

A citoszolikus nukleinsavak által kiváltott keratinocita immunfolyamatok vizsgálata

Danis Judit

PhD értekezés tézisei

Témavezető:

Prof. Dr. Széll Márta

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Szeged

2018

Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **J. Danis**, L. Janovák, B. Gubán, A. Göblös, K. Szabó, L. Kemény, Z. Bata-Csörgő, M. Széll: Differential Inflammatory-Response Kinetics of Human Keratinocytes upon Cytosolic RNA- and DNA-Fragment Induction, *Int J Mol Sci* 19(3):774 (2018)
IF:3.226*
- II. **J. Danis**, A. Göblös, Z. Bata-Csörgő, L. Kemény, M. Széll: PRINS Non-Coding RNA Regulates Nucleic Acid-Induced Innate Immune Responses of Human Keratinocytes, *Front Immunol* 8:1053 (2017)
IF:6.429*
(Független idézetek: 0 Függő idézetek: 1 Összesen: 1)
- III. M. Széll, **J. Danis**, Z. Bata-Csörgő, L. Kemény: PRINS, a primate-specific long non-coding RNA, plays a role in the keratinocyte stress response and psoriasis pathogenesis, *Pflug Arch Eur J Phys* 468(6), p. 935–943 (2016)
IF:3.156
(Független idézetek: 6 Függő idézetek: 1 Összesen: 7)

Egyéb közlemények

- IV. **J. Danis**, M. Széll: Functional relevance of pyknons in tumor formation, *Non-coding RNA Investig* 2:3 (2018) [Invited Editorial]
- V. **J. Danis**, M. Széll: VELUCT, a long non-coding RNA with an important cellular function despite low abundance, *J Thorac Dis* 9(10):3638-3640 (2017) [Invited Editorial]
- VI. A. Göblös, **J. Danis**, K. Vas, Z. Bata-Csörgő, L. Kemény, M. Széll: Keratinocytes express functional CARD18, a negative regulator of inflammasome activation, and its altered expression in psoriasis may contribute to disease pathogenesis, *Mol Immunol* 73, p. 10–18. (2016)
IF:3.236
(Független idézetek: 3 Függő idézetek: 2 Összesen: 5)
- VII. **Danis J.**, Forczek E., Bari F.: A telemedicina alkalmazása a bőrgyógyászatban: a teledermatológia [Telemedicine in dermatological practice: teledermatology] *Orv Hetil* 157:(10) pp. 363-369. (2016)
IF:0.349
(Független idézetek: 0 Függő idézetek: 1 Összesen: 1)
- VIII. **J. Danis**, T. Turányi: Sensitivity Analysis of Bacterial Chemotaxis Models, *Procedia Computer Science* 7 p.233-234. (2011)
(Független idézetek: 1 Függő idézetek: 1 Összesen: 2)

1. Bevezetés

1.1 A keratinociták immunológiai funkciói

A bőr biztosítja a fizikai és biokémiai határfelületet testünk és a külvilág között, eközben biztosítja az érzékelést, segíti a homeosztázis fenntartását, egyes vitaminok és hormonok termelődését. Anatómiailag a bőr három rétegre osztható: hám, irha és bőralja.

A hámszövet nem csak fiziko-kémiai határfelületként szolgál, de elsődleges immunológiai védelmi vonalként is szerepet játszik a patogénekkal szembeni védekezésben. E feladat ellátásában a a bőrben és hámszövetben folyamatosan jelen lévő professzionális immunsejtek mellett a keratinociták is aktívan részt vesznek. A keratinociták, mint a veleszületett immunrendszer sejtjei különböző mintázatfelismerő receptorokat (PRR-ek) fejeznek ki, melyek különböző patogén és veszély asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP-ok és DAMP-ok) ismernek fel. A sejteken található PRR-ek teszik lehetővé a gyors elsődleges immunválaszt. A keratinociták különböző Toll-szerű receptorokat (TLR), RIG-szerű receptorokat és NOD-szerű receptorokat fejeznek ki, melyek a mikrobiális mintázatok széles skáláját ismerik fel.

A szabad RNS és DNS fragmentumok PAMP-ként aktiválják a sejteket, így a keratinociták immunválaszát, és általában virális vagy bakteriális eredetűek. Ugyanakkor az elhaló sejtek genetikai anyagának nem megfelelő lebontása révén felhalmozódhatnak a saját sejtekből származó nukleinsav fragmentumok, melyek DAMP-ként aktiválják az immunrendszert, és hozzájárulnak a krónikus betegségek, így a pikkelysömör kialakulásához és a gyulladásos tünetek fenntartásához.

A nukleinsavak által indukált immunreakciók vizsgálatára főként a szintetikus RNS-analóg poly(I:C) és DNS-analóg poly(dA:dT) kezelést alkalmaznak, melyek indukálják az I. típusú interferon (IFN) és különböző gyulladásos citokinek expresszióját a keratinocitákban is. A poly(I:C) elsősorban a TLR3 receptort aktiválja, de ettől függetlenül a RIG-I receptort is aktiválhatja. A poly(dA:dT) érzékelése részben átfed a poly(I:C) érzékelésével, mivel az RNS polimeráz III általi RNS-sé történő transzkripciója után a RIG-I receptort aktiválja, míg ettől függetlenül a ciklikus GMP-AMP szintáz is receptoraként szolgál.

A keratinocitákban a gyulladásos citokinek kifejeződése alacsony, és a transzkripciós szinten szabályozódik. Az aktivált PRR-ek az NF κ B, a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) és a STAT jelátviteli útvonalakat indítják be, melyek a transzkripciós faktorok aktiválása révén indukálják a citokinek kifejeződését.

1.2 A pikkelysömörös keratinociták tulajdonságai

A pikkelysömör egy krónikus gyulladós bőrbetegség, melynek kialakulásában fontos szerepet játszik a keratinociták és a professzionális immunsejtek nem megfelelően szabályozott együttműködése. A betegség az európai populáció 2-3 %-át érinti. A betegség komplex eredetű, környezeti hatások és a multigénes genetikai háttér együttesen vezet a tünetek megjelenéséhez: jól körülhatárolt, a bőrfelszínből kiemelkedő, hámló gyulladt foltok megjelenéséhez.

A betegség egyik kiváltó faktoraként a saját eredetű nukleinsav darabok megjelenését tartják számon. Pikkelysömörös bőrben mind az RNS és DNS receptorok, mind az ezeket aktiváló RNS, DNS és RNS:DNS duplex molekulák mennyisége megnövekedett az egészséges bőrhöz képest. A plakk kialakítása során az LL-37 antimikrobiális peptid a szabad nukleinsavakhoz kötődik, és elősegíti azok felvételét a keratinocitákba és a bőrben jelenlévő denritikus sejtekbe (pDC), ahol a nukleotidok gyulladós folyamatokat indítanak el. Az aktivált pDC-k a közeli nyirokcsomókba vándorolnak, ahol aktiválják a naív T-sejteket. Az aktivált T_{h1} és T_{h17} sejtek a bőrbe visszatérve támogatják a keratinocitákban lejátszódó gyulladós folyamatokat és elősegítik túlzott osztódásukat, mely a tüneteket okozza.

A pikkelysömörös tünetmentes bőrterületek keratinocitái olyan molekuláris eltéréseket hordoznak, melyek hozzájárulnak a fokozott gyulladós- és proliferatív tulajdonságok kialakulásához. Munkacsoportunk korábban egy differenciál-display kísérlet és egy cDNS microarray kísérlet során hasonlította össze az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes hámszövet génkifejeződését. Ezek a kísérletek megmutatták az extracelluláris mátrix eltéréseit, azonosítottak egy hosszú nem kódoló RNS-t, felvetették pikkelysömörben a megváltozott mRNS érési folyamatok jelentőségét, illetve kimutatták a gyulladós folyamatokban szerepet játszó interleukin (IL)-1 β , IL-23 valamint az inflammoszóma szabályozásában részt vevő caspase recruitment domain (CARD) 18 megváltozott kifejeződését.

1.3 A PRINS hosszú nem kódoló RNS

A humán genom projekt eredménye rávilágított, hogy a fehérje-kódoló gének mindössze a teljes genetikai állomány 2%-át alkotják, habár a genom többi része is aktívan átíródik RNS-sé. Ezek közül a 200 nukleotidnál hosszabb, fehérjét nem kódoló RNS molekulákat hosszú nem-kódoló RNS-nek (lncRNS) nevezzük, melyek száma (>70 000) az emberi genomban messze meghaladja a fehérje kódoló gének számát (<20 000). Eltérő méretük és funkciójuk

megnehezíti a vizsgálatukat, így jelenleg a prediktált lncRNS-ek csupán 0,1%-áról rendelkezünk funkcionális adattal.

Kutatócsoportunk elsőként azonosított egy lncRNS-t, mely a pikkelysömörös tünetmentes hámszövetben magasabb szintű kifejeződést mutatott, mint az egészséges, vagy pikkelysömörös tünetes hámban, és a PRINS *psoriasis susceptibility related non-coding RNA induced by stress* nevet kapta. Az első kísérletek megmutatták, hogy a PRINS kifejeződése a keratinocitákban különböző stressz faktorok hatására növekedett, és a PRINS csendesítése befolyásolta a HaCaT sejtvonal életképességét a celluláris stressz során, ezek alapján feltételezhető volt a sejtek stresszre adott válaszában betöltött szerepe.

Bioinformatikai adatbázisok segítségével meghatároztuk a *PRINS* gén genomikai tulajdonságait. A gén a 10. kromoszóma rövid karján található (Chr. 10p12.31), két exonból áll, melyeket egy kb. 7 000 bázis hosszúságú intron választ el. A teljes *PRINS* gén a *KIAA1217* (más néven *SKT*) gén egy intronjában lokalizálódik, mely az embriógenézis korai fázisában játszik szerepet. A transzkripció feltételezett kezdőpontja a PRINS gén 5' végétől kb. 6 000 bázis távolságra található, melyet a transzkripciós faktor kötőhelyek és az aktív transzkripciót jelző hisztonmódosítások jelölnek. A *PRINS* gén szekvenciáján három *Alu* transzpozíciós elem található, mely gyakori a lncRNS-ek esetén, de ritka a fehérje kódoló génekben. A *PRINS* gén evolúciósan valószínűleg a főemlősökben alakult ki, mivel ortológjai csak főemlősök genomjában találhatóak meg.

Korábbi funkcionális vizsgálataink során egy cDNS microarray és egy *in vitro* fehérjekötődési vizsgálatot végeztünk. A cDNS microarray azonosította az interferon- α indukálható protein 6 (IFI6, más néven G1P3) molekulát, aminek kifejeződése csökkent a HeLa sejtekben a PRINS csendesítés hatására. A fehérjekötődési kísérletben a nukleofozmin (NPM) fehérje került azonosításra, amely képes kötődni a PRINS lncRNS-hez. A kötődés funkcionalitását igazolta, hogy a PRINS csendesítése megakadályozta a NPM fehérje ultraibolya B sugárzás okozta sejtmagi transzlokációját.

Korábbi eredményeink tehát arra utalnak, hogy az evolúciós szempontból fiatal PRINS lncRNS szerepet játszhat a sejtek stressz-faktorokra adott válaszában, és a pikkelysömörben megváltozott expressziója szerepet játszhat a betegségben.

A legújabb kutatási eredmények kimutatták, hogy a mikrobiális komponensek csökkentik a PRINS kifejeződését makrofágokban és egészséges hám eredetű keratinocitákban is (NHEK). Ezen túlmenően a PRINS lncRNS és a CCL-5 (más néven RANTES) kemokin mRNS-ének

kötődését is felvetették, bár magát az interakció funkcióját nem vizsgálták. Emellett kimutatták a PRINS szerepét a tumor nekrozis faktor (TNF)- α gyulladáshoz köthető citokin által kiváltott apoptózis kivédésében. Ezek az adatok összességében felvetik a PRINS szerepét a gyulladáshoz köthető folyamatokban.

2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a nukleinsav fragmentumok által kiváltott keratinocita immunfolyamatok karakterizálását különböző, pre- és poszttranszkripcionális szabályozási folyamatok vizsgálatával. Ennek során céljaink a következők voltak:

- A nukleotid fragmentumok által indukált citokin kifejeződés karakterizálása különböző keratinocita sejttípusokban.
- A nukleotid fragmentumok által a keratinocitákban indukált jelátviteli folyamatok és azok funkcionalitásának vizsgálata a citokinek kifejeződésében.
- A DNS fragmentumok hatásának vizsgálata a PRINS nem kódoló RNS kifejeződésére a keratinocitákban.
- A PRINS nem kódoló RNS szerepének vizsgálata a DNS fragmentumok által okozott citokinexpresszió szabályozásában.

3. Anyagok és módszerek

- A kísérletekhez egészséges humán hám eredetű keratinocitákat (NHEK), a HaCaT sejtvonalat és a HPV-KER sejtvonalat használtuk.
- A sejteket X-tremeGene9 reagens segítségével transzfektáltuk 0,666 µg/ml DNS analóg polydeoxyadenylic acid-polydeoxythymidylic-sav dupla-szálú homopolimerrel [poly(dA:dT)] vagy 0,666 µg/ml RNS analóg polyinosinic–polycytidylic-savval [poly(I:C)]. Egyes kísérletekben 5 ng/ml tumor nekrozis faktor (TNF)- α és 5 ng/ml interferon (IFN)- γ előkezelést alkalmaztunk 24 órán keresztül.
- A jelátviteli útvonalak vizsgálatához a sejteket a poly(I:C)/poly(dA:dT) transzfekeció előtt egy órán keresztül kezeltük a specifikus gátlószerekkel: NF κ B (Bay11-7085, 10 µM), STAT-1 (Fludarabine, 10 µM), STAT-3 (Stattic, 5 µM), MEK1 (PD98059), JNK (SP600125, 10µM) and p38 (SB203580, 10 µM).
- A TRIzol[®] reagensben felvett minták teljes RNS tartalmát izoláltunk, majd DNáz kezeltük a Turbo DNA-free Kit segítségével, ezután 1 µg RNS-t átírtunk cDNS-sé a iScript cDNA Synthesis Kit felhasználásával.
- Valós idejű RT-PCR kísérleteket az Univerzális Próba Könyvtár (UPL) segítségével végeztük egy C1000 Touch Thermal Cycler készüléken, a relatív mRNS expressziót a $\Delta\Delta$ Ct módszer alkalmazásával számoltuk.
- NF κ B luciferáz riporter esszét végeztünk az NF κ B aktivitás mérésére poly(I:C) és poly(dA:dT) kezelés során.
- A western blot kísérletekhez a HPV-KER sejtekből a poly(I:C)/poly(dA:dT) kezelés után fehérjét izoláltunk, a lizátumból egyforma mennyiségeket futtatunk meg SDS-PAGE-en, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránt blokkolás után az elsődleges antitestekkel egy éjszakán keresztül 4°C-on, majd 60 percig HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A kemilumineszcens jelet SuperSignal[™] West Pico Chemiluminescent Substrate felhasználásával egy C-Digit Blot Scanner műszeren mértük.
- A PRINS overexpressziós vektort az AK022045 cDNS szekvencia pcDNA3.1(+) vektorba klónozásával hoztuk létre. A Δ PRINS vektorhoz az AK022045 cDNS 538-622 pozíciók közötti szakaszát az alábbi kevert szekvenciára cseréltük: 5'-GTGCGTGGCGGAGACGTGGTGGTAGACCGAATTGAGGAGGATCCGAAGGTTAGACGTAGGCGATCGCCGCTTCGGACGCGGTCGC-3'. Az NHEK sejtek

transzfekcióját az X-tremegeneHP reagenssel végeztük, transzfekciós kontrollként az üres pcDNA3.1(+) vektort használtuk.

- A PRINS (AK022045) és az egyes mRNS-ek [IL-1 α (M28983.1), IL-1 β (NM_000576.2), IL-6 (NM_000600.4), IL-8 (NM_000584.3)] közötti interakció bioinformatikai vizsgálatát az RIssearch és az INTARNA programokkal végeztük. A mindkét program által megjelölt kötőhelyeket tekintettük potenciális kötőhelyeknek.
- *In vitro* transzkripcióval állítottuk elő a PRINS és Δ PRINS RNS molekulákat, melyeket a fluoreszcens kötődési vizsgálatban használtunk.
- A fluoreszcensen jelölt IL-6 szekvencia részletet az Integrated DNA Technologies gyártotta, mely az IL-6 (NM_000600.4) szekvencia 91-205 pozíciói közötti szakasz: 5'6-carboxyfluorescein(6-FAM)/GAAGCUCUAUCUCCCCUCCAGGAGCCCAGC UAUGAACUCCUUCUCCACAAGCGCCUUCGGUCCAGUUGCCUUCUCCCU GGGGCUGCUCCUGGUGUUGCCUGCUGCCUUCCCUGCC-3'.
- Az *in vitro* kötődésvizsgálatot egy Monolith NT.115 Pico MicroScale Thermophoresis készüléken a 2bind Kft. (Németország, Regensburg) végezte, a kötődési görbét a kezdeti fluoreszcencia intenzitás felhasználásával, 1:1 arányú kötődési modellt alkalmazva állapítottuk meg.
- Az egyes citokinek (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL-5 és TNF- α) mennyiségét a sejtek felülúszójában ELISA technikával mértük.
- A vizsgálatokat három párhuzamos kísérlettel és legalább három biológiai replikátumban végezzük el. A statisztikai eltérés varianciánálízissel (ANOVA) és egy-oldalú, párosított t-próbával határoztuk meg az R szoftvert (Ver. 3.2.2.) illetve a Sigma Plot szoftvert (Ver. 13.0) használva, a szignifikancia értékét $p \leq 0,05$ állapítottuk meg.

4. Eredmények

4.1 A citoszolikus nukleinsav darabok beindítják a keratinociták citokinkifejeződését, valamint aktiválják az NFκB, MAP kináz és STAT jelátviteli útvonalakat

Három keratinocita sejttypusban (NHEK, HaCaT és HPV-KER) összehasonlítottuk a duplaszálú RNS és DNS molekulák által beindított citokinkifejeződést. A poly(I:C) kezelés hatására mindhárom sejttypusban jelentősen megnövekedett az IL-6 és TNF- α kifejeződése, míg a poly(dA:dT) kezelés után kisebb mértékű és eltérő kinetikájú citokin mRNS kifejeződést mértünk: míg a poly(I:C) kezelés 3-6 órával, a poly(dA:dT) kezelés 6-12 órával a kezelés után okozta a legnagyobb mértékű citokin kifejeződést. A HaCaT sejtek válasza a poly(I:C) kezelés során szignifikánsan eltért a másik két sejttypus választától, míg poly(dA:dT) kezelés során közel azonos mintázatot tapasztaltunk a 3 sejttypusban.

A jelátviteli útvonalak aktiválódását a HPV-KER sejtekben vizsgáltuk. Az NFκB útvonal aktiválódása hasonló mintázatot mutatott a citokinek kifejeződéséhez: míg az aktiváció csúcspontja poly(I:C) kezelés után 6 órával jelentkezett, addig poly(dA:dT) kezelés hatására csak 24 óra elteltével tapasztaltunk NFκB aktiválódást. Ehhez hasonlóan az ERK1/2, STAT-1 és STAT-3 aktiváció is gyorsabb volt a poly(I:C) kezelés hatására, mint a poly(dA:dT) kezelés során, míg a p38 és JNK útvonalak aktivációja nem volt megfigyelhető.

4.2 A poly(I:C) és poly(dA:dT) az NFκB, p38 és STAT útvonalakon keresztül befolyásolja a keratinociták citokinkifejeződését

Az előzőekben meghatározott útvonalak szerepét specifikus inhibitorokkal történő kezelést követően, HPV-KER sejtekben vizsgáltuk. Az NFκB útvonal gátlása szinte teljesen megszüntette mind a poly(I:C), mind a poly(dA:dT) indukált IL-6 és TNF- α kifejeződést. Habár a p38 útvonal aktivációját nem mutattuk ki, gátlása szignifikánsan csökkentette az IL-6 és TNF- α kifejeződését mindkét nukleinsav kezelés során. A JNK gátlása nem befolyásolta a citokinexpressziót, míg az ERK1/2 útvonalat aktiváló MEK1/2 gátlása megnövekedett IL-6 kifejeződést okozott, ami ennek a jelátviteli útvonalnak a potenciális negatív visszacsatolási szerepére utal. A STAT-3 útvonal gátlása mind a poly(I:C), mind a poly(dA:dT) indukált IL-6 és TNF- α expressziót csökkentette, míg a STAT-1 útvonal gátlása csupán az IL-6 kifejeződésre volt hatással.

Eredményeink alapján tehát az IL-6 kifejeződésre a vizsgált útvonalak legtöbbször hatása volt, míg a TNF- α kifejeződését csak a NF κ B, a p38 és a STAT3 útvonal szabályozza.

4.3 A PRINS overexpressziója befolyásolja a keratinociták IL-6 és IL-8 kifejeződését

Míg a poly(dA:dT) kezelés szignifikánsan csökkentette a PRINS kifejeződését NHEK sejtekben, addig más sejttípusokban, illetve a poly(I:C) kezelés hatására szignifikáns változást nem tapasztaltunk, így a továbbiakban poly(dA:dT) kezelt NHEK sejteken vizsgáltuk a PRINS nem kódoló RNS szerepét a gyulladásos folyamatokban.

Plazmid vektor alapú túlexpresszáltatással megnöveltük az NHEK sejtekben a PRINS szintjét, majd megvizsgáltuk a citokinek kifejeződését. Mivel a poly(dA:dT) kezelés során nem minden donorban tapasztaltunk megfelelő mértékű citokinekifejeződést, ezért olyan kezelést állítottunk be, mely nagyobb mértékű gyulladásos reakciót okozhat: 24 órás TNF- α és IFN- γ előkezelést alkalmaztunk, ami nagyobb mértékű citokinekifejeződést okozott, mint a poly(dA:dT) kezelés önmagában. A PRINS kifejeződés hasonló mértékben csökkent, a kombinált- és a csak poly(dA:dT)-vel való kezelés során.

A továbbiakban a kombinált előkezelés és poly(dA:dT) kezelés során megnöveltük a PRINS kifejeződését plazmid vektor alapú transzfekcióval, majd megmértük a citokinek expresszióját. Eredményeink szerint az IL-6 és az IL-8 kifejeződése és szekréciója szignifikánsan csökkent a PRINS overexpresszió hatására, míg az IL-1 α , IL-1 β és TNF- α kifejeződésben nem tapasztaltunk változást. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a PRINS részt vehet egyes citokinek kifejeződésének szabályozásában.

4.4 A bioinformatikai vizsgálatok kimutatták egy potenciális interakciós kötőhely jelenlétét a PRINS lncRNS és az IL-6 mRNS-e között

Egy korábbi publikációban feltételezték a CCL-5 kemokin és a PRINS mRNS-lncRNS szintű kapcsolódását, de ennek funkcionalitását nem vizsgálták. Ebből kiindulva megvizsgáltuk a CCL-5 mRNS kifejeződését és fehérje szekrécióját a PRINS túlexpresszáltatása során. CCL-5 kifejeződése és szekréciója, hasonlóan az IL-6 és IL-8 kifejeződéséhez és szekréciójához, csökkent a PRINS túlexpresszáltatása során, ami arra utalt, hogy a PRINS hasonló módon befolyásolhatja az IL-6, IL-8 és a CCL-5 kifejeződést.

Az Rsearch és az INTARNA programok segítségével vizsgáltuk meg, hogy van-e feltételezhető interakciós hely a PRINS (AK022045) lncRNS és az IL-6 (NM_000600.4), IL-8 (NM_000584.3) és CCL-5 (NM_002985.2) mRNS-e között. A programok egy-egy,

egymástól mintegy 200 nukleotidnyi távolságra található kötőhelyet találtak a CCL-5 és az IL-6 mRNS-e valamint a PRINS lncRNS között, míg az IL-8 mRNS és a PRINS között nem talált interakciós szakaszt. Érdekes módon a PRINS kötőhelye a CCL5 mRNS 3' nem transzlálódó régiójában, míg az IL-6 mRNS esetén az 5' nem transzlálódó régióban található.

4.5 A PRINS lncRNS szekvenciaspecifikusan kötődik az IL-6 mRNS-éhez

A feltételezett kötőhelyeket egy *in vitro* kötődési esszé segítségével vizsgáltuk, melyben a teljes PRINS nem kódoló RNS és az IL-6 mRNS ehhez kötődő, fluoreszcensen jelölt szakaszát használtuk fel. Negatív kontrollként a Δ PRINS szekvencia szolgált, melyben az IL-6 kötődésért felelős régió szekvenciáját kevert szekvenciára cseréltük. Míg a PRINS RNS erős affinitással ($K_d=10,3436$ nM) kötődött az IL-6 fluoreszcensen jelölt mRNS szakaszához, addig a Δ PRINS RNS esetén specifikus kötődést nem tapasztaltunk. Ezek az *in vitro* eredmények igazolták az *in silico* azonosított kötőhelyeket.

4.6 A PRINS szekvenciaspecifikus kötődésén keresztül szabályozza az IL-6 kifejeződését

Az *in silico* és *in vitro* módszerekkel azonosított kötőhelyek sejten belüli funkcióját olyan kísérletekkel igazoltuk, melyekben túlexpresszáztattuk a PRINS illetve a Δ PRINS RNS-t, majd vizsgáltuk az IL-6 mRNS kifejeződését és fehérje szekrécióját. Az IL-6 kifejeződése szignifikánsan csökkent a PRINS overexpresszió hatására, ezzel szemben a ronott szekvenciájú kötőhelyet tartalmazó Δ PRINS túlexpresszáltatása nem befolyásolta. IL-6 szekréció esetében hasonló tendenciát tapasztaltunk. Ugyanakkor a CCL-5 kifejeződését, melynek kötőhelye változatlan a PRINS és a Δ PRINS molekulákban is, mind a PRINS mind a Δ PRINS túlexpresszáltatása szignifikánsan csökkentette. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PRINS lncRNS a rajta található szekvenciaspecifikus kötőhelyek révén szabályozza más mRNS-ek kifejeződését.

5. Diszkusszió

Az RNS és DNS darabok PAMP- és DAMP-ként képesek indukálni a veleszületett immunrendszert. A nukleinsav-indukált A professzionális immunsejtekben lejátszódó reakciókról részletes ismeretekkel rendelkezünk, azonban a nem professzionális immunsejtekről kevés adat áll rendelkezésre. Célunk volt a keratinocitákban, mint nem professzionális immunsejtekben, a nukleinsav fragmentumok hatására lejátszódó folyamatok karakterizálása. Vizsgálatainkhoz a duplaszálú RNS analóg poly(I:C) és a DNS analóg poly(dA:dT) kezelést alkalmaztunk, és megvizsgáltuk a transzkripciót befolyásoló jelátviteli útvonalakat és az lncRNS-ek általi poszttranszkripcionális szabályozást is.

Kutatócsoportunk korábbi munkáiból ismert, hogy a HaCaT keratinocita sejtvonal gyulladási válasza eltér a NHEK sejtektől, míg a HPV-KER sejtvonal (melyet munkacsoportunk hozott létre és karakterizált) gyulladási folyamatai hasonlóak az NHEK sejtekéhez. Ezt a korábbi megfigyelésünket jelen eredményeink is igazolták, hiszen a HaCaT sejtek poly(I:C) válasza eltérő volt a HPV-KER és NHEK sejtektől. Emellett a HaCaT sejtekről ismert, hogy fokozott NF κ B aktivációjuk miatt nem alkalmasak a gyulladási jelátviteli folyamatok vizsgálatára, így kísérleteinkben a HPV-KER sejtvonalat alkalmaztuk.

Korábban különböző sejttípusokban leírták az NF κ B, a MAPK és a STAT jelátviteli útvonalak szerepét a nukleinsavak által kiváltott immunválaszban, de ezek a folyamatok keratinocitákban kevésbé vizsgáltak. Eredményeink szerint a keratinocitákban a poly(I:C) hatására ezek a jelátviteli útvonalak gyorsabban aktiválódnak, mint a poly(dA:dT) hatására, amivel párhuzamosan megfigyelhető a citokinek kifejeződésének eltolódása is. Ezt az eltérést feltételezhetően az okozza, hogy míg a poly(I:C) közvetlenül aktiválja a TLR3 receptort, addig a poly(dA:dT)-t elsősorban az RNS polimeráz III általi transzkripciót követően érzékeli a RIG-I receptor. A keratinocitákban a poly(I:C) és a poly(dA:dT) a citokinek kifejeződését az NF κ B, p38, STAT-1 és a STAT-3 útvonalakon keresztül indukálja.

Egérmodellekben és monocitákban az ERK1/2 és a JNK útvonalak gátlása egyértelműen gyulladáscsökkentő hatásúak. Ezzel szemben a kísérleteinkben az ERK1/2 útvonal gátlása növelte az IL-6 gyulladási citokin kifejeződését a keratinocitákban. Ezek az eredmények párhuzamba állíthatóak azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy az ERK1/2 útvonal terápiai gátlása a betegek nagy részében gyulladási bőrtünetekhez vezet. Összességében ez arra utal, hogy az ERK1/2 útvonal a gyulladási folyamatok negatív visszacsatolásában vesz részt.

Az elmúlt évek nagyskalájú génexpressziós vizsgálatai során az azonosított humán nem-kódoló RNS-ek száma ugrásszerűen emelkedett, de sejten belüli funkciójuk kevésbé ismert. Munkánk során célunk volt egy nem kódoló RNS, a PRINS molekula szerepének vizsgálata a keratinociták gyulladási folyamataiban.

A PRINS nem-kódoló RNS túlexpresszáltatása csökkentette az IL-6, IL-8 és CCL-5 kifejeződését NHEK sejtekben. Bioinformatikai analízis segítségével kimutattuk, hogy az IL-6 és a CCL-5 mRNS-e szekvenciaspecifikusan a PRINS nem kódoló RNS bizonyos régióihoz képes kapcsolódni. A kötőhely az IL-6 mRNS szekvenciáján két exont köt össze, ami mRNS-lncRNS szintű kapcsolódásra utal. Az elvégzett *in vitro* kötődési esszé egy nagy affinitású ($K_d=10,3436$ nM) kötődést igazolt az IL-6 mRNS és a PRINS lncRNS között, míg a roncsolt kötőhellyel rendelkező Δ PRINS lncRNS esetén kötődést nem tapasztaltunk. Érdekes módon, az IL-6 mRNS-en a kötőhely az 5' nem transzlálódó régióban található, ellentétben más mRNS-ek lncRNS kötőhelyeivel. Sejt szinten a PRINS lncRNS IL-6 kötőhely szekvenciájának módosítását követően már nem tapasztalható az IL-6 kifejeződésének csökkenése, míg az eltérő kötőhellyel rendelkező CCL-5 kifejeződését egyformán csökkentette a PRINS és Δ PRINS lncRNS túlexpresszáltatása is. Ezek az eredmények megmutatták, hogy a PRINS kötődhet az IL-6 mRNS-éhez, és a szekvenciaspecifikus interakció révén képes destabilizálni a citokin kifejeződését. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a pikkelysömörös tünetmentes hámban tapasztalt magasabb PRINS kifejeződés e mechanizmus által hozzájárulhat a gyulladási folyamatok szabályozásához, és a tünetmentes fenotípus fenntartásához.

Az elmúlt évtizedek pikkelysömörrel kapcsolatos kutatásai során bizonyítást nyert a jelátviteli folyamatok megváltozása, melyek végül specifikus terápiák kifejlesztéséhez is vezettek. Ugyanakkor teljes mélységükben még ma sem ismerjük ezeket a folyamatokat. A jelen tanulmányban bemutatott vizsgálatokat egy nem-professzionális immunsejt-típuson, keratinocitákon végeztük, de hasonló mechanizmusok professzionális immunsejtekben is fontosak lehetnek. Eredményeink növelik tudásunkat a nukleinsav fragmentumok által kiváltott pre- és poszttranszkripciósi folyamatokról keratinocitákban, emellett a PRINS hosszú nem kódoló RNS funkcionális vizsgálata révén általában a nem kódoló RNS-ekről is.

6. Összefoglalás

Tanulmányunkban a duplaszálú RNS és DNS molekulák által a keratinocitákban beindított immunfolyamatokat jellemeztük a pre- és poszttranszkripciós szabályozási mechanizmusok vizsgálatával.

- Három keratinocita sejttypusban (NHEK sejtek, HaCaT és HPV-KER sejtvonalak) összehasonlítottuk a duplaszálú RNS és DNS által kiváltott citokin kifejeződés mennyiségét és időbeli kinetikáját. Eredményeink szerint mind a duplaszálú RNS analóg poly(I:C), mind a DNS analóg poly(dA:dT) beindítja a sejtek IL-6 és TNF- α kifejeződését, azonban a kifejeződés kinetikája és az indukció mértéke jelentős különbségeket mutatott.
- Eredményeink szerint a poly(I:C) és a poly(dA:dT) azonos jelátviteli útvonalakat indukál, bár eltérő kinetikával. A poly(I:C) és poly(dA:dT) transzfekció aktiválta az NF- κ B és STAT útvonalakat, amelyek, a p38 útvonallal együtt szükségesek a citokinek kifejeződéséhez. Emellett kimutattuk, hogy az ERK1/2 jelátviteli útvonal a nukleinsav fragmentumok által beindított IL-6 kifejeződés negatív szabályozója a keratinocitákban, amely valószínűleg sejttypus specifikus funkció.
- Megállapítottuk, hogy a poly(dA:dT) kezelés szignifikánsan csökkenti az NHEK sejtek PRINS kifejeződését, azonban a poly(I:C) nem befolyásolja a sejtek PRINS expresszióját.
- Megmutattuk a PRINS nem kódoló RNS potenciális gyulladásgátló hatását a poly(dA:dT) indukált keratinocita immunfolyamatokban. A PRINS nem kódoló RNS szekvenciaspecifikusan kapcsolódhat az IL-6, valamint a CCL-5 mRNS-éhez, ami hozzájárulhat az mRNS-ek lebontásához, így szerepe lehet a poszttranszkripciós negatív szabályozásban. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a pikkelysömörös tünetmentes hámban tapasztalt magasabb PRINS kifejeződés e mechanizmus által hozzájárulhat a gyulladós folyamatok szabályozásához, és a tünetmentes fenotípus fenntartásához.

7. Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával tartozom témavezetőmnek, Széll Márta Professor Asszonynak, aki hasznos tanácsokkal és ötletekkel látott el és végtelen türelemmel támogatott munkám során. Minden helyzetben számíthattam tudására, tapasztalatára és támogatására, ugyanakkor kellő önállóságot biztosított számomra.

Köszönettel tartozom Kemény Lajos Professor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy munkámat a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán végezzem, és csatlakozzam az MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoporthoz.

Köszönettel tartozom Bata-Csörgő Zsuzsanna Professor Asszonynak munkámmal kapcsolatos ötleteiért és értékes meglátásaiért a kéziratok elkészítése során.

Külön köszönettel tartozom Dr. Szabó Kornéliának, aki támogatott, hasznos tanácsokkal látott el és hatalmas molekuláris biológiai tudásával segített a mindennapi munkám során.

Hálás vagyok kollégáimnak, Dr. Göblös Anikónak, Erdei Lillának, Bolla Beáta Szilviának, Konczné Dr. Gubán Barbarának és Bozó Renátának, akik bevezettek a kutatási technikák rejtjelmeibe, munkám során segítettek, valamint barátságukkal tüntettek ki az elmúlt években. Egyúttal köszönettel tartozom a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika és az MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport minden dolgozójának, akik lehetővé tették e munka elvégzését.

Munkám során lehetőségem nyílt felügyelni két fiatal hallgató, az ERASMUS hallgatóként a Cataniai Egyetemről érkező Letizia La Rosa és a Szegedi Tudományegyetemen biológia szakos Janovák Luca, munkáját. Köszönöm, hogy lehetővé tették számomra, hogy laboratóriumi munkájuk és szakdolgozatuk elkészítése közben csiszoljam oktatói, kutatásszervezési és témavezetői képességeimet.

Végül köszönettel tartozom barátaimnak és családomnak szeretetükért, támogatásukért és türelmes biztatásukért. Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok Gergőnek, aki miatt Szegedre kerültem, szerelméért, és különösen az utóbbi két évben biztosított támogatásáért és türelméért. Köszönöm!

A kutatás a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OKTA K105985, K111885, GINOP-2.3.2-15-2016-00015) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma által biztosított Nemzeti Tehetség Program (NTP-NFTÖ-17-B-0164) támogatásával valósult meg.