

PhD értekezés

A TL1A/VEGI gén expressziójának vizsgálata differenciálódó csirke porcszövetben és humán autoimmun folyamatokban

Tubak Vilmos
Témavezető: Dr. Duda Ernő

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet

Szeged
2008

Irodalmi áttekintés

A TNF géncsalád tagjainak azonosítása

A Tumor Nekrózis Faktor (TNF) felfedezése még 1893-94-re nyúlik vissza, amikor William Coley New York-i sebész leírt egy daganatos betegek bakteriális fertőzésekor fellépő jelenséget, amely a daganat bevérzéses elhalásához¹ vezetett. A kutatások előrehaladtával felfedezték a TNF szerkezeti homológ rokon fehérjéit, amelyeket egy családba lehetett sorolni. Ezek a fehérjék többféle élettani hatással rendelkeznek, és ma már tudjuk, hogy szinte minden életfolyamatban részt vesznek. Mivel halakban sikerült azonosítani a TNF-t, a cél, hogy csirkében azonosítsuk a TNF-et vagy a TNF-fel rokon fehérjét kézenfekvő volt, hiszen ennek a molekulacsaládnak az eredete szinte teljesen ismeretlen, és tanulmányozva a különböző fajokból származó molekulákat új ismereteket szerezhetünk azok szerkezetéről és funkciójáról. Korábban csirke eredetű makrofágok esetében írták le, hogy azok bakteriális lipopoliszaccharid hatására kibocsájtottak egy kb. 17 kDa molekulású fehérjét, amely keresztreakált egy poliklonális anti-humán TNF ellenanyaggal. Mai tudásunk szerint génduplikációkkal jöhetett létre ez az emberben mintegy 20 tagot számláló, szerteágazó hatásokkal bíró molekulacsalád, illetve azok receptorai.

A TL1A a TNF legközelebbi rokona

A humán TL1A (TL1A= TNF Like 1..., VEGI=Vascular Endothelial Growth Inhibitor) a Tumor Necrosis Factor SuperFamily (TNFSF) tagja, nevezéktanilag: TNFSF15. A tagok között szerkezeti homológia mutatható ki. A TL1A és a TNF közötti hasonlóságot még élettani hatások is alátámasztják. A TNF biológiai hatásai közül az egyik legismertebb, hogy egér fibroblaszt sejteken (L929) képes apoptózist kiváltani. A TNF-család tagjainak lényeges jellemzője, hogy a trimer formában fejtik ki hatásaikat az ugyancsak trimerizált receptoron keresztül. A TL1A receptora a DR3, az egyik TNF-receptor (TNF.R1) legközelebbi rokona. A DcR3 gén terméke ugyancsak homotrimer formában kötődik a TL1A-hoz, de ez a molekula — a DR3-mal ellentétben — nem membránhoz kötött, hanem szabadon keringő formában képződik. A DcR3 azonban kötődik még két másik TNF-családtaghoz is, mégpedig a LIGHT és a FasL molekulákhoz, bár eltérő mértékben. A DcR3 termelődése megfigyelhető tumorokban, és bizonyítottan részt vesz a tumorszövet immunoprivilegizált helyzetének kialakításában, továbbá szerepe van a dendritikus sejtek érésében. Csirkében bizonyított a DcR3 létezése, ám funkciójáról kevés adat áll rendelkezésre.

A TL1A/VEGI biológiai hatásai

A humán TL1A-t kódoló gén a 9. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (9q32), egy 16,8 kilobázis hosszú DNS szakaszon és 4 exonból áll. A fehérjének 3 izoformája ismert, amelyek alternatív promoterről képződnek, továbbá jelentős megjegyeznünk, hogy a fehérje poszttranszlációs modifikáción megy keresztül. Az izoformák biológiai hatásairól tudjuk, hogy a 174 aminosav hosszú variánsa (VEGI-174) gátolja a vérerek endotél sejteinek osztódását, a 192 aminosav hosszú izoforma (VEGI-192) a tumornövekedést gátolja. Ugyancsak ez az izoforma az antigénprezentáló funkcióval rendelkező naiv dendritikus sejtek (DC) érését és antigénprezentáló aktivitását indukálja. Ez a lépés alapvető fontosságú a T-sejtek specifikussá éréséhez. A legnagyobb mennyiségben termelődő 251 aminosav hosszú TL1A a DR3 receptoron keresztül a T-sejtek effektor funkcióját serkenti.

¹ Bevérzéses elhalás: Haemorrhagic necrosis

A TL1A patológiás viszonyok között fokozottan termelődik gyulladásoz bélszakasz *lamina propria* rétegében, amelyet elsőként a *Crohn-betegségben* írtak le.

A *Reumatoid artritisz* (RA) a kisízületek ismeretlen eredetű krónikus gyulladásoz megbetegedése. A TL1A fokozott termelődését mutatták ki az IgG1 Fc fragmentjének hatására humán monocita és dendritikus sejtekben. A DR3 receptor génjében már leírtak olyan SNP-t is, amely halmozottan fordul elő RA-s betegekben. A DR3 receptor egy részének duplikációja is előfordul ugyancsak a RA-es populációban, amely egy DcR3-hoz hasonlító molekulát eredményez.

A *Szkleroszis multiplex* egy súlyos idegrendszeri betegség, amely főleg a perifériás idegrostokat támadja meg auto-reaktív T-sejtek közvetítésével, autoimmun gyulladás formájában. A TL1A-hiányos kísérleti egérben a szkleroszis tünetek kb. csak 50%-ban válthatók ki.

A *pikkelysömör* (psoriasis) a bőr T-sejt mediálta autoimmun betegsége. Jelentős szerepe van a betegség fenntartásában a gyulladásoz mediátoroknak, így a TNF-nak, és az interferon gammának (IFN), amelyek az aktivált T-sejtek termelnek. A bőr keratinocitái immunsejtek tekinthetők és hordoznak citokin receptorokat, ezekre a génextpressziós mintázatuk megváltozásával reagálnak. Elem lehet a betegség eredetének tisztázásában fontos lenne azon gének megismerése, amelyek a betegség létrejöttében, illetve a betegség fennmaradásában játszanak kulcsszerepet. Ezek kiiktatása egy specifikus gátlószerrel megakadályozhatja a progressziót és/vagy hosszú ideig tünetmentességet biztosíthat a beteg számára.

A *Crohn-betegség*, a *Pikkelysömör*, a *Reumatoid artritisz* és a *Szkleroszis multiplex* T-sejt (Th1) mediálta betegségek. Tünetegyüttesük néha „átfednek”, s mindhárom betegség kezelésében a TNF-elleni célzott terápia több év óta bevezetésre került és jó eredményekről tesznek jelentést, a sajnálatos és jelentős mellékhatások ellenére.

Citokinek expressziója a bőrben

A bőr az egyik legfontosabb védekező szervünk, amely megvéd a külső környezet káros behatásaitól, így a káros UV sugárzástól, mechanikai behatásoktól, kórokozóktól. A védekezés fontos elemei az immunsejt tulajdonságokkal is rendelkező keratinociták. Ezen felül a bőrben is megtalálhatóak az adaptív immunválasz fontos elemei is, a naív, myeloid eredetű dendritikus sejtek (DC), amelyek aktiválódása kórokozók által jön létre és professzionális antigénprezentálási képességük révén a központi nyirokszervek felé közvetítik a vészjelzést a testidegen ágens jelenlétéről. A naív T sejteket aktiválják, amelyek ezt követően szövetspecifikus jelleggel az immun-inger kiindulási helyére vándorolnak. Ezek azok a sejtek, amelyek TNF-át és IFN-át termelnek, így a citokinek helyben a keratinocitákra (KC) hatva gyulladást generálnak. Ismert, hogy az epidermális keratinociták génextpressziós mintázata TNF indukció hatására megváltozik. Az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy ez kb. 1300 gént jelent.

Transzkripciós faktorok szerepe a pikkelysömör pathomechanizmusában

A pikkelysömör létrejöttében szerepet játszó transzkripciós aktiváló faktorok közül az Interferon Regulált Faktorokat (IRFs=Interferon Regulated Factors), a STAT faktorokat (STAT=Signal Transducer and Activator of Transcription) és az NF- κ B-t, mint mester regulátort kell megemlítenünk. Az IRF-ek közül az IRF1 és IRF2-vel foglalkozom részletesen, mivel irodalmi adatok szerint pikkelysömör esetén a keratinocitákban kifejeződő egymással rokon fehérje szintje egymáshoz képest megváltozik.

Az immunsejtek IFN-indukcióra adott válasza több szinten valósul meg. Az „Elsődleges Génszinten” vannak olyan transzkripciós faktorok génjei, amelyek aktiválódásukat követően más gének kifejeződését segítik elő, amelyeket így „Másodlagos Génszintnek” nevezhetünk. Az Elsődleges Gének között találjuk az IRF és STAT transzkripciós faktorok génjeit, amelyek a Másodlagos Génszinten lévő gének közül olyanokat aktiválnak, amelyeknek cisz-reguláló

promoter-elemei között megtalálhatóak az IRF és STAT kötőhelyek. Ilyen gének az iNOS) és az IL-8, amelyek részvétele a pikkelysömörre jellemző Th1-típusú klinikai kép kialakításában ugyancsak ismert tény.

Az NF- κ B és az IRF1 transzkripciós faktorok kötőelemei sok gén promoterében megtalálhatóak, általában egymás közelében. A két faktor egyidejű jelenléte és aktivált állapota a célgének expressziós szintjének megsokszorozódást szinergista módon növeli meg. A TL1A gén promoterét korábban alaposan feltérképezték, amely összhangban van a TL1A különböző citokinekkal történő indukálhatóságával.

A pikkelysömör tanulmányozásának szempontjából fontos azt is megjegyezni, hogy az egyik elfogadott modell az IRF2^{-/-} egér, ahol a faktor génjének teljes hiánya az állatban spontán pikkelysömörös tünetek kifejlődéséhez vezet. Pikkelysömör betegség esetében kapcsoltság mutatható ki egy az IRF2 gént is tartalmazó kromoszómális lokusszal, továbbá eltérés tapasztalható az IRF1/IRF2 transzkripciós faktorok szintjében az egészségesekhez képest.

A STAT3 pikkelysömörben fokozottan aktivált, és a STAT3 egy aminosav cserével létrehozott konstitutíven aktivált formájának (STAT3C) szövetspecifikus túlexpresszálatásával kísérletesen pikkely-sömörös állatmodellt lehet létrehozni.

Célkitűzések

Eredeti célkitűzésünk az volt, hogy **(1)** bizonyítsuk a Tumor Nekrózis Faktor (TNF) génjének vagy a **(2)** TNF-fel rokon gének létezését a csirke (*Gallus gallus*) genomban. Mivel korábban már halakban is igazolták a TNF gén létezését, ezért kézenfekvő volt annak fellelhetősége a madarakban is. A későbbiekben ez a feladat módosult és így célunk lett a **(3)** csirke végtag növekedési porckorongjában expresszálandó TL1A gén vizsgálata, valamint a humán TL1A lehetséges szerepének tanulmányozása pikkelysömörösben és reumatoid arthritisben. Mivel pikkelysömörben ismert volt, hogy kapcsolat van a kórkép és egyes transzkripciós szabályozó faktorok aránya között, ezért megpróbáltunk adatokat nyerni pikkelysömörös betegmintákból a TL1A, a transzkripciós faktorok expressziója és a betegség összefüggését illetően.

Anyagok és módszerek

In silico lépések

Tblastx keresést hajtottunk végre egy, az interneten keresztül elérhető csirke porcsejt EST könyvtár adatbázison az emberi és a szívárványos pisztráng TNF fehérjeszekvenciák kereső motívumként történő felhasználásával, és így azonosítottuk a csirke TL1A-t. A humán TL1A gén promoterének analízisét különböző emlős fajok TL1A génjének 3000 bp-os upstream promoter szekvenciájának összehasonlításával végeztük el.

Sejtek, sejtvonalak és szövetminták felhasználása

A 14,5 napos csirke embriók végtagkezdeményeiből kimetszettük a növekedési porckorongokat és az ebből készített cDNS preparátumokat használtuk a csirke TL1A génextpressziós vizsgálatokhoz. A humán TL1A génextpressziós kísérletekhez az SW1353 jelű kondroszarkóma sejtvonalat, valamint a helyi etikai bizottság beleegyezése és útmutatásai alapján a pikkelysömörös beteg tünetes és tünetmentes bőrből vett mintákat használtuk fel.

Biológiai tesztek

A citokinekkal történő indukciós kísérletekhez rekombináns humán TNF α -t, IFN γ -t és IL-1 β -t használtunk. A citokinek aktivitását gyári standard készítményekkel szemben validáltuk. A humán TL1A expressziójának vizsgálatát SW1353 sejten 24 órás citokin indukciót követően végeztük el.

cDNS készítés

A sejtekből össz-RNS preparátumot készítettünk guanidium-tiocianát extrakcióval. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét ellenőriztük. A cDNS-t egy pontmutációt tartalmazó RNase H⁻ reverz transzkriptázzal készítettük el, amit ezt követően valós idejű (real-time) és normál PCR-es kísérletekhez használtunk fel.

PCR primerek és PCR körülmények

Az *in silico* keresést követően a hasonlóságot mutató EST szekvenciák alapján egy 470 bp-os szakaszt klónoztunk, PCR-rel. A bakteriális és bakulovírusos expresszióhoz a megfelelő plazmidba építettük be az irodalmi adatok alapján biológiai funkciót hordozó cDNS fragmenteket. A csirke DcR3 mRNS expressziójának igazolásához ugyancsak PCR primereket szintetizáltattunk a szekvencia alapján, amely egy 370 bp-os fragmentet amplifikál.

Valós idejű (Real-Time) PCR

A humán TL1A, IRF1 és IRF2 gének expressziójának vizsgálatát génspecifikus TaqMan assay-vel folytattuk le, Bio-Rad gyártmányú iCycler készüléken a szokásos TaqMan körülmények között.

Klónozás, szekvenálás

A PCR amplikonokat agaróz gélelektroforézissel analizáltuk, majd a gélből kitisztított fragmenteket TA klónozó vektorba építettük, baktérium sejtbe transzformáltuk és a telepekből tisztított plazmid DNS miniprepeket szekvenálással ellenőriztük. A szekvencia-adatokat összehasonlítottuk azzal az EST adatbázissal, amelyből kiindultunk.

A csirke TL1A fehérje termeltetése bakteriális és bakulovírusos rendszerben

A PCR amplifikációval kinyert, gélből kitisztított, majd megemésztett fragmentet a pET28a jelű bakteriális expressziós vektor *Bam*HI-*Xho*I helyére építettük be, majd *E. coli* BL21/RIL bakteriális törzs sejtjeibe transzformáltuk. A transzformánsokból miniprepeként kinyert plazmid DNS bázissorrendjét a klónozóhely mindkét oldaláról kiindulva meghatároztuk. A csirke TL1A fehérje bakteriális rendszerben történő termeltetését a gyártó ajánlásainak megfelelően végeztük el. A bakulovírus alapú fehérjetermeléshez a pFastBacHTB vektort használtuk.

Affinitás kromatográfia

A jégen felolvasztott, rekombináns fehérjét tartalmazó sejteket PBS oldatban szuszpendáltuk, és ultrahangos feltárással szolubilizáltuk, A sejtfa-törmelékét centrifugálás révén távolítottuk el az oldatból. A feltisztult oldatot egy előzetesen PBS-sel ekvilibrált Talon (His6 affinitás) oszlopra vittük fel. Az oszlopot a felvivő pufferrel mostuk, majd frakciókat szedve, lineáris imidazol grádiens alkalmazva eluáltuk a megkötődött fehérjéket. A frakciókat poliakrilamid gélen analizáltuk.

Western blot

A Western blotting kísérletet a standard eljárásoknak megfelelően végeztük el, nitrocellulóz membránon, a rovarsejtek „crude extrakt”-jából készült affinitás kromatográfia frakcióiból vett mintákon. Elsődleges (kecske anti-VEGI ellenanyag) és másodlagos (tormaperoxidáz-konjugált nyúl anti-kecske IgG, Fc fragment specifikus) ellenanyagokat alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően. A peroxidáz aktivitás detektálását kemilumineszcens kit segítségével végeztük el, ugyancsak a felhasználási útmutató szerint.

Immunhisztokémia

A TL1A protein kimutatása rutin immunohisztokémiai detektálási módszerrel történt poliklonális kecske anti-VEGI (humán/egér/patkány) elsődleges ellenanyaggal, nyúl anti-kecske immunoglobulinnal és polimer-tormaperoxidázzal jelölt anti-nyúl Ig ellenanyaggal.

Eredmények

A humán TNF gén legközelebbi rokonának azonosítása a csirke genomban

Az eredeti célkitűzésünk az volt, hogy a csirke Tumor Nekrózis Faktor (TNF) génjét megklónozzuk, amelynek létezésére csak funkcionális adatokon alapuló indirekt bizonyítékok álltak rendelkezésre. Az először degenerált PCR primerekkel elvégzett PCR reakciókkal nem sikerült előbbre jutnunk, mivel a kapott amplifikátumok szekvencia adatai alapján azok egyike sem volt azonosítható a TNF α -val. A másik megközelítésben már ismert TNF α fehérjeszekvenciákat felhasználva mintaként a GenBank adatbázisban történő *in silico* keresés a korábban VEGI-ként (Vascular Endothel Growth Inhibitor) leírt fehérje génjét eredményezte, csirkében. A humán TL1A fehérje biológiailag már aktív része a 72. aminosavtól a 251. aminosavig terjed. A fehérjeszekvenciák egymásra illesztésével meghatároztuk a klónozáshoz használható primerek helyzetét és ezt követően építettük be a csirke TL1A cDNS egy 670 bp-os szakaszát expressziós vektorokba, amely az említett fehérjét kódolja.

Génszerkezet és kromoszómális lokalizáció

A csirke kromoszómális szekvencia-adatbankot 2004-ben tették nyilvánosan elérhetővé². A ChEST230f6 szekvencia felhasználásával BLAST keresési módszerrel beazonosítottuk a gén kromoszómális lokalizációját. Ennek alapján a csirke VEGI/TL1A a 17. kromoszómán található, egy 13 kilobázispár (kbp) hosszú szegmensben. A géncsalád génduplikálódásra visszavezethető keletkezését mutatja, hogy például a szomszédos CD30L gén, amely ugyancsak a TNF géncsalád tagja az emlős fajokhoz hasonlóan ugyanezen a kromoszómán helyezkedik el. A gén exon/intron szerkezete szinte teljesen megegyezik más emlős fajok TL1A génjének felépítésével.

A promoter-analízis eredménye

A TL1A promoterében az eddig ismert szabályozó régiókon felül feltételezünk egy új, mások által eddig még fel nem fedezett transzkripciós aktivátor szekvenciát, amely szinte teljesen megegyezik a konszenzus IRF-1 kötőhellyel. Az analízist 6 különböző faj TL1A szekvenciájának egymáshoz illesztésével kezdtük, majd ezt összevetettük olyan adatbankokkal, amelyek szisztematikusan tartalmazzák az eddig ismert összes szabályozó faktor felismerő-szekvenciáját. A tény, hogy a TL1A promoter régiójában sok fajra kiterjeszhetően fellelhető egy szekvencia mutatja, hogy evolúciósan fontos szabályozó elvről lehet szó, mivel ugyanezen fajokban ismert az IRF-1 fehérjék létezése is. Érdekes tény, hogy az IRF-1 faktort csirkében is azonosították, mint az IFN- α -ra adott válasz fontos alkotóeleme. A humán IL4 gén promoterében az IRF elemek több példányban találhatóak meg, létezésüket funkcionális kísérletekkel bizonyították.

A csirke TL1A expressziója az osztódó porcsejtekhez lokalizálható

Az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséhez a kereskedelemben nem volt kapható olyan ellenanyag, amely kifejezetten a csirke TL1A ellen készült volna (mivel akkor még nem is

² <http://genome.wustl.edu/projects/chicken/>

ismerték azt). Ezért a prediktált protein-szekvencia alapján más fajok TL1A fehérjével homológ szakaszokat kerestünk az általunk azonosított TL1A fehérjében. Ennek alapján a Santa Cruz cég P-18 jelzésű poliklonális, multispecies specifikus ellenanyagát választottuk ki további kísérleteinkhez, amely már első próbálkozásra jelet adott csirke növekedési porckorongból készült metszeten. Mivel a gyártó nem adta meg a használt peptidantigén szekvenciáját, ezért a porcsejtek által termelt fehérjéről be kellett bizonyítani, hogy azonos a TL1A fehérjével. Ehhez a TL1A gént meg kellett klónozni a porcsejtből származó cDNS mintából, majd expresszálni bakteriális és bakulovírusos rendszerben.

A csirke DcR3 cDNS jelenlétének igazolása a végtagporc-kezdeményben

A porcsejtekből készült RNS (illetve cDNS) tartalmazhatja a TL1A keringő receptorának, a DcR3-nak az mRNS-ét, ami a TL1A szerepének tisztázásához adhat segítséget. Ennek lehetőségét először *in silico* ellenőriztük úgy, hogy BLAST összehasonlítást végeztünk el ugyancsak azon a nyilvános csirke génbankon, amelyben a TL1A gént megtaláltuk. Ebben az esetben viszont az ismert csirke DcR3 szekvenciát használtuk kereső motívumként. A keresés eredményeként egy EST³ szekvenciát kaptunk, és ezért ugyanabból az RNS preparátumból kiindulva RT-PCR reakciót végeztünk el, amelyhez a primereket ezen EST szekvencia alapján terveztük meg. A várható amplicon mérete 339 bp. Az ígéretes amplifikációt követően a PCR fragmentet plazmid vektroba építettük és meghatároztuk nukleotid sorrendjét (4. és 5. ábra).

A csirke TL1A biológiai aktivitásának mérése

Mivel hosszú ideig nem sikerült előállítani hosszabb darabot a csirke TL1A cDNS-éből, ezért kezdetben a tenyésztett csirke-kondrociták felülszóját használtuk biológiai tesztkísérletekben, hogy el tudjuk dönteni, hogy hasonlóan a humán ortológhoz ez is képes-e T-sejteket aktiválni. Ehhez csirkéből származó immortalizált T-sejteket használtunk (REV-T), amelyek IFN termelését vizsgáltuk. A teszthez a csirke porcsejtek felülszójának hígításait inkubáltuk célsejtekkel. A célsejt egy olyan stabil transzfektáns fűj fibroblaszt sejtvonala, amelyben a luciferáz riporter gén kifejeződése a guanilát kötőfehérje (GBP) transzkripciósi faktor kontrollja alatt áll. A csirke T-sejtek által a tápfolyadékba kiválasztott IFN γ a fűjsejtek tenyészetéhez adva indukálja a GBP-t. Tehát a fűjsejtek feltárása után mért luciferáz aktivitás a T-sejtek IFN γ termelésének függvénye. A mi tesztrendszerünkben a luciferáz gén kifejeződését is elindítja a módosított fűj fibroblaszt sejtekben. Ugyanaz az elem képes nemcsak csirke, hanem egér- és humán eredetű sejtekben is működni.

A csirke TL1aA expressziója

A bakteriális expresszióval előállított fehérje tisztításakor technikai akadályokba ütköztünk. Már az ultrahangozást követően a fehérje gélelektroforézis eredménye révén észleltük, hogy az izolálni kívánt fehérje jelentős része zárványtestekben található, illetve a szolubilis része pedig kicsapódik rövid ideig tartó állás során is. Ezért döntöttünk úgy, hogy áttérünk a bakulovírus alapú expressziós rendszer alkalmazására. A csirke TL1A a klónozási kísérlet során kapott egy affinitás-kromatográfiás tisztításra alkalmas His6-tag-et (toldalékot).

A His6-tag-elt, rekombináns fúziós fehérje 235 aminosav hosszú, számított molekulatömege 26 kD-nak becsülhető.

A TL1A fokozott mértékű kifejeződése pikkelysömörben

A feltételezésünk — hogy a TL1A esetleg jelen van proliferáló keratinocitákban — abból a megfigyelésből indult ki, hogy csirkében az osztódó porcsejtek termelik a TL1A fehérjét. Ugyan

³ EST= Expressed Sequence Tag (kifejeződő szekvencia darab, részlet)

a két sejttípus igen távol áll egymástól, de mivel **(1)** pikkelysömörre is jellemző a fokozott — keratinocita — proliferáció (parakeratózis) és hogy **(2)** a keratinocita tulajdonképpen immunsejt. Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a TL1A indukciója bekövetkezik többek között TNF és IL-1 hatására is. A TNF α -val történő indukció esetében az indukció egy NF- κ B transzkripciós faktor/kötőhely révén valósul meg. Azok a transzkripciós faktorok (IRF1 és IRF2), amelyeknek szerepet tulajdonítunk a TL1A gén expressziójában jelen vannak és így vizsgáltuk azok indukálhatóságát. Korábban publikált irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a pikkelysömörös bőrben az IRF1/IRF2 faktorok mennyiségének aránya eltolódik az előbbi javára. Ezzel összhangban áll az egyik egérmodell esetében megfigyelt jelenség, ahol az IRF2^{-/-} egérben az emberi pikkelysömörre jellemző tüneteket lehet kiváltani.

Az IRF1 és IRF2 gének relatív expressziójának vizsgálatához egészséges emberből származó keratinocita szuszpenziót használtunk, amelyet különböző koncentrációjú citokinekkal indukáltunk. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk ugyanezen gének expresszióját pCMV-STAT3C konstrukcióval stabilan transzformált keratinocita sejtekben, mivel elfogadott egérmodell létezik pikkelysömörre a STAT3C transzgenikus egér formájában. A TL1A génextpressziójának vizsgálatában összehasonlítottuk a tenyésztett és indukált keratinocitákban, valamint pikkelysömörös betegekben származó keratinocitákban a relatív expresszió mértékét.

A TL1A expresszióját vizsgáltuk még az SW1353 jelű humán kondroszarkóma sejtekben, citokin indukciókat követően.

Eredmények összefoglalása

1. A TNF géncsalád tagjai klaszterekben helyezkednek el az egyes kromoszómákon. A csirke TL1A lokalizációja megfelel ennek a klaszterszabálynak.
2. A TL1A kifejeződik a fejlődő, 14,5 napos csirke embrió végtagjainak növekedési porckorongjaiban.
3. Több faj esetében megfigyelhető, hogy a TL1A gén promoterében megtalálható a konszenzus IRF kötőhely.
4. Sikeresen kimutatni — a TL1A fokozott expresszióját a reumatoid artritisz modelljeként használt emberi sejtvonalban, valamint a
5. — pikkelysömörben szenvedő betegekben származó mintákban, és
6. — az IRF1 és IRF2 faktorok cDNS-ének eltérő arányát a bőr különböző rétegeiben.

Eredmények megvitatása — *diskusszió*

Mivel a csirkében nincs TNF ortológ, ugyanakkor a csirke TL1A az L929 sejtben képes hasonló módon apoptózist kiváltani, ez arra enged következtetni, hogy a TNF által kifejtett biológiai funkciót csirkében a TL1A látja el, amit munkacsoportunk hasonló típusú előkísérleti eredményei alapján magunk is feltételeztünk.

Kísérleteinkben sikerült meggyőzően bizonyítani a TL1A gén kifejeződését **(1)** csirke eredetű osztódó porcsejtekben, **(2)** emberi eredetű kondroszarkóma sejtekben és **(3)** pikkelysömörben szenvedő betegnek bőrének keratinocitáiban, mRNS szinten. Az első esetben a kifejeződő fehérje jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel is igazolni tudtuk

A csirke porcsejtben kifejeződő TL1A/VEGF fehérjének egyrészt szerepe lehet a porca jellemző szöveti szerkezet kialakulásában, másrészt hozzájárulhat a porcszövetre jellemző viszonylagos érzékenységhez. A morfológiai szerepkört alátámasztja, hogy kimutattuk a Dcr3 gén kifejeződését mRNS szinten. Az emberi eredetű kondroszarkóma sejtvonal (SW1353) a kísérletes reumatoid artritisz-kutatások kedvence. A TL1A kifejeződésének itt abban rejlik a jelentősége, hogy mivel ezt a sejtvonalat tekintik a reumás ízületi porc kísérletes

megfelelőjének, az általa termelt citokinek és biológiailag aktív molekulák szerepe a gyulladással kapcsolatos kialakulásában és fenntartásában ezen keresztül vizsgálható. A gyulladt ízületi folyadékban (izzadmányban) — az immunkomplexek alkotóinak betudhatóan — a TL1A-nak emelkedett a szintje, és ez a jelenlévő aktivált T-sejtek helybenmaradását idézheti elő. Mivel az emlősökben megtalálható DcR3-ról tudjuk, hogy képes makrofág sejteket oszteoklaszt sejtekké differenciáltatni, ezért fennáll annak a lehetősége, hogy a porcsejtekben a TL1A esetleg a DcR3 által esetlegesen kiváltott reverz szignál mechanizmuson keresztül vesz részt a porcából kiinduló endokondrális csontosodás folyamatában. Ezért megpróbáltuk a DcR3 jelenlétét detektálni a csirke végtag növekedési porcporongjából készült cDNS-en, amely azonban önmagában csak fogódzónak tekinthető későbbi kísérletekhez.

Lehetőségek a krónikus gyulladással járó kórképek kezelésére

A STAT3 transzkripciós faktor aktivált állapota jellemzője a keratinociták differenciálódásának és pikkelysömörben ehhez hozzájárul a sejtek folyamatos osztódása. A STAT3, mint mesterregulátor más gének aktiválódásáért felelős — pl. ICAM—, amely fokozott expressziójáért részben az IRF elemet teszik felelőssé. A konszenzus IRF felismerő-helyet — saját *in silico* adatainkra alapozva — fellelhetjük a TL1A gén promoterében is.

Fehérje-természetű anyagoknak a bőrön, mint barrier-en keresztül történő bevitelével jelenleg még nem megoldott, de egy hidrogéles kenőcsben, illetve ennek kombinálása iontoforetikus v. ultrahangos kezeléssel eredményekkel kecsegtet. A helyi anti-TL1A kezelés megvalósítása a mellékhatások kiküszöbölésének egyik módja lehet a pikkelysömör kezelését illetően.

A receptor fehérjeszekvenciájának egyetlen aminosav eltérése gyengítheti a ligand kötődésének erősségét, amelyre példa az osteoprotegerin 4. számú, ún. cisztein-gazdag doménjében (CRD⁴) felfedezett mutáció. Ezt teszik felelőssé az öröklődő, juvenilis Paget kór kialakulásáért. Szerkezet-homológiai megfontolásból ered az az elképzelés, hogy más, a TNF receptor családba tartozó fehérjéknél egy ugyanebbe a doménbe eső mutáció okozhat funkcióbeli eltérést. A DR3 receptor ilyen D159G aminosavcserét eredményező mutációja halmozottan fordul elő reumatoid artritiszes betegekben. A D159G cseréről azt gondolják, hogy a DR3 glikoziláltságában játszhat szerepet, ami kérdéses, mert az aminosav-sorrend ezen a helyen nem felel meg a konszenzus szabálynak (N-X-S, N-X-T vagy N-X-C), másrészt nincs tanulmány, amely a DR3 glikoziláltságát taglalná. Elképzelésünk szerint a DR3 receptor ezen polimorfizmusa (SNP⁵) rávilágít egy kismolsúlyú inhibitor fejlesztésének lehetőségére, mivel feltételezhető, hogy a receptor ezen régiója közvetlenül vesz részt a receptor-ligand kölcsönhatás kialakításában.

A TL1A fehérje szintje megemelkedett a reumatoid artritiszes gyulladással járó ízületi folyadékban. A Sclerosis *multiplex* állatmodelljében ha a TL1A-ra nézve KO egeret használnak, akkor a szokásos gyulladás csak kb. 50%-ban váltható ki.

Az adatok azt sugallják, hogy a TL1A lehet egy gyógyszerfejlesztési célmolekula, amely hatásának neutralizálása csökkentheti vagy megszüntetheti az T-sejt mediálta betegségek tüneteit. A legmodernebb módszer az, hogy humanizált monoklonális ellenanyaggal gátolják az egy adott molekula hatásait, amelyre példa az anti-TNF hatású Infliximab. Mivel ezek alkalmazása általában szisztémásan történik, a mellékhatások előfordulása jelentős.

A TL1A/VEGI szerepe a dendritikus sejtek érésében

Az antigénprezentáló funkcióval rendelkező naív dendritikus sejt szerepe az, hogy bemutassa az antigént a naív, nyugvó T-sejtnek és így aktiválja azt. Az aktiválásra képes a TL1A egyik

⁴ CRD= Cystein Rich Domain

⁵ Single Nucleotide Polymorphism

izoformája, a VEGI-192 is, de nem ismert, hogy mely receptoron keresztül. A TL1A hatásának specifikus gátlása indokolt lehet. Ez jelentheti egyrészt az antigén-inger bevezető (afferens) szárának gátlását a dendritikus sejtek aktiválódásának blokkolásával, másrészt a szövetekbe kivándorló aktivált T-sejtek effektor funkciójának (efferens) gátlását. Az afferens út sikeres gátlására példa az Efalizumab nevű, a CD11a molekula ellen használható humanizált monoklonális ellenanyag, míg az effektor funkció gátlását valósítja meg az Infliximab nevű humanizált monoklonális ellenanyag gyógyszer, a T-sejtek által termelt TNF blokkolása révén.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a TL1A/DR3 molekulapáros fontos szerepet tölt be az immunrendszer folyamataiban. Korunk medicinájának egyik sokat kutatott betegségcsoportja a krónikus, T-sejt mediálta betegségek sok-sok embert érintenek szerte a világban. Ha valahol a világban lélnak olyan gyógymódot, amely csak egy kicsit is képes ezeket a betegségeket érdemlegesen befolyásolni, óriási figyelem összpontosul rá!

A 2004-ben az FDA által engedélyezett szisztémás Infliximab kezelésről mára már tudjuk, hogy igen hatásos pikkelysömörben, de a mellékhatások nem elhanyagolhatóak. Ezek közül a legjelentősebb a TBC fertőzés és néhány limfoproliferatív kórkép fokozott előfordulása. A betegség magas előfordulási aránya indokolja az alternatív célpont molekulák keresését, és az ezeken alapuló új és hatékony gyógyszerek fejlesztését. Ha a feltételezett (putatív) IRF1 kötőhely a TL1A promoterében az irodalmi adatoknak megfelelően fejti ki hatását, akkor magyarázhatóvá válik az öngerjesztő folyamat, amelynek a létezését régóta sejtik. Ezalatt egy olyan jelenséget értünk, amelyben az egyik sejt által termelt gyulladáso mediátor egy másik sejtet arra készítet, hogy ugyancsak valamilyen másik mediátor termelésével az első sejt gyulladást elősegítő működését serkentsse. Összefoglalásként elmondható, hogy a feladat tehát adott: az egyre növekvő ismeretanyag birtokában a modern orvosi biotechnológia tárházát felhasználva új, kedvezőbb tulajdonságú gyógyszereket kifejleszteni és azt minél előbb a gyógyítás szolgálatába állítani! Erre jó lehetőségnek látszik a TL1A hatását neutralizálni képes humanizált ellenanyag kifejlesztése és terápiás alkalmazásának kidolgozása.

A disszertáció témájához kapcsolódó elsőszerzős közlemény

Tubak, V., E. Határvölgyi, L. Krenács, É. Korpos, E. Kúsz, E. Duda, É. Monostori "Novel function of immunoregulatory TL1A in chicken chondrocyte differentiation" Can. J. Vet. Immun. Közlésre elfogadva

Egyéb, nem a disszertáció tárgyához tartozó közlemények

Lukacs, J., **V. Tubak**, J. Mester, S. David, Z. Bartfai, T. Kubica, S. Niemann and A. Somoskovi (2004). "Conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in homeless patients in Budapest, Hungary." J Clin Microbiol **42**(12): 5931-4.

Praznovszky, T., J. Kereso, **V. Tubak**, I. Cserpan, K. Fatyol and G. Hadlaczky (1991). "De novo chromosome formation in rodent cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11042-6.

Hadlaczky, G., T. Praznovszky, I. Cserpan, J. Kereso, M. Peterfy, I. Kelemen, E. Atalay, A. Szeles, J. Szelei, **V. Tubak** and et al. (1991). "Centromere formation in mouse cells cotransformed with human DNA and a dominant marker gene." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(18): 8106-10.