

ZÁRÓ BESZÁMOLÓ

A jelen pályázatban egy gyakori multifaktoriális, krónikus gyulladással járó bőrbetegség, a pikkelysömör kialakulásában szerepet játszó immunológiai mechanizmusokat, valamint a bőr homeosztázisában bekövetkező alapvető eltérések alapjait vizsgáltuk. A záró beszámolót a pályázatban megadott tematikus bontás szerint készítettük el.

I. Abnormális keratinocita proliferációs és differenciációs szabályozó folyamatok azonosítása és vizsgálata a pikkelysömörös nem léziós epidermiszben

I/A. A D-típusú ciklinek szerepének vizsgálata a keratinociták proliferációs és differenciációs folyamataiban

A D-típusú ciklinek, de különösen a D1 ciklin jelentőségét a pikkelysömör pathogenezisében több irodalmi adat, köztük kutatócsoportunk eredményei is kiemelik (Belső és mtsai, 2007; Sano és mtsai, 2005; Masuda és mtsai, 2002)

Korábbi kísérleteinkben a D típusú ciklinek mRNS szintű kifejeződését csendesítettük HaCaT keratinocitákban. Az egyes ciklinek expressziójának csökkenése nem befolyásolta a sejtek alakját, morfológiáját vagy proliferációs képességét, azonban két, illetve három D ciklin hiányában nagy, multinukleált sejtek jelentek meg a sejt kultúrában, amelyek a propidium jodid alapú sejt ciklus analízis szerint a S-G2 fázisban akkumulálódtak.

Mindez arra utal, hogy a D típusú ciklineknek a sejt ciklus G2-M fázisának szabályozásában is szerepe van. Az erősen osztódó hámsejtekre jellemző marker, az alfa5 integrin és a K1/K10 differenciációs marker kifejeződésében nem találtunk különbséget a kontroll sejtekhez viszonyítva a többmagvú sejtekben sem.

A PCR módszeren alapuló *Human Cell Cycle Superarray Kit* segítségével 84 proliferáció-, sejt ciklus asszociált gén közül, a kettős és hármas D ciklin specifikus csendesítés során többek között a CDC20 és a Ki67 gén kifejeződésében mutatkozott szignifikáns csökkenés. A Ki67 legnagyobb mennyiségben a sejt ciklus G2/M fázisában van jelen a sejtekben, nagyon széles körben használt marker a sejtek proliferatív statusának megítélésére, de funkciója részleteiben kevésbé ismert.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a jól ismert G1-S fázisban betöltött szabályozó szerepük mellett a D ciklinek a Ki67 gén expressziójának szabályozásán keresztül részt vesznek a mitózis szabályozásában is.

A fenti adatok ismeretében tovább vizsgáltuk a D ciklin-Ki67 kapcsolatot, Ki67 csendesített sejtekben megvizsgáltuk a D típusú ciklinek génszintű kifejeződését. Eredményeink alapján a Ki67 gén mRNS szinten történő specifikus csendesítését követően a D ciklin gének kifejeződése nem változott a kezeletlen kontroll és kontroll RNS-sel transzfektált sejtekhez viszonyítva. Úgy tűnik tehát, hogy a D ciklinek szabályozzák a Ki67 gén kifejeződését, de a Ki67 fehérje nem befolyásolja a D ciklinek expresszióját. Ugyanakkor a Ki67 gén csendesítését követően, a D típusú ciklinek együttes kiütéséhez hasonló, aberráns morfológiájú, óriás többmagvú sejtek megjelenését észleltük. Ez alapján feltételezhető a Ki67 fehérje funkcionális szerepe a sejtek G2/M fázisában.

A munka jelentőségét a keratinociták viselkedésének jobb megértésén túl, a Ki67 szerepének tisztázása adja. A Ki67 fehérje sejt ciklusban betöltött funkcióját ezért tovább vizsgáltuk egy olyan kísérletben, ahol magas és alacsony Ki67 fehérje szint mellett csendesítettük a D ciklinek kifejeződését, majd a sejtek morfológiáját tanulmányoztuk. Abban a sejt kultúrában, ahol magas Ki67 expresszió mellett végeztük el a D ciklinek csendesítését, a nagy multinukleált sejtek aránya közel azonos volt az kontroll RNS-sel transzfektált kultúrákhoz viszonyítva, míg az alacsony Ki67 kifejeződés mellett történt a D ciklinek

csendesítés során a multinukleált sejtek száma szignifikánsan emelkedett volt. Ez alapján arra következtetünk, hogy a magas Ki67 expresszió a D ciklin csendesítés mellett is megakadályozza, hogy kialakuljon a citokinézis zavara, biztosítva a mitózis zavartalan lefolyását.

Eredményeinket egy kéziratban foglaltuk össze, amely jelenleg bírálattal van.

I/B. A neurophilin-1 (NRP) szerepének vizsgálata a hámsejtekben

Az NRP1 fehérjéről korábbi adatok alapján már ismert volt, hogy a VEGF (vascular endothelial growth factor) és a SEMA (semaforin) típusú tirozin-kináz receptorok ko-receptora, mely fontos szerepet játszik különféle biológiai folyamatokban; angiogenezis, axon guidance, sejt-vándorlás, életképesség, invázió (Chen, 2005; Kolodkin, 1997). Ezen folyamatok szabályozása során különféle jelátviteli utakkal működhet együtt (Wang, 2008). Arra vonatkozóan, hogy milyen szerepe lehet keratinocitákban azonban korábban nem rendelkezünk adatokkal.

Munkánk során ezért célul tűztük ki az NRP1 gén kifejeződésének és szerepének vizsgálatát *in vitro* tenyésztett hámsejtekben, és különféle bőrbetegségek kialakulása során.

Ehhez először a neurophilin-1 (NRP1) gén expressziójának proliferáció és differenciáció függését vizsgáltuk különféle keratinocita modell rendszerekben: szinkronizált HaCaT sejtekben, illetve magas kalcium koncentráció hatására differenciálódó normál humán keratinocitákban (NHEK).

Valós idejű RT-PCR kísérleteink eredményei szerint az NRP1 gén kifejeződése az osztódó hámsejtekben a legmagasabb szintű, és a keratinociták differenciációjának előrehaladtával nagymértékben csökken.

Ezt követően immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, melynek során az NRP1 fehérje kifejeződését és festődési mintázatát vizsgáltuk hiperproliferatív bőrbetegségekben (pikkelysömör, basalioma és laphám carcinoma). A mintákban az NRP1 mellett az ismert proliferációs marker, a Ki67 festését is elvégeztük. Eredményeink alapján az NRP1 mindhárom vizsgált bőrbetegségben a Ki67 proliferációs markerhez hasonló mintázatot adva, feltételezhetően a hiperproliferáló hámsejtekben fejeződött ki legmagasabb szinten. A pikkelysömör esetében már a betegek makroszkópicusan egészségesnek tűnő, tünetmentes bőrében is fokozott kifejeződést találtunk, mely a plakkok területén tovább emelkedett.

A fenti eredményeink alapján elsőként sikerült igazolni az NRP1 szerepét a keratinociták proliferációs folyamataiban, mely adatokat közleményben foglaltunk össze (Nagy N, Farkas K, Bacsá S, Nemeth IB, Bata-Csorgó Z, et al. (2013) *NRP1 Activates NF- κ B Signaling Pathway and Initiates Proliferation in Keratinocytes. Int J Genomic Med 1: 102. c).*

II. A pikkelysömör immunszabályozása

II/A. In vitro rendszer fejlesztése szövetspecifikus hatások modellezésére az effektor és a regulátoros T sejtek fejlődése és működése során egészséges és pikkelysömörös bőrben

A regulátoros T sejtek szerepe igen nagy jelentőséggel bír a különféle autoimmun és gyulladással járó kórképek kialakulásában (Maloy és mtsai, 2001; Baecher-Allan és mtsai, 2004). Korábbi munkánk során megmutattuk, hogy a pikkelysömörös CD4+CD25+ regulátoros T sejtek (Treg) funkcionálisan nem működnek megfelelően (Sugiyama, Gyulai és mtsai, 2005).

Célunk volt egy olyan *in vitro* rendszer felállítása, amely segítségével képesek leszünk megvizsgálni a bőrben lezajló komplex immunológiai folyamatok közül a Treg sejteket érintő kérdéseket. Ehhez egészséges önkéntesektől és psoriasisos betegektől származó perifériás

vérből T sejteket izoláltunk, illetve normál és psoriasisos humán keratinocytákat szeparáltunk. A T sejtekből további lépésekkel effektor (CD4+CD25-), illetve szabályozó (CD4+CD25+CD127-) Treg sejteket izoláltunk.

Az alprojekthez kapcsolódóan elsőként az effektor (CD4+CD25-) illetve szabályozó (CD4+CD25+CD127-) T sejtek interleukin-1 receptor expressziójának jellemzését végeztük el, feltételezve, hogy ezen struktúrák központi szerepet játszanak a bőr komplex gyulladási folyamatainak irányításában.

Az egészséges és pikkelysömörös CD4+ T sejtek sejtfelszíni IL1R1 és IL1R2 expresszióját áramlási citométerrel határoztuk meg. A mágneses alapú negatív szelekciót követően a CD4+ populáción belül elkülönítettük a naív, a memória, valamint a Treg szubpopulációit CD45RO és CD25 jelöléseket alkalmazva. A sejteket két napon keresztül aktiváltuk IL-2 jelenlétében anti-CD3/CD28 gyöngyök segítségével. Az aktivált CD4+ T sejtekben a szubpopulációk elkülönítésére a CD45RO és GARP fehérjéket jelöltük meg, a sejtfelszíni GARP kifejeződés aktivált Treg sejtekre jellemző (Wang és mtsai, 2009). A Treg sejtekben az aktivációt követően igen nagymértékben emelkedett az IL1R1 és az IL1R2 pozitív sejtek aránya mind a pikkelysömörös, mind az egészséges mintákban. A receptorok expressziójának intenzitásának összehasonlítását is elvégeztük, amelyhez a pozitív sejtek fluoreszcencia intenzitását vettük alapul. A funkcionális IL1R1 fehérje sejtfelszíni kifejeződésének intenzitása szignifikánsan magasabb volt pikkelysömörös Treg sejtekben az egészséges Treg-hez képest ($P < 0,05$). Pikkelysömörös Treg-ben az aktivációt követően nem figyeltünk meg változást a pozitív sejtek fluoreszcencia intenzitásában. Egészséges Treg sejtekben jelentősen emelkedett az IL1R1 expresszió intenzitása az aktivációt követően ($P < 0,05$). A decoy IL1R2 intenzitása hasonlóan változott, de a megfigyelt különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

Ezzel párhuzamosan perifériás vérmintákat gyűjtöttünk egészséges önkéntesektől és pikkelysömörös betegektől abból a célból, hogy a vérből szeparált Treg sejteken összehasonlítsuk az IL-2, a TGF β , az IL-10 és a FOXP3 gének expressziójának változását IL-1 β kezelés hatására.

A rendelkezésünkre álló áramlási citométerrel végzett Treg szeparálás során nem jutottunk megfelelő mennyiségű sejthez a valós idejű PCR vizsgálatokhoz. Anti-CD25 konjugált mágneses gyöngyökkel nagymértékben dúsítottuk a Treg populációt, amely ugyan elmarad a kívánt tisztaságtól (40-70% CD25 magasan pozitív sejtek aránya), azonban összehasonlítva a CD25-, Treg sejteket nem tartalmazó mintákkal jelentős különbség volt kimérhető a nyugvó Treg sejtekre jellemző FOXP3 mRNS szintű kifejeződésében. A Treg dúsított sejteket két napon keresztül aktiváltuk 10 U/ml IL-2 jelenlétében anti-CD3/CD28 gyöngyökkel (ACT). Az aktivált sejtek egyik felét 10 ng/ml IL-1 β citokinnel kezeltük (ACT/IL1). Kontrollként nem aktivált mintákat is vizsgáltunk, amelyet csak IL-2 citokinnel kezeltünk. Két nap elteltével a sejtekből totál RNS-t izoláltunk majd cDNS szintézist követően valós idejű PCR segítségével mértük meg a FOXP3, TGFB, IL-2 és IL-10 gének kifejeződését. Egészséges személyekből (n=3) származó Treg sejtekben a FOXP3 mRNS szintje az aktiválás hatására jelentősen nőtt (4-14-szeres emelkedés). Az IL-1 β kezelés mellett további igen kismértékű, nem jelentős emelkedés volt megfigyelhető. A TGFB gén kifejeződése nem változott az aktiváció hatására, illetve egyik donor esetén a kontrollhoz képest 30,99%-ra (ACT) és 23,65%-ra (ACT/IL1) csökkent. Az IL-2 gén kifejeződése nagymértékű indukciót mutatott aktiválást követően, az IL-1 β kezelés mellett további 2,98-szoros emelkedés jelentkezett az ACT-hoz képest. Az IL-10 gén kifejeződését nem tudtuk kimutatni sem a kontroll, sem az aktivált mintákban, azonban IL-1 β hatására az esetek többségében kismértékben indukálódott a gén expressziója. Pikkelysömörös betegekből származó sejtekben a FOXP3 és az IL-2 gének kifejeződése hasonlóan alakult az aktiváció és az IL-1 β hatására, ugyanakkor az IL-2 esetében az egészséges Treg-hez képest jóval

magasabb mRNA szintet detektáltunk már a kontrollban is, ami tovább nőtt aktiváció hatására. A TGF β gén expressziójában az egészséges Treg-el ellentétben emelkedést figyeltünk meg az aktiváció hatására, erre az IL-1 β nem volt hatással.

A fenti eredményeinket egy közleményben foglaltuk össze, amely a *Mediators of Inflammation* c. lapban jelent meg (Bebes A, Kovács-Sólyom F, Prihoda J, Kui R, Kemény L, Gyulai R: *Interleukin-1 receptors are differentially expressed in normal and psoriatic T cells. Mediators Inflamm (2014) 2014:472625*)

II/B. Az egyes TL1A (TNFSF15) izoformák, és a DR3 (TNFRSF25) receptor kifejeződésének, és a pikkelysömör patogenezisében betöltött jelentőségének vizsgálata

A TL1A (TNFSF15) gén a TNF szupercsalád egy jól ismert tagja, receptora a DR3 (TNFRSF25) molekula, amely pedig a TNF receptor szupercsaládba tartozik. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a DR3/TL1A rendszer fontos szerepet játszik különféle krónikus gyulladásos betegségek, mint pl. a Crohn betegség patogenezise során, a kóros Th1 immunpolarizáció létrejöttében (Wen, 2003). Emellett mindkét faktor aberráns kifejeződését igazolták rheumatoid arthritisben is, valamint a DR3 lókuszt duplikációja az 1-es kromoszómán is gyakrabban fordul elő ugyanebben a betegségben (Osawa, 2004).

Valós idejű PCR kísérletekre alkalmas primer szettekter terveztünk a TL1A molekula három izoformájának specifikus detektálására. A TL1A/198 és TL1A/174 izoformák expressziója alig volt detektálható a pozitív kontroll endotél sejtvonalakból izolált mintákon. Irodalmi adatok alapján a fő izoforma, a TL1A/251 kifejeződésének van fiziológiai jelentősége (Mück és mtsai, 2010), ezért a másik két izoformát a továbbiakban nem vizsgáltuk.

Pikkelysömörös betegek tünetes és tünetmentes bőrmintáin, valamint imiquimoddal kezelt egerek pikkelysömörhöz hasonló tüneteket mutató bőrén fluoreszcens és normál immunhisztokémiai módszerrel detektáltuk a TL1A, valamint receptora a DR3 kifejeződését. Fluoreszcens immunfestés segítségével kimutattuk a TL1A fehérje nagymértékű expresszióját pikkelysömörös tünetes és tünetmentes dermiszben. Egészséges személyek bőrből származó mintákban a TL1A fehérje alig kimutatható mértékben van jelen. A pikkelysömörös tünetes epidermiszben és dermiszben a DR3 receptor számos sejten kifejeződik. Morfológiájuk alapján ezek a sejtek különféle immunsejtek lehetnek, például limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek.

A CD3/DR3 markerekkel végzett kettős immunfluoreszcens jelöléssel megmutattuk, hogy a T-limfocitákon (CD3 pozitív sejteken) csak nagyon kismértékben, vagy egyáltalán nem detektálható a DR3 receptor a pikkelysömörös léziós bőrben az epidermiszhez közeli régiókban, itt leginkább antigén prezentáló sejtek fejezték ki a fehérjét. A dermisz mélyebb rétegeiben elhelyezkedő főként CD4 pozitív helper T sejtekből álló sejtcsoportokban elsősorban megtalálható CD3/DR3 kettős pozitív T sejt.

Kimutattuk, hogy a tenyésztett normál humán keratinociták szolubilis formában szekretálják a TL1A citokint az extracelluláris térbe, ezt azonban TNF α citokinnel való kezelés nem befolyásolta.

Ismert, hogy a TL1A molekulával kapcsolatba hozott kórképek, valamint a pikkelysömör kialakulása során zajló patogén folyamatok között sok hasonlóság figyelhető meg, ezért a TL1A gén öt egynukleotidos polimorfizmusának (SNP) vizsgálatát kezdtük, melyekről már korábban megmutatták, hogy gyulladásos bélbetegséggel asszociációt mutatnak (Picornell, 2007).

Munkánk során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a TNFSF15 kiválasztott SNP-inek (rs3810936, rs6478108, rs6478109, rs7848647, rs7869487) és ezek speciális kombinációinak

(haplotípus) szerepe van-e a pikkelysömör és az arthritis psoriatica betegségekre való hajlam kialakításában.

Ehhez 219 pikkelysömörös, 105 arthritis psoriaticás beteg, és 200 egészséges kontroll DNS mintájának felhasználásával meghatároztuk az öt pozícióban az egyének genotípusát specifikus TaqMan próbák alkalmazásával PCR alapú módszerrel. A kapott eredmények alapján három haplotípust (A,B,C) azonosítottunk, majd az egyes SNP-k alléljainak, illetve a haplotípusok előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk a különböző csoportokban.

Eredményeink arra utalnak, hogy az rs6478109 SNP genetikai kockázati tényező, ($p=0,005$), míg a C haplotípus védő genetikai faktorként szerepelhet a pikkelysömör kialakulásában. Adatainkat közleményben foglaltuk össze, melyet a Human Immunology című lapban közöltünk (Képiró L, Széll M, Kovács L, Keszthelyi P, Kemény L, Gyulai R. Genetic risk and protective factors of TNFSF15 gene variants detected using single nucleotide polymorphisms in Hungarians with psoriasis and psoriatic arthritis. *Hum Immunol.* 2014 Feb;75(2):159-62. doi: 10.1016/j.humimm.2013.11.006.).

III. A pikkelysömör molekuláris patogenezisének vizsgálata

III/A. A pikkelysömörös tünetmentes bőrben emelkedett kifejeződést mutató PRINS nem-kódoló RNS (ncRNS) gén szerepének vizsgálata, és interakciós partnereinek azonosítása a keratinociták apoptotikus folyamataiban

A PRINS ncRNS gént egy 2000-ben készített „differential display” kísérlet során azonosítottuk, melyben az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes epidermisz génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze. További vizsgálataink során megmutattuk, hogy a PRINS mRNS molekula fontos szerepet játszik a keratinociták stresszválaszában (Sonkoly, 2005). Expressziója azonban nem korlátozódik erre a sejttípusra, hiszen számos más egyéb szövetben sikerült igazolni a jelenlétét.

További vizsgálataink során célunk a PRINS kifejeződésének részletes jellemzése, és a sejtekben betöltött funkciójának, valamint interakciós partnereinek azonosítása volt.

Ehhez részletesen elemeztük a PRINS expresszióját HaCaT sejtekben és normál humán keratinocitákban is, valamint megmutattuk, hogy ez az ncRNS feltehetően nem az NF-kappaB jelátviteli út tagjaként vesz részt a különféle külső noxák hatására induló celluláris stresszválasz szabályozásában. Ezen eredményeinket közlemény formájában is megjelentettük (Bari L, Bacsa S, Sonkoly E, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M. Comparison of stress-induced PRINS gene expression in normal human keratinocytes and HaCaT cells. *Arch Dermatol Res.* 2011 Dec;303(10):745-52. doi: 10.1007/s00403-011-1162-8.).

Ezt követően olyan gének azonosítását végeztük, melyek a PRINS szabályozása alatt állhatnak. Ehhez génspecifikus csendesítést végeztük HeLa sejtekben, majd cDNS microarray vizsgálatokban olyan géneket kerestünk, melyek kifejeződése megváltozott a kontroll sejtekhez viszonyítva. Az egyik ilyen génnek a G1P3 bizonyult, mely egy anti-apoptotikus hatású interferon indukálta faktor. A G1P3 pikkelysömörben betöltött szerepét célzó kísérleteink eredményeit közleményben foglaltuk össze (Szegedi K, Sonkoly E, Nagy N, Németh IB, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M. The anti-apoptotic protein G1P3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS. *Exp Dermatol.* 2010 Mar;19(3):269-78. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01066.x.).

Később olyan molekulákat is kerestünk, melyek fizikailag képesek kölcsönhatásba lépni a PRINS RNS-sel. Ribonukleoprotein inzuláló kit segítségével *in vitro* kísérletekben MALDI-TOF módszerrel azonosítottuk a nucleophosmin (NPM) fehérjét, mely egy olyan nukleáris foszoprotein, mely folyamatosan a citoplazma és a sejtmag között mozog. Ezt követően célunk annak tanulmányozása volt, hogy vajon a NPM fehérje stresszindukált intracelluláris eloszlását szabályozza-e a PRINS ncRNS. siRNS módszerrel történő csendesítést követően különböző technikákkal (NPM-GFP fúziós fehérje vándorlásának detektálás és NPM

immunhisztokémia) követtük, hogy a PRINS gén expressziójának csökkenése befolyásolja-e az NPM sejtmagvacskából sejtmagba, ill. citoplazmába történő migrációját HaCaT és HPV-KER sejtekben. Ezek a kísérleteink egymást megerősítő eredményeket szolgáltatottak: a PRINS nem-kódoló RNS kifejeződésének csendesítése visszatartó (retenciós) hatással volt az NPM fehérje UV-indukcióra bekövetkező magvacskából a magplazmába, majd azt követően a citoplazmába történő vándorlására. Ezzel egyértelműen bizonyítottnak tekintjük, hogy a PRINS nem-kódoló RNS nem csupán fizikai, de funkcionális kapcsolatban is áll a sejtek stressz válaszában alapvető szerepet betöltő NPM fehérjével. Eredményeinket közleményben összesítettük (Szegeci K, Göblös A, Bacsa S, Antal M, Németh IB, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M. *Expression and Functional Studies on the Noncoding RNA, PRINS. Int J Mol Sci. 2012 Dec 21;14(1):205-25. doi: 10.3390/ijms14010205.*).

Nemzetközi együttműködésben (Karolinska Institute, Stockholm, Svédország) sikeresen beállítottuk a PRINS ncRNS *in situ* hibridizációjának módszerét is laboratóriumunkban. Ezen vizsgálataink eredményei igazolták a valós idejű RT-PCR kísérletekben kapott PRINS kifejeződési mintázatokat. Ezt követően egészséges egyének mintáit tartalmazó szöveti chip-en vizsgáltuk a PRINS expresszióját. Legerősebb festődést a bél-, bőr-, here-, méh-, nyirok-, és tüdőszövetben találtunk, ezzel szemben a kis-, és nagyagyszövetben nem detektáltunk festődést. Az epidermiszben és izolált keratinocitákban szöveti- és sejttestet követően egyaránt kifejezett nukleoláris és perinukleáris festődést, illetve homogén citoplazmás eloszlást detektáltunk.

III/B. Az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes bőrben eltérő kifejeződést mutató gének és fehérjék azonosítása és vizsgálata.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján ismert volt, hogy a pikkelysömörös betegek CD4+ T sejtjei olyan limfokineket termelnek, melyek fokozzák *in vitro* körülmények között a pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrmintáiból szeparált bazális keratinociták proliferációját. Ez a hatás azonban az egészséges egyének sejtjei esetében nem volt megfigyelhető. Neutralizáló ellenanyagokkal végzett kísérletekben megmutattuk, hogy a fenti hatások kialakításában az IFN- γ , GM-CSF és IL-3 limfokinek játszhatnak szerepet (Bata-Csörgő, 1995). Kísérleteink során azt is megfigyeltük, hogy egyes gének, például a PRINS kifejeződése eltérő módon változik a fenti 3 T-limfokinnel történő kezelés hatására egészséges, és pikkelysömörös tünetmentes bőrből származó keratinocitákban. Míg az előbbiekben a PRINS bazális kifejeződése alacsony volt és nem változott a kezelés hatására, addig a betegek tünetmentes bőrből származó sejtekben a magasabb kezdeti expressziós szint markáns csökkenést mutatott. Mindez arra is utal, hogy a betegek bőre inherens eltéréseket mutat az egészséges egyénekével összehasonlítva.

A fentiek alapján kísérleteinkben célunk a pikkelysömörös tünetmentes és az egészséges epidermiszben a PRINS-hez hasonlóan T-limfokin kezelés hatására eltérő kifejeződés-változást mutató gének azonosítása volt, melyek szerepet játszhatnak a betegség patogenezisében.

Ehhez 4-4 egészséges és pikkelysömörös fiatal férfi tünetmentes bőrből vettünk biopszia mintákat, melyekből *in vitro* organotipikus kultúrákat hoztunk létre. Ezek egyik felét T-sejt limfokinekkal kezeltük, majd a kezelt és a kezelt mintákat cDNS microarray módszerrel hasonlítottuk össze.

Az adatok kiértékelése után 57 ismert gént, és 11 még ismeretlen transzkriptumot azonosítottunk, melyek eltérő kifejeződés-változást szenvedtek a limfokin kezelés hatására. Ezt követően a cDNS microarray adatok validálása érdekében kiválasztott gének kifejeződését PCR alapú módszerekkel az eredeti minták alkalmazásával, valamint *in vitro*

keratinocita proliferációs és differenciációs modellekben is elemeztük. Megállapítottuk, hogy a PCR validálás eredményei jó korrelációt mutattak a chip vizsgálatok eredményeivel.

Ezt követően az azonosított géneket részletes *in silico* analízisét kezdtük, illetve néhány, a pikkelysömör patogenezise szempontjából fontos gén esetében kísérletes munkát is végeztünk. Megállapítottuk, hogy az 57 annotált gén közül 11-nek a szerepét már leírták a betegség patogenezisében. A kísérleti felállásunk sajátosságai miatt azt is feltételeztük, hogy az általunk azonosított gének a tünetek kialakulásának korai lépései során játszhatnak szerepet.

Az azonosított gének összefüggéseit bioinformatikai módszerekkel (GO analízis a DAVID szoftver alkalmazásával, valamint Ingenuity pathway analízis) vizsgáltuk. Eredményeink alapján az azonosított gének két hálózatba voltak rendezhetőek. Míg az egyik fontos szerepet játszik a sejtmorfológia, fejlődés, és sejthalál folyamataiban, addig a másik feladata a kismolekulák, valamint lipidek metabolizmusának szabályozása.

Mivel az eredeti kísérleteink 4 egészséges és 4 pikkelysömörös fiatal férfi bevonásával készültek, a vizsgált elemszámok növelése érdekében *in vitro* kísérleteinket további 4-4 donor bevonásával is megismételtük. Ezeken a mintákon célzottan, valós idejű RT-PCR módszerrel csak a korábban kijelölésre került gének alapszintű kifejeződésének, valamint a kezelések hatására bekövetkező kifejeződés-változások különbségeit elemeztük. Eredményeink igazolták a korábbi megfigyeléseinket, melyek arra utaltak, hogy pikkelysömörös betegek tünetmentes bőrben számos olyan gén kifejeződése inherensen magasabb szintű (pl. IL-1A, IL-1B, IL-23A), melyek szerepet játszhatnak a különféle külső környezeti hatásokra induló abnormális T-sejt differenciációs folyamatok kialakításában. Mindez azt is felvetette, hogy ezen gének finomszabályozásának felborulása a pikkelysömörre hajlamos egyének keratinocitáiban a betegség kialakulásának korai lépéseinek tekinthetőek.

A cDNS microarray kísérletek során korábban bioinformatikai módszerek alkalmazásával részletes funkcionális analízist is végeztünk. Ennek során megállapítottuk, hogy az 57 gén között 3 olyan is található (SFRS18, LUC7L3, PPIG), melyek szerepet játszanak az mRNS molekulák érési folyamataiban, ezen belül az alternatív splicing szabályozásában. *In vitro* keratinocita proliferációs és differenciációs modell rendszerekben, szinkronizált immortalizált keratinocita kultúrák (HaCaT, HPV-KER) alkalmazásával megmutattuk, hogy a három gén mRNS és fehérje szintű szabályozása nagy hasonlóságot mutat, annak ellenére, hogy egymástól távol, más-más kromoszómákon helyezkednek el. Ez arra utal, hogy kifejeződésük szabályozásában hasonló jelátviteli folyamatok, illetve transzkripció faktorok játszhatnak szerepet.

Korábbi eredményeink alapján ismert, hogy a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben a fibronectin egy speciális, EDA-domént tartalmazó onkofötális formája van jelen, mely a gén alternatív splicing folyamatai során képződik. Megmutattuk, hogy a PPIG és a LUC7L3 gének csendesítése eredményeképpen a keratinocitákban az EDA+/EDA- alternatív splice variánsok aránya eltolódik. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a betegek bőrben az mRNS molekulák érési folyamatainak zavarai is hozzájárulhatnak a pikkelysömör kialakulásához. A cDNS microarray kísérletek eredményeit közleményben foglaltuk össze (Szabó K, Bata-Csörgő Z, Dallos A, Bebes A, Francziszti L, Dobozy A, Kemény L, Széll M. *Regulatory networks contributing to psoriasis susceptibility. Acta Derm Venereol. 2014 Jul;94(4):380-5. doi: 10.2340/00015555-1708.*)

A fenti chip kísérletek, ill. az azok eredményeit igazoló validálások ráirányították a figyelmünket az IL-23A molekulára pikkelysömörben. Ehhez a molekulához ill. receptorához kapcsolódóan hazai együttműködésben került vizsgálatra az IL-23 receptor molekula polimorfizmusainak szerepe különböző immunmediált humán betegségekben. A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Prof. Dr. Melegh Béla által irányított Orvosi Genetikai Intézete vezette, munkacsoportunk a klinikailag jól karakterizált pikkelysömörös betegcsoport adataival, valamint az önkéntesek vénás vérből izolált genomi DNS gyűjtemény

rendelkezésre bocsátásával járult hozzá ezekhez. Az együttműködés eredményeképpen két közlemény született. Az egyik közleményben azt a megfigyelésünket közöltük, hogy a magyar populációban az IL23R gén polimorfizmusai a pikkelysömörrel asszociáltak, de az immunoglobulin A nefropátiával nem (Safrany E, Szell M, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Szabo T, Kemeny L, Nagy J, Melegh B. *Polymorphisms of the IL23R gene are associated with psoriasis but not with immunoglobulin A nephropathy in a Hungarian population. Inflammation. 2011 Dec;34(6):603-8. doi: 10.1007/s10753-010-9268-2.*), míg az ezt követő közleményben azt a megállapítást tettük, hogy hogy ulceratív colitis-ban eltérő IL23R haplotípusok járulnak hozzá a betegség kialakulásához, mint Crohn betegségben és pikkelysömörben (Safrany E, Szabo M, Szell M, Kemeny L, Sumegi K, Melegh BI, Magyar L, Matyas P, Figler M, Weber A, Tulassay Z, Melegh B. *Difference of interleukin-23 receptor gene haplotype variants in ulcerative colitis compared to Crohn's disease and psoriasis. Inflamm Res. 2013 Feb;62(2):195-200. doi: 10.1007/s00011-012-0566-z.*).