szövetek védelmével és regenerálásával kapcsolatosak. Jelentősen megváltozott a leukociták, köztük az agranulociták és granulociták véráramból a gyulladt szöveti állományba való vándorlását segítő molekulákat magába foglaló szignalizációs útvonalak aktivitása valamint számos a gyulladásban kulcsfontosságú szignalizációs útvonalat összesítő NF- $\kappa$ B jelátvitel.

3. A veleszületett immunválasz a mikrobiális sejtalkotók vagy saját sérült sejtekből származó molekulák mintázatfelismerő receptorok (PRR) általi felismerését követően indukálódik (Akira, Uematsu és mtsai 2006). A PRR jelátviteli útvonal aktiválódását, továbbá a mintázatfelismerő TLR és NLR receptorok szignifikánsan megváltozott kifejeződését figyeltük meg a TNBS kezelt patkány vastagbél gyulladt szakaszaiban. Az elsőként azonosított IBD-re hajlamosító mutációt egy NLR receptorban, a NOD2-ben azonosították, mely a bakteriális eredetű molekulák felismerését követően gyulladáskeltő gének kifejeződését idézi elő (Hugot, Chamaillard és mtsai 2001, Ogura, Bonen és mtsai 2001, Elinav, Strowig és mtsai 2011). A transzkriptóma analízis során a Nod2 megemelkedett expresszióját figyeltük meg a TNBS kezelt patkány vastagbél gyulladt területein, míg a nem-gyulladt mintákban nem változott a kifejeződése. RNS-Seq eredményeinket QPCR módszerrel is validáltuk, melyek a Nod2 esetében és a dolgozatban bemutatott további 37 fehérjekódoló gén esetében is teljes mértékig korreláltak. A gyulladáskeltő citokinek érését segítő inflammaszóma alkotó NLR receptorok közül az NLRP3 és szubsztrátjai az IL1 $\beta$  és IL33 szintje szignifikánsan megemelkedett a gyulladt területeken; ellenben a gyulladásgátló hatású NLRP6 és az azt szabályozó PPAR $\gamma$  expressziója szignifikánsan csökkent. A mintázatfelismerő receptorok génexpressziós mintázatára jellemző a gyulladáskeltő gének fokozott, és a gyulladásgátló molekulák csökkent kifejeződése a TNBS kezelt patkányok gyulladt szövetrégióiban.

A PRR-ek ligand kötése kemotaktikus molekulák, citokinek és kemokinek expresszióját indukálja, melyek az immunsejtek szöveti infiltrációját idézik elő (Feghali és Wright 1997). A gyulladás markereiként is ismert Tnf $\alpha$ , Il1 $\beta$ , Il6, Il10, Ccl3 és Cxcl1 kifejeződése

szignifikánsan nőtt a gyulladt szövetekben, azonban a TNBS kezelt nem-gyulladt területeken nem változott az expressziójuk. Az *in vivo* modellben azonosított változások relevanciájának igazolására IBD-s betegek vastagbeleinek gyulladt és nem-gyulladt részeiről begyűjtött szövetmintákat, inaktív betegekből származó mintákhoz hasonlítottunk. Ahogy a rágszáló rendszerben is láthattuk, a gyulladáskeltő citokinek kifejeződése szignifikánsan megemelkedett az IBD-s betegek gyulladt mintáiban, mind az inaktív, mind a relapszáló betegek nem-gyulladt mintáihoz viszonyítva, ami egyértelmű bizonyítéka az aktív gyulladás jelenlétének. Az IBD-s páciensek tüneteinek enyhítésére kifejlesztett terápiás módszerek főként a fent említett pro-inflammatórikus citokinek, leginkább a TNF $\alpha$  gátlásán alapulnak (Silva, Ortigosa és mtsai 2010). Ez a módszer azonban nem minden betegnél eredményez javulást, és csak a gyulladás tüneti kezelésére alkalmas, de nem jelent tartós gyógymodot az IBD-vel szemben.

4. Miután az IBD patomechanizmusával már korábban kapcsolatba hozott gének expressziós mintázatát megvizsgáltuk a TNBS indukált patkány vastagbélgyulladás rendszerben, valamint IBD-s páciensekből származó szövetminták segítségével is igazoltuk a modell hitelességét, a betegség kezelésére alkalmas új célmolekulák azonosítására törekedtünk. A gyulladásos válasz során a sérült sejtekből felszabaduló fehérjék jelátviteli kaszkádot indítanak be. Annak érdekében, hogy ez az öngerjesztő folyamat ne váljon irányíthatatlanná és a saját szervekre, szövetekre károsná, szükségesek a gyulladást gátló visszacsatolások. A TLR-ek által kiváltott gyulladás negatív szabályozóiként ismert TAM receptorok (Rothlin, Ghosh és mtsai 2007) és ligandjaik különböző irányú génexpressziós változását figyeltük meg a TNBS indukált patkány IBD modellben: amíg az Axl kifejeződése szignifikánsan megemelkedett mRNS és fehérje szinten is a gyulladt bélszakaszokban, addig a Mertk és Tyro3 szintje csökkent az azonos szövetrégiókban. Az IBD-s betegek vastagbeleiben csak az AXL kifejeződése változott szignifikánsan, ahol az aktív-gyulladt mintákban emelkedett expresszióját detektáltuk. A pleiotróp hatású AXL megemelkedett kifejeződésének több funkciója is lehet a gyulladt területeken: negatív regulátorként és a fagocitózis elősegítése által (Lemke és Rothlin 2008) a szöveti homeosztázis helyreállítását támogathatja; másrészt, mint az epiteliális – mezenhimális tranzíció inducere (Asiedu, Beauchamp-Perez és mtsai 2014) az IBD-s betegeknél gyakran kialakuló vastagbélrák kockázatát növelheti.



5. A transzkriptóma vizsgálat során a legjelentősebb expressziós változások a gyulladt szöveteket jellemezték, míg a nem-gyulladt mintákban jóval kevesebb szignifikánsan változó transzkriptet azonosítottunk. Érdekes módon, ha a nyálkahártya védelméért felelős mucinok és azok glikolizációjában szerepet játszó fehérjéket kódoló gének expresszióját követtük nyomon, akkor szignifikáns eltérést tapasztaltunk a TNBS kezelt nem-gyulladt patkány vastagbelekben. Az epitél sejtek felszínét borító kettős nyákréteg kialakításáért felelős Muc2 expressziója szignifikánsan emelkedett a TNBS kezelt patkány vastagbél ép területein. Korábbi tanulmányok említik a MUC2 jelentőségét IBD-s betegeknel - melynek kifejeződésben nem találtak jelentős változást - azonban vizsgálataik során nem különböztették meg a relapszáló betegek gyulladt és nem-gyulladt területeit (Larsson, Karlsson és mtsai 2011). Az általunk feldolgozott, IBD-s páciensekből származó biopsziák vizsgálatakor a MUC2 kifejeződése az aktív stádiumban lévő betegek gyulladt és nem-gyulladt vastagbél területein eltérő volt, a patkány vastagbélhez hasonlóan, a makroszkópiusan normális területeken magasabb, mint a fekélyes részekben. Feltételezhető, hogy az emberi és a patkány minták esetén is a gyulladt területek mellett elhelyezkedő, még ép területeken megfigyelt magasabb MUC2 expresszió fokozott védelmet jelenthet a további szöveti károsodással szemben.

A tápcsatornát bélelő epitélium védelmében fontos szerepe van a glikokalix szintézisét végző glikoziltranszferázoknak, köztük fukoziltranszferázoknak is (Pu és Yu 2014), melyek jelentős expresszió változását azonosítottuk a nem-gyulladt és gyulladt patkány vastagbél területeken is. A Muc2 és Dmbt1 mRNS-ekhez hasonlóan szignifikánsan nőtt a kifejeződése az A4gnt, a B4galnt2, a Fut4 és a Fut9 géneknek a TNBS kezelt nem-gyulladt szövetrégiókban; velük ellentétben a Fut1 és Fut2 kifejeződése szignifikánsan csökkent a gyulladt területeken. A glikolizációért felelős fehérjéket kódoló gének expressziós mintázatának TNBS kezelést követő változása arra utal, hogy a nem-gyulladt területeken a szervezet próbálja fenntartani a szöveti homeosztázist és megóvni a nyálkahártyát az esetleges sérülésektől.

6. A TNBS indukált vastagbélgyulladás *in vivo* patkány modelljének transzkriptóma vizsgálata során számos olyan molekulát is azonosítottunk, melyek szerepe nemcsak a gyulladás szabályozásában, hanem a daganatos elváltozások kialakulásában is ismert. Ezek vizsgálatát azért tartottuk fontosnak, mert az IBD-s betegekkel jellemző elhúzódó, krónikus gyulladás jelentősen növeli a vastagbélrák kialakulásának kockázatát (Saleh és Trinchieri

2011), melynek kifejlődésében a metasztázis képződést elősegítő epiteliális-mezenhimális tranzíció (EMT) kulcsfontosságú folyamat (Lamouille, Xu és mtsai 2014). Az EMT molekuláris komponensei szignifikánsan aktiválódtak a TNBS által kiváltott vastagbélgyulladás és az IBD-s páciensek vastagbelében egyaránt. A mezenhimális fenotípus kialakításáért is felelős növekedési faktorok (FGF2, FGF7, EGR1) és szignáltranszducer molekulák (NOTCH1/2, JAK2, HIF1 $\alpha$ ) kifejeződése szignifikánsan megemelkedett a TNBS kezelt patkányok és az IBD-s betegek gyulladt vastagbélrégióiban; akárcsak az EMT-t indukáló transzkripciós faktorok (ZEB2, SNAI1) és az extracelluláris mátrix átalakításban szerepet játszó MMP9, valamint a VIM és LOX expressziója. Ellenben az epiteliális marker, CDH1 kifejeződése szignifikánsan csökkent a gyulladt területeken.

7. Az RNS-Seq során azonosított transzkriptek között a mRNS-ek mellett pri-miRNS-eket is detektáltunk, melyek kettős szálú RNS szakaszai magukban hordozzák a későbbi érett miRNS-eket. A miRNS-ek bonyolult, több szinten szabályozott biogenezise miatt, a változó expressziójú pri-miRNS-ek érett miRNS származékainak kifejeződését QPCR-rel követtük nyomon. A szignifikánsan változó kifejeződésű pri-miRNS-ek többsége csökkent a gyulladt szövetekben, és ezeket a változásokat az érett miRNS-ek mennyiségében is azonosítottuk. Jelentősen csökkent a kifejeződése többek között a MIR8 és MIR192 miRNS géncsalád tagjainak (miR-200a/b/c, -141, -429; miR-192, -215), a közös klaszterben elhelyezkedő miR-143/-145-nek, valamint miR-375-nek. Közös jellemzőjük ezeknek a miRNS-eknek, hogy mindegyikük az EMT-t indukáló gén/ek inhibitora (Zaravinos 2015). A miR-200b és ZEB2 között negatív visszacsatolás figyelhető meg, azaz gátolják egymás kifejeződését (Bracken, Gregory és mtsai 2008). Továbbá a ZEB2 inhibitora a miR-192 is, melyet az EMT-t aktiváló TWIST1 transzkripciós represszor szabályoz (Wu, Rupaimoole és mtsai 2016). A miR-192 csökkent kifejeződését az IBD-s betegek gyulladt vastagbélrégióiban is megfigyelhettük, ahol további targetjei, a már bemutatott EGR1 és FGF2 kifejeződése fordítottan változott, azaz szignifikánsan emelkedett. Szintén fontos EMT indukáló transzkripciós faktor, a SNAI1 pedig a miR-375 kifejeződésének gátlásával járul hozzá targetje (Ding, Xu és mtsai 2010, Xu, Jin és mtsai 2014) a JAK2 expressziójának növekedéséhez. Ezekon felül olyan érett miRNS-ek mennyiségi változását is megmértük, amelyek prekursorait az RNS-Seq során nem azonosítottuk, de ismert, hogy az EMT kialakításában szerepet játszó gének inhibitorai.

Ilyen például a miR-199a, ami nemcsak a SNAI1 (Suzuki, Mizutani és mtsai 2014), hanem többek között az AXL gátlásában is részt vesz (Mudduluru, Ceppi és mtsai 2011). Inverz expressziós mintázatukat nemcsak a TNBS kezelt patkány vastagbél gyulladt területin, hanem az IBD-s páciensek gyulladt szövetmintáiban is megfigyeltük. Az EMT poszttranszkripcionális szabályozása szempontjából fontos miR-30 és miR-107 expressziója is szignifikánsan csökkent a gyulladt szövetrégiókban, melyek a VIM (Liu, Chen és mtsai 2014) és HIF1 $\alpha$  (Yamakuchi, Lotterman és mtsai 2010) inhibitorai. Az általunk vizsgált összes EMT-t indukáló miRNS-mRNS target pár expressziós mintázatára igaz, hogy ahol a gátló miRNS mennyisége lecsökken, ott a célmolekula kifejeződése megemelkedik.

8. Az *in vivo* vastagbélgyulladás modell teljes transzkriptóma vizsgálata során azonosított pri-miRNS-ek a gyulladás féken tartásában is jelentős szereppel bírnak. A gyulladást okozó citokinek és kemokinek inhibitoraként ismert miR-223 kifejeződése mind a patkány mind a humán vastagbélből származó mintákban pri- és érett miRNS szinten is megemelkedetten expresszálódott a gyulladt szövetekben. Az immunválasz során a vastagbélbe infiltráló immunsejtek által expresszált miR-223 a CXCL2 és CCL3 kemotaktikus fehérjéket kódoló gének (Johnnidis, Harris és mtsai 2008) és a gyulladást okozó TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 és NLRP3 (Poon, Palanisamy és mtsai 2017) gátlásán keresztül részt vesz a szöveti homeosztázis helyreállításában és a gyulladás féken tartásában.

Az IBD-s betegek tüneteinek enyhítésére gyakori terápiás célpont a TNF $\alpha$ , mely inaktív formában tárolódik a sejtekben mindaddig, amíg egy mátrix metalloproteináz, például az MMP13 enzim hatás révén ki nem alakítja belőle a funkcióképes alakot (Vandenbroucke, Dejonckheere és mtsai 2013). A TNBS kezelt gyulladt patkány vastagbél mintákban és az aktív stádiumban lévő IBD-s betegek gyulladt szöveteiben az emelkedett TNF $\alpha$  expresszió, szignifikánsan megnövekedett MMP13 kifejeződéssel társult. Az MMP13 poszttranszkripcionális szabályozásában résztvevő miR-27b (Akhtar, Rasheed és mtsai 2010) kifejeződése ellenben szignifikánsan csökkent a patkány és IBD-s betegek gyulladt vastagbéljében is. További vizsgálatokat követően a miR-27b potenciális terápiás célmolekulává válhat, amennyiben ektopikus túltermelésével az MMP13 mennyiségének és így a TNF $\alpha$  hatásának csökkenését idézné elő. Az aktív TNF $\alpha$  szintjének redukálódása pedig a gyulladás visszaszorulását eredményezhetné a szövetekben.

Az IBD-s betegek életében váltakozó remissziós, azaz inaktív és relapszáló, vagyis aktív periódusok során a léziós és ép szövetrégiók elhelyezkedése váltakozó a tápcsatorna mentén. Ez a váltakozás, a gyulladást és az EMT-t indukáló gének és azokat szabályozó miRNS-ek mennyiségének fluktuációját is jelenti a bélben. A hosszan elhúzódó gyulladás felboríthatja a kényes egyensúlyt ebben a bonyolult szabályozott rendszerben, ami az IBD-s betegekre jellemző magasabb vastagbélrák incidencia egyik tényezője is lehet. Másrészt a vérben keringő exoszómákban szállított vagy a vér alakos elemei által expresszált miRNS-ek (Poon, Palanisamy és mtsai 2017) a tápcsatorna gyulladt és nem-gyulladt területein található sejtekben egyaránt kifejthetik gátló hatásukat, ami késleltetheti/megakadályozhatja a szöveti homeosztázis helyreállítását.

A vastagbél szöveti felépítésében számos sejtalkotó részt vesz, melyek mindegyike más-más módon járul hozzá a homeosztázis fenntartásához és szükség esetén az immunválasz szabályozásához. Kísérleteink során a patkány és IBD-s betegek vastagbeléből származó szövetminták gyulladt és nem-gyulladt területeit vizsgálva az adott szöveti régióra aktuálisan jellemző heterogén sejtpopulációban bekövetkező szignifikáns génexpressziós eltéréseket azonosítottuk. További kísérleteink során az egysejt izolálási technikák fejlődésének köszönhetően a sejttípusok elkülönített vizsgálatával szeretnénk az eddig feltárt transzkripciós mintázatot pontosítani, mellyel lehetőségünk nyílik a gyulladással járó bélbetegségek molekuláris hátterének sokkal nagyobb felbontású ezáltal precízebb tanulmányozására.

A transzkriptóma analízis során detektált pri-miRNS-ek globális expresszió csökkenése a gyulladt vastagbélterületeken egy közös szabályozó mechanizmus meglétét feltételezi. Ezt a megfigyelést az érett miRNS-ek szintjén, miRNS-Seq módszer alkalmazásával szeretnénk a továbbiakban vizsgálni. Abban az esetben, ha a fiziológiás körülmények között konstitutívan expresszáldó miRNS-ek folyamatos negatív szabályozás alatt tartják gyulladáskeltő targetjeiket, akkor a miRNS-ek kifejeződésének gyulladás során bekövetkező teljes körű csökkenésével a célmolekulák egyszerre szabadulhatnak fel a gátlás alól és erőteljes gyulladással járó választ indukálhatnak. A feltételezett folyamat átfogó hatását erősítheti az a tény is, hogy egy miRNS számtalan mRNS szabályozásában is részt vehet, ami exponenciálisan növeli az érintett molekulák körét. Jövőbeli vizsgálataink tárgyát képezi a sejttípus specifikus transzkriptóma vizsgálat mellett ennek a lehetséges szabályozó mechanizmusnak a felderítése is.

## IV. PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10059533

A FOKOZATSZERZÉSI ELJÁRÁS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Éva Boros, Marianna Csatari, Csaba Varga, Balázs Balint, István Nagy: **Specific Gene- and MicroRNA-Expression Pattern Contributes to the Epithelial to Mesenchymal Transition in a Rat Model of Experimental Colitis**. MEDIATORS OF INFLAMMATION Paper 5257378. 9 p. (2017)  
(IF: 3.232)

Tóth EJ, Boros É, Hoffmann A, Szebenyi C, Homa M, Nagy G, Vágvolgyi C, Nagy I, Papp T: **Interaction of THP-1 monocytes with conidia and hyphae of different *Curvularia* strains**. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 8: Paper 1369. 9 p. (2017)  
(IF: 6.429)

Éva Boros, Zoltán Kellermayer, Péter Balogh, Patrícia Sarlós, Áron Vincze, Csaba Varga and István Nagy: **Elevated expression of AXL may contribute to the epithelial-to-mesenchymal transition in Inflammatory Bowel Disease patients**. MEDIATORS OF INFLAMMATION  
Elbírálás alatt

Összesített IF: 9.661

A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ SZAKMAI ANYAGOK

Boros E: **Transcriptome profiling of TNBS induced rat model of IBD**. ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 60:(1) p. 81. (2016)

Boros E: **The expression profile of TAM and NLR receptors upon physical activity in TNBS induced colitis in rats**. 21th International Congress on Sport Science, Budapest, 2014. április 10-12., (2014)

Boros E, Strifler G, Voros A, Szasz A, Kemeny L, Varga C, Tubak V, Nagy I: **The Expression Profile of TAM and NLR Receptors upon Immune Challenge and Chronic Inflammation** IMMUNOLÓGIAI SZEMLE V:(3) p. 19. (2013) Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlés. Pécs, Magyarország: 2013.10.16 -2013.10.18.

EGYÉB SZAKMAI ANYAGOK

Kellermayer Z, Vojkovic D, Kajtar B, Berta G, Nagy I, Boros E, Balint B, Schippers A, Wagner N, Balogh P: **Mouse colonic stromal cells induce a protective ILC3 phenotype in the absence of Nkx2-3 transcription factor**. ICMI 2017: 18th International Congress of Mucosal Immunology. Konferencia helye, ideje: Washington, Amerikai Egyesült Államok, 2017.07.19-2017.07.22.p. 113.

Tóth EJ, Boros É, Hoffmann A, Vágvolgyi Cs, Nagy I, Papp T: **Activation of monocytes and their production of cell signaling molecules induced by *Curvularia* strains**. 18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts.

Konferencia helye, ideje: Újvidék, Szerbia, 2016.06.02-2016.06.04. Újvidék: University of Novi Sad, 2016. p. 36. (ISBN:978-86-6253-059-2)

Toth EJ, Boros E, Hoffmann A, Vagvolgyi C, Nagy I, Papp T: **Ativation of cytokine, chemokine and chemotactic genes in THP1 cells in response to conidia and hyphase of *Curvularia* strains.** 13th European Conference on Fungal Genetics (ECFG13), Bacterial Fungal Interactions Workshop,,: Abstract Book. 620 p.

Toth EJ, Boros E, Hoffmann A, Nagy I, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, Alharbi NF, Vagvolgyi C, Papp T: **Interaction of *Curvularia* Strains with Human THP1 Cells.** ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 62:(Suppl.) p. 231. (2015); 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Magyarország: 2015.06.08 -2015.06.10.

Toth EJ, Hoffmann A, Boros E, Nagy I, Papp T: **Response of human macrophages for infections with *Culvularia* strains.** 17th Danube-Kris-Mures-Tisza (DKMT) Euroregional Conference on Enironment and Health. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2015.06.05-2015.06.06. Szeged: University of Szeged, Faculty of Medicine, p. 72.

## V. NYILATKOZATOK

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy Boros Éva Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel.

Éva Boros, Marianna Csatari, Csaba Varga, Balázs Balint, István Nagy

**Specific Gene- and MicroRNA-Expression Pattern Contributes to the Epithelial to Mesenchymal Transition in a Rat Model of Experimental Colitis**

MEDIATORS OF INFLAMMATION, 5257378. 9 p. (2017)

Szeged, 2018. április 27.

.....

Dr. Nagy István

Tudományos munkatárs

MTA SZBK

Tóth EJ, Boros É, Hoffmann A, Szébenyi C, Homa M, Nagy G, Vágvolgyi C, Nagy I, Papp T

**Interaction of THP-1 monocytes with conidia and hyphae of different *Curvularia* strains**

FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 8: 1369. 9 p. (2017)

Szeged, 2018. április 27.

.....

Dr. Papp Tamás

Egyetemi docens

SZTE TTIK, Mikrobiológiai Tanszék