

Terápiás célpontok és biomarkerek vizsgálata asztmában és allergiában

Doktori tézisek

Gál Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Vellainé Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Bohács Anikó, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Lakatos Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Barta Imre, Ph.D., tudományos munkatárs

Dr. Pikó Henrietta, Ph.D., biológus

Budapest
2021

1. Bevezetés

Az elmúlt évtized során az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) előfordulási gyakorisága nagy léptékű növekedést mutatott, mellyel a terápiás és differenciáldiagnosztikai módszerek nem tudtak lépést tartani. Jelenleg nincs olyan differenciáldiagnosztikai marker, amellyel megbízhatóan lehetne megkülönböztetni az egyes asztma vagy COPD altípusokat egymástól, ráadásul ez utóbbi két betegség együttesen is előfordulhat, asztma-COPD szindrómát (ACOS) okozva, melynek biomarkerek segítségével történő elkülönítése a mai napig nem megoldott. A betegségek pontos diagnosztizálása elengedhetetlen a megfelelő terápia kiválasztása érdekében.

A komplex betegségek közé sorolható asztma, COPD és allergia kialakulásának hátterében számos minor hatású gén játszik szerepet, melyek teljes genom asszociációs vizsgálat révén kimutathatóak. Ily módon azonosították a *TEK* gént is, amely vizsgálataink egyik fő célpontja és már több cikkben is összefüggésbe hozták asztmával és allergiás conjunctivitisszel.

A neutrofil granulociták kiemelt szereppel bírnak mind az asztma, mind a COPD kialakulásában, hozzájárulva a krónikus gyulladás fenntartásához. A neutrofil granulociták képesek extracelluláris csapdákat létrehozni bizonyos triggererek hatására. A csapdák jelenlétét már asztmások tüdejében is kimutatták, viszont a kiváltó tényező és a súlyossággal való összefüggés még nem tisztázott.

A kódoló génszekvenciák a humán genom körülbelül 1,2%-át teszik ki. Ez a régebben „junk DNS”-ként emlegetett, de ma már bizonyítottan igen fontos szabályozó szereppel bíró DNS szakasz nem-kódoló RNS-é íródhat át. A 200 bázispárnál hosszabb ilyen szakaszokat hosszú nem-kódoló RNS-eknek (lncRNS) nevezzük. Az lncRNS-ek expressziójának változása szerepet játszhat számos kórkép kialakulásában, beleértve a krónikus légzőszervi betegségeket is.

2. Célkitűzések

PhD munkám során a Klinikai genomika munkacsoport tagjaként célul tűztem ki az asztma és allergia hátterében álló patomechanizmusok vizsgálatát. A munkacsoport fő célja olyan biomarkerek felderítése, amelyek kvantitatív vagy kvalitatív módon egyedi karakterisztikát mutatnak betegségek endotípusaiban, így segítséget nyújthatnak a differenciáldiagnosztika területén. A patomechanizmusok meghatározása új potenciális terápiás célpontok felderítését teszi lehetővé. Az itt bemutatott doktori munka során több molekuláris szinten (DNS, RNS, fehérje) végeztünk vizsgálatokat.

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A DesensIT projekt során kapott GWAS eredmények újraértékelése a *TEK* gén kiemelt vizsgálatával felnőtt parlagfű allergiás populációban, majd az asztmával, illetve allergiás conjunctivitisszel legerősebb asszociációt mutató SNP-k (single nucleotide polymorphism) további genotipizálása és asszociációs tesztek elvégzése felnőtt, illetve gyermek asztmás populációban. Emellett terveink között szerepelt a *TEK* gén és a kapcsolódó Tie2 útvonal egyéb komponenseinek génexpressziós analízise ovalbumin-szenzitizált asztma-egér modellben, az útvonal asztmában játszott szerepének felderítése érdekében.
2. Neutrofil extracelluláris csapdák áramlási citométerrel való kimutatására alkalmas módszer kifejlesztése. Ezt felhasználva, gyermek és felnőtt asztmás, kontroll, COPD és ACOS minták cirkuláló NET-szintjének meghatározása, majd potenciális asszociációk felderítése. A légúti betegségek egyes szubtypusainak összehasonlítása, súlyosság, FEV1 érték és gyógyszeres kezelés alapján. A mért eredmények validálása.
3. Felfedező kohorsz során 84, gyulladáshoz vezető immunválaszban és autoimmunitásban szerepet játszó cirkuláló hosszú nem-kódoló RNS array-alapú vizsgálata felnőtt súlyos, illetve enyhe asztmás, COPD-s és kontroll mintákban. A kiértékelés során a legjelentősebb eltérést mutató, és irodalomkutatók alapján is relevánsnak mondható lncRNS-ek expressziós szintű validálása egy kiterjesztett, már gyermek és

allergiás mintákat is tartalmazó populáción. Emellett, a kiválasztott lncRNS-ek potenciális biológiai szerepének vizsgálata rendszerbiológiai analízissel.

3. Módszerek

3.1 Populáció

Teljes genom és jelölt gén asszociációs vizsgálatban résztvevő személyek

Ezen vizsgálat során tanulmányozott populáció több alcsoportból állt. A felfedező kohorszban a DesensIT projekt populációját vizsgáltuk, melyben 306 parlagfű allergiás páciens vett részt, 22%-uk asztma és 76%-uk allergiás conjunctivitis diagnózissal is rendelkezett.

A validáló populáció összesen 1258 személyből állt, melynek 64%-a gyermek és 36%-a felnőtt. Négyezerötvennégy felnőtt mintából 237 asztmás megbetegedésben, míg 101 allergiás conjunctivitisben is szenvedett. A FEV1 értékeket az asztmás betegek tüdőfunkciójának becslésére használtuk.

Cirkuláló lncRNS vizsgálatban résztvevő személyek jellemzése

A hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata szintén két szakaszból állt. Az első fázisban 24 felnőtt páciens vérmintáját használtuk fel. A felfedező populációt 4 darab 6 fős csoportra osztottuk: kontroll, enyhe-középsúlyos asztma (GINA1-3), súlyos asztma (GINA4-5) és COPD.

A replikációs kohorsz során 11 asztmás gyermek, 95 felnőtt asztmás, 9 COPD-s, 25 allergiás rhinitis és 23 egészséges kontroll mintát tartalmazott. A felnőtt asztmás betegek közel 33%-a súlyos asztmában (GINA4-5) szenvedett, míg 64 páciens enyhe-középsúlyos GINA1-3 besorolású asztma diagnózissal rendelkezett.

Plazma minták NET-szintjének mérésében résztvevő személyek jellemzői

A vizsgálatban 46 felnőtt asztmás, 17 gyermek asztmás, 6 COPD-ben, 6 ACOS-ban szenvedő páciens mintáját tartalmazta. A kontrollcsoport 23 egészséges személy mintájából állt.

3.2 Alkalmazott laboratóriumi technikák

Humán minták

A perifériás vérminták EDTA tartalmú csőben kerültek levételre és felhasználásig (DNS izolálás) -20°C -on tároltuk azokat.

RNS izolálás céljából speciális *PAXgene Blood RNA Tube* csövet használtunk, melyet, vérvételt követően 8-10 alkalommal megforgattunk és 2-3 óra szobahőmérsékleten történő inkubációt követően -20°C -on tároltuk.

A neutrofil extracelluláris csapdák *in vivo* vizsgálata vérlemezke-mentes plazma (PFP) mintákból történt. A vérminták nátrium-citrát tartalmú csövekben kerültek levételre, majd két egymás utáni 15 perces 2500 RCF-en történő centrifugálási lépést követően a felülúszót -70°C -on tároltuk.

Genomiális DNS izolálása

A gén asszociációs vizsgálat során 1564 személy teljes vérmintájából szeparáltunk genomi DNS-t *QIAamp DNA Blood Midi kit* segítségével manuálisan, míg a DesensIT projekt mintái az *iPrep PureLink gDNA Blood kit* felhasználásával *iPrep Purification Instrument* segítségével, automatizálva kerültek izolálásra.

Teljes genom asszociációs vizsgálat (GWAS)

A DesensIT projekt genomikai analízise *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* felhasználásával készült, amely hozzávetőlegesen 1.8 millió genetikai marker azonosítását teszi lehetővé. Ezen vizsgálat során a *TEK* génben 112 SNP-t értékeltük.

Jelölt gén asszociációs vizsgálat

A vizsgálatok az rs3739542, rs994934, rs622232, rs638203, rs7034505 SNP-k esetében a *KBiosciences Competitive Allele-Specific PCR (KASP) version 4.0* genotipizáló rendszer használatával, manuálisan történtek *ABI 7900HT Fast Real-Time PCR* berendezés alkalmazásával. A hatodik vizsgált SNP (rs3824410) mérése *TaqMan SNP Genotyping Assay* és *Master Mix* felhasználásával történt.

RNS izolálás és reverz transzkripció

Az izolálás a *PAXgene Blood RNA Kit* használatával történt, gyártói utasítások alapján. Az ezt követő koncentrációmérés *NanoDrop ND-1000 spektrofotométer* segítségével történt.

A hosszú nem-kódoló RNS vizsgálat felfedező populációjának méréséhez szükséges RNS amplifikációja és reverz transzkripciója *RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit* használatával történt. A replikációs vizsgálat mérése *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* felhasználásával valósult meg.

LncRNS PCR array és assay

Az lncRNS vizsgálat első fázisában feltérképező méréseket végeztünk a *Human RT2 lncRNA PCR Array (LASH-004Z)* panel segítségével, amely 84 előzetesen validált primerpárt tartalmazott olyan specifikus lncRNS génekre, melyek részt vesznek autoimmun folyamatokban és gyulladásos immunválaszban. Az array ezek mellett tartalmazott 5 primerpárt referencia génekre, 3-3 primerpárt a reverz transzkripció és a PCR reakció ellenőrzésére és 1-et a humán genomiális DNS kontamináció detektálására. A real-time PCR reakció az *Applied Biosystems 7900HT* készülék segítségével zajlott *RT2 SYBR Green ROX qPCR Master Mix* használatával.

A replikációs kohorszban 6 kiválasztott hosszú nem-kódoló RNS és 2 referencia gén expresszióját vizsgáltuk *TaqMan Non-coding RNA Assay (JPX; AC016629.8; HNRNPU; OIP5-AS1; RP11-282O18.3; RP11-325K4.3)* és *Gene Expression Assay (B2M; RPLP0)*, valamint *Gene Expression Master Mix* felhasználásával. A mérések során minden minta duplikátumban szerepelt, pozitív és negatív kontrollokkal egyetemben.

Egér-asztma modell vizsgálata

Munkacsoportunk által korábban előállított (Tölgyesi et. al., 2009) ovalbumin-indukált egér-asztma modell vizsgálata során *Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarray 4x44K chip* által kapott eredményeket használtuk fel kontroll és allergizált állatok izolált tüdőszövetére jellemző génextpressziós profil összehasonlítása érdekében. A tüdőszövetből történő RNS izolálás *RNeasy oszlopok* által valósult meg.

Az egérmodell előállításánál 6-8 hetes, nőstény, patogénmentes BALB/c egerekből indultunk ki. Három egércsoportot szenzitizáltunk. Ovalbumin, alumínium-hidroxid, és PBS tartalmú intraperitoneális oldat injekálásával kezeltük őket a 0. és 14. napon. A kontroll egércsoport kizárólag PBS és alumínium-hidroxid kombinációját kapta. Az egerek a 28., 29. és 30. napon 1%-os OVA aeroszolt vagy csupán PBS-t (kontrollok) lélegezték be 20 percen át egy műanyag kamrában. A 28. és a 30. napon 4 óra elteltével az első és a harmadik allergén provokációt követően az 1-es és 2-es csoport egereit elaltattuk és a tüdőszövetet további analízis céljából eltávolítottuk. A 31. napon, 24 órával a harmadik allergén provokációt követően a 3. egércsoport és a kontrollcsoport egyedei esetében is altatásra, majd tüdőszövet eltávolításra került sor.

Neutrofil granulociták izolálása

Az áramlási citométer paraméteres beállításához elengedhetetlen volt a neutrofil granulociták izolálása, és PMA általi stimulációja, majd használata pozitív kontrollként. A neutrofil sejtek szeparálása sűrűség gradiens módszerrel történt, 5%-os dextrans és percoll (63%-os és 72%-os) oldat felhasználásával, EDTA tartalmú vérvételi csövekből kiindulva. A szeparált granulocitákhoz PMA (100X) és 2% BSA (szarvasmarha szérum albumin) oldatot pipettáztunk, majd 4 órás inkubációt követően specifikus antitesteket és DNS festéket tartalmazó oldattal kezeltük a felüliszót.

Áramlási citométer alapú NET detektálás

A NET-ek kimutatása *anti-MPO FITC* (anti-human mouse IgG) és *rabbit anti-histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17)* antitestek alkalmazásával, valamint egy nagy affinitású nukleinsav festék, a *SYTOX Red dead cell stain* parallel használatával történt. Az anti-hisztin H3 antitest jelöletlen voltából fakadóan egy szekunder antitest (*rabbit IgG PE-conjugated antibody*) használatára is szükség volt a detektálás érdekében. A mintákat első lépésben hígítottuk PFA oldattal, majd egy FACS csöbe pipettáztuk az említett antitestekkel és nukleinsav festékekkel (leszámítva a szekunder antitestet) együtt. Szobahőmérsékleten történő inkubáció után a szekunder antitest is hozzáadásra került, majd újabb inkubáció következett. Az oldathoz ezután szűrt PBS oldatot és *PKH26 Reference Microbeads* gyöngyöket adtunk, a mérések kvantitatív vá tétele érdekében. Pozitív eredményként csak a hármas pozitív, tehát MPO/Sytox

Red/Histone pozitív eseményeket azonosítottuk. A mérések *BD FACSCalibur* készüléken zajlottak. Az áramlási citométer optimalizálása és a kapuzási stratégiák van der Pol et al. 2018-as cikke alapján történtek.

Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

A neutrofil extracelluláris csapdák jelenlétének megerősítése érdekében a PFP mintákat konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A mintaelőkészítés során hasonló jelöléseket használtunk, mint az áramlási citométerrel történő mérés során. Első lépésként PFP mintát cseppentettünk speciális tárgylemezre (*MilliCell EZ tárgylemez*) 10 perc szobahőmérsékleten történő száradást követően PFA oldattal fixáltuk a mintákat. Három egymást követő 1% PBS-el történő mosás után 5% BSA-val történt a blokkolás, majd 30 perces inkubálási lépés következett. A tárgylemezen lévő mintákat ezután elsődleges antitestekkel (*mouse monoclonal anti-MPO FITC* és *rabbit polyclonal anti-histone H3*) kezeltük. Egy órán át tartó inkubáció és 5% BSA-val történő mosást követően a tárgylemezre pipettáztuk a másodlagos antitesteket is (*F(ab')₂-goat anti-mouse IgG (H+L) konjugálva eFluor 570* és *goat anti-rabbit IgG konjugálva ATTO647N*), majd 1 órán át pihenni hagytuk szintén szobahőmérsékleten, sötétben. Mosást követően a tárgylemezeket DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmú fedőlemezzel fedtük be (*Prolong Diamond*). A minták vizsgálata *Lecia SP8 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal* történt.

3.3 Bioinformatikai módszerek

Jelölt gén asszociációs vizsgálatban alkalmazott módszerek

Az allélfrekvenciát és a Hardy-Weinberg egyensúly fennállását egy *online DeFinetti HWE szoftverrel* (Helmholtz Zentrum München, Institut für Humangenetik, <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), Khi-négyzet (χ^2) próba segítségével számoltuk ki, a HWE-től való szignifikáns eltérést pedig p-érték $<0,01$ megállapításával határoztuk meg. A nyers eredmények elemzése az *SPSS v19* szoftver segítségével történt. Logisztikus regresszió módszerével értékeltük a *TEK* genotípusok és asztma, illetve allergiás conjunctivitis asszociációját nemre és korra illesztve.

Az asztma-egér modell vizsgálata során kapott adatok a *GeneSpring 9.02 program* segítségével lettek kiértékelve. A statisztikai analízis *R statisztikai*

szoftver (version 3.5.1.) segítségével történt. A génexpressziós adatok összehasonlítása az egyes csoportok között, illetve a kontrollokhoz viszonyítva T-próba alkalmazásával valósult meg. A kiválasztott 10 Tie2 útvonalban szerepet játszó gén logFC értéke is meghatározásra került. A többszörös tesztelésből adódó hibalehetőséget Benjamini-Hochberg korrekció számításával kompenzáltuk, $p < 0,05$ érték figyelembe vételével.

Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata során alkalmazott statisztikai módszerek

A statisztikai elemzések az *R statisztikai program* segítségével kerültek kiértékelésre. A vizsgálati csoportok közötti különbségek feltárása egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) módszerével valósult meg, F-eloszlás használatával. Az alcsoportok összehasonlítása Student-féle páros t-próbával történt. A p-értékeket a hamis felfedezési arány korrekciója érdekében Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltuk, amelyet követően csak a 0,05 alatti p-értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. A NET-szintek és FEV1 értékek viszonyát Pearson-féle korrelációs együttható kiszámításával értékeltük. Az eredmények grafikus megjelenítéséhez szintén a már említett *R statisztikai programot* használtunk.

Cirkuláló lncRNS vizsgálatban alkalmazott biostatisztikai módszerek

A számítások *R statisztikai szoftver* segítségével készültek. A felfedező populációban alkalmazott előre elkészített specifikus Human RT2 lncRNA PCR Array panel 5 referencia génre specifikus primerpárt tartalmazott, melyek génexpressziós átlagát, mint normalizáló faktort használtunk a számítások során. A referencia gének közül validálásra a *B2M* és *RPLP0* géneket választottuk ki, mert ezek mutatták a legkisebb szórást a minták között. Az lncRNS expressziós különbségek a Limma csomag által kerültek kiértékelésre. A vizsgálat eredményeként kapott nominális p-értékeket többszörös hipotézisvizsgálási korrekciós módszerrel módosítottuk.

lncRNS-ek vizsgálata, mint diagnosztikai markerek

A hat kiválasztott lncRNS elemzése, mint diagnosztikai marker krónikus légúti betegségekben, Naïve Bayes-modellek létrehozásával történt az *R szoftver e1071 csomagjának* használatával. Az osztályozás a normalizált expressziós értékeken alapul különböző lncRNS-eket, illetve azok

kombinációját figyelembe véve: (1) minden lncRNS önmagában, (2) együtt a 6 lncRNS, (3) csak azon lncRNS-ek figyelembe vétele, melyek az adott összehasonlításban szignifikánsan eltérő expressziót produkáltak.

Mivel a páciensek száma jelentős szórást mutatott az alcsoportok között, az osztályozási modell során súlyozott pontosságot (weighted accuracy - WA) számoltunk. Minden modell esetén kiszámítottuk a tévesztési mátrix értékét egy keresztvalidációs sémával, úgynevezett „leave-one-out” elv alapján. Ezt követően megjósoltuk a kimaradt minta osztályát egy alapértelmezett 0,5-ös cut-off értékhatár segítségével, és összehasonlítottuk az adott minta előre jelzett osztályelnevezésével.

Az lncRNS-ek feltételezett funkcióinak előrejelzése

Először az lncRNS-gének hálózatát alakítottuk ki, három különböző adatbázis adatait összevetve (GTEX adatbázis; LncTarD adatbázis; STRING adatbázis). A létrehozott hálózat csomópontjai géneket, a csomópontokat összekötő élek pedig funkcionális kapcsolatot képviselnek. Ezután a hat lncRNS mindegyikéből indítottunk hálózati terjedési algoritmust, véletlenszerű sétát újraindítással, az egyes lncRNS-ek által szabályzott gének kvantitatív rangsorolására. Ezt követően génhalmaz feldúsulási elemzést (GSEA) végeztünk a funkcionálisan releváns útvonalak és a Gene Ontology (GO) kifejezések azonosítására.

A statisztikai számítások Dr. Gézsi András segítségével valósultak meg.

4. Eredmények

Tie2 útvonal és a TEK gén szerepének vizsgálata

A TEK gén és a Tie2 útvonal összefüggéseit asztmával és allergiás conjunctivitisszel kapcsolatban vizsgálva, az eredmények alapján az alábbi 5 SNP mutatott nominálisan szignifikáns asszociációt conjunctivitisszel: rs3739542; rs994934; rs622232; rs638203; rs7034505, így ezeket egy kibővített vizsgálati csoportban elemeztük tovább. Asztmával kapcsolatban egyetlen variáció (rs3824410) mutatott nominálisan szignifikáns eltérést.

A replikációs kohorszban gyermekkori asztmás populáción belül az rs622232 SNP ritka allélja összefüggést mutatott conjunctivitisszel fiúkban, domináns ($p=0,004$; OR =4,76 (95% CI: 1,54-14,75)) és allélikus módon is. Ezzel ellentétben az rs7034505 SNP ritka alléljának hordozása 2,42-szeresére növeli a conjunctivitis kialakulásának valószínűségét lányokban. Ezen SNP ritka alléljára nézve homozigóta személyek 5,46-szoros kockázati értékkel rendelkeznek conjunctivitisre, mint a gyakori allélra nézve homozigóták. Felnőtt asztmás populációt vizsgálva, az rs3824410 SNP ritka alléljának hordozása negatívan asszociált a súlyos asztma kialakulásával, tehát csökkentette kialakulásának valószínűségét (domináns modell: $p=0,022$; OR = 0,45 (95% CI: 0,22-0,90)). Amikor tovább szűkítettük a vizsgálati csoportot a felnőtt allergiás asztmás páciensekre, a rs3824410 variáció ritka allélja szintén alacsonyabb rizikóval asszociált súlyos asztmára allélikus és domináns módon egyaránt.

Egérmodell segítségével a *Tek* és *Angpt1* gének expressziójának szignifikáns csökkenését mutattuk ki az asztma kiváltásának folyamata során, míg a proinflammatorikus hatású *Nfkb* expressziója szignifikánsan emelkedett a kontrollcsoporthoz képest.

Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata

Konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével a neutrofil extracelluláris csapdák jelenlétét igazolni tudtuk, stimulálatlan sejtmentes plazma mintából, amelyre jelen tudásunk szerint az irodalomban még nem volt példa.

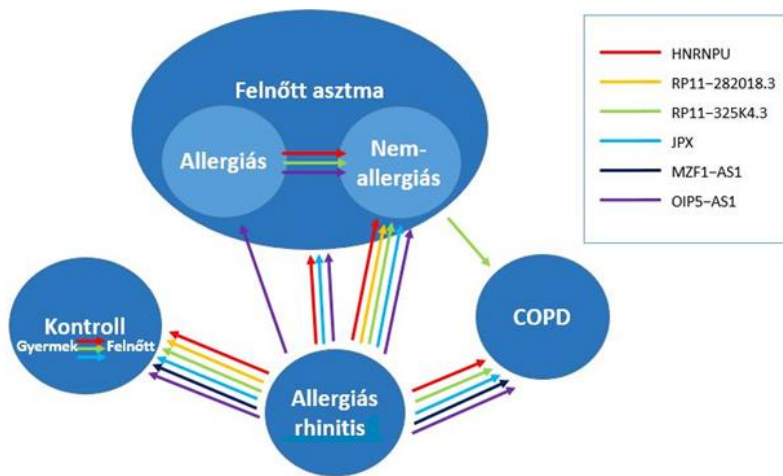
A keringő NET-ek *in vivo* kvantitatív kimutatására egy áramlási citometrián alapuló módszert dolgoztunk ki, mely akár klinikai körülmények között is alkalmazható. A NET-ek szintje a csoportok (felnőtt- és gyermekkori asztma, COPD, ACOS, felnőtt és gyermek kontroll) között nem tért el egymástól szignifikánsan, azonban asztma csoporton belül szignifikáns összefüggést (korrigált $p=0,027$) mutatott az betegség súlyosságával (GINA besorolás alapján), és negatívan korrelált a FEV1 légzésfunkciós értékkel ($r = -0,39$, $p = 0,002$). Ennek megfelelően minél alacsonyabb a FEV1 érték (rosszabb tüdőfunkció), annál magasabb a NET-szintje. A gyógyszerhasználat vizsgálata alapján elmondható, hogy az inhalációs kortikoszteroid folyamatos használata

alacsony plazma NET-szinttel asszociál ($p = 0,016$; korrigált $p = 0,027$). A NET mennyisége szignifikánsan magasabb volt azok között, akik nem alkalmaztak rendszeresen inhalációs kortikoszteroidot szemben azokkal, akik igen.

Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata

Nyolcvannégy hosszú nem-kódoló RNS expresszióját vizsgáltuk asztmás, COPD-s és kontroll mintákból álló felfedező populációban. Irodalomkutató, adatbázis-elemzés és saját vizsgálatunk eredményei alapján 6 hosszú nem-kódoló RNS-t (*OIP5-AS1*, *HNRNPU-AS1*, *RP11-325K4.3*, *JPX*, *RP11-282018.3*, *ACO16629.8*) választottunk ki validálásra egy kibővített populáción, melyben gyermek és allergiás rhinitises minták is helyet kaptak.

A validáló vizsgálatban mind a 6 általunk vizsgált lncRNS szignifikánsan magasabb szinten expresszáldott felnőtt allergiában kontrollokhoz képest. A további eredmények az alábbi ábrán megtekinthetők:



1. ábra. A szignifikáns értékek összefoglaló ábrázolása, a nyilak iránya a csökkenő normalizált expressziós szint felé mutat, míg a nyilak színe az egyes lncRNS-eket jelöli

Biomarker vizsgálat során az allergiás rhinitis vs. felnőtt kontroll összehasonlításban érték el mindhárom modellben a legmagasabb súlyozott pontossági értéket. Az *OIP5-AS1* és *JPX* rendelkezett a legmagasabb diszkriminatív értékkel. Emellett a felnőtt allergiás rhinitis és nem-allergiás

asztma összehasonlítás során szintén az *OIP5-ASI* hosszú nem-kódoló RNS érte el a legmagasabb WA értéket az összes modell közül (WA=0,74).

5. Következtetések

Tie2 útvonal és a *TEK* gén szerepének vizsgálata

- Az rs622232 SNP jelenléte gyermekkori asztmás populációban, fiúkban megnövelte az allergiás conjunctivitis kialakulásának kockázatát
- az rs7034505 variáció minor alléljának homozigóta formában való jelenléte lányokban emelkedett allergiás conjunctivitis kockázattal asszociált
- az rs3824410 variáció minor T alléljának jelenléte csökkenti a súlyos asztma kialakulásának rizikóját felnőtt (allergiás) asztmás populációban
- asztma-egér modell vizsgálata során a *Tek* és *Angpt1* gén alulexpresszáldott kontrollokhöz képest, míg az *Nfkb* expressziója szignifikánsan emelkedett
- a Tie2 útvonal és *TEK* gén szerepe asztmában és allergiás conjunctivitisben további bizonyítást nyert
- a Tie2 útvonal, a *TEK* gén és a kapcsolódó génvariációk potenciális terápiás célpontok lehetnek asztmában és allergiás conjunctivitisben.

Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata

- Kidolgoztunk egy új áramlási citométer alapú mérési technikát a neutrofil extracelluláris csapdák mennyiségi értékeléséhez, amely akár a klinikumban is alkalmazható
- nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a betegcsoportok közötti átlag NET-szintben

- az asztma súlyossággal parallel emelkedő NET átlagértéket kaptunk
- a légzésfunkció FEV1 értéke negatív korrelációt mutatott a NET-szinttel
- az inhalációs kortikoszteroidok NET-csökkentő hatásúak lehetnek, mely jelenség kihasználható lehetne olyan kórképekben, ahol a netózis folyamata szerepet játszik a betegség patogenezisében.

Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata

- A felfedező kohorszban 27 lncRNS mutatott nominálisan szignifikáns eltérést legalább egy összehasonlításban
- mind a hat, replikációs vizsgálatra kiválasztott (*OIP5-AS1*, *HNRNPU*, *RP11-325K4.3*, *JPX*, *RP11-282O18.3*, *MZF1-AS1*) lncRNS szignifikánsan magasabb szinten expresszáldott felnőtt allergiás rhinitisben kontrollokhöz képest
- allergiás asztmában az *RP11-325K4.3*, *HNRNPU* és *OIP5-AS1* lncRNS-ek szignifikánsan magasabb expressziót mutattak nem-allergiás asztmával szemben
- felnőtt asztma és COPD között egyetlen lncRNS mutatott különbséget, az *RP11-325K4.3*, mely szignifikánsan magasabb normalizált expressziós szintet mutatott asztmában COPD-vel szemben, azonban a nagy minták közötti szórás miatt differenciáldiagnosztikára nem alkalmas
- az *OIP5-AS1* átlag expressziója minden esetben szignifikánsan magasabb szintet mutatott abban a csoportban, ahol az allergia jelen volt önmagában vagy társbetegség formájában, valamint a biomarkerként történő vizsgálata során a legmagasabb diszkriminatív erővel

rendelkezett → Allergénspecifikus immunterápia nyomonkövetésére alkalmas lehet.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Első szerzős közlemények:

1. **Gál Z**, Gézsi A, Molnár V, Nagy A, Kiss A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Bálint BL, Póliska S, Szalai C. Investigation of the Possible Role of Tie2 Pathway and *TEK* Gene in Asthma and Allergic Conjunctivitis. *Front Genet.* 2020 Feb 27;11:128. doi: 10.3389/fgene.2020.00128. Erratum in: *Front Genet.* 2020 Jul 10;11:702. PMID: 32180797; PMCID: PMC7057532.
IF: 3,258
2. **Gál Z**, Gézsi A, Pállinger É, Visnovitz T, Nagy A, Kiss A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Szalai C. Plasma neutrophil extracellular trap level is modified by disease severity and inhaled corticosteroids in chronic inflammatory lung diseases. *Sci Rep.* 2020 Mar 9;10(1):4320. doi: 10.1038/s41598-020-61253-2. Erratum in: *Sci Rep.* 2020 Jul 31;10(1):13182. PMID: 32152402; PMCID: PMC7062787.
IF: 3,998
3. **Gál Z***, Gézsi A*, Semsei ÁF, Nagy A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Szalai C. Investigation of circulating lncRNAs as potential biomarkers in chronic respiratory diseases. *J Transl Med.* 2020 Nov 10;18(1):422. doi: 10.1186/s12967-020-02581-9. PMID: 33168013; PMCID: PMC7653503.
IF: 4,124

* Megosztott első szerzős közlemény

Társszerzős közlemények:

1. Molnár V, Nagy A, Tamási L, Gálffy G, Böcskei R, Bikov A, Czaller I, Csoma Z, Krasznai M, Csáki C, Zsigmond G, Csontos Z, Kurucz A, Kurucz E, Fábos B, Bálint BL, Sasvári-Székely M, Székely A, Kótyuk E, Kozma GT, Cserta G, Farkas A, **Gál Z**, Gézsi A, Millinghoffer A, Antal P, Szalai C. From genomes to diaries: a 3-year prospective, real-life study of ragweed-specific sublingual immunotherapy. *Immunotherapy*. 2017 Nov;9(15):1279-1294. doi: 10.2217/imt-2017-0093. PMID: 29130793.
IF: 2,964
2. Csoma Z, **Gál Z**, Gézsi A, Herjavec I, Szalai C. Prevalence and characterization of severe asthma in Hungary. *Sci Rep*. 2020 Jun 9;10(1):9274. doi: 10.1038/s41598-020-66445-4. PMID: 32518278; PMCID: PMC7283249.
IF: 3,998

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

1. Fodor LE, Gézsi A, Ungvári L, Semsei AF, **Gál Z**, Nagy A, Gálffy G, Tamási L, Kiss A, Antal P, Szalai C. Investigation of the Possible Role of the Hippo/YAP1 Pathway in Asthma and Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017 May;9(3):247-256. doi: 10.4168/air.2017.9.3.247. PMID: 28293931; PMCID: PMC5352576.
IF: 4,157
2. Fodor LE, Gézsi A, **Gál Z**, Nagy A, Kiss A, Bikov A, Szalai C. Variation in the TEK gene is not associated with asthma but with allergic conjunctivitis. *Int J Immunogenet*. 2018 Jun;45(3):102-108. doi: 10.1111/iji.12365. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29667338.
IF: 1,130

Összesített impakt faktor: **23,629**