

XXXI. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

A Tumor Nekrózis Faktor kétirányú jelfolyamata

Sipos Orsolya

Török Annamária

Biomérnök BSc IV. Évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Filkor Kata

Dr. Duda Ernő

Konzulens: Dr. Boros Imre

2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke.....	3
1.Bevezetés.....	4
1.1. Előterben a tumor nekrosis faktor	4
1.2. A membránkött és a szolubilis TNF molekula biológiai aktivitása.....	5
1.4. A TNF reverz jelfolyamata	7
1.5. A reverz jelfolyamat alkalmazása az anti-TNF terápiák során.....	8
2.Célkitűzések	10
3.Anyagok és módszerek.....	11
3.1. Sejttenyésztés	11
3.2. Egér csontvelői makrofágok preparálása	12
3.3. RNS tisztítás és reverz transzkripció.....	12
3.4. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	12
3.5. Statisztikai analízis	14
4.Eredmények.....	15
4.1. Ifx és LPS kezelt THP-1 humán monocita sejtek relatív génexpressziós vizsgálata 15	
4.2. Ifx és IgG kezelt humán monocita sejtvonalak relatív génexpressziós vizsgálata... 17	
4.3. Relatív génexpressziós vizsgálatok PMA aktivált primer egér makrofágokon..... 18	
4.4. Relatív génexpressziós vizsgálatok Ifx és IgG kezelt egér sejtvonalakon 20	
5.Diszkusszió.....	21
5.1. A reverz szignál szerepe esszenciális a génexpresszió szabályozásában	21
5.2. Az Ifx kezelés hatása függetlennek tekinthető az Fc fragment jelenlététől	24
Köszönetnyilvánítás	28
Tételes szerzői hozzájárulás	29
Irodalomjegyzék.....	30

Rövidítések jegyzéke

ACK	Ammónium klorid (kálium) tartalmú lízis puffer
CH₁	Nehéz lánc konstans domén 1 (<u>C</u> onstans domain, <u>H</u> eavy chain <u>1</u>)
CKIP	Kazein kináz-2-vel kölcsönható protein (<u>C</u> asein <u>K</u> inase 2- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein)
CXCL	CXC (Cysteine-X-Cysteine) kemokin ligand
DD	Halál domén (<u>D</u> eath <u>D</u> omain)
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-féle médium (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium)
Fab	Antigén kötő régió (Fragment, antigen-binding)
FBS	Fötális borjú szérum (<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
Fc	Kristályosítható fragmentum (<u>F</u> ragment, <u>c</u> rystallizable)
Ifx	Infliximab
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LPS	Lipopoliszacharid
MM6	MonoMac6, emberi eredetű mieloid leukémia sejtvonal
PMA	Forbol 12-mirisztil 13-acetát (<u>P</u> horbol 12- <u>m</u> yristate 13- <u>a</u> cetate)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (fejlesztő cég neve) médium
TACE	TNF- α átalakító enzim (<u>T</u> NF- <u>a</u> lpha- <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme)
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor béta (<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor-beta)
TNF	Tumor Nekrózis Faktor
sTNF	Szolubilis TNF
tmTNF	Transzmembrán TNF

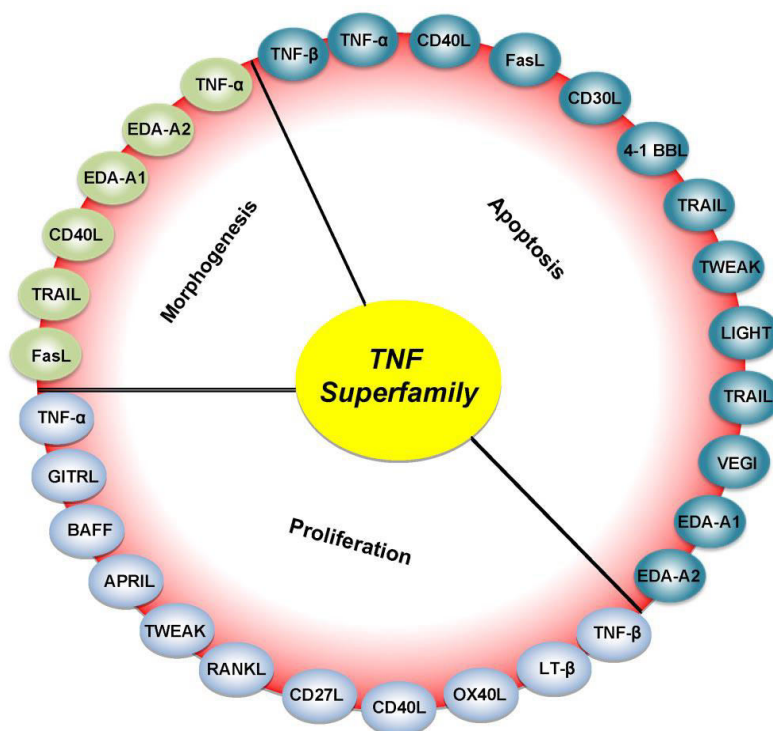
1. Bevezetés

1.1. Előtérben a tumor nekrosis faktor

Az immunrendszer a többsejtű szervezetek rendkívül összetett és bonyolult védelmi rendszere [1]. Szépsége abban rejlik, hogy képes megkülönböztetni a környezetből a szervezetbe kerülő idegen (baktériumok, vírusok, gombák), saját, és a szervezetben képződő „megváltozott saját” (megváltozott fehérjék, sejtek) struktúrákat. Az evolúció során a fertőző ágensek leküzdésére az immunrendszer két, egymással kölcsönható ága fejlődött ki: a veleszületett (természetes) és a szerzett (adaptív) immunrendszer. A veleszületett immunrendszer evolúciósan konzervált, önmagában is hatékonyan pusztítja el a patogéneket, de az adaptív immunválasszal ellentétben nem alakulnak ki memóriasejtek a fertőzést követően, mely azonban egy következő, ugyanazon patogén által okozott megbetegedés esetén gyorsabb és hatékonyabb immunválaszt tenne lehetővé. Fertőzés esetén nem specifikus effektor sejtei (pl.: az epitelsejtek közül a keratinociták) érzékelik a kórokozókat és a fertőzés helyszínére vonzzák a specifikus immunválasz sejtjeit (makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölősejtek) azáltal, hogy gyulladást keltő mediátorokat (citokineket, kemokineket) szabadítanak fel. A veleszületett immunrendszer sejtjes elemei által szekretált citokinek/kemokinek milyensége és mennyisége határozza meg az illető patogén/antigén ellen irányuló immunválasz típusát [2], [3]. A fertőzést követő kezdeti válasz reakciók általában előnyösek a gazda szervezet számára, azonban ezen folyamatok megfelelő szabályozása elengedhetetlen, mivel a túl nagy mennyiségben keletkező gyulladáskeltő mediátorok olyan patofiziológias változásokat (pl. septicus sokkot) idézhetnek elő, melyek súlyos szöveti károkat okozhatnak, végső soron akár a gazda szervezet elpusztulásához is vezethetnek [4].

1975-ben Carswell és munkatársai egy olyan szérumból faktorról számoltak be, mely tumoros egerekben bakteriális fertőzés esetén a daganat bevérvézéses elhalásához vezetett. A molekulát, mely endotoxin hatására tumor nekrozist indukált, tumor nekrosis faktornak (TNF) nevezték el [5]. Annak ellenére, hogy valóban megfigyelhető volt a molekula tumor regressziót indukáló hatása, a TNF valódi szerepe csak évtizedekkel később tisztázódott. 1984-ben Aggarwal és munkatársai elsőként számoltak be két citotoxikus faktor sikeres izolálásáról: az egyik, egy makrofágokból izolált 17 kDa-os fehérje (TNF), míg a másik, a limfocitákból származó 20 kDa-os limfotoxinnak nevezett molekula volt. Mivel a két fehérje 50%-os aminosav szekvencia homológiát mutatott és ugyanazon receptorokhoz kapcsolódott, az előbbi TNF- α -nak, az utóbbit TNF- β -nak nevezték el [6, 7]. Szekvencia homológia alapján

mára már a TNF szupercsalád 19 tagját, továbbá a hozzájuk kapcsolódó 29 receptort azonosították.[8]. Nyilvánvalóvá vált, hogy a fehérje szupercsalád tagjai fontos szerepet játszanak a sejtek halálában, túlélésében, a sejtek, valamint a szövetek differenciálódásában, a szervképződés folyamataiban (1. ábra).

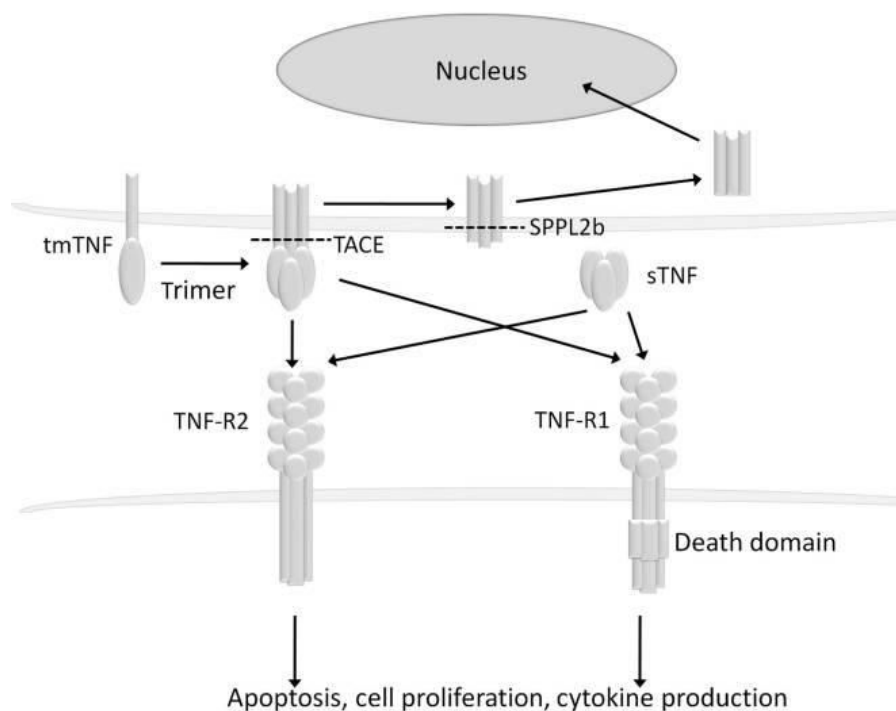


1. ábra. A TNF család tagjai fontos folyamatok szabályozásában vesznek részt. A TNF szupercsalád minden tagja gyulladáskeltő aktivitású. A sötétkék háttéren vett citokinek apoptotikus folyamatok irányítói, a világoskék háttéren feltüntetett fehérjék a sejtosztódásban játszanak szerepet, míg a zöld háttéren szereplő molekulák a szövet- és szerv képződés szabályozásában vesznek részt [8].

1.2. A membránkött és a szolubilis TNF molekula biológiai aktivitása

A tumor nekrosis faktor, a TNF szupercsalád névadója, egy tipikus gyulladásos citokin, melyet főként immunsejtek, de más sejtípusok is termelhetnek. Esszenciális szerepe van a parazita, vírus, bakteriális, gombás fertőzések elleni immunválasz kialakításában [9]. Akut-fázis proteinként citokin kaszkádok elindításával, az érfalak átteresztő képességének növelésével, makrofág és neutrofil sejtek toborzásával helyi gyulladásos immunválaszt közvetít. Fontos azonban megjegyezni, hogy számos tumor sejt is képes a TNF termelésére [10].

Az elsősorban gyulladásokeltő citokinként számontartott TNF-nek két formája ismert: a keringő, három 17 kDa méretű alegységből álló TNF (szolubilis, sTNF), valamint a plazmamembránba épült, 26 kDa tömegű alegységekből álló trimer TNF (transzmembrán, tmTNF). A tmTNF első sorban aktivált professzionális immunsejteken (pl.: aktivált makrofágokon és limfocitákon) termelődik. Az ektodoménból a TNF konvertáló enzim (TNF converting enzyme; TACE; vagy más néven: ADAM metalloproteináz 17, ADAM17) hasítja le a 157 aminosav hosszú, 17 kDa tömegű fehérjét. Az ilyen módon keletkezett sTNF homotrimert alkotva 1-es és 2-es típusú TNF receptorokon keresztül fejti ki hatását. A membrán-kötött maradékot tovább hasít(hat)ja a szignál peptid peptidáz-szerű proteáz 2 (SPPL2b). A hasítás következtében, a nukleáris lokalizációs szignált hordozó szignál peptid a sejtmagba vándorol, és ott feltehetően szerepe van elsősorban gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének expressziójának módosításában [11] (2. ábra). Az N terminális lehasítása nem csak a TNF-re jellemző, hanem más, a TNF családba tartozó ligand (pl. Fas ligand) estén is ismert [12].



2. ábra. TNF ligandok és receptorok. A transzmembrán TNF (tmTNF), a szolubilis TNF (sTNF) prekursora, homotrimer formában van jelen a sejt felszínén. TACE általi hasítást követően a sTNF, a tmTNF-hez hasonlóan, TNF-R1 és -R2 receptorokhoz kapcsolódhat. A membránkötött maradékot tovább hasít(hat)ja a szignál peptid peptidáz-szerű proteáz 2 (SPPL2b), ezáltal az intracelluláris domén a nukleuszba transzlokálódhat ahol feltételezhetően a citokin szekréció szabályozásában van szerepe [11].

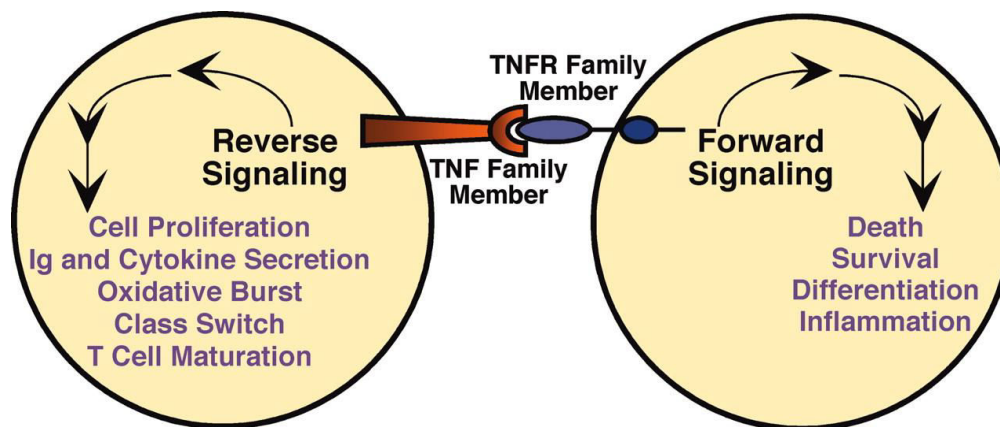
Ahogy a fentiekben említettük, a szolubilis TNF ligand a sejt felszínén található 1-es és 2-es típusú receptorhoz (TNF-R1 és TNF-R2) is képes kötődni, melyek homotrimereket alkotnak a sejt felszínén [13]. A TNF-R1-t minden sejtmagvas sejt, míg TNF-R2-t főleg neuronok, endotélsejtek és immunsejtek expresszálnak. A TNF-R1 közvetlen képes sejt apoptózist indukálni, ugyanis citoplazmatikus részén „haláldoménnek” („death domen”; DD) nevezett, apoptotikus folyamatokat is kiváltó jeleket indukáló molekulaszakasz található. Ezzel ellentétben a TNF-R2 nem tartalmazza az ún. haláldomént, stimulálása kizárólag a ligand membrán kötött formája által lehetséges [14]. Abban az esetben, ha a stimuláció sTNF által történik, a TNF-R2 azonnal „elfogja” a ligandot és rögtön továbbítja a TNF-R1-hez [15]. A receptor-ligand kölcsönhatás transzkripciós faktorok aktiválódását eredményezi, ezáltal szabályozza a sejt életműködését. Ahogy a tmTNF egyedüli funkciója a sejtek közötti kommunikáció biztosítása, szerepe esszenciális a lokális gyulladások kialakításában. Habár mindkét receptorhoz kötődhet a célsejten, biológiai aktivitása miatt feltételezhető, hogy főként a TNF-R2 receptorral létesít kapcsolatot [14]. A tmTNF képes citotoxikus immunválaszt indukálni vírussal fertőzött [16] és tumoros sejtekkel szemben is [11], továbbá szerepet játszik az adaptív immunválasz sejtjeinek aktiválásában, antitestek termelésében [11].

1.4. A TNF reverz jelfolyamata

A transzmembrán TNF-t expresszáló sejt biológiai aktivitása megváltozhat, amint a felszínén található tmTNF receptorával kapcsolatot létesít. Az utóbbi évtized áttörő felismerése volt, hogy a TNF szupercsalád membránba integrálódott ligandjai képesek kétirányú jelátviteli folyamatokat kiváltani (3. ábra).

A TNF szupercsalád tagjainak vizsgálatával megállapították, hogy a családtagok citoplazmatikus doménjei erősen konzerváltak a különböző fajok között [17]. Ezen eredményeket felhasználva, további kutatások során Smith és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a TNF család transzmembrán ligandjai képesek lehetnek kétirányú jelek kiváltására, azaz a molekulák jelfolyamatokat indukálhatnak a ligand expresszáló sejtekben is. Annak ellenére, hogy a tmTNF-en induló reverz szignál biológiai funkciója nem teljesen ismert, feltételezhető, hogy a ligand expresszáló sejtekben végbemenő változások hozzájárulhatnak gyulladáskeltő citokin genetikai polimorfizmusához, valamint fontos szerepet játszik az immunválasz finomhangolásában. Emellett számos egyéb folyamat

pl. T-sejtek E-szelektin expresszáló folyamataiban, monociták/makrofágok gyulladásokeltő citokinek szuppressziójában, végül de nem utolsó sorban axonok elágazódási folyamataiban van igen jelentős szerepe [18].



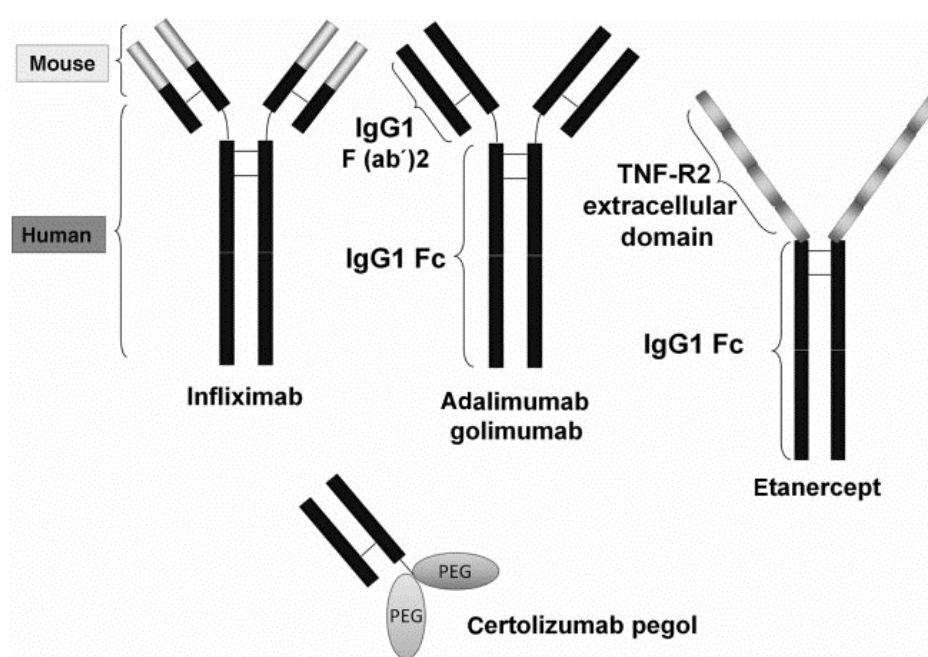
3. ábra. A TNF szupercsalád kétirányú jelfolyamata. A TNF fehérje család tagjainak membrán kötött ligandjai képesek reverz szignál kiváltására is, amelynek többek között az immunrendszer megfelelő működésében van kulcs szerepe [19].

A tmTNF-en induló reverz jelátvitelt anti-TNF terápiák alkalmazása során is megfigyelték, ahol gyakran a tmTNF-et expresszáló különféle immunsejtek aktiválódását vagy apoptózist okozza [11]. Klinikai relevanciájának ellenére a tmTNF-en induló reverz jelátvitel molekuláris mechanizmusa napjainkban sem egészen ismert.

1.5. A reverz jelfolyamat alkalmazása az anti-TNF terápiák során

Ismert, hogy nem csak fertőzések, valamint tumoros folyamatok hatására emelkedhet meg a gazda szervezetben a TNF mennyisége. Egyes neurológiai megbetegedések [20], a kardiovaszkuláris rendszer bizonyos kórképei [21, 22], néhány tüdő betegség [23], illetve az inzulin rezisztencia [24] is fokozott TNF termeléssel járhatnak. Fokozott expressziója megfigyelhető továbbá különböző autoimmun betegségek, mint például a reumatoid arthritisz (RA), a pikkelysömör (psoriasis) vagy a krónikus vastagbélgyulladás, más néven Crohn betegség esetén is. A klasszikus, az immunrendszer egészére drasztikus hatással lévő immunszupprimáló kezelési eljárások helyett napjainkra az anti-TNF terápiák fokozatos térhódítása figyelhető meg: ahol a TNF túltermelődik, ellenanyaggal semlegesíthető a citokin

kóros mennyisége, ezáltal lehetővé válik a betegségben szenvedők tüneteinek enyhítése, akár a teljes tünetmentesség is [25]. A leggyakrabban alkalmazott anti-TNF antitest az infliximab. Az infliximab (Ifx, kereskedelmi név Remicade) egy kiméra monoklonális ellenanyag, mely a humán immunglobulin G (IgG) konstans régiójából és az egér TNF monoklonális antitest variábilis régiójából áll [26]. Nagy affinitással kötődik a TNF- α molekulához, ezáltal megakadályozza, hogy a TNF molekula saját receptorához kapcsolódjon. Napjainkra számos, különböző szerkezettel rendelkező, a klinikumban is általánosan használt anti-TNF ellenanyag került kereskedelmi forgalomba (4. ábra) [11].



4. ábra. Hazánkban is kereskedelmi forgalomban kapható, terápiás célra használható anti-TNF ellenanyagok szerkezeti felépítése. Infliximab: kiméra ellenanyag; Adalimumab, Golimumab: human IgG1 anti-TNF monoklonális ellenanyag; Etanercept: fúziós protein, amely a TNFR2 extracelluláris doménjéből és az IgG1 Fc régiójából áll; Certolizumab: PEG-gel kapcsolt humanizált anti-TNF Fab fragment [11].

2. Célkitűzések

Kutatásaink fő célja a transzmembrán TNF- α -n induló reverz jelátvitel hatásának vizsgálata a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó citokinek relatív génexpressziójára.

A vizsgálatok során következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. kiváltható-e a reverz szignál anti-TNF ellenanyag (Infliximab) segítségével a membránkött TNF- α -t expresszáló sejteken?
2. ha indukálható reverz jelfolyamat, milyen hatással van az LPS által kiváltott gyulladásos folyamatokra humán, illetve egér monocita/makrofág sejtvonalakon
3. valamint, függ-e az infliximab hatása az infliximab és az immunglobulin G-re is jellemző Fc fragment jelenlététől

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtenyésztés

A kísérletek során a következő sejt kultúrákat alkalmaztuk:

Egér „professzionális” immunsejtek (RAW 264.7, DHO3):

A sejteket 10% (v/v) hő inaktivált FBS-sel (foetal bovine serum, PAA Gold, GE Healthcare) és 2mM L-glutaminnal (Invitrogen, Life Technologies) kiegészített DMEM tápoldatban (Lonza) tenyésztjük. A sejtek nevelése standard sejt kultúra kondíciók között, 37 °C-on, 100 % párateltség, 5%-os CO₂ tartalom mellett történt. A sejteket 70-80%-os konfluencia esetén használtuk fel a kísérletekben.

Humán „professzionális” immunsejtek (MonoMac6, THP-1):

A sejteket RPMI-1640 (Lonza), 10% (v/v) hőinaktivált FBS (PAA Gold, GE Healthcare) és 2 mM L-glutamin (Invitrogen, Life Technologies) hozzáadásával tenyésztjük. A sejtek nevelése standard sejt kultúra kondíciók között, 37 °C-on, 100 % párateltség, 5%-os CO₂ tartalom mellett történt. A sejteket 70-80%-os konfluencia esetén használtuk fel a kísérletekben.

A kísérletek során a következő kezeléseket alkalmaztuk:

Infliximab (Remicade; Schering-Plough): gyógyászati célokra széles körben alkalmazott anti-TNF monoklonális ellenanyag, melyet 10 µg/ml végkoncentrációban adtunk a sejt kultúrákhoz

Immunglobulin G (IgG; Human Bioplazma Kft): segítségével meghatározható, hogy a kezelés által indukált válaszreakciót a TNF blokkolása, vagy az antitest váltotta ki, az IgG kezelés 10 µg/ml végkoncentrációban történt

Lipopoliszacharid (LPS; Sigma): *Escherichia coli*-eredetű LPS (Toll-like receptor 4 ligand), melyet kísérleteink során 100 ng/ml végkoncentrációban alkalmaztunk a sejtek aktiválása végett

Forbol 12-mirisztil-13-acetát (PMA; Sigma): 100 nM végkoncentrációban, az egér makrofágok aktiválására használtuk

3.2. Egér csontvelői makrofágok preparálása

A preparáláshoz kísérletenként öt darab SPF (specified pathogen free; meghatározott kórokozótól mentes) B6 nőstény egér hátsó combjait és tibiáit használtuk fel. A preparálás előtt cervikális diszlokációval (nyaki csigolya kimozdításával) elölt egereket 70%-os etanollal letisztítottuk, majd alkoholban áztatott eszközökkel vágtuk fel a hátsó comboknál a bőrt, és távolítottuk el az izmokat a csontról, törekedve arra, hogy minél tisztábban dolgozzunk. Az ízületből kifordított csontokat antibiotikummal (kanamycin) kiegészített RPMI-1640 tápoldatba tettük. A csontvelő kinyerése előtt a csontok végeit levágtuk, majd a velőt fecskendő segítségével kifűjtük. A kifűjához 10 µg/ml kanamycin (Sigma) tartalmú RPMI-1640 tápoldatot használtunk, majd ezzel az oldattal kétszer mostuk. ACK oldat (Lonza) segítségével lizáltuk a vörösvértesteket, majd kiegészítve 10%-os FBS és 10 µg/ml kanamycin tartalmú RPMI-1640 tápoldattal (Lonza), kétszer mostuk a sejteket. A sejtek tenyésztése, differenciálása DMEM (high glucose) Na-piruvát (Lonza); 15% FBS (PAA, Gold; GE Healthcare); 20% kondicionált, szűrt L929 felülszót tartalmazó, 100 µg/ml kanamycin tartalmú médiumban történt. (Az L929 sejtek termelik a makrofágok éréséhez szükséges makrofág kolónia-stimuláló faktort, M-CSF-et). A sejteken háromnaponta cseréltünk tápfolyadékot.

3.3. RNS tisztítás és reverz transzkripció

A sejtek kezelését követően meghatározott időpontokban teljes RNS-t tisztítottunk. Az RNS kivonáshoz Gene Jet Kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztunk. Az RNS tisztítást a gyártó utasításai szerint végeztük. A tisztított RNS-t nukleáz mentes vízben vettük fel, majd az így kapott RNS minőségét és mennyiségét spektrofotométer segítségével (BioPhotometer, Eppendorf) állapítottuk meg. Az RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzését követően, legalább 100 ng RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR*-rel (Thermo Scientific) az Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Life Technologies) készülék segítségével a gyártó utasításai szerint.

3.4. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A relatív gén expresszió meghatározásához exon-exon határookra tervezett primereket (1. táblázat), valamint Luminaris Color HiGreen Low ROX QPCR Master Mixet (Thermo Scientific) használtunk. A relatív génexpresszió meghatározását Corbett real-time PCR

berendezésen (Corbett Research) végeztük. A kapott relatív génexpressziós értékeket a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz génre (GAPDH) normalizáltuk. Minden kísérletet legalább 3 független biológiai és 2 technikai párhuzamossal végeztünk el. A relatív génexpressziót a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számítottuk ki.

(A)

Gének	Forward primer (5'→3')	Reverz primer (3'→5')
GAPDH	CAGTCAGCCGCATCTTCTTTTG	CGCCCAATACGACCAAATCC
IL-1β	CCACCTCCAGGGACAGGATA	TTTGGGATCTACACTCTCCAGC
IL-6	GGATTCAATGAGGAGACTTGC	CTGGCATTGTGGTTGGGTC
IL-8	ACTCCAAACCTTTCCACCCC	TTCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTC
IL-10	GGCACCAGTCTGAGAACAG	GGCAACCCAGGTAACCCCTTAAA
IL-17A	ATTGGTGTCACTGCTACTGCT	TTCCAAGGTGAGGTGGATCG
CXCL-9	AGTGCAAGGAACCCAGTAG	TCACATCTGCTGAATCTGGGTT
CXCL-10	ACACTAGCCCCACGTTTTCT	GAGAGGTACTCCTTGAATGCCA
CXCL-12	CTACAGATGCCCATGCCGAT	CCTCTCACATCTTGAACCTCTTGT
TNF	GCCTCTTCTCCTTCCTGATCG	GCTTGAGGGTTTGCTACAACAT
CKIP-1	ACCTGCAACCGACGATTCTT	CATTCCATGAAGTCAGCGATATGT
ICAM-1	TGTGACCAGCCCAAGTTGTT	TGGAGTCCAGTACACGGTGA
TGF-β	ACCAACTATTGCTTCAGCTCCA	CTTGCTGTACTGCGTGTCCA

(B)

Gének	Forward primer (5'→3')	Reverz primer (3'→5')
GAPDH	CTGGAAAGCTGTGGCGTGAT	ATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG
IL-1β	AACCTTTGACCTGGGCTGTC	CAGAGGATGGGCTCTTCTTCAA
IL-6	GCCTTCTTGGGACTGATGCT	TGCCATTGCACAACCTTTTTCT
IL-10	AAGGGTACTTGGGTGTTGCCA	GAGAAATCGATGACAGCGCC
CXCL-9	CAGTGTGGAGTTCGAGGAACC	GGCAGGTTTGATCTCCGTTCT
CXCL-10	TCATCCTGCTGGGTCTGAGT	TCATCGTGGCAATGATCTCAACA
TNF	TAGCCACGTCGTAGCAAAC	GCAGCCTTGTCCTTGAAGA
CKIP-1	GGATGAGGTCACCGTTGAGG	CGGAAGCTCTCAGCACAAGA

1. táblázat. Humán (A) és egér (B) exon-exon határookra tervezett primerek

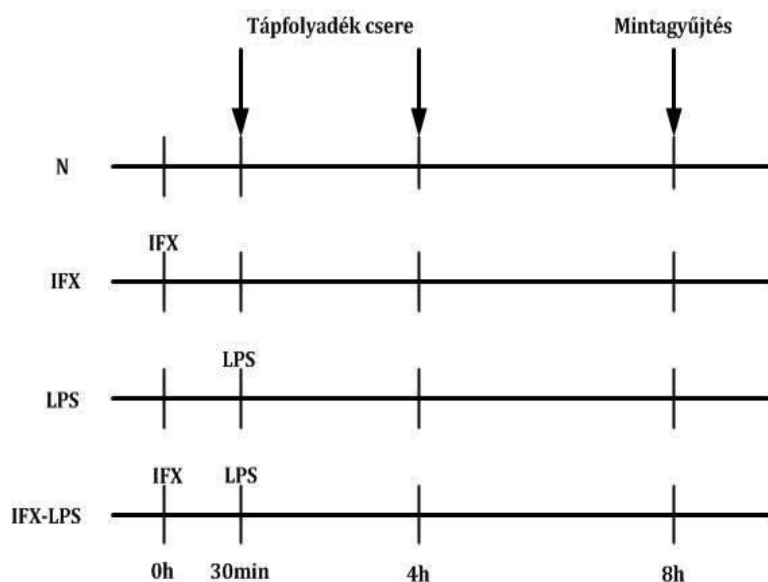
3.5. Statisztikai analízis

Az ábrákon feltüntetett adatok – ahol azt külön nem jeleztük – legalább három, független biológiai mintán mért érték átlagai és szórásai. A statisztikai analízist GraphPad Prism for Windows szoftverrel végeztük el. A statisztikai szignifikancia megállapítása egy tényezős ANOVA program, valamint Student-féle páros t próba alkalmazásával történt. Az eltéréseket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha teljesült, hogy $p \leq 0,05$.

4. Eredmények

4.1. Ifx és LPS kezelt THP-1 humán monocita sejtek relatív génexpressziós vizsgálata

A reverz szignál immunmoduláló hatásának vizsgálata céljából Ifx és/vagy LPS kezelt, illetve kezeletlen THP-1 humán monocita sejtekben kifejeződő gyulladásokeltő molekulák relatív génexpresszióját követtük nyomon. Munkánk alapjául G. Eissner és munkatársainak 2000-ben megjelent közleménye szolgált; kimutatták, hogy a TNFR-rel, vagy anti-TNF monoklonális ellenanyaggal való kezelés hatására humán monocita sejtvonalakban a szekretált IL-1 és IL-6 mennyisége a sejt kultúra felülűszókban jelentősen lecsökkent [27]. A THP-1 humán monocita sejtek kezelését és a mintagyűjtést az 5. ábrán feltüntetett módon végeztük.



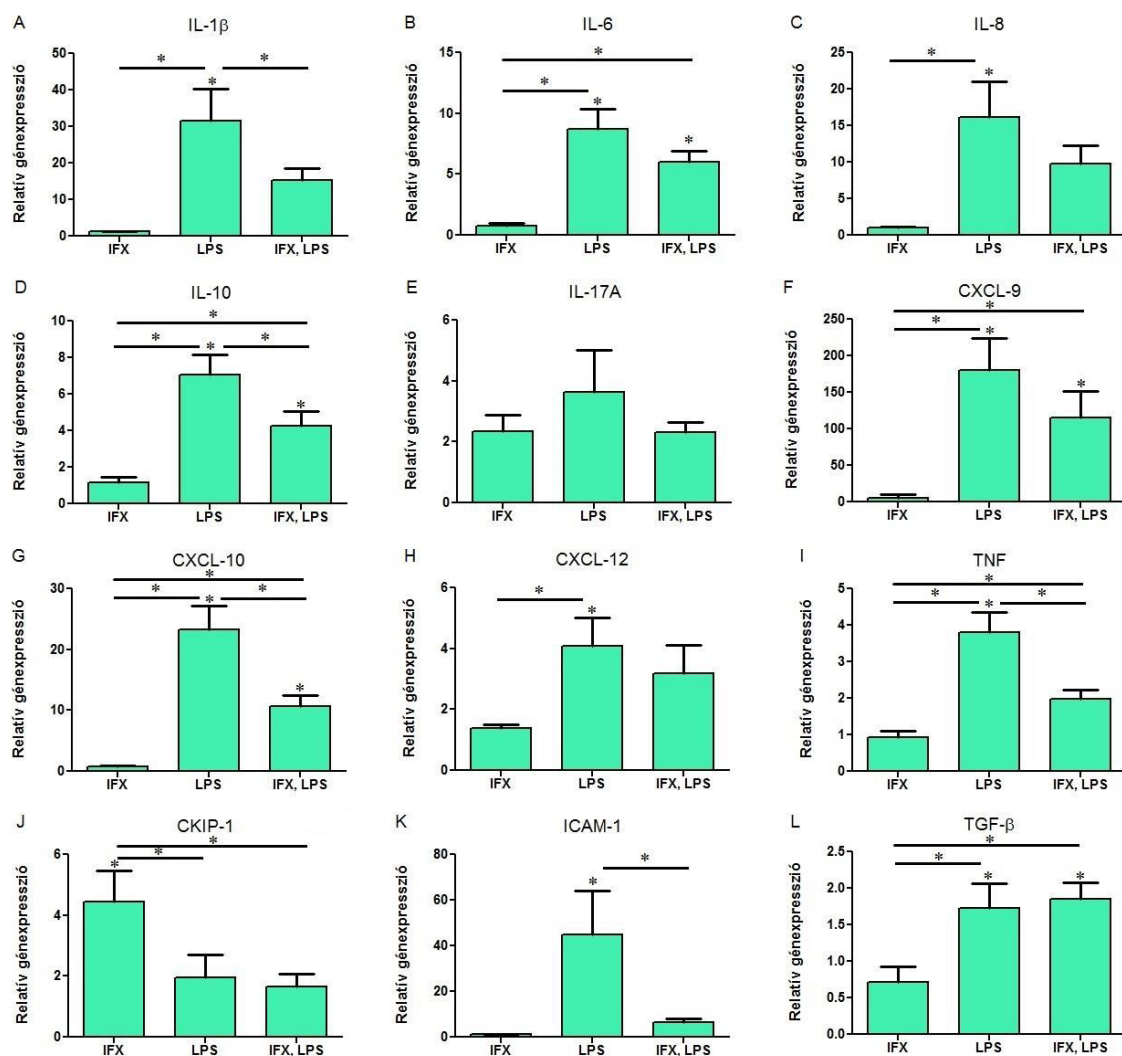
5. ábra. Az Ifx kezelés immunmoduláló hatásának vizsgálata LPS kezelt THP-1 humán monocita sejtvonalakon. A reverz szignál indukciójához 30 perccel az LPS kezelést megelőzően Ifx-bal stimuláltuk mintáinkat, majd az Ifx kezelést követően 4 órával a sejtenyészeteket mostuk és friss tápfolyadékot adagoltunk hozzájuk. Ismételt 4 óra inkubálás után történt meg az RNS tisztítás (Ifx: 10 µg/ml; IgG: 10 µg/ml; LPS: 10 ng/ml).

Jól ismert az a tény, hogy a Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó LPS az immunrendszer egyik leghatékonyabb gyulladáskeltő induktora, jelenléte fertőzés esetén számos gyulladásos következménnyel jár [28]. Ennek alapján tehát nem meglepő, hogy az LPS stimuláció önmagában szignifikáns túltermelődést eredményezett minden vizsgált gyulladáskeltő molekula relatív génexpressziója esetén: IL-1 β (6A ábra), IL-6 (6B ábra), IL-8 (6C ábra), IL-17A (6E ábra), CXCL-9 (6F ábra), CXCL-10 (6G ábra), CXCL-12 (6H ábra), ICAM-1 (6K ábra).

Ahogy az a bevezetőben említettük, az Ifx egy monoklonális kiméra antitest, mely a TNF- α molekulához nagy affinitással kötődik, ezáltal megakadályozza, hogy az kölcsönhatásba lépjen receptorával. Továbbá, képes reverz szignál folyamatokat kiváltani a tmTNF-et hordozó sejtekben. Az Ifx a humán immunglobulin G (IgG) konstans régiójából és az egér TNF monoklonális antitest variábilis régiójából épül fel [26].

Az Ifx kezelés hatására a CKIP-1 kivételével (6J ábra) nem volt változás az egyes molekulák relatív génexpressziójában. A tmTNF-en induló reverz jelátvitel önmagában nem képes megváltoztatni a gyulladáskeltő molekulák alap génexpresszióját. Azonban az irodalmi adatokkal egybecsengően, az elvárt CKIP-1 szintnövekedés nem maradt el. Szakirodalom adatok támasztják alá, hogy a reverz szignál hatására CKIP-1 túltermelődés, valamint a fehérje plazma membránból a sejt intracelluláris részeibe történő transzlokációja figyelhető meg [29].

Abban az esetben, amikor a reverz szignál indukciója az LPS aktiváció előtt történt – összevetve a sejtek Ifx kezelésénél kapott eredményekkel – a kísérlet a gyulladáskeltő molekulák relatív génexpressziójának drasztikus csökkenésével végződött. Érdekes módon az Ifx előkezelés összehasonlítva az LPS által stimulált mintákkal az IL-10 (6D ábra) esetén szignifikáns relatív génexpresszió csökkenést eredményezett, annak ellenére, hogy az IL-10 egy gyulladáscsökkentő citokin [30].



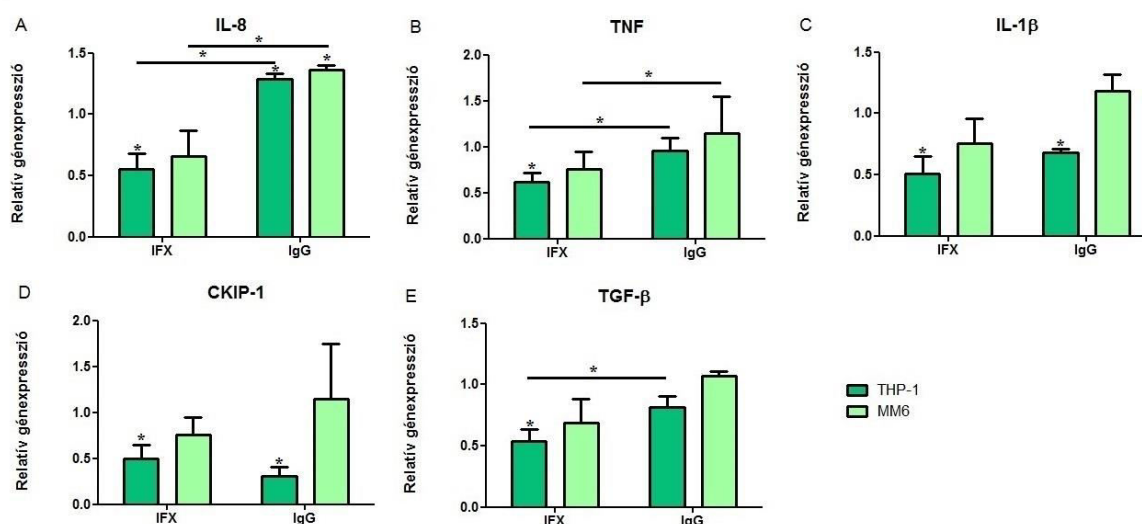
6. ábra. Az LPS kezelés előtti reverz szignál indukálása erős relatív génexpresszió csökkenést eredményezett a gyulladásal kapcsolatos effektor molekulák esetén. Az IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-17A (E), CXCL-9 (F), CXCL-10 (G), CXCL-12 (H), TNF (I), CKIP-1 (J), ICAM-1 (K) és a TGF- β (L) gének relatív génexpressziójának meghatározása infliximab és/vagy lipopoliszacharid kezelés után történt (* $p \leq 0,05$).

4.2. Ifx és IgG kezelt humán monocita sejtvonalak relatív génexpressziós vizsgálata

Az előbbieken láhattuk, hogy az LPS kezelést megelőző reverz szignál indukció drasztikus relatív génexpresszió csökkenést eredményezett a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó effektor molekulák esetén. Célunk, hogy a következőkben tisztázzuk a kérdést, miszerint az Ifx hatása függ-e az Fc fragment jelenlététől, avagy sem (hiszen a makrofágok jelfolyamatokat beindító Fc receptorokkal rendelkeznek). A humán monocita sejtvonalakon folytatott kísérletek során THP-1 és MonoMac6 (MM6) sejtekkel dolgoztunk. A sejteket Ifx vagy IgG kezelésnek vetettük alá, a kezetlen mintákat kontrollként alkalmaztuk a fentiekben

leírtak szerint. A kezelést követően 24 órával teljes RNS-t tisztítottunk, az egyes gének relatív génexpresszióját qRT-PCR-rel határoztuk meg (7. ábra).

A THP-1 humán monocita sejtvonal esetén azt tapasztaltuk, hogy az Ifx kezelés jelentős génexpresszió csökkenést okozott minden vizsgált gén esetén: IL-8 (7A), TNF (7B), IL-1 β (7C), CKIP-1 (7D), TGF- β (7E). Az IgG kezelés génexpresszió moduláló hatása csak bizonyos gének, így az IL-8 (7A), IL-1 β (7C), CKIP-1 (7D) esetében volt megfigyelhető. Más humán monocita sejtvonal, a MM6 esetén szintén azt tapasztaltuk, hogy az Ifx nagymértékben csökkenti a vizsgált gének relatív génexpresszióját. Ellenben, az IgG kezelés ebben az esetben hatástalannak bizonyult.



7. ábra. Az IL-8 (A), TNF (B), IL-1 β (C), CKIP-1 (D) és a TGF- β (E) gének relatív génexpressziós mintázata Ifx és IgG kezelt THP-1 és MM6 humán monocita sejtvonalakon. Az infliximab kezelés drasztikus relatív génexpresszió csökkenést eredményezett minden gyulladásokeltő gén esetén (*p≤0,05).

4.3. Relatív génexpressziós vizsgálatok PMA aktivált primer egér makrofágokon

A fentiekben láthattuk, hogy a (leukémia eredetű) humán monocita sejtek Ifx kezelése nagymértékű relatív génexpresszió csökkenést eredményezett az LPS kezelt mintákhoz képest. Ezt követően a jelenség további megfigyelését tűztük ki célul (egészséges) primer sejteken. Erre a célra egér csontvelőből származó makrofágokat alkalmaztunk.

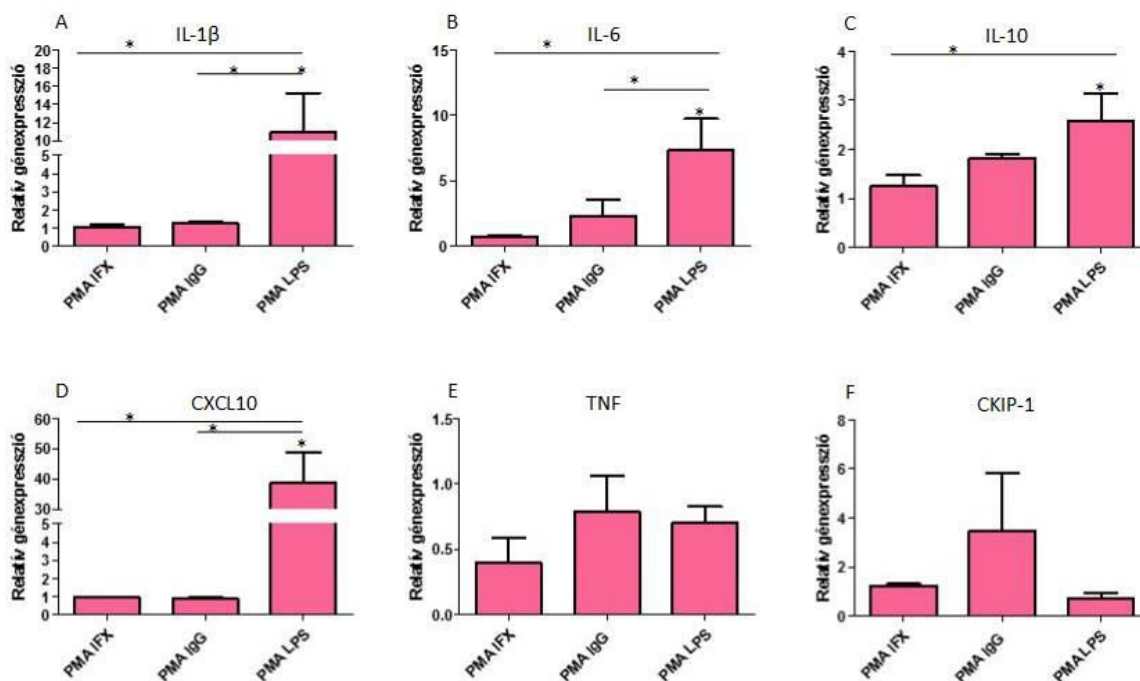
Az öt napos primer egér makrofág sejteket 100 nM végkoncentrációban PMA kezeléssel aktiváltuk. Az aktivációt követően 24 órával a sejteken tápfolyadékot cseréltünk.

Újabb 24 óra elteltével történt a sejtek Ifx, IgG, illetve LPS kezelése. Kontrollként csak PMA stimulációban részesült sejteket alkalmaztunk.

A THP-1 sejtek kezelése során kapott eredményekkel egybecsengően, az LPS stimuláció nagymértékben indukálta a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó effektor molekulák relatív génexpresszóját: IL-1 β (8A ábra), IL-6 (8B ábra), IL-10 (8C ábra), CXCL-10 (8D ábra). Az IL-1 β és az IL-6 jól ismert akut fázis molekulák, a CXCL-10 a T-sejtek inger irányba történő kemotaxisát képes kiváltani (kemoattraktáns).

Az LPS kezelt mintákkal összevetve az Ifx kezelés erős relatív génexpresszió csökkenést eredményezett. Annak ellenére, hogy az IL-10 egy gyulladáscsökkentő citokin, érdekes módon az LPS kezelt minta esetén jelentős relatív génexpresszió fokozódás figyelhető meg a kezeletlen kontrol mintához képest. Azonban, összehasonlítva az LPS kezelt sejtekkel, az Ifx kezelés az adott citokin relatív génexpressziójának nagymértékű csökkenését eredményezte (8C ábra).

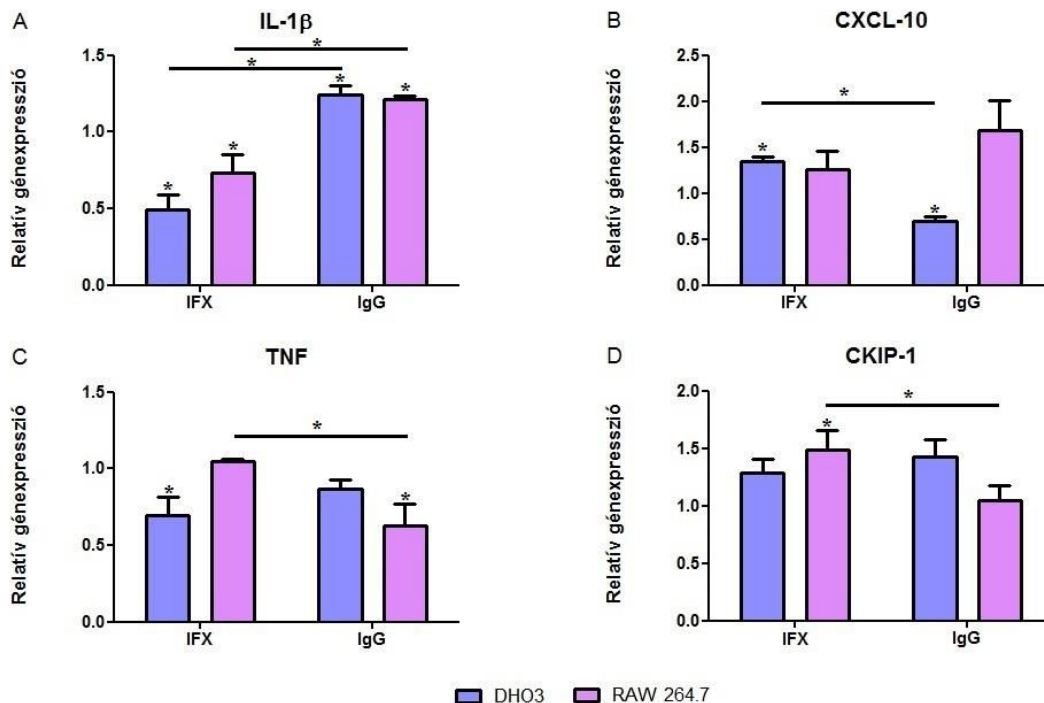
A THP-1 sejtekkel folytatott kísérlet eredményeivel ellentétben, az LPS stimuláció a TNF (8E ábra) és a CKIP-1 (8F ábra) esetén génexpresszió csökkenést eredményezett.



8. ábra. Az infliximab kezelés erős relatív génexpresszió csökkenést eredményezett a gyulladásokeltő molekulák esetén PMA kezelt primer egér makrofágokban. Az IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), CXCL-10 (D), TNF (E) és a CKIP-1 (F) gének relatív génexpressziójának meghatározása Ifx, LPS, IgG kezelés után történt (* $p \leq 0,05$; az adatok három független biológiai párhuzamosból származnak).

4.4. Relatív génexpressziós vizsgálatok Ifx és IgG kezelt egér sejtvonalakon

A fentiekben láthattuk, hogy a PMA kezelést követő reverz jelfolyamat indukciója drasztikus relatív génexpresszió csökkenést eredményezett a gyulladásokeltő molekulák esetén. Ez alapján célul tűztük ki, hogy kiderítsük, vajon az Fc fragment jelenléte felelős-e az Ifx kezelés hatásáért. Az egér makrofág sejtvonalakon folytatott kísérletek során DHO3 és RAW 264.7 sejtekkel dolgoztunk. A sejteket Ifx vagy IgG kezelésnek vetettük alá, kontrolként kezeletlen mintákat használtunk. A kezelést követően 24 órával teljes RNS-t tisztítottunk, az egyes gének relatív génexpresszióját qRT-PCR-rel határoztuk meg (9. ábra). Az Ifx kezelés – összevetve a kezeletlen és IgG kezelt mintákkal - az IL-1 β (9A ábra) szignifikáns génexpresszió csökkenését eredményezte mindkét sejtípus esetén. Nem meglepő, hogy a DHO3 sejtek esetén az Ifx kezelés a TNF (9C ábra) relatív génexpressziójának csökkenését eredményezte, azonban a RAW 264.7 sejtvonala esetén nem volt különösebb hatása. A CXCL-10 (9B ábra) relatív génexpresszióját tekintve jelentős mértékű génexpresszió fokozódás figyelhető meg az Ifx kezelt minták esetén. Továbbá, az Ifx kezelés által indukált CKIP-1 (9D ábra) relatív génexpresszió növekedés a humán monocita sejtvonalakhoz hasonlóan a vizsgált primer egér makrofágok esetében is megfigyelhető.

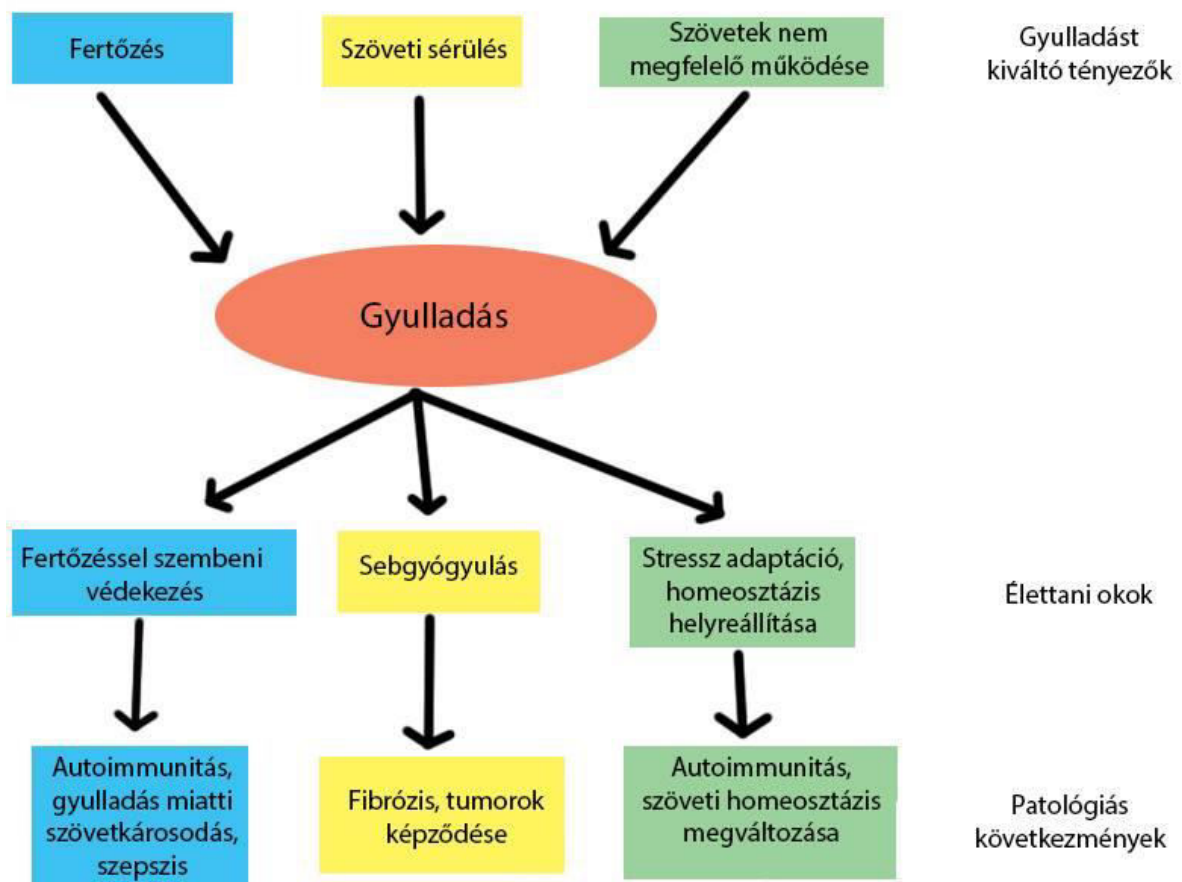


9. ábra. Az IL-1 β (A), CXCL-10(B), TNF(C) és a CKIP-1(D) gének relatív génexpressziója Ifx és IgG kezelt DHO3 és RAW 264.7 egér makrofág sejtvonalakon. Az IgG kezeléssel összehasonlítva az Ifx kezelés jól láthatóan különböző relatív génexpressziós mintázatot eredményezett a vizsgált gének esetén (* p<0,05).

5. Diskusszió

5.1. A reverz szignál szerepe esszenciális a génexpresszió szabályozásában

A fertőzések hatására indukálódó gyulladás alapvető fontosságú, megfelelő szabályozása mégis túlélésünk záloga [31]. Ha a szabályozási mechanizmusok hibát szenvednek, a gazda szervezet számára káros, nem egy esetben akár halálos patológias folyamatok indukálódhatnak (10. ábra).



10. ábra. Emlős szervezetekben számos folyamat vezethet gyulladás kialakulásához. Amíg ez a folyamat megfelelően szabályozott, az előnyös a gazda szervezet számára, azonban az indokolatlanul hosszú ideig fennálló gyulladás számos patológias következménnyel is járhat [32].

Ezen káros folyamatok elkerülésére, valamint az immunválasz átmeneti jellegének biztosítására számos mechanizmus fejlődött ki. Egyrészt ismertek a mintázat felismerő receptorok által indukált jelátviteli utak negatív regulátorai, többek között a TNF- α indukálható protein 3 (TNFAIP3, vagy A20) [33]. Másrészt, mivel a kommunikáció a

veleszületett és az adaptív immunválasz között citokinek szekréciója révén valósul meg, a SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) fehérje családba tartozó proteinek, interferálva a citokinek mediálta jelátviteli utakkal hatékonyan csendesítik az immunválaszt [34]. Harmadrészt ismertek olyan, negatív szabályozó funkcióval rendelkező receptorok, melyek közvetlenül gátolják a veleszületett immunrendszer működését [35], [36]. A kontrolálatlan immunválasz szövet károsító hatása ellen véd az LPS tolerancia: Foster és munkatársai kimutatták, hogy ismételt LPS kezelés hatására makrofágokban a gyulladáskeltő citokineket kódoló gének expressziója csökken az egyszeri LPS kezeléshez képest, ugyanakkor az antimikrobiális peptideket kódoló gének expressziója fokozódik ismételt LPS kezelést követően [37]. Korábban ugyan azt feltételezték, hogy az LPS tolerancia hátterében a receptorok deszenzitizációja áll [38, 39], mára igazolódott, hogy e jelenség hátterében kromatin módosulások állnak [37].

Szintén az immunválaszt szabályozó folyamatok közé sorolhatjuk a reverz jelfolyamatot, hiszen a receptor-ligand kölcsönhatás nem csak a receptort expresszáló sejtekben indít választ (*forward* szignál), hanem a ligandot termelő sejtben is (reverz szignál) [40], amely jól ismert a gyulladásos folyamatok egyik főszereplője, a TNF esetében. Mivel a TNF funkciója nem korlátozódik az ún. akut-fázis reakciókra, hanem túlműködése ismert számos krónikus gyulladással járó kórképben, ezért a TNF kutatás az elmúlt évtizedben a patológiás mennyiségben termelődő TNF monoklonális ellenanyagokkal való blokkolására, illetve a TNF reverz szignaling-ra fókuszált.

Krónikus gyulladásos kórképek kezelésére a klinikumban rutinszerűen alkalmazzák az Ifx-et számos autoimmun betegség kezelésére [41]-[42], bár pontos hatásmechanizmusa teljes egészében ma sem ismert.

Eredményeinket tekintve megállapíthatjuk, hogy az LPS kezelést megelőzően kiváltott reverz jelfolyamat nagymértékben csökkent a THP-1 humán monocita sejtvonal esetén vizsgált gyulladáskeltő citokinek relatív génexpresszióját. Az adatok alapján arra következtethetünk, hogy a reverz szignálnak fontos szerepe van a génkifejeződés módosításában. Megállapításunk korábbi tanulmányok alapján is helytállónak bizonyult. Eissner és munkatársai arról számoltak be, hogy a tmTNF-en keresztüli reverz szignál indukció következtében történő LPS-indukált citokinek (sTNF, IL-1, IL-6, IL-10) alulszabályozása LPS rezisztenciával "ruházza fel" a TNF receptort hordozó monocita sejteket [27]. Szintén ismert, hogy az Ifx kezelés primer humán dendritikus sejtekben is jelentős mértékben lecsökkentette az IL-6, valamint a CCL1 relatív gén expresszióját, illetve

ez utóbbi citokin mennyiségét a sejt kultúra felülszókban *Staphylococcus aureus* eredetű peptidoglikán stimulus hatására [43]. Az Ifx előkezelés hatékonyságát támasztja alá továbbá az a megfigyelés, hogy az előkezelt mintákban az IL-17 relatív génexpressziója jelentősen lecsökkent az LPS kezelésben részesült sejteken. Ezt az eredményt alátámasztja, hogy az IL-17 egyrészt szerepet játszik az extracelluláris patogénnel szembeni immunválaszban [44-46], másrészt túltermelődése megfigyelhető mindazon krónikus gyulladásos kórképekben, melyekben az Ifx kezelést alkalmazzák [47-49].

Fontos megjegyezni, hogy bár az IL-10 alapvetően gyulladásgátló citokin, mégis szignifikáns relatív génexpresszió emelkedést tapasztaltunk a kontrol mintákhoz képest az LPS kezelt humán sejtvonalon, és a PMA indukálta primer egér makrofág sejteken, viszont az Ifx előkezelés szignifikáns génexpresszió csökkenéshez vezetett az LPS kezelt mintákhoz képest. Ismert, hogy az IL-10 mennyisége metasztatizist képző melanómákban fokozott, ahol a tumor szövetet védi az immunrendszertől [50]. Ennek tükrében joggal vetődik fel a kérdés, hogy a TNF blokkolása révén indukált reverz szignálnak lehet-e tumorelles hatása. Egy a nyáron megjelent közlemény szerint a tmTNF-re tervezett monoklonális ellenanyag sikeresen gátolta az emlő karcinóma sejtek növekedését egér modellben, valamint sejt kultúrában [51].

A gyulladásos folyamatokban részt vevő mediátorokkal szemben azonban, mind a humán, mind pedig az egér kísérletekben megállapítottuk, hogy az Ifx kezelés hatására a CKIP-1 relatív gén expressziója mind a kezelt kontrolhoz, mind pedig az LPS kezelt sejtekhez viszonyítva jelentősen megemelkedett. Kutatócsoportunk korábban beszámolt arról, hogy a CKIP-1 képes interakcióba lépni a tmTNF N terminális, intracelluláris doménjével a monociták gyulladásos válasza során, illetve a tmTNF-en induló reverz jelátvitel esetén. A reverz szignál hatására a CKIP-1 a plazma membránból az intracelluláris kompartmentekbe transzlokálódik, ahol különböző funkciójú fehérjékkel hat kölcsön, amelynek következtében számos fiziológiás folyamatot (sejt differenciáció, mozgás, sejthalál) indukál. A transzlokációval párhuzamosan az Ifx által indukált TNF reverz jelátvitel a CKIP-1 különböző aktivitásainak csökkenéséhez vezet [29]. Mindezek alapján tehát feltételezhető, hogy az Ifx hatására túltermelődő CKIP-1 kölcsönhatva a tmTNF N terminális fragmentjével közvetlenül részt vesz a reverz szignál kialakításában, és ez által szerepet játszik a citokin válasz kialakításában.

A PMA-val előkezelt primer egér makrofág sejtekkel folytatott kísérleteink alátámasztották a humán monocita sejtvonal esetén tett megfigyelésünket, hiszen a reverz szignál relatív génexpresszió moduláló hatása itt is megfigyelhető: az Ifx kezelés a vizsgált

gyulladásokkeltő citokinek jelentős génexpresszió csökkenését eredményezte. Azonban fontos megjegyeznünk, hogy az eredmények néhány esetben eltérőek lehetnek. Ez elsősorban azzal a ténnyel magyarázható, hogy míg első kísérletünkben THP-1, leukémiás betegekből származó monocita sejtvonallal dolgoztunk, másodszor monocita sejtvonal helyett primer egér sejteket vizsgáltunk. Másrészt a primer monociták receptorai, génexpressziós tulajdonságai differenciáltatásuk során megváltozhatnak, ennél fogva összehasonlítva a monocitákkal gyulladásos folyamataik is részben másképpen zajlanak le [52]. Emellett a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó effektor molekulák génexpressziós mintázata a transzkripció szabályozás és a poszttranszlációs módosítások következtében is eltérést mutathat [53, 54].

5.2. Az Ifx kezelés hatása függetlennek tekinthető az Fc fragment jelenlététől

Az infliximab egy kiméra monoklonális ellenanyag, melynek alapvázát a humán Immunglobulin G adja. Az IgG antitest alapú molekula egy nehéz- és egy könnyű polipeptid láncból tevődik össze, két antigén-kötő karral rendelkezik (Fab), melyek egy rugalmas kapocs régió (hinge) keresztül kötődnek a glikozilált Fc régióhoz. Az infliximab egyrészt tartalmazza az egérből származó monoklonális antitest könnyű (V_L) -és nehéz (V_H) láncú variábilis doménjeit, másrészt a humán IgG1 Fab régiójában lévő nehéz láncú konstans domént (CH_1) és az Fc konstans régiót [26].

Az Ifx mellett számos, különböző szerkezettel rendelkező, a klinikumban is általánosan használt anti-TNF ellenanyag került kereskedelmi forgalomba: az adalimumab és a golimumab humán IgG1 anti-TNF monoklonális ellenanyag, az etanercept egy fúziós protein, amely a TNFR2 extracelluláris doménjéből és az IgG1 Fc régiójából áll, végül de nem utolsósorban a certolizumab, mely PEG-gel kapcsolt humanizált anti-TNF Fab fragment [11]. Bizonyos esetekben előfordulhat, hogy az anti-TNF ágensek ellen antitestek (neutralizáló ellenanyagok) képződnek a szervezetben, melyek hiábavalóvá tehetik az ellenanyagok hosszas és költséges terápiás alkalmazását.

Egy tanulmány arról számolt be, hogy az anti-TNF ellenanyagok terápiás alkalmazása során, a kezelés végkimenetelét befolyásolhatja az Fc-receptorok polimorfizmusa [55]. Elvi szinten az Fc régió által mindhárom monoklonális antitest (infiximab, adalimumab, golimumab) képes komplement fixálásra, valamint az Fc-receptorhoz való kötődésre. Két különböző Fc-receptor családot különböztetünk meg: az $Fc\gamma$ receptorok többek között leukocitákon, míg az $FcRn$ endotél sejteken expresszálódik. Mindhárom monoklonális ellenanyag és az etanercept is rendelkezhet Fc-mediált hatásokkal, melyek strukturális

különbözőségek, valamint a TNF és antitest komplex formáció sokasága miatt különbözőek lehetnek. Ezek alapján felvetődhet a kérdés, miszerint lehetséges-e, hogy az általunk vizsgált hatásmechanizmusok kiváltásáért nem is a reverz szignál a felelős.

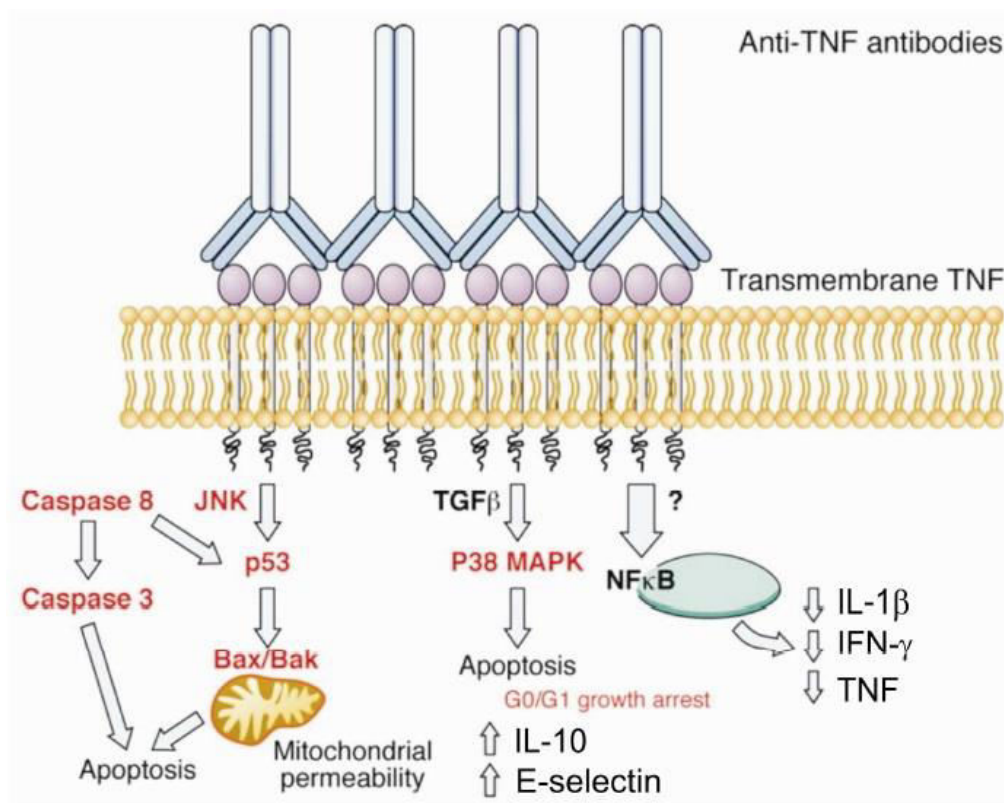
Egyre nagyobb figyelemben részesülnek a TNF antagonisták által kiváltott hatásmechanizmusok, melyek során az anti-TNF ellenanyagok tmTNF-hez való kötődése funkcionális változásokat indíthatnak el. A jelenlegi bizonyítékok azt mutatják, hogy az imént említett ellenanyagok szerepe kettős: egyrészt antagonisták, mivel megakadályozzák, hogy a tmTNF bekössön a receptorához, másrészt agonisták, mivel képesek a reverz szignál kiváltására. A tmTNF-en induló reverz jelátvitel *in vitro* indukál citokin szuppressziót és endotoxin rezisztenciával „ruhazza fel” az adott sejtet. Ez a tény arra utal, hogy egy hasonló mechanizmus játszódhat le rheumatoid arthritis és más betegségek anti-TNF terápiás kezelése során is [40].

Monociták Toll-like receptor 4-en (TLR4) keresztül történő endotoxin/LPS aktivációja indukálja a citokin molekulák, többek között a TNF, IL-1 β , IL-10 és az IL-12 szekrécióját. Az imént említett citokinek tmTNF-hordozó makrofágok általi termelése a gyulladás helyszínén ugyancsak megfigyelhető. Nyilvánvaló, hogy a TLR-en történő aktiváció esszenciális a citokinek indukációjához [56]. TNF antagonisták tmTNF-hez való kötődése reverz jelátviteli utakat indukál, melyek kereszteződhetnek többek között LPS-által indukált utakkal is. A jelátviteli útvonalak egyidejű lefutása a citokin termelés csökkenését eredményezi, melynek oka valószínűleg a jelátviteli komponensek gyors és nagymértékű felhasználása [40]. Habár számos tanulmány alapján egyértelmű, hogy minden TNF ellenanyag képes a tmTNF-hez kötődni, bizonyított, hogy a citokin szuppresszió különböző módon történő indukciója reverz szignál útján történik [57-59].

Egy publikáció arról számolt be, hogy az etanercepttel ellentétben az Ifx jelentősen lecsökkenti az LPS-indukált TNF és IL-1 β termelését humán monocita sejtek esetén [60]. Hasonlóképpen, egy következő tanulmány a humán monocita sejtek kapcsán azt állítja, hogy az adalimumab és az Ifx gátolja az LPS által indukált IL-10 és IL-12 citokinek szekrécióját, míg az etanercept hatástalannak bizonyult [59]. Hasonló *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy az Ifx, az adalimumab és a certolizumab által történő TNF és az IL-1 β citokinek teljes szuppressziója elérhető, míg az etanercept esetén csak részleges blokkolásra van lehetőség.

A tmTNF-en induló reverz jelfolyamat aktivált T-sejtek esetén indukálja az E-szelektin termelődést [61], [58]. A T-sejtes E-szelektin expresszió a gyulladás helyén kezdő lépésként

szerepet játszik az endotél sejtadhéziós folyamataiban. A tmTNF-mediált E-szelektin expresszió T-sejtekben infliximab és etanercept ellenanyaggal is egyaránt indukálható [58]. Az adatok alapján arra következtethetünk, hogy a monovalensen kötődő etanercept a tmTNF-hez kötődve képes reverz szignált kiváltani, ezáltal indukálja az E-szelektin termelődését, ennek ellenére nem képes meggátolni a sejt proliferációt. Míg, a bivalensen kötődő Ifx kapcsolódása a tmTNF-hez olyan reverz jelátviteli folyamatot indukál, mely során képes megakadályozni a sejtosztódást [25].



11. ábra. Számos anti-TNF ellenanyag képes reverz szignált indukálni, mely többek között E-szelektin és különböző citokinek expressziójához vezet. A reverz szignál génexpressziót gátló hatása az NF-κB-n keresztül valósul meg (Juhász Kata PhD tézisei alapján).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy az Ifx kezelés által indukált reverz szignál jelentős génexpresszió szabályozó hatással rendelkezik. A THP-1 sejtek esetén azt tapasztaltuk, hogy az infliximab kezelés jelentős génexpresszió csökkenést okozott minden vizsgált gén esetén: IL-8, TNF, IL-1β, CKIP-1, TGF-β. Az IgG kezelés génaktivitást moduláló hatása csak bizonyos gének, így az IL-8, IL-1β, CKIP-1 esetében volt megfigyelhető. Más humán monocita sejtvonal, a MM6 esetén szintén azt tapasztaltuk, hogy az Ifx nagymértékben

csökkenti a vizsgált gének relatív kifejeződését. Ellenben, az IgG antitest ebben az esetben hatástalannak bizonyult. Továbbá az egér sejtvonalak esetén is megfigyelhető az Ifx génaktivitást gátló hatása: DHO3 és a RAW 264.7 sejtek esetén is megfigyeltük az IL-1 β relatív génexpressziójának csökkenését, valamint a DHO3 sejtekben a TNF relatív génexpressziója szintén szignifikáns eltérést mutatott a kezeletlen kontrol mintához képest.

Eredményeink megfelelően szemléltetik, hogy a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó effektor molekulák relatív génexpressziójának csökkenése mind a humán monocita sejtvonal, mind az egér makrofág sejtek esetén megfigyelhető. Felépítésüket tekintve az Ifx és az IgG₁ konstans régiója megegyezik, azonban ennek ellenére a kísérletek során kapott génexpressziós mintázatok eltérnek egymástól. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy az Ifx által indukált hatásmechanizmus független az Fc fragment jelenlététől. Eredményeink igazolták, hogy az IgG jelenléte önmagában nem volt elegendő ahhoz, hogy a gyulladásokeltő citokinek termelése csökkenjen. Kísérleteink eredményei egyértelműen alátámasztják a felvetést, miszerint a megfigyelés hátterében a reverz jelfolyamat áll. Ennélfogva, irodalmi adatokkal egybecsengően megállapíthatjuk, hogy a TNF antagonisták képesek a tmTNF-hez kötődve reverz szignált kiváltani, és ezáltal apoptózist okozni, a citokinek termelődését jelentősen lecsökkenteni és más folyamatokat indukálni [25].

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk megköszönni Dr. Duda Ernő Professzor Úrnak, hogy mindvégig támogatta és ösztönözte a munkánkat, valamint lehetővé tette számunkra, hogy az Orvosi Biológia Intézetben gazdagítsuk tudásunk. Különös köszönettel tartozunk Filkor Katának a konferenciára való felkészülés ideje alatt nyújtott segítségéért, rendkívül értékes tanácsaiért, türelméért.

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Sipos Orsolya, Török Annamária a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- a sejt kultúrák fenntartását és kezelését,
- az egér csontvelői makrofágok preparálását,
- az RNS tisztítást,
- a cDNS írást,
- a PCR reakciót

végeztük el.

Aláírás

Szeged, 2014. június 12.

Irodalomjegyzék

1. Postel, S. and B. Kemmerling, *Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(9): p. 1025-31.
2. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
4. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
5. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
6. Aggarwal, B.B., B. Moffat, and R.N. Harkins, *Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization*. J Biol Chem, 1984. **259**(1): p. 686-91.
7. Aggarwal, B.B., et al., *Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2334-44.
8. Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*. Blood, 2012. **119**(3): p. 651-65.
9. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
10. Balkwill, F., *TNF-alpha in promotion and progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 409-16.
11. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(7): p. 1215-28.
12. Kirkin, V., et al., *The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1678-87.
13. Chan, F.K., et al., *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-4.
14. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
15. Tartaglia, L.A., D. Pennica, and D.V. Goeddel, *Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18542-8.
16. Lazdins, J.K., et al., *Membrane tumor necrosis factor (TNF) induced cooperative signaling of TNFR60 and TNFR80 favors induction of cell death rather than virus production in HIV-infected T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 81-90.
17. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-62.
18. Kisiswa, L., et al., *TNFalpha reverse signaling promotes sympathetic axon growth and target innervation*. Nat Neurosci, 2013. **16**(7): p. 865-73.
19. Sun, M. and P.J. Fink, *A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4307-12.
20. Dowlati, Y., et al., *A meta-analysis of cytokines in major depression*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(5): p. 446-57.

21. Kapadia, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 1042-52.
22. Levine, B., et al., *Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure*. N Engl J Med, 1990. **323**(4): p. 236-41.
23. Matera, M.G., L. Calzetta, and M. Cazzola, *TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water*. Pulm Pharmacol Ther, 2010. **23**(2): p. 121-8.
24. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
25. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
26. Lin, M.V., et al., *The influence of anti-TNF therapy on the course of chronic hepatitis C virus infection in patients with inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(4): p. 1149-56.
27. Eissner, G., et al., *Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6193-8.
28. Frost, L.L., et al., *Propanil inhibits tumor necrosis factor-alpha production by reducing nuclear levels of the transcription factor nuclear factor-kappaB in the macrophage cell line ic-21*. Toxicol Appl Pharmacol, 2001. **172**(3): p. 186-93.
29. Juhasz, K., et al., *Casein kinase 2-interacting protein-1, an inflammatory signaling molecule interferes with TNF reverse signaling in human model cells*. Immunol Lett, 2013. **152**(1): p. 55-64.
30. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
31. Karin, M., T. Lawrence, and V. Nizet, *Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer*. Cell, 2006. **124**(4): p. 823-35.
32. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
33. Turer, E.E., et al., *Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20*. J Exp Med, 2008. **205**(2): p. 451-64.
34. Dalpke, A., et al., *Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins*. Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 225-35.
35. Lemke, G. and C.V. Rothlin, *Immunobiology of the TAM receptors*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 327-36.
36. Rothlin, C.V., et al., *TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1124-36.
37. Foster, S.L., D.C. Hargreaves, and R. Medzhitov, *Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 972-8.
38. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 508-19.
39. Fujihara, M., et al., *Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex*. Pharmacol Ther, 2003. **100**(2): p. 171-94.

40. Eissner, G., W. Kolch, and P. Scheurich, *Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(5): p. 353-66.
41. Ogilvie, A.L., et al., *Treatment of psoriatic arthritis with antitumour necrosis factor-alpha antibody clears skin lesions of psoriasis resistant to treatment with methotrexate*. Br J Dermatol, 2001. **144**(3): p. 587-9.
42. Chey, W.Y., et al., *Infliximab for refractory ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(8): p. 2373-81.
43. Filkor, K., et al., *Genome wide transcriptome analysis of dendritic cells identifies genes with altered expression in psoriasis*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73435.
44. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 519-27.
45. Happel, K.I., et al., *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 761-9.
46. Ferretti, S., et al., *IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2106-12.
47. Kotake, S., et al., *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1345-52.
48. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
49. Albanesi, C., A. Cavani, and G. Girolomoni, *IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 494-502.
50. Gerlini, G., et al., *Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions*. Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 1853-63.
51. Yu, M., et al., *Targeting transmembrane TNF-alpha suppresses breast cancer growth*. Cancer Res, 2013. **73**(13): p. 4061-74.
52. Scull, C.M., W.D. Hays, and T.H. Fischer, *Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 53.
53. Yin, K., et al., *Tristetraprolin-dependent post-transcriptional regulation of inflammatory cytokine mRNA expression by apolipoprotein A-I: role of ATP-binding membrane cassette transporter A1 and signal transducer and activator of transcription 3*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 13834-45.
54. Novotny, G.W., et al., *Transcriptional and translational regulation of cytokine signaling in inflammatory beta-cell dysfunction and apoptosis*. Arch Biochem Biophys, 2012. **528**(2): p. 171-84.
55. Tutuncu, Z., et al., *Fcgamma receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor alpha-blocking agents*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2693-6.
56. van Lent, P.L., et al., *Toll-like receptor 4 induced FcgammaR expression potentiates early onset of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex arthritis: Toll-like receptor 4 largely regulates FcgammaR expression by interleukin 10*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(3): p. 334-40.
57. Scallon, B., et al., *Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(2): p. 418-26.

58. Mitoma, H., et al., *Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 376-92.
59. Shen, C., et al., *Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(3): p. 251-8.
60. Kirchner, S., et al., *Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes*. Cytokine, 2004. **28**(2): p. 67-74.
61. Harashima, S., et al., *Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 130-6.