

## **Szakmai zárójelentés „A Caterpillar molekulák szerepe a szaruhártya természetes immunitásának kialakításában OTKA pályázathoz.**

### **A TÉMA HÁTTERE**

A Nod-like receptorok (NLR) (rég elnevezés: Caterpillar molekula család) intracelluláris mintázat felismerő receptorok, melyek patogénekre jellemző mintázatokat (PAMP) (pl. LPS, flagellin, dsRNS) vagy az extracelluláris ill. intracelluláris környezetből származó vészjeleket ismerik fel (azbeszt, húgysavkristályok, amiloid szemcsék). Működésük során legtöbbször fehérje komplexet alkotnak és közvetlenül (pl. IL-1 $\beta$ , IL-18) vagy közvetetten, szignál transzdukciós útvonalak szabályozása révén befolyásolja más citokinek ill. az immunválaszban résztvevő egyéb molekulák (pl. sejt felszíni markerek) kifejeződését. Mára már az is világossá vált, hogy az NLR útvonalak más mintázatfelismerő receptorokkal, így pl. a Toll-like receptorokkal (TLR) ill. Rig-like helikázokkal (RLH) is kommunikálnak.

Az NLR család intenzív kutatások középpontjában áll, mely kutatások folyamatosan és dinamikusan nőnek, ennek ellenére a családba tartozó 22 tag közül meglepően keveset karakterizáltak eddig. A már karakterizált tagokról azonban kiderült, hogy mindegyik kapcsolatba hozható valamilyen krónikus gyulladásos-, autoimmun- vagy daganatos megbetegedéssel (pl. Crohn-betegség, asztma, Alzheimer-kór, mellrák).

### **D) UV-B sugárzás hatása az NLR –ek expressziójára humán szaruhártya sejtvonalon**

Annak ellenére, hogy az NLR család kutatása intenzíven növekszik, az NLR-eknek a szem- és a szaruhártya immunfolyamataiban játszott szerepéről a mai napig nagyon keveset tudunk: az ide vonatkozó cikkek száma 10-nél kevesebb, s ezeknek nagy része nem humán, hanem egér modellből származik.

### **Eredmények:**

Az ide vonatkozó eredményeket nemzetközi folyóiratban publikáltuk. (Benko et al., Mol. Vision, 2007). Röviden összefoglalva:

1) Kimutattuk, hogy az inflammaszoma tagok közül a HCE-T (human corneal epithelial) sejtvonalban erősebben expresszálódik a Nalp3 szenzor, mint a fotorefraktív keratektomiából (PRK) származó primer korneális epitélisejtekben. Ezzel ellentétben azonban az ASC adaptor és a kaszpáz-1 enzim jelentősen gyengébben fejeződik ki a sejtvonalban.

2) Kísérleti eredményeink szerint a HCE-T sejtvonal nem termel IL-1 $\beta$  gyulladásos citokint, feltételezéseink szerint az ASC adaptor expresszió hiánya vagy a kaszpáz-1 enzim nagyon gyenge expressziója miatt.

3) Az NLR család Nod-alcsaládba tartozó tagjai közül az NLRC5 expresszióját nem sikerült detektálnunk a primer sejtekben, míg a Nod1, Nod2 és NLRX1 expressziója közel azonos volt az általunk vizsgált két sejt típusban.

4) Kimutattuk, hogy HCE-T sejtvonalban a Nalp-alcsalád tagjainak expressziója UV-B sugárzást követően 6 órával csökken, viszont 24 órával később az expresszió visszaáll az eredeti szintre. Ezzel ellentétben, a Nod-alcsalád tagjának expressziója mind 6-, mind 24 órával a sugárzást követően jelentősen csökkent.

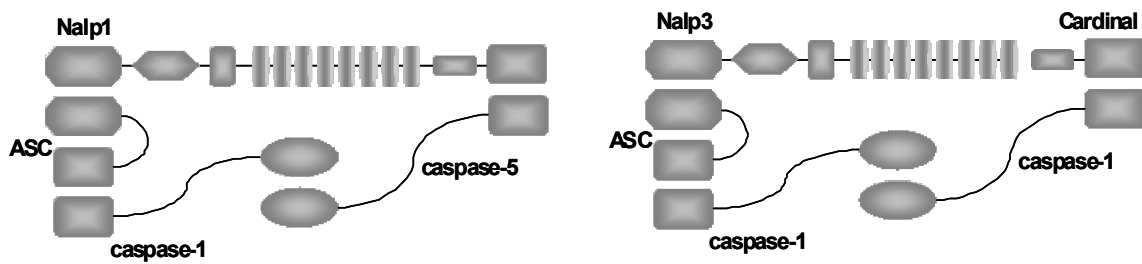
5) Western blot technika segítségével kimutattuk a Nod2 működését: Nod2-specifikus agonista hatására fokozza az I $\kappa$ B foszforilációját, így ez az útvonal megfelelően működik a HCE-T sejtvonalon.

## **II) Nod-like receptorok humán keratinocitákban**

Az eredeti munkatervtől eltérően a szem szaruhártyája mellett a bőr külső rétegét alkotó sejttípusban, a keratinocitákban is vizsgáltuk az NLR-ek lehetséges szerepét. Ennek fő oka az volt, hogy munkánk során kiderült, hogy a HCE-T sejtvonal nem fejezi ki az inflammoszoma bizonyos tagjait (1. ábra), így funkcionális vizsgálatokat nem tudunk végezni. Ezért kiépítettünk a Debreceni Egyetem Bőrklinikájával egy kollaborációt, melynek keretében hozzájuthattunk műtétből származó humán primer keratinocitákhoz.

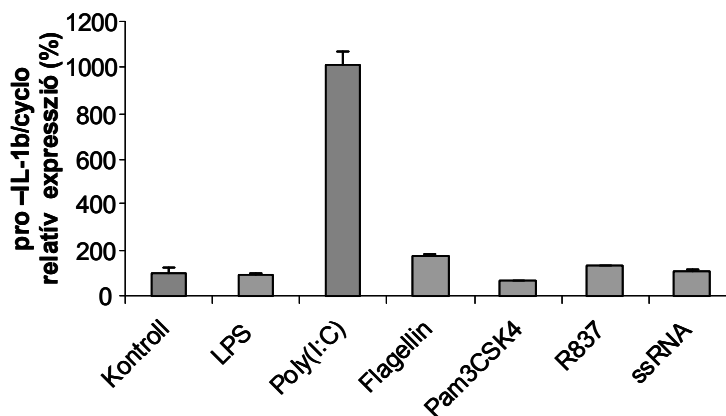
Az emberi bőr, hasonlóan a szemhez, amellet, hogy fizika határt képez a külvilág és a belső környezet között, immunológiai feladatokat is ellát. Az epidermis legjelentősebb alkotói a keratinociták, melyek képesek antigént prezentálni, citokineket és kemokineket termelni. Irodalomból ismert, hogy UV-B sugárzás során, ill. késői típusú túlérzékenységi reakcióban az inflammoszomák fontos szerepet játszanak a hatékony immunválaszok kialakításában. Bár a keratinocitáknak fontos szerepük van a primer és az ismétlődő fertőzések elleni védekezésben, a folyamat hátterében álló molekuláris mechanizmusok, ill. az NLR-ek lehetséges szerepe még kevésbé tanulmányozott.

## Eredményeink összefoglalva:



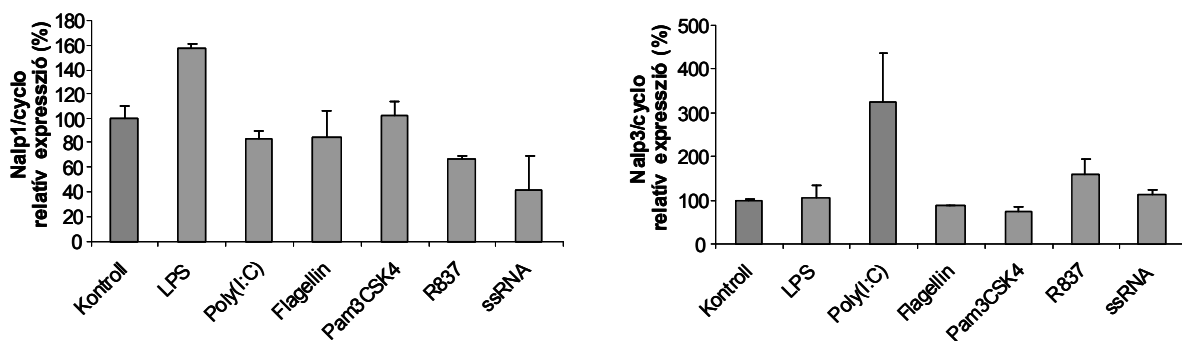
1. ábra. A Nalp1 és Nalp3 inflammoszoma felépítése.

1. ELISA módszerrel kimutattuk, hogy a keratinocitákat különböző TLR agonistákkal kezelve, egyedül a szintetikus dsRNS, poly(I:C) eredményezett IL-1 $\beta$  szekréciót. A TLR agonista kezelések hatására a pro-IL1 $\beta$  génexpresszióját szintén csak a poly(I:C) kezelés indukálta, melyet kvantitatív RT-PCR (Q-PCR) technikával mutattunk ki (2.ábra).



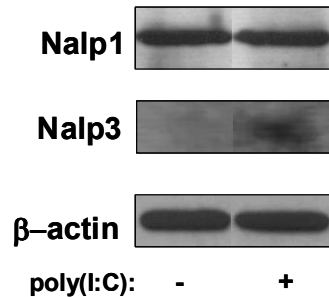
2. ábra. A pro-IL-1 $\beta$  expressziója TLR ligandok hatására, Q-PCR technikával mérve.

2. Kimutattuk, hogy a Nalp1 ill. Nalp3 szenzorok közül, míg a Nalp1 expressziója egyetlen általunk alkalmazott TLR agonista hatására sem indukálódott szignifikánsan, a Nalp3 expressziója mRNA szinten jelentősen fokozódott poly(I:C) kezelést követően (3. ábra).



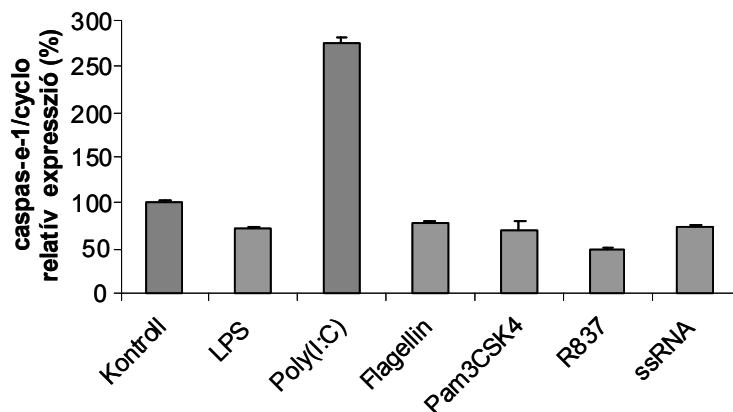
3. ábra. A Nalp1 és Nalp3 expressziója TLR ligandok hatására, Q-PCR technikával mérve.

3. Western-blot módszer segítségével fehérjeszinten is igazoltuk a Q-PCR méréssel kapott eredményeinket (4. ábra).



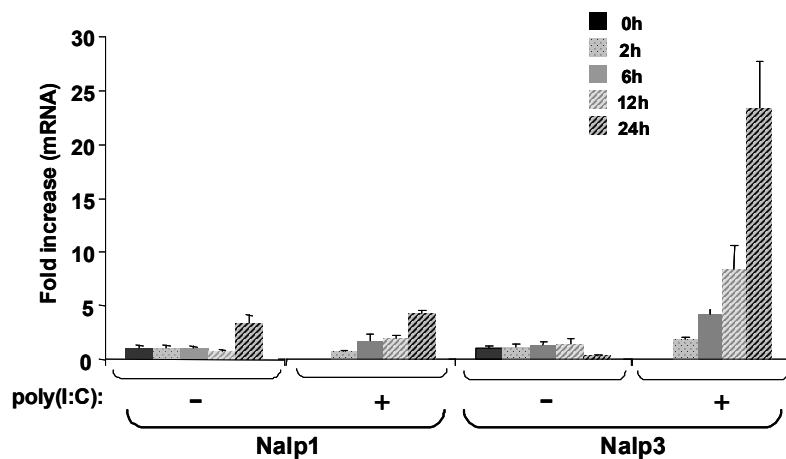
4. ábra. A Nalp1 és Nalp3 expressziója poly(I:C) kezelés hatására, Western blot technikával.

4. Kimutattuk, hogy a Nalp3-inflammoszoma kaszpáz-1 enzimjének expressziója, amely az inaktív pro-IL-1 $\beta$  aktív IL-1 $\beta$ -vá történő hasításáért felelős, szintén egyedül poly(I:C) kezelés hatására indukálódik (5. ábra).

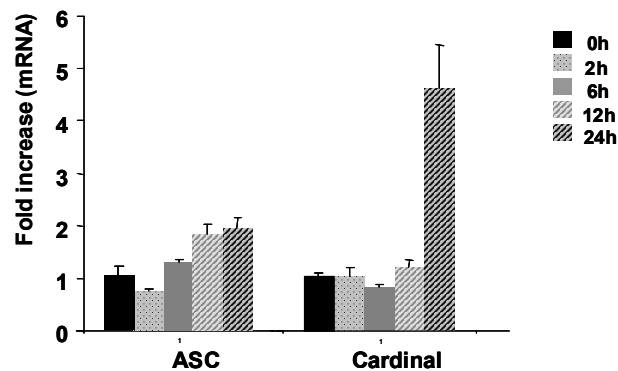


5. ábra. A kaszpáz-1 enzim expressziója TLR ligandok hatására, Q-PCR technikával mérve.

5. Időfüggő kezeléseket végezve kimutattuk, hogy a Nalp3 expressziója génszinten már korai időpontban, a kezelést követő 2. órában indukálódik, s az expresszió az idővel arányosan fokozódik (6. ábra). Az adaptor molekulák vizsgálata során azt az eredményt kaptuk, hogy az ASC szintje 24 óra alatt alig kétszeresére nő poly(I:C) kezelés hatására (7. ábra), míg ez a kezelés a Cardinal esetében jelentős expresszó fokozódást eredményezett, de csak a késői időpontban, ami felveti azt a lehetőséget, hogy ebben az esetben nem a poly(I:C) közvetlen hatása eredményezi a jelenséget.



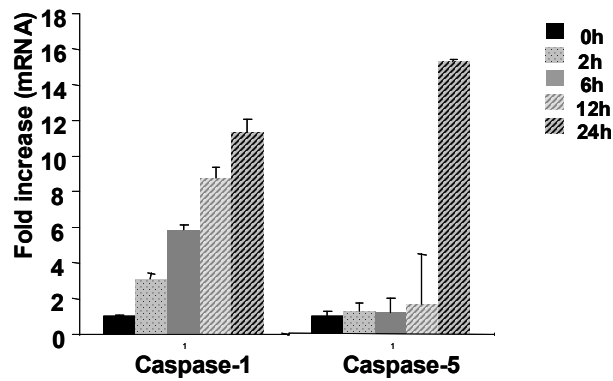
6. ábra. A *Nalp1* és *Nalp3* expressziója az idő függvényében *poly (I:C)* kezelést követően, *Q-PCR* technikával mérve.



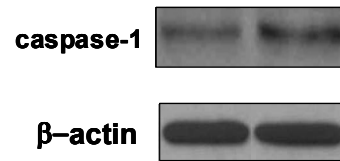
7. ábra. Az *ASC* és *Cardinal* expressziója az idő függvényében *poly (I:C)* kezelést követően, *Q-PCR* technikával mérve.

7. Az inflammoszomát alkotó enzimek expressziójának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy míg a kaspáz-1 expressziója gén szinten már 2 óra után indukálódik és 24 óráig ez fokozatosan növekszik, addig a kaspáz-5 csak 24 óra elteltével mutat expresszió fokozódást, ami feltehetően közvetett hatás eredménye (8/A. ábra). A kaspáz-1 expressziójának fokozódását fehérje szinten Western blot segítségével is kimutattuk (8/B ábra).

A)

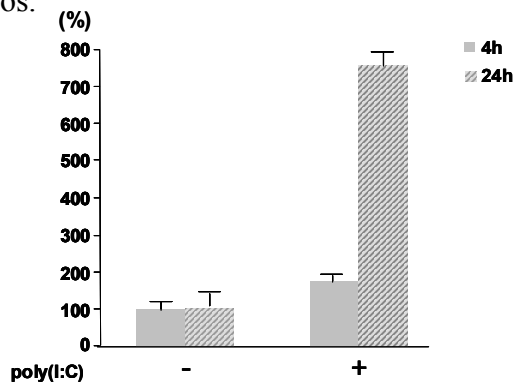


B)

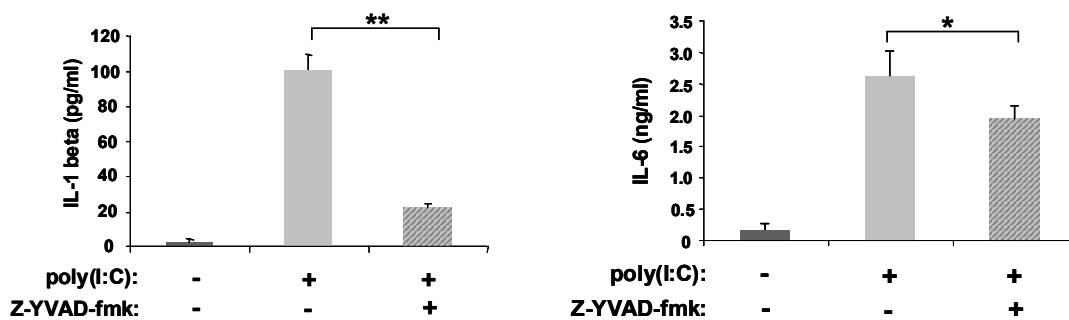


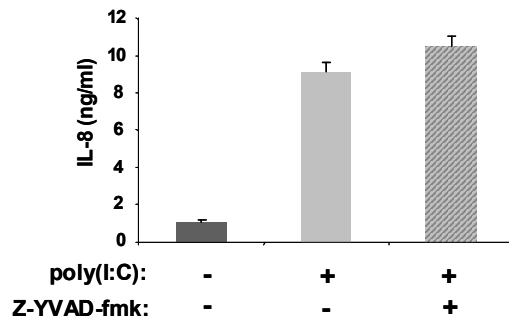
8. ábra. A caspase-1 és a caspase-5 enzimek expressziója. A) Az enzimek expressziója az idő függvényében poly (I:C) kezelést követően, Q-PCR technikával mérve. B) A caspase-1 enzim expressziója 24 órás poly(I:C) kezelést követően, Western blot technikát alkalmazva.

8. Fluoreszcens szubsztrát felhasználásával kimutattuk, hogy a kaszpáz-1 enzim aktivitása jelentősen fokozódik poly(I:C) kezelés hatására (9. ábra). Kaszpáz-1 specifikus inhibitor (Z-YVAD-fmk) alkalmazva az IL-1 $\beta$  szekrécióban jelentős csökkentést tapasztaltunk (10. ábra), ami bizonyítja, hogy a keratinocitákban a poly(I:C) kezelést követő IL- $\beta$  termelésért a kaszpáz-1 enzim a felelős.



9. ábra. A caspase-1 enzim aktivitás mérése poly(I:C) kezelést követően.



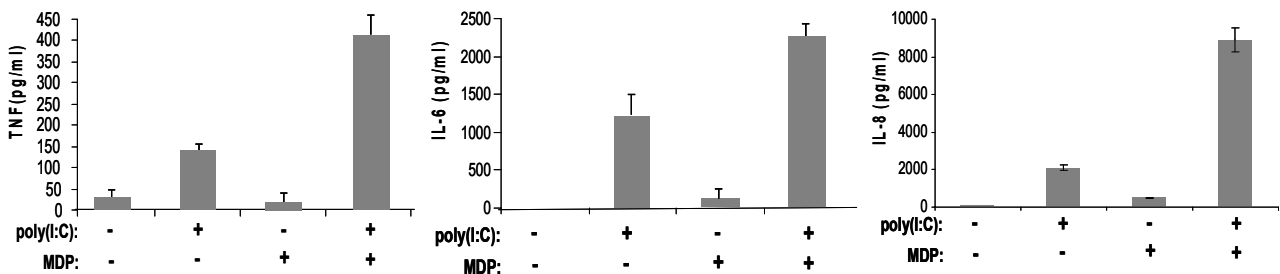


10. ábra. Caspase-1 inhibitor hatása a poly(I:C) kezelést követő citokin termelésre, ELISA módszerrel mérve.

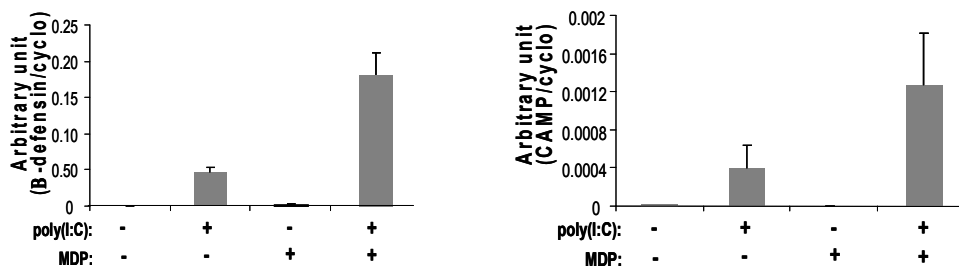
9. A Nod2 expresszióját siRNS-sel csendesítve nem változott az IL-1 $\beta$  szekréciója poly(I:C) kezelés hatására a kontroll (scramble) mintákhoz képest, míg a Nalp3 expressziójának csendesítését követően a poly(I:C) kezelést nem okozott akkora IL-1 $\beta$  termelést, mint a kontroll minták poly(I:C) kezelése. Jelenleg ezeket a méréseket ismételjük.

10. Előző kísérleteinkben kimutattuk, hogy poly(I:C) kezelést követően indukálódik a Nod2 expressziója, ezért megvizsgáltuk, hogy poly(I:C) kezelést követő Nod2 specifikus ligand (MDP) kezelés hatására változik-e a keratinociták citokin termelése. Eredményeink szerint poly(I:C)-vel és MDP-vel egyidejűleg kezelve a keratinocitákat, szinergista módon fokozódik az IL-6, IL-8 és TNF citokinek termelése (12/A. ábra), valamint indukálódik a  $\beta$ -defensin és a CAMP antimikrobiális peptidek génjeinek expressziója (12/B ábra).

A)



B)



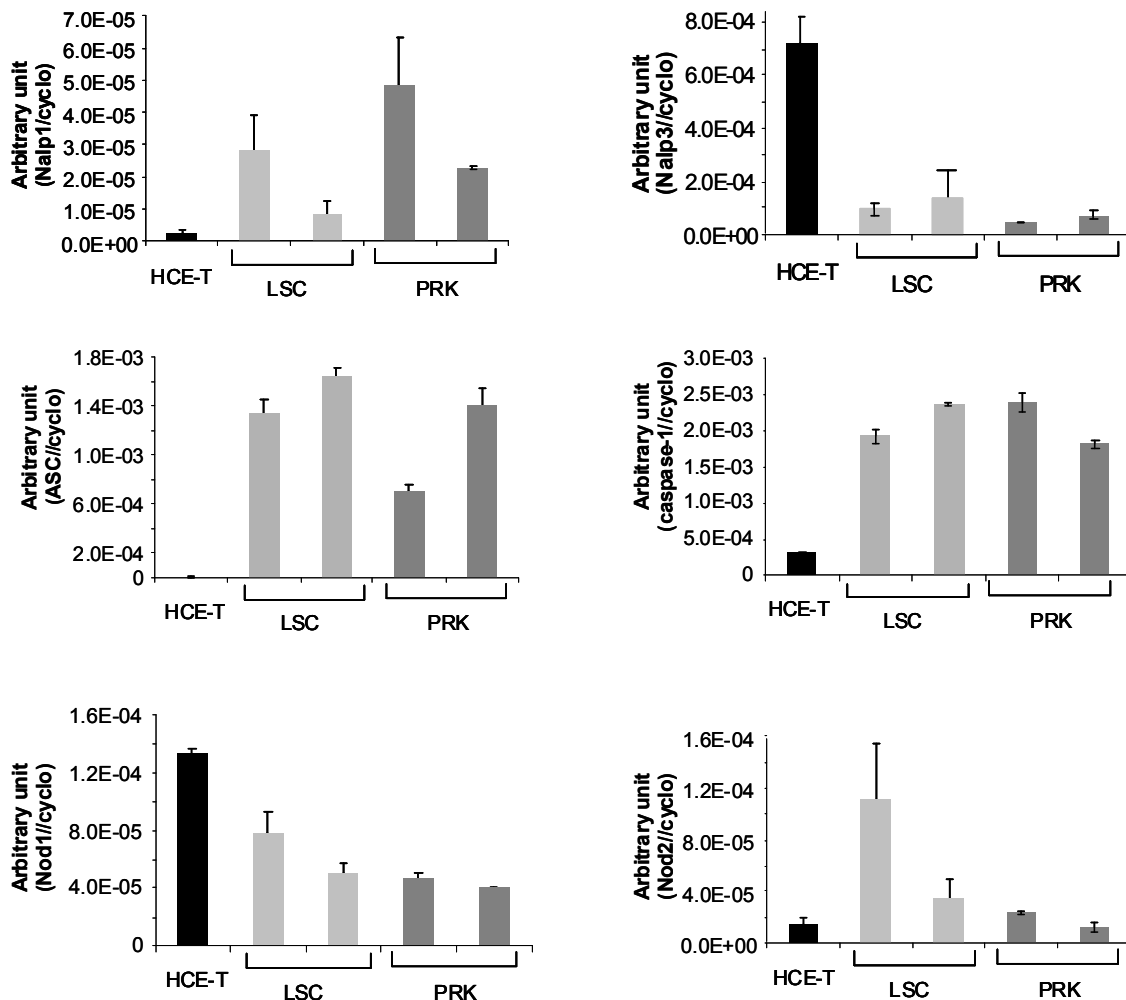
12. ábra. Poly(I:C) és MDP közös kezelés hatása. A) Gyulladásos citokinek termelése, ELISA módszerrel mérve. B) Antimikrobiális peptidek génexpressziójának indukálása, Q-PCR módszerrel mérve.

Jelenleg a kezelések hatására aktiválódó szignál transzdukciós útvonalakat (NF $\kappa$ B, p38MAPK) vizsgáljuk Western-blot technikával. Terveink szerint ezen vizsgálatok után eredményeinkből kéziratot készítünk publikálás céljára.

### III) Nod-like receptorok humán limbális őssejtekből (LSC) származó korneális epítél sejtekben (szaruhártyában).

Az utóbbi hónapokban lehetőségünk nyílt arra, hogy a Debreceni Egyetem Szemklinikájával együttműködve limbális őssejtekből differenciáltatott szaruhártyán vizsgáljuk a Nod-like receptorok expresszióját és működését.

1. Eredményeink szerint a limbális őssejtekből differenciáltatott (LSC) minták NLR expressziója összevethető módon hasonlít a photorefractive ceratectomia-ból (PRK) származó minták NLR expressziójával.

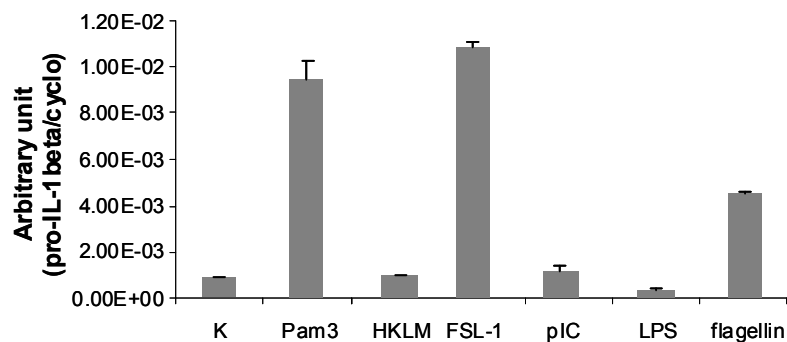


13. ábra. NLR-ek alapexpressziójának összehasonlítása HCE-T sejtvonalonban, limbális őssejtekből differenciálódott cornealis epítél sejtekben (LSC) ill. photorefractive keratectomiából származó sejtekben, Q-PCR módszerrel mérve.



2. Ismert, hogy a szemfertőzések leggyakoribb bakteriális kórokozója, a *Pseudomonas aeruginosa* L-1beta termelést indukál fertőzés során. Annak kiderítésére, hogy az NLR család tagjainak a szerepük lehet-e a szaruhártya fertőzést követő immunfolyamatokban, a Debreceni Egyetem Mikrobiológia Intézetével kollaborációban beállítottuk az LSC sejtekből származó epitelsejtek *Ps. aeruginosa*-val történő fertőzését. ELISA módszer felhasználásával kapott eredményeink szerint az *in vitro* fertőzött sejtek jelentős mennyiségű IL-1 $\beta$  citokint termelnek. Irodalmi adatok szerint a makrofágok és dendritikus sejtek *Ps. aeruginosa*-val történő fertőzése során az NLR családba tartozó IPAF-inflammoszóma közvetíti az IL-1 $\beta$  termelést. Q-PCR technikával vizsgálva LSC és PRK mintákban azonban nem tudtuk detektálni az IPAF expresszióját (pozitív kontrollként makrofág sejteket használtunk). Ez felveti azt a lehetőséget, hogy szaruhártya sejtekben a *Ps. aeruginosa* fertőzés során tapasztalható IL-1 $\beta$  termelésért más, feltételezésünk szerint a Nalp3-inflammoszóma felelős. Annak kiderítésére, hogy a Nalp3 szerepet játszik-e a fertőzés során tapasztalt IL-1 $\beta$  termelésben, a Nalp3 siRNS-sel történő csendesítését tervezzük. Jelenleg ennek a módszernek a beállítását végezzük.

3. A baktériummal történő fertőzés során számos TLR aktiválódik egyszerre, ezért annak kiderítésére, hogy melyik TLR ligand aktiválás indukálja gén szinten a pro-IL-1 $\beta$  expresszióját, TLR specifikus ligandokkal egyenként kezeltük az LSC eredetű epitél sejtet (14. ábra).



14. ábra. Pro-IL-1 $\beta$  génexpressziója TLR ligandkezelést követően, Q-PCR technikával mérve.

Eredményeink szerint a bakteriális strukturákra jellemző Pam3 (TLR1/2), FSL-1 (TLR2/6) és flagellin (TLR5) szignifikánsan fokozta a pro-IL-1 $\beta$  génexpresszióját, míg a HKLM (TLR2), poly(I:C) (TLR3) és LPS (TLR4) nincs hatással (14. ábra). Érdekes módon azonban ezek a kezelések önmagukban nem eredményeztek IL-1 $\beta$  citokin szekréciót. Ez azt jelenti, hogy a

szaruhártya sejtekben, hasonlóan az irodalomban számos esetben publikált megfigyeléshez, az IL-1 $\beta$  citokin szekréciójához 2 szignál szükséges: 1. szignál: indukálja a pro-IL-1 $\beta$  génexpresszióját, 2. szignál: összeáll az inflammoszoma, aktiválódik a kaspáz-1 és hasítja az inaktív pro-IL-1 $\beta$ -t aktív IL-1 $\beta$ -vá, ami azután szekretálódik a sejtből.

Eredményeinket összefoglalva azt mondhatjuk, hogy mind a primer keratinocitákban, mind a primer szaruhártya sejtekben kifejeződnek a Nalp3 inflammoszoma alegységei és a komplex bizonyos kezelések hatására aktiválható. Fontos megfigyelésünk ugyanakkor az, hogy annak ellenére, hogy mindkét epitel típus testfelszíni epitel, a TLR ligand kezelések hatására jelentős eltéréseket tapasztaltunk a két sejt típus aktiválásában. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a szem szaruhártyájának védekezését és immunfolyamatainak működését egy könnyfilm is segíti, ami a bőrnél hiányzik.