

ZÁRÓBESZÁMOLÓ

A pályázat során végzett kutatás alapvetően négy, a célkitűzésekben megszabott területre tagolható. Célkitűzéseink a következők voltak:

- I. A D típusú (D1, D2, D3) ciklinek szerepének vizsgálata a keratinocita proliferáció és differenciálódás szabályozásában
- II. A D típusú ciklinek és $\alpha 5$ integrin általi szabályozásának, valamint az $\alpha 5$ integrin KGF általi szabályozásának vizsgálata keratinocitákban
- III. A pikkelysömörös tünetmentes keratinociták és a normál bőrből származó sejtek proliferációjának és differenciálódásának összehasonlítása fiziológiás és stressz körülmények között
- IV. Pikkelysömörös tünetmentes és normál keratinociták génexpresszióban mutakozó különbségének vizsgálata rövid idejű (72 óras) T sejt limfokin környezetben (γ -IFN, GM-CSF és IL-3) való tenyésztést követően

A D típusú ciklinekkel kapcsolatban tervezett vizsgálataink nagy részét befejeztük, az eredményeket tartalmazza egy elfogadott és egy benyújtás előtt álló dolgozat. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, vajon a D típusú ciklinek gyorsan osztódó immortalizált HaCaT keratinocitákban a keratinocita különböző sejtciklusaiban (G0-G1/S illetve G1/S tranzit) különbözőképpen fejeződnek-e ki. Eredményeink szerint a HaCaT keratinociták a D típusú ciklinek mindhárom fajtáját (D1, D2, D3) kifejezik. A D1 ciklin megjelenése jellemző a sejtek G0-G1/S fázisára, míg a sejtnyugalmi fázisból kikerült sejtek ismételt gyors osztódásakor (G1/S tranzit) a D2 és D3 ciklinek megjelenése dominál. Korábbi vizsgálatainkból ismert, hogy, az $\alpha 5$ integrin mRNS megelőzi, az $\alpha 5$ protein megjelenése pedig végig jellemzi a HaCaT keratinocitákban az intenzív sejtosztódást. Eredményeink szerint a sejtnyugalmi fázis elhagyását megelőzően az $\alpha 5$ integrin funkciójának gátlása a D1 ciklin megjelenését visszaszorítja a sejtekben, arra utalva, hogy az $\alpha 5$ integrin a sejtproliferáció szabályozásában ezen a ponton részt vesz. A pikkelysömör egy krónikus, gyulladásos bőrbetegség, mely az egyébként sejtnyugalmi fázisban levő bazális keratinociták fokozott proliferációjával jár, a bazális keratinociták populációja tartalmazza a keratinocita őssejteket is. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a D1, D2 és D3 ciklinek mRNS szinten és fehérje szinten is eltérő kifejeződést mutatnak pikkelysömörben a normál bőrhöz viszonyítva. Ezen eredményeink a pikkelysömörös hámsejtekben zajló normálistól eltérő proliferációs szabályozásra utalnak, mely a betegség kialakulásában lényeges elem lehet. Ezeket az eredményeinket publikáltuk.

A D típusú ciklinek sejtproliferációban és differenciációban játszott szerepének vizsgálatát kiterjesztettük a melanociták vizsgálatára, mivel laboratóriumunkban saját fejlesztés kapcsán egészséges felnőtt epidermális melanociták kémiai mitogénektől mentes Mel-mix tápfolyadékban való tenyésztése egy olyan sejt kultúra modell, melyben a melanociták dedifferenciálódnak és *in vitro* differenciálhatókká válnak. A sejtek ilyen körülmények között gyorsan proliferálnak, alakjuk bipolárisá válik, melanin-tartalmuk, valamint a tyrozinázhoz kapcsolt protein-1 (TRP-1) és a c-Kit differenciációs antigének kifejeződése csökken, idősebb kultúrákban eltűnik. Ezek a tulajdonságok arra engednek következtetni, hogy a melanociták a kémiai mitogénektől mentes környezetben „dedifferenciálódnak”. Ezt az *in vitro* rendszert használtuk a D-típusú ciklinek differenciációfüggő kifejeződésének vizsgálatához melanocitákban. Összehasonlítottuk a D-típusú ciklinek kifejeződését érett (TRP-1+c-Kit+) és dedifferenciálódott (TRP-1-c-Kit-) pigmentsejtekben. A melanocitákkal kapcsolatos vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a kémiai mitogénektől

mentes sejt környezetben tenyésztett melanociták kifejezik mindhárom általunk vizsgált D ciklin izotípust mRNA szinten. A D típusú ciklinek kifejeződése nagyon hasonló melanocitákban a keratinocitákéhoz. Ha a sejt nyugalmi fázisba szorított sejteket osztódni engedjük, a D1 típusú ciklin kifejeződés dominál a sejtekben, a gyors egymásutánban osztódó melanocitákban a hámsejtekhez hasonlóan a D2 és D3 típusú ciklinek kifejeződése a jellemző. Megvizsgáltuk a D-ciklinek kifejeződését melanómában és benignus naevusokban is, ahol csak a D1 illetve D3 ciklinek fejeződtek ki. Melanómában a D3 ciklin kifejeződése erősebb volt a benignus naevusokhoz képest. A D típusú ciklinek szerepének jobb megértését célzó funkcionális vizsgálataink folyamatban vannak melanocitákban. A melanocitákkal kapcsolatos vizsgálatok egy részét tartalmazó dolgozat benyújtás előtt áll.

A következőkben géncsendesítéssel vizsgáltuk a D típusú ciklinek szerepét a keratinocita proliferáció szabályozásában HaCaT keratinocitákban. A csendesítés után detektáltuk a D ciklinek mRNA szintű kifejeződését, a sejtek morfológiáját és proliferációját. A csendesítéshez különböző transzfekciós technikákat alkalmaztunk, igen eredményes közel 80-90%-os transzfektálást sikerült nukleofekcióval elérnünk a sejtekben. Valós idejű RT-PCR-rel igazoltuk a D ciklinek sikeres csendesítését. A D1, D2 és D3 siRNA transzfekciók külön-külön nem voltak hatással a sejtek morfológiájára és proliferációjára, ugyanakkor az egyidejű kétszeres és háromszoros csendesítés nagy, többmagvú sejtek megjelenését eredményezte. A D típusú ciklinek kombinált csendesítése minimális S fázis blokkhoz, mérsékelt proliferáció csökkenéshez vezetett, míg a proliferációs marker $\alpha 5$ integrin és a differenciációs marker K1/K10 fehérje szintű kifejeződése nem mutatott különbséget a kontroll sejtekhez viszonyítva.

Eddigi vizsgálatainkkal egyelőre nem sikerült igazolnunk a D típusú ciklinek specifikus funkcióit hámsejtekben, eredményeink arra utalnak, hogy a sejt ciklus szabályozásában ezekre a ciklinekre a funkcionális redundancia a jellemző. Ugyan néz ki, hogy a D típusú ciklinek jelenléte nem esszenciális a HaCaT sejtek sejt ciklusának G0/G1-S fázisának szabályozásában, de legalább két D ciklin együttes jelenléte szükséges a sejtek normális G2/M tranzíciójához. A D típusú ciklinek eddig nem ismert, G2/M fázisban játszott fontos szerepének további vizsgálatához, a kombinált géncsendesítés sejt ciklusra gyakorolt hatásának vizsgálatához RT2 Profiler PCR Array System (Super Array, Super Array Bioscience Corporation) segítségével használtuk. A sejt ciklusban szerepet játszó 84 gén expressziós változatait detektáltuk, a vizsgált gének közül az MKi67 expressziója mutatott a D2-D3 kombinációs kiütés kivételével három független kísérletben jelentős csökkenést. Bár a Ki 67 jól ismert és igen széles körben alkalmazott markere az osztódó humán sejteknek, szinte semmit sem tudunk a funkciójáról. Nagy felbontású lézer pásztázó mikroszkóp a Ki 67-et a nucleolus külső fibrilláris kompartmentjében azonosítja, ami riboszómális funkciót sejtet. Ezeket az eredményeinket egy benyújtás előtt álló dolgozatban foglaltuk össze.

Következő vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy a KGF szabályozza-e az $\alpha 5$ integrin promotor aktivitását a gyorsan osztódó HaCaT keratinocitákban. A HaCaT sejtek, habár immortalizált és genetikailag transzformált sejtek, a humán keratinociták jó modelljei. Célunk az volt, hogy $\alpha 5$ integrin promotor-pGL3 luciferáz riportter gén-puromycin rezisztencia gén kiméra konstrukcióval stabilan transzformált szinkronizált HaCaT keratinocitákban vizsgáljuk a KGF $\alpha 5$ integrin promotor aktivitására gyakorolt hatását. Sikeresen előállítottuk az $\alpha 5$ integrin promotor-luciferáz riportter gén-puromycin rezisztencia gén konstrukciót, majd ezt transzfektáltuk JetPEI reagenssel HaCaT keratinocitákba. A bevitt $\alpha 5$ integrin promotor-luciferáz riportter gén-puromycin rezisztencia gén konstrukció a sejtek proliferációját valamilyen módon zavarta, ezért a sejtek egy idő után lecsendesítették magukban a konstrukció aktivitását. Ezt követően a HaCaT keratinocitákat $\alpha 5$ integrin

promoter-luciferáz riporter gént tartalmazó plazmival tranziensen transzfektáltuk. Transzfekciót követően a sejteket szérumos vagy szérummentes médiumban növesztettük. Ebben a kísérleti rendszerben a transzfektált sejtek nem mutattak különbséget sem morfológiai, sem proliferációs tulajdonságaikban a kezeletlen kontroll, a fordított állású és üres vektorral transzfektált kontroll sejtekhez viszonyítva. 24 ill. 48 órával a transzfekciót követően a sejteket 10 ng/μl végkoncentrációjú KGF hatásnak tettük ki. 24 és 48 óra múlva az α5 integrin promoter aktivitását luminométerrel detektáltuk. A szérummentes táptalajban tenyésztett transzfektált HaCaT keratinocitákban KGF indukció hatására jelentősen magasabb α5 integrin promoter aktivitást detektáltunk a szérumos táptalajban tenyésztett transzfektált és a konstrukciót nem tartalmazó üres plazmival transzfektált kontroll keratinocitákhoz viszonyítva. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a KGF részt vesz az α5 integrin kifejeződésének szabályozásában. Ugyanezen α5 integrin promoter – luciferáz riporter gént tartalmazó plazmival transzfektáltunk HEK 293 sejteket és egészséges bőrből származó keratinocitákat. A sejteket KGF-el indukálva, HEK 293 sejteken a HaCaT sejtekhez hasonló α5 integrin promoter aktivitás növekedést tapasztaltunk, míg az egészséges keratinociták esetében nem volt aktivitás növekedés. Időközben az AJP Cell Physiologyban megjelent egy dolgozat, amelyben bizonyították, hogy a KGF az alfa5 integrin expresszióját a CCAAT/enhancer-kötő protein bétán keresztül valóban szabályozza laphámcarcinoma sejtekben. Ezek az eredmények megerősítik azon feltevésünket, hogy a KGF az α5 integrin szabályozásán keresztül szerepet játszik a pikkelysömör tüneteinek kialakulásában.

Annak vizsgálatára, hogy egészséges bőrben és pikkelysömörös betegek nem-léziós, tünetmentes bőrében milyen molekuláris változások játszódnak le mechanikai stressz hatására enyhe mechanikai stresszt indukáltunk tape strippinggel a bőrön, majd a kezelés után hat órával shave biopsziákat vettünk. Három egészséges donortól és három pikkelysömörös betegtől vettünk mintákat. Három pikkelysömörös beteg nem-léziós bőrén erősebb mechanikai stresszt is indukáltunk úgy, hogy a stripping előtt erősebb dörzsölésnek is kitettük a bőrt. Minden donortól vettünk kontroll mintákat is. Az egészséges donorok epidermiszében az α5 integrin mRNS szintje kb. háromszorosára emelkedett a sebzés hatására, míg pikkelysömörös betegekben ugyanez az enyhe mechanikai stressz hatására kb. tizenötszörösére. Érdekes módon az erősebb mechanikai hatásra az emelkedés a tünetmentes bőrben csupán kétszeres volt. Az egészséges donorok dermiszében a KGF mRNS mintegy kilencszeres emelkedést mutatott a mechanikai stressz hatására, míg pikkelysömörös betegek dermiszében enyhe mechanikai stressz hatására kb. kétszeres, erősebb mechanikai stressz hatására kb. ötszörös emelkedést láttunk. A K10 keratin mRNS az egészséges donorok és az erősebb mechanikai stressznek alávetett betegek epidermiszében nem mutatott jelentős változást, míg az enyhe mechanikai stressznek kitett pikkelysömörös betegek epidermiszében kb. tizennégyszeres emelkedést mutatott. Kísérleti elrendezésünkben a K1 keratin és a D-típusú ciklinek mRNS expressziójában nem tapasztaltunk változást.

A mechanikai stressz hatására bekövetkező fehérjeszintű változások vizsgálatához punch biopsziákat vettünk. Enyhe mechanikai stresszt indukáltunk tape strippinggel, majd a kezelés után 24 és 48 órával 6 mm átmérőjű punch biopsziákat vettünk. Három egészséges donortól vettünk mintákat és három pikkelysömörös beteg nem-léziós bőrterületén is elvégeztük ezt az eljárást. Minden donortól kontroll mintákat is vettünk, a pikkelysömörös betegek esetén egy tünetes kontroll mintát is vettünk. A biopsziás mintákat immunfluoreszcens technikával festettük. Vizsgáltuk az α5 integrint, a K10 keratint, a D1 ciklint, a celluláris fibronektint, az EDA⁺ fibronektint, a KGF-et és a KGFR-t.

Egy egészséges donor és pikkelysömörös beteg mintáinak feldolgozása ért véget eddig. A K10 keratin az epidermisz szuprabazális rétegeiben fejeződik ki és szintjére a mechanikai stressz nincs hatással. A D1 ciklin egészséges mintákban és a pikkelysömörös

beteges tünetmentes bőrben nagyon alacsony szintű expressziót mutat. A celluláris fibronectin a dermiszre lokalizálódik, míg az EDA⁺ fibronectin megjelenik az epidermiszben is és mechanikai stresszre a szintje megemelkedik. A KGF a pikkelysömörös nem-léziós epidermiszben nagyobb mennyiségben van jelen, mint az egészséges epidermiszben és szintje a mechanikai stressz hatására tovább növekszik. A KGFR az epidermisz bazális sejtrétegében expresszálódik, és szintje nem változik a kezelés hatására. Az $\alpha 5$ integrin nagy mennyiségben expresszálódik a dermiszokban, viszont csupán a pikkelysömörös minták epidermiszében van jelen, szintje a mechanikai stressz hatására megemelkedik.

Ezen jelenleg még feldolgozás alatt álló adataink, várakozásunknak megfelelően, alapvető adatokat szolgáltatnak a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrben mutatkozó, az egészséges egyének normál bőrétől alapvetően eltérő folyamatokról.

Psoriasisos organotipikus chip vizsgálataink során egészséges és pikkelysömörös egyének tünetmentes bőrből eltávolított shave biopszia mintákban bekövetkező génexpressziós változásokat hasonlítottuk össze T-sejt limfokinekkal történő kezelést követően. Előkísérleteink során először arra a kérdésre kerestünk választ, hogy vajon a 72 órás *in vitro* kultúrában történő kezelést követően a biopszia mintákból megfelelő minőségű RNS izolálható-e. Ehhez egészséges donorok bőrmintáit 24, 48 és 72 órán keresztül organotipikus kultúrában tartottuk, majd diszpáz enzimmel történő emésztést követően az epidermiszt és a dermiszt elválasztottuk. Az epidermisz mintákból Trizol reagens felhasználásával totál RNS-t tisztítottunk, melyeket minőségét a Semmelweis Egyetem Microarray Core Facility laboratóriumában Agilent 2100 Bioanalyzer rendszer segítségével elemezték. Az eredmények azt mutatták, hogy a minták minősége a leghosszabb, 72 órás organotipikus kezelést követően is megfelelő a további vizsgálatokhoz.

A chip kísérletek során a 4 egészséges és 4 pikkelysömörös egyén tünetmentes bőrből származó biopszia mintákat megfeleltük. Mindkét felet organotipikus kultúrába helyeztük, ahol az egyik felet kontroll, a párját T-sejt limfokinet (IL-3, IFN γ , GM-CSF) tartalmazó tápfolyadékban inkubáltuk. Az izolált RNS mintákból készített jelölt cDNS mintákat az SE Microarray Core Facility laboratóriumában Affymetrix humán oligo chiprekekre hibridizáltatták. Az adatok analízise során az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes limfokin kezelt minták összehasonlításával kapott adatok részletes elemzését kezdtük el, melynek során a psoriasisos tünetmentes epidermisz olyan inherens eltéréseit kívántuk azonosítani melyek a tünetek kialakulásának okainak, illetve a folyamatok korai lépéseinek felelnek meg.

Az adatok elemzése során 79 gén mutatott eltérő expressziós változást a limfokin kezelés hatására az egészséges és tünetmentes pikkelysömörös mintákat összehasonlítva. Két gén kétszer is szerepelt a listában, ami belső technikai kontrollként a chip hibridizációs folyamatok minőségét jellemzi. A génlista részletes elemzése jelenleg folyamatban van, melynek során először irodalmi adatok felhasználásával meghatároztuk az egyes gének lehetséges funkcióját, valamint a keratinocitákban betöltött speciális szerepüket. 8 olyan gént találtunk (a vizsgálatok során azonosított gének 10%-a), melyekről ismert, hogy szerepük lehet a pikkelysömör kialakulásában (MMP9, TNC, KLK6, PRSS27, ARG1, IL23A, VNN3). Ez a tény azt sugallja, hogy az általunk alkalmazott kísérleti összeállítás valóban alkalmas arra, hogy a psoriasis kialakulása során végbemenő patogén folyamatokat, illetve ezek szereplőit azonosítsa. Jelenleg folyamatban van a chipes eredmények validálása valós idejű RT-PCR módszer alkalmazásával. Folyik emellett az adatok további elemzése, melynek során az azonosított gének közötti kapcsolatrendszer próbáljuk felderíteni, melynek során olyan biológiai, szignál transzdukciós, valamint metabolikus folyamatokat próbálunk azonosítani, melyekben ezek a gének szerepet játszhatnak.