

A hámsejtek immunológiai működésében résztvevő gének azonosítása microarray módszerrel

1. Bevezetés

Az emberi szervezetet a külső környezettől elválasztó legfontosabb határoló szervünk a bőr, amely nem pusztán passzív, mechanikai védelmet nyújt a külvilág káros hatásai ellen, de egyre több adat igazolja, hogy aktív protektív feladatokat is ellát. A bőr sejtjei felismerik a behatoló patogén mikroorganizmusokat, képesek a veleszületett- és az adaptív immunfolyamatok aktiválására, valamint direkt módon szerepük van a kórokozók elpusztításában.

2. A hámsejtek immunológiai működésében szerepet játszó gének vizsgálata microarray módszerrel

Munkacsoportunk a bőr immunológiai működésében szerepet játszó folyamatok jobb megértését tűzte ki célul. Kísérleteinkben különféle mikrobiális anyagok és a keratinociták kölcsönhatását vizsgáltuk. Ennek során plasztikai műtéten átesett egészséges donorok bőréből tenyésztettünk primer keratinocitákat. A sejteket Gram-negatív baktériumból (*Escherichia coli*) származó lipopoliszacchariddal (LPS), Gram-pozitív *Staphylococcus aureus* tisztított peptidoglykánjával (PGN), hővel elölt *Candida albicans* gombával, illetve élő Gram-pozitív *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) baktériumokkal kezeltük.

Előkísérleteink során először meghatároztuk a fenti anyagokkal történő kezelések optimális paramétereit, vizsgálataink többek között kiterjedtek a kezelések időtartamának, valamint a felhasznált mikrobiális anyagok koncentrációjának, illetve sejtszámának optimalizálására. A chip hibridizálás során felhasznált minták készítése során végül a következő kezeléseket alkalmaztuk:

| Alkalmazott mikrobiális anyag | Koncentráció |
|-------------------------------|-------------------|
| LPS | 1 µg/ml |
| PGN | 5 µg/ml |
| Candida albicans | 2 millió sejt/ml |
| P. acnes | 10 millió sejt/ml |

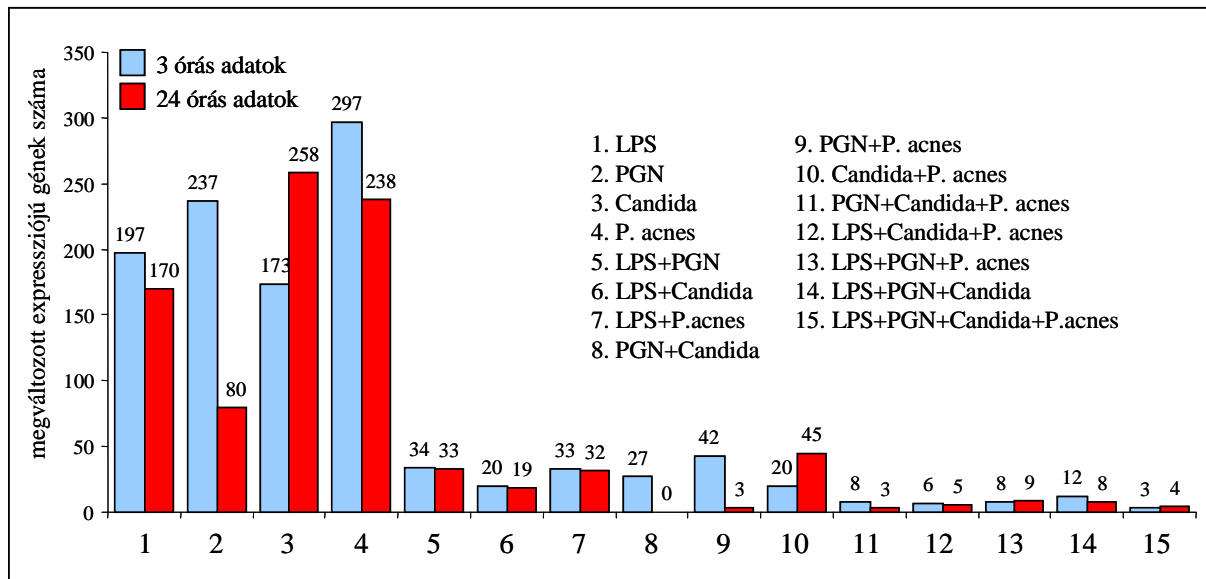
1. táblázat: A keratinociták mikrobiális anyagokkal történő kezelése során alkalmazott koncentrációk

Eredményeinket felhasználva harmadik passzázsban levő primer keratinocitákat kezeltünk 0, 3, illetve 24 órán keresztül, majd a sejtekből RNS-t izoláltunk. Reverz transzkripciót, és a kapott cDNS-ek fluoreszcens festékekkel történő jelölését követően a kezeletlen és indukált mintákból származó cDNS mintákat a 18664 humán gént reprezentáló cDNS chiphez hibridizáltattuk. A fluoreszcens jeleket a ScanArray Lite konfokális lézer szkennelvel mértük, a kapott nyers adatokat pedig a GenePix Pro 3.0 szoftver felhasználásával analizáltuk. A munkák ezen része a Szegedi Biológiai Központ Funkcionális Genomikai Laboratóriumával együttműködve készült.

Az eredmények feldolgozásánál szigorú szűrőket alkalmaztunk. A további vizsgálatokba csak azokat a géneket vontuk be, melyek független kísérletek során reprodukálhatóan legalább kétszeres változást mutattak. Az így kapott adatok feldolgozásával, bioinformatikai módszerekkel és publikus adatbázisok felhasználásával (Entrez Gene, Gene Cards) vizsgáltuk azokat a lehetséges jelátviteli és metabolikus folyamatokat, melyekben

szerepet játszó gének kifejeződése megváltozott a mikrobiális kezelések hatására. A változást mutató géneknek meghatároztuk a feltételezhető funkcióját az irodalmi kereszthivatkozások és a bennük található ismert funkciójú domének szisztematikus átvizsgálásával. Ezáltal átfogóbb képet szereztünk az egyes gének által kódolt fehérjék funkcionális környezetéről.

A különböző mikrobiális anyagokkal kezelt keratinociták transzkriptóma változásait összehasonlítva egy érdekes megfigyelést is tettünk. A gének nagyobbik részét az egyes anyagok specifikusan indukálták illetve gátolták, és csak kisebb csoportjuk játszhat a patogének elleni általános immunválaszban központi szerepet (1. ábra). Ezek között találtunk többek között a sejtek energia metabolizmusában, transzlációs folyamatokban, DNS metabolizmusban, illetve riboszómális biogenezisben fontos géneket.



1. Ábra A kísérletek során azonosított gének nagyobb részének kifejeződése patogénspecifikus változást mutatott.

Mindezek az eredmények jó összhangban voltak kezdeti feltevésünkkel, mely szerint az epidermális keratinociták rendelkeznek az immunsejtek egyik legfontosabb jellemzőjével, vagyis különböző mikrobák támadása esetén a betolakodó típusától függő, hatékony választ képesek generálni. Ezt támasztják alá munkacsoportunk azon megfigyelései is, mely szerint a bőr sejtei kifejezik a különböző patogének felismerésében fontos szerepet játszó Toll-like receptorok családjának számos tagját. Megmutattuk, hogy a TLR-2 és a TLR-4 RNS és fehérje szinten is kifejeződik immortalizált HaCaT keratinocitákban. Az általunk kidolgozott szinkronizált HaCaT rendszer alkalmazásával, ami jól modellezi a keratinociták proliferációs és differenciációs folyamatait, azt is beláttuk, hogy mindkét gén kifejeződése és a fehérjék expressziója fokozódik a sejtek differenciációja során. Ezek az eredmények egybevágóak azzal a megfigyeléssel is, hogy a humán epidermisben belül a felső rétegekben elhelyezkedő differenciált keratinociták játsszák a legfontosabb szerepet az immunfolyamatok során, hiszen ezek azok a sejtek, melyek szoros kapcsolatban vannak a külvilággal, és először találkoznak a betolakodó mikroorganizmusokkal.

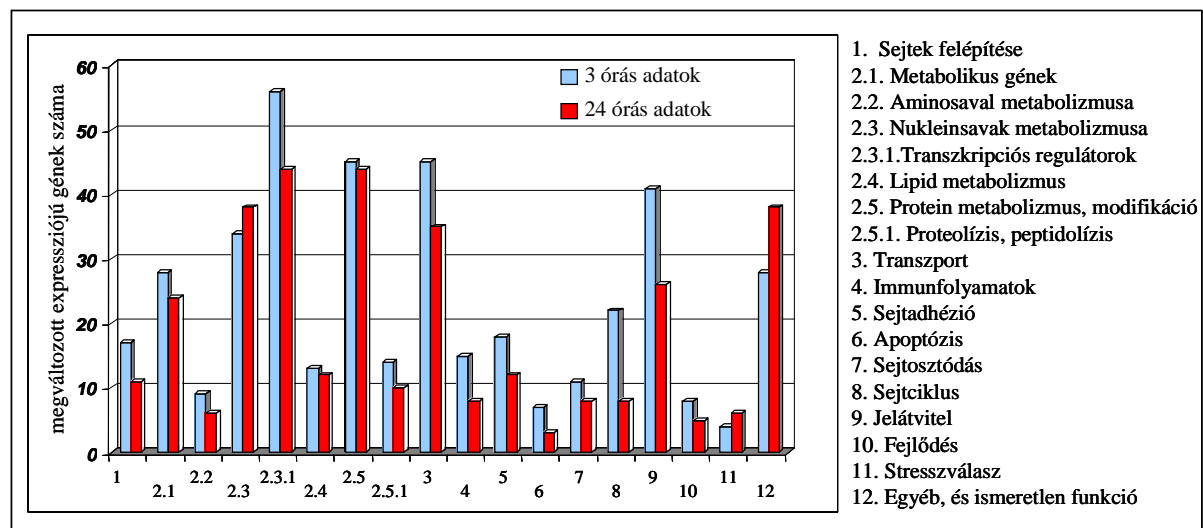
(Pivarcsi A, Koreck A, Bodai L, Szell M, Szeg C, Belso N, Kenderessy-Szabo A, Bata-Csorgo Z, Dobozy A, Kemeny L.: Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. Arch Dermatol Res. 2004 Aug;296(3):120-4.)

3. A P. acnes által kiváltott globális génexpressziós változások részletes vizsgálata

A fent részletesen bemutatott kísérleteink eredményeképpen rendkívül nagy mennyiségű adatot sikerült nyernünk, amelynek feldolgozása folyamatos. Figyelmünket ezért az acne vulgaris kialakulásában központi szerepet játszó *P. acnes* által kiváltott génextpressziós változások elemzésére irányítottuk.

A 3 órás adatok esetében mintegy 416 gén mutatott változást, 206 kifejeződése fokozódott, 210 expressziója csökkent. 24 óránál ezzel szemben 155 gén kifejeződése nőtt, 181 esetben pedig csökkenést detektáltunk (összesen 366 gén). Mintegy 33 olyan transzkriptumot találtunk, amely mindkét időpontban változást mutatott. Ezek között transzkripciósz regulátorokat, a lipid metabolizmusban szerepet játszó géneket, valamint jelátviteli folyamatok szereplőit találjuk.

A géneket ezután általunk definiált mesterséges csoportokba rendeztük. Az egyes kategóriák meghatározása a GO adatbázis (Syntax Ontology Database – <http://obo.sourceforge.net>) alapján történt. Ezek például az apoptózisban, a sejtciklus szabályozásában, vagy a differenciációs, és jelátviteli folyamatokban résztvevő géneket magukba foglaló kategóriák (2. ábra).



2. Ábra A *P. acnes* kezelés hatására megváltozott expressziót mutató géneket funkciójuk alapján általunk mesterségesen definiált csoportokba soroltuk.

A KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) és a BioCarta adatbázisok (<http://www.biocarta.com/genes/index.asp>) felhasználásával pedig azt vizsgáltuk, hogy kijelölhetőek-e olyan konkrét szignál transzdukciós vagy metabolikus folyamatok, melyek szerepet játszhatnak a mikrobiális anyagokra adott sejtválaszban. Számítógépes elemzések alapján egyedül a MAPK jelátviteli útvonal adott statisztikailag szignifikáns eredményt ($p < 0.013$), melyről ismert, hogy szinte alig van olyan biológiai folyamat amelyben ne játszana valamilyen szerepet.

4. A *P. acnes* és a bőr sejtjei közötti kölcsönhatás génszintű vizsgálata

Az általunk részletes vizsgálatnak alávetett gének kiválasztása a cDNS chipes adataink, valamint korábbi eredményeink figyelembe vételével történt. Munkánk során real-time PCR, ELISA, és immuncitokémiai módszerekkel vizsgáltuk a *P. acnes* baktérium hatását a keratinociták gyulladáshoz vezető citokin, illetve antimikrobiális peptid termelésére.

A hámsejtek a szervezetet támadó mikroorganizmusok felismerésére során képesek a professzionális immunsejtek aktiválására, és a veszély helyére irányítására kemotaktikus

sajátságú molekulák szekréciójának segítségével. Ilyen kemotaktikus hatású gyulladásoos citokin az interleukin 8 (IL-8/CXCL8), melyről korábban már igazoltuk, hogy termelődése fokozódik lipopoliszaccharid (LPS), peptidoglycan (PGN), valamint *Candida albicans* hatására is. Újabb eredményeink megmutatták, hogy a keratinociták IL-8 RNS és protein termelődése fokozódik a *P. acnes* baktériumkezelés hatására.

Részletes vizsgálataink során egy érdekes jelenségre is felfigyeltünk. Az IL-8 génkifejeződés, illetve a protein szekréció változásának mértéke és időbeli kinetikája nem változott megegyező módon, ha eltérő *P. acnes* klinikai izolátumokat alkalmazunk a kezelésekek során. Az általunk felhasznált *P. acnes* törzsekről később azt is megállapítottuk, hogy ezek eltérő, fajon belüli filogenetikai csoportokba tartoznak. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az általunk felhasznált baktérium törzsek eltérő patogenicitással rendelkezhetnek.

Az IL-8 gén szabályozásának megismerésére végzett kísérleteink azt mutatták, hogy a Gram-pozitív baktériumok, így a *P. acnes* felismerésében szerepet játszó TLR-2 (Toll-like receptor-2) fontos szerepet játszik. Ha a TLR-2 funkcióját blokkoló ellenanyag jelenlétében kezeltük a keratinocitákat a baktériummal, az IL-8 kifejeződésének fokozódása szignifikánsan kisebb mértékű volt mind RNS, mind pedig fehérje szinten. Ez arra utal, hogy a TLR-2 által aktivált jelátviteli folyamatok hozzájárulnak az IL-8 gén kifejeződésének megváltozásához, de emellett még más tényezők is szerepet játszanak a szabályozásban.

Hasonló eredményeket kaptunk a hBD2/DEFB4 (human b-defensin 2) gén vizsgálata során, mind RNS, mind fehérje szinten megnövekedett expressziót detektáltunk a baktériumkezelés során egyes *P. acnes* izolátumok esetében. A hBD2 az antimikrobiális hatású peptideket kódoló gének közé tartozik, melynek szerepe lehet egyrészt a betolakodó eliminálásában, illetve a patogén specifikus immunválasz kiváltásában. Mivel a rekombináns hBD2 fehérjének nem volt szignifikáns hatása a *P. acnes* baktériumok életképességére, ezért feltehetően immunreguláló hatása játszik fontos szerepet az általunk vizsgált folyamatokban.

Az interleukin-1 (IL-1) nevű gyulladásoos citokin az irodalmi adatok szerint a keratinocitákban konstitutív módon expresszázó gének, melynek kifejeződése külső stresszhatásokra (pl. hőstressz, UV besugárzás, LPS, citokinek) fokozódik, és igen jelentős szerepet játszik számos jelátviteli folyamat aktiválásában. Az általunk vizsgált *P. acnes* klinikai izolátumok nem okoztak szignifikáns expressziós változást az IL-1 gén kifejeződésében. A 3 órás chipes adatok között szerepelt azonban az IL-1RA jelű gén (interleukin 1 receptor antagonist), mely az IL-1R receptorhoz kötődve megakadályozza az IL-1 molekulák receptorhoz kapcsolódását, és a target sejtek citoplazmájában gátolja a ligand kötődése következtében induló jelátviteli folyamatokat. Mind a chipes eredményeink alapján, mind pedig a későbbi validálások során azt tapasztaltuk, hogy a *P. acnes* baktériummal történő kezelés hatására megnövekszik a keratinocitákban ezen receptor antagonist mRNS-ének mennyisége. A fent leírtak alapján feltételezzük, hogy hatását úgy fejtí ki, hogy a krónikus gyulladásoos folyamatok kialakulását akadályozza. Ehhez hasonló jelenségek tehetik lehetővé azt is, hogy normális körülmények között a *P. acnes* a bőr természetes rezidens mikroflórájának egyik legjelentősebb tagja, és fontos szerepet játszik az egészséges bőr működésében.

Saját és irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a természetes immunfolyamatok során a különféle mikrobiális anyagok az immunsejtekben az NF- κ B transzkripciós faktor nukleáris transzlokációját okozzák. Ennek eredményeképpen számos gyulladásoos citokin, kemokin, és antimikrobiális hatású gén kifejeződése megváltozik TLR-függő módon. Kísérleti eredményeink azt sugallják, hogy az epidermális keratinocitákban a patogének hatására a professzionális immunsejtekhez hasonló jelátviteli folyamatok játszódnak le.

(1. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Szell M, Urban E, Kemeny L.: *Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8*

expression in human keratinocytes through toll-like receptors. J Invest Dermatol. 2005 May;124(5):931-8.

2. Pivarcsi A, Kemeny L, Dobozy A. *Innate immune functions of the keratinocytes. A review. Acta Microbiol Immunol Hung. 2004;51(3):303-10. Review.)*

5. A keratinociták immunfunkcióit befolyásoló szerek hatásának vizsgálata

A keratinociták mikrobiális anyagokkal történő kölcsönhatásának vizsgálata során egy olyan komplex vizsgálati rendszert sikerült laboratóriumunkban beállítani, amely lehetővé teszi ezen sejtek immunfunkcióit befolyásoló anyagok hatásmechanizmusának jellemzését. A rendszer felhasználásával olyan kísérleteket végeztünk, melynek során összehasonlítottuk a szintetikus kortikoszteroid típusú budesonid, illetve a nem-szteroid gyulladáscsökkentők családjába tartozó tacrolimus hatását.

LPS-sel kezelt keratinocitákat kezeltünk a fenti anyagokkal, és kvantitatív RT-PCR, ELISA, valamint áramlásos citometriás módszerekkel vizsgáltuk gyulladáscsökkentő citokinek (IL-1a, IL-8, TNF α), valamint a TLR2 és TLR4 kifejeződésében bekövetkező változásokat mRNS és fehérje szinten.

Az általunk vizsgált két anyag közül a budesonid csökkentette az LPS hatására bekövetkező IL-8 expresszió fokozódást mRNS és fehérje szinten egyaránt, és fokozta a TLR2 kifejeződését. A budesonid hatásmechanizmusának vizsgálata során azt is megmutattuk, hogy a fenti események hátterében a keratinociták immunfunkciója során központi szerepet játszó NF- κ B aktiválódásának gátlása áll. A tacrolimusnak ezzel szemben sem a fenti gének kifejeződésére, sem az NF- κ B aktivációjára nem volt számottevő hatása.

Bár az általunk vizsgált mindkét szert elterjedten használják gyulladáscsökkentő bőrbetegségek esetében, eredményeink arra utalnak, hogy hatásukat egymástól teljesen eltérő módon fejtik ki.

(Kis K, Bodai L, Polyanka H, Eder K, Pivarcsi A, Duda E, Soos G, Bata-Csorgo Z, Kemeny L.: *Budesonide, but not tacrolimus, affects the immune functions of normal human keratinocytes. Int Immunopharmacol. 2006 Mar;6(3):358-68.*)

6. Eredményeink kiterjesztése más sejttípusokra

Felvetődött bennünk az a kérdés is, hogy vajon a szervezetet a külvilágtól elhatároló egyéb szövetekben/szövetekben található, nem immun-eredetű sejtek képesek-e az epidermális keratinocitákhoz hasonlóan a támadó mikroorganizmusok felismerésére, és immunválasz indítására. Ennek megválaszolására megvizsgáltuk azt is, hogy vajon a bőrben megtalálható további sejttípusok, mint például a szebociták, valamint a vaginális epitéliumban található sejtek kifejezik-e a Toll-like receptorokat, és képesek-e gyulladáscsökkentő citokinek, kemokinek és antimikrobiális hatású fehérjék termelésére mikrobiális eredetű anyagok hatására.

Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a patogén támadásoknak kitett felületeken az általunk eddig megvizsgált sejttípusok mindegyike rendelkezett a mikróbak azonosításának képességével, annak ellenére, hogy egyikük sem tartozott a professzionális immunsejtek közé. Bakteriális és gomba-eredetű anyagok hatására számos olyan anyag termelődése fokozódott, melyek fontos szerepet játszanak a veleszületett és adaptív immunfolyamatok elindításában és szabályozásában. Antimikrobiális hatású anyagok termelése révén pedig szerepük lehet a patogének „kordában tartásában” mindaddig, amíg az immunsejtek a támadás helyére nem érnek.

(1. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, Dobozy A, Kemeny L.: *Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines,*

chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. Microbes Infect. 2005 Jul;7(9-10):1117-27.

2. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, Seltsmann H, Patrick S, Zouboulis CC, Kemeny L. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect. 2006 Jul;8(8):2195-205.*)

7. Eredményeink elméleti és gyakorlati haszna

A hámsejtek immunfunkciójának vizsgálatai csak az utóbbi pár évben kerültek a figyelem és a kutatások középpontjába, ezért egyelőre kevés adattal rendelkezünk. Munkánk során számos olyan gént azonosítottunk, amely fontos szerepet játszik a bőr immunfolyamataiban, és megvizsgáltuk ezek pontos szerepét, valamint szabályozását is mikrobiális anyagok hatására epidermális keratinocitákban. Eredményeink elméleti jelentősége mellett gyakorlati hasznuk is elvitathatatlan. A bőr sejtjeinek kóros működése következtében a mikrobák támadása hozzájárulhat különféle bőrbetegség kialakulásához. Jól ismert, hogy a népesség nagy számát érintő *acne vulgaris* patomechanizmusában például fontos szerepet játszik az általunk is vizsgált *P. acnes* baktérium. A bőrelváltozások kialakulásának hátterében álló folyamatok jobb megismerése pedig hozzájárulhat új terápiás eljárások kidolgozásához, melyek gazdasági jelentősége is óriási lehet.

Ezen az úton jelent fontos lépést az a törekvésünk, hogy új elméleti jelentőségű eredményeinket a gyakorlati életbe is átültessük, mint azt a jelen pályázat keretein belül az immunmoduláló szerek (budesonid és tacrolimus) hatásmechanizmusának összehasonlítása esetében tettük.