

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

A certolizumab pegol által indukált reverz jelátvitel vizsgálata professzionális immunsejteken

Török Annamária
Biomérnök BSc V. évfolyam
Sipos Orsolya
Biológia MSc I. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Duda Ernő
Dr. Filkor Kata

Konzulens: Dr. Boros Imre

2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	5
1.1. TNF és a gyulladás	5
1.2. A szolubilis és a membránkötött TNF molekula biológiai aktivitása.....	6
1.3. Biológiai terápiák új lehetőségei krónikus gyulladásos folyamatokban.....	8
2. Célkitűzések	11
3. Anyagok és módszerek.....	12
3.1. Sejtenyésztés	12
3.2. RNS tisztítás és reverz transzkripció	13
3.3. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	13
3.4. Statisztikai analízis	15
4. Eredmények.....	16
4.1. A CZP által indukált reverz jelfolyamat hatása a humán monociták génexpressziójára gyulladásos körülmények között	16
4.2. A CZP által kiváltott reverz jelfolyamat módosítja az egér makrofágok génexpresszióját.....	18
4.3. A reverz jelátvitel humán T limfociták esetében csökkenti a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződését	19
4.4. M1, M2 makrofágok relatív génexpressziós vizsgálata CZP kezelés hatására	21
5. Diskusszió.....	24
Köszönetnyilvánítás	27
Irodalomjegyzék.....	28
Tételes szerzői hozzájárulás	32

Rövidítés jegyzék

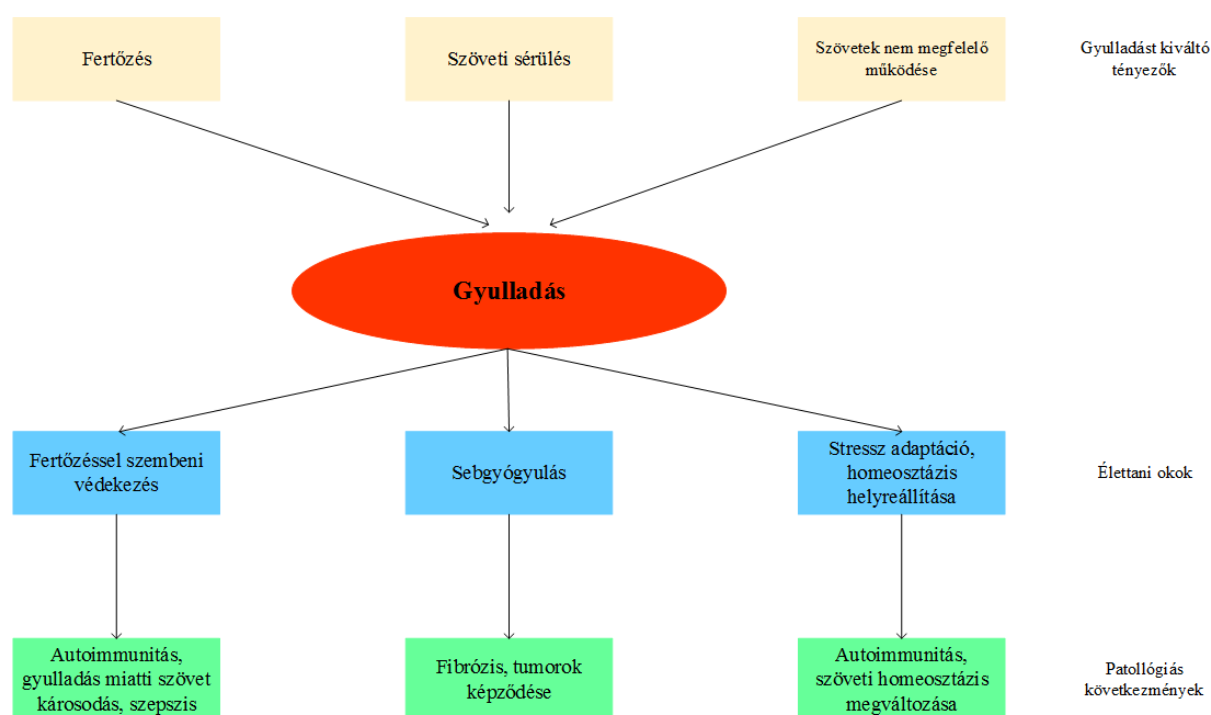
ADA	Gyógyszer elleni ellenanyag (<u>A</u> nti- <u>D</u> rug- <u>A</u> ntibody)
ANOVA	Varianciaanalízis (<u>A</u> nalysis <u>O</u> f <u>V</u> ariance)
CKIP	Kazein kináz-2-vel kölcsönható protein (<u>C</u> asien <u>K</u> inas 2- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein)
CXCL	CXC (Cysteine-X-Cysteine) kemokin ligand
CZP	Certolizumab pegol
DD	Halál domén (<u>D</u> eath <u>D</u> omain)
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-féle medium (<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)
IFN-γ	Interferon-gamma
IFX	Infliximab
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LPS	Lipopoliszacharid
MHC	Főhisztokompatibilitási génkomplex (<u>M</u> ajor <u>H</u> istoncompatibility <u>C</u> omplex)
MM6	MonoMac6, emberi eredetű mieloid leukémia sejtvonal
OKT-3	anti-CD3
PMA	Forbol 12-mirisztol 13-acetát (<u>P</u> horbol 12- <u>m</u> yrystate 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)
TCR	T-limfocita receptor
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. TNF és a gyulladás

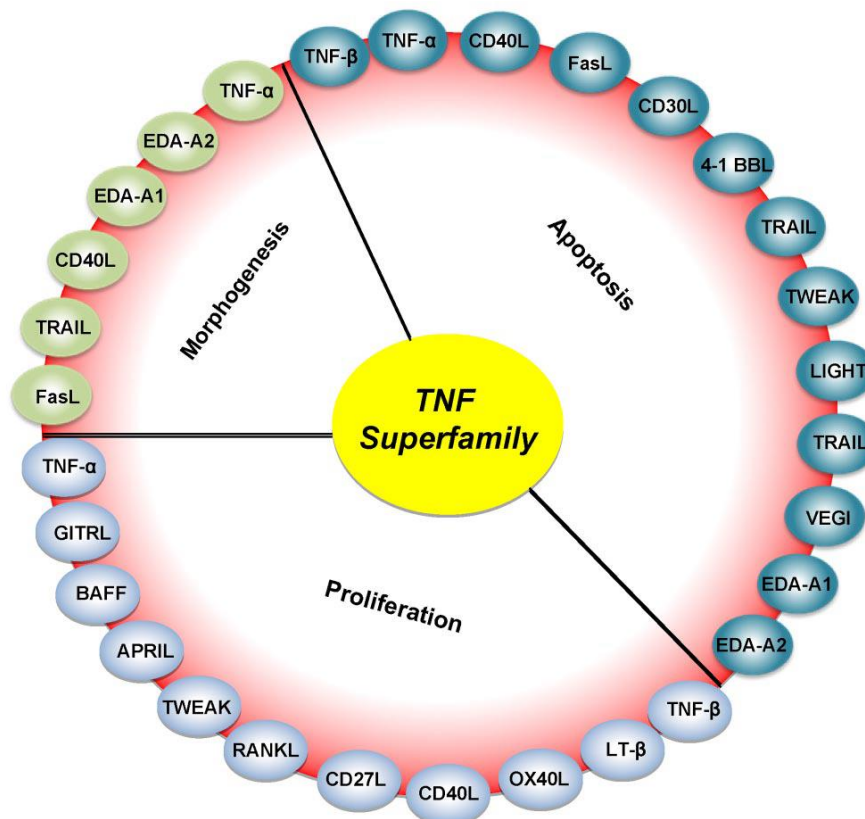
Az emlős szervezeteket életük során számos olyan külső, illetve belső hatás (pl.: mikrobiális fertőzések, szöveti sérülés) éri, amely gyulladás kialakulásához vezet. A gyulladás átmeneti jellegének biztosítása azonban a szervezet túlélésének záloga, hiszen az indokolatlanul hosszú ideig fennálló gyulladás súlyos, akár az életet is közvetlenül veszélyeztető következményekkel járhat (1. ábra) (Karin, Lawrence et al. 2006), (Medzhitov 2008).



1. ábra. Emlős szervezetben számos folyamat vezet gyulladás kialakulásához. Bár a kezdeti válasz reakciók kedvezőek a gazda szervezet számára, az indokolatlanul elhúzódó gyulladás súlyos patológiás következményekkel jár (Medzhitov 2008)

A gyulladás kialakulásában kulcs szerepet játszik a tumor nekrosis faktor (TNF). A citokin leírása Carswell és munkatársai nevéhez fűződik; a munkacsoport 1975-ben egy olyan szérum faktorról számolt be, amely tumoros egerekben bakteriális fertőzést követően a daganatok bevérzéses elhalásához vezetett (Carswell, Old et al. 1975). Igazolódott, hogy a fertőzést követően a TNF mennyisége szinte azonnal megemelkedik, elősegítve ezzel az IL-1, az IL-6, stb., ún. akut fázis proteinek termelését, végső soron pedig a fertőzés leküzdését (Ramadori, Van Damme et al. 1988). Napjainkra emlős szervezetekben a TNF szupercsaládba tartozó 19 ligand és 29 receptor azonosítása történt meg (Aggarwal, Gupta et al. 2012),

(Juhasz, Buzas et al. 2013). A családtagok legfontosabb szerepe az immunrendszer működésének finomszabályozása, de morfogénként részt vesznek nem immun sejtípusok differenciációjában, valamint apoptotikus hatásuk is ismert (2. ábra) (Bhardwaj and Aggarwal 2003), (Gaur and Aggarwal 2003).



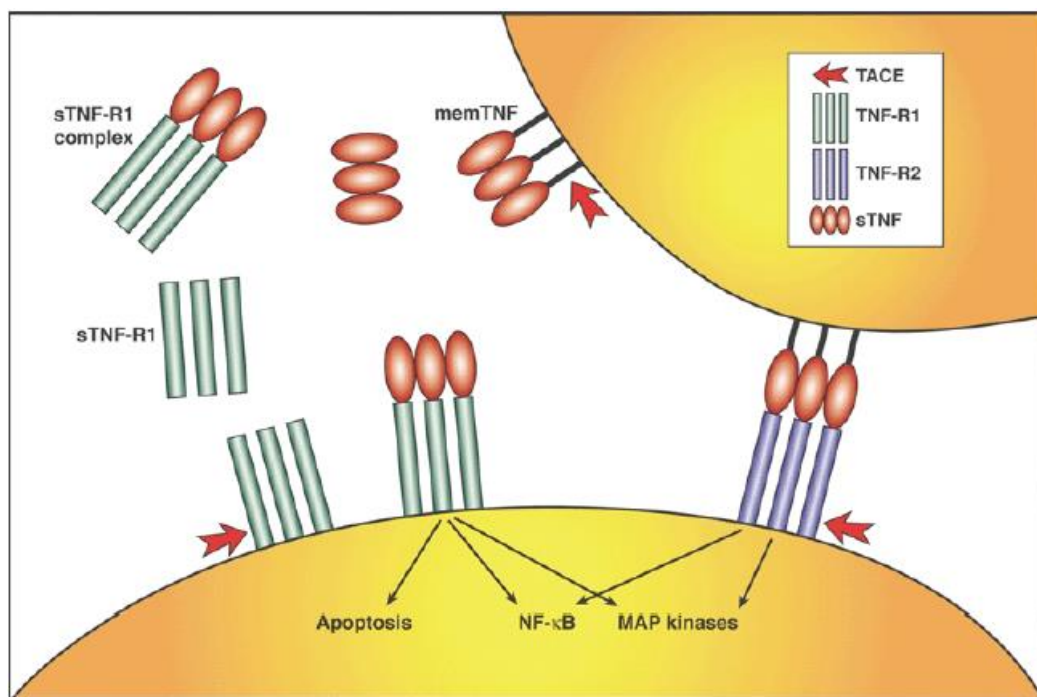
2. ábra. Ugyan a TNF családtagok elsődleges feladata az immunrendszer működésének szabályozása, számos egyéb fiziológiás folyamatban részt vesznek (Aggarwal, Gupta et al. 2012)

1.2. A szolubilis és a membránkötött TNF molekula biológiai aktivitása

A TNF molekula az emlős szervezetben két formája ismert: a vérben keringő, egyenként 17 kDa méretű alegységekből felépülő homotrimer szolubilis (sTNF), valamint a sejtek plazma membránjához kapcsolódó, 26 kDa tömegű transzmembrán (tmTNF) forma. A tmTNF-et első sorban professzionális immunsejtek (pl.: aktivált makrofágok) termelik. Az ektodoménból a TNF konvertáló enzim (TNF converting enzyme, TACE) hasítja le a 157 aminosav hosszúságú, 17 kDa tömegű fehérjét, amely homotrimert alkotva az I. és II. típusú transzmembrán TNF receptorokon (TNF-RI és TNF-RII) fejt ki hatását. A membrán kötött maradékot tovább hasítja a szignál peptid peptidáz szerű proteáz 2 (signal peptide peptidase like protease 2; SSPL2b). A hasítás következtében a nukleáris lokalizációs szignált hordozó szignál peptid a sejtmagba vándorol, és ott feltehetően szerepe van egyes, feltételezéseink

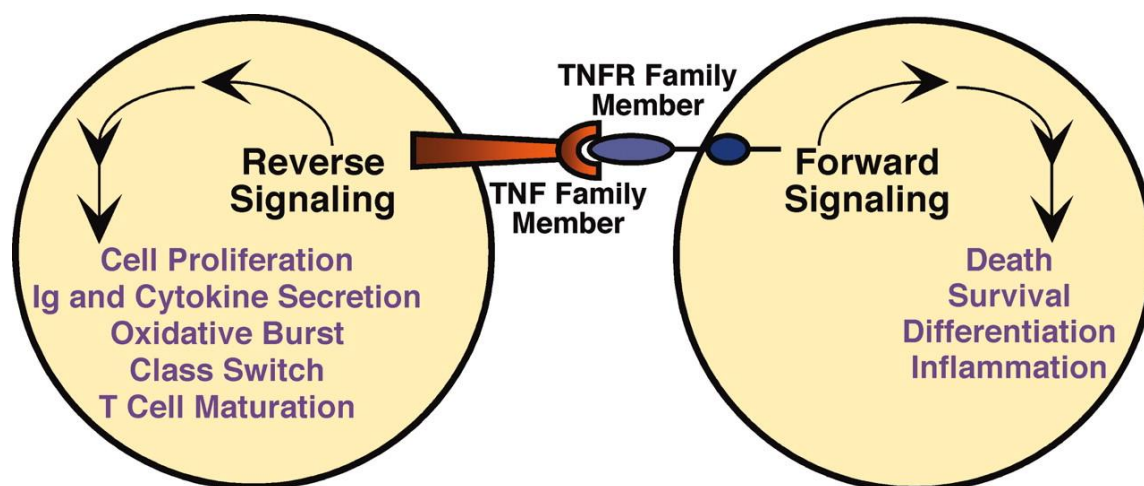
szerint első sorban gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződésének módosításában (Horiuchi, Mitoma et al. 2010).

Az sTNF molekula mindkét típusú TNF receptorral képes kölcsönhatást kialakítani, noha a TNF-RI molekula valamennyi, sejtmaggal rendelkező sejt felszínén megtalálható, addig a TNF-II főként neuronok, endothel sejtek, valamint professzionális immunsejtek felszínén figyelhető meg. A másik rendkívül fontos különbség a két receptor között az, hogy a TNF-RI molekula ún. halál domént (death domain, DD) hordoz, melynek következtében közvetlenül is képesek apoptózis kiváltására. Ezzel szemben a TNF-II halál doménnel nem rendelkezik, így a receptor és ligand közötti kölcsönhatás kizárólag a MAP kinázok aktiválódásával, illetve az NF- κ B transzkripció faktor aktivációjával jár (Grell, Douni et al. 1995) (3. ábra).



3. ábra. A membrán kötött TNF enzimatis hasítás következtében alakul szolubilis formává, és a membrán kapcsolt TNF receptorokkal való kölcsönhatás révén fejti ki hatását a célsejten (Campbell, Roberts et al. 2003).

A TNF kutatás elmúlt bő egy évtizedének egyik legjelentősebb felfedezése a reverz jelátvitel felismerése volt. Felismerték, hogy a receptor és a ligand közötti kölcsönhatás a jól ismert módon változásokat indukál a receptort kifejező sejteken (forward jelátvitel), ugyanakkor a kölcsönhatás következtében a membrán kötött ligandot expresszáló sejteken is változás történik (reverz jelátvitel) (Eissner, Kolch et al. 2004) (4. ábra).



4. ábra. A membrán kötött TNF és a TNF receptor közötti kölcsönhatás változást indukál mind a receptort (forward jelátvitel), mind pedig a ligandot (reverz jelátvitel) kifejező sejteken (Sun and Fink 2007).

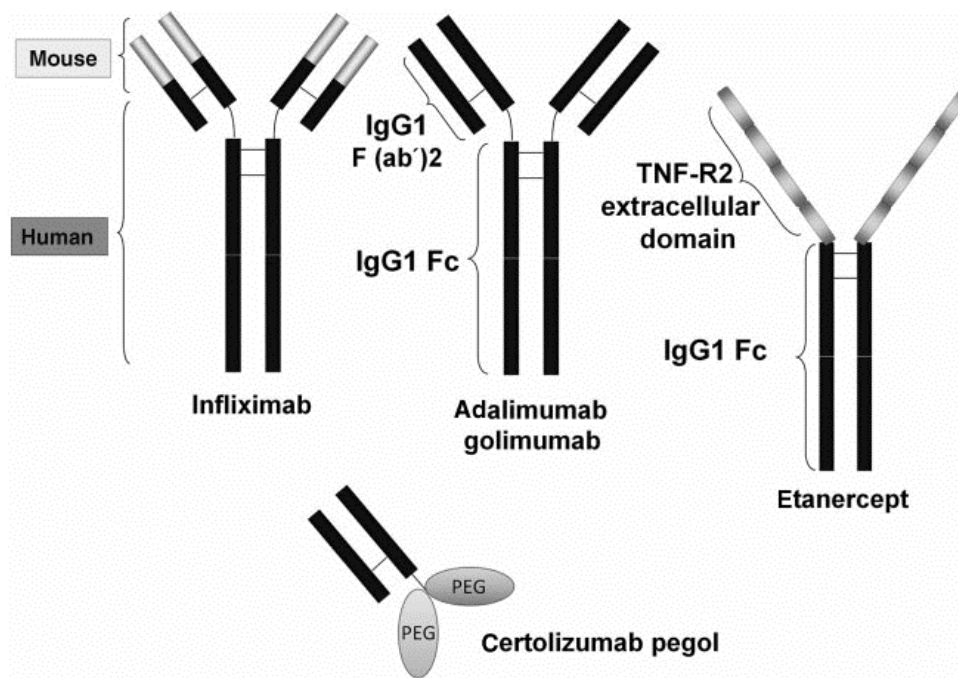
A reverz jelátvitel fő feladata az immunrendszer működésének finomszabályozása (Vudattu, Holler et al. 2005), de az egyedfejlődés során kulcs szerepet játszik az axonok megfelelő elágazásainak kialakításában (Kisiswa, Osorio et al. 2013), illetve részt vesz a nociceptorok fejlődésének szabályozásában (Wheeler, Heffner et al. 2014) is. A reverz jelátvitel fontos, az egész élővilágban általános funkcióját támasztja alá az a tény, hogy a tmTNF N terminális doménje rendkívül nagy fokú szekvencia homológiát mutat különböző fajok között (Watts, Hunt et al. 1999). A reverz jelátvitel jelensége továbbá nem korlátozódik a TNF-re, a TNF molekula család egyéb tagjai esetében, így pl.: a CD137 ligand (Moh, Lorenzini et al. 2013), a BAFF (Jeon, Kim et al. 2010), GITRL (Bae, Kim et al. 2008), stb. esetén is ismert.

1.3. Biológiai terápiák-új lehetőség krónikus gyulladásos folyamatokban

A szervezetben termelődő TNF mennyiségének szigorú szabályozása azonban nem csak a korábban már említett akut károsodás elkerülése miatt fontos. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a kis mennyiségben, de krónikusan termelődő TNF súlyos következményekkel jár, többek között tumoros megbetegedésekben kahexiát vált ki (Onesti and Guttridge 2014), amely közvetlen halálókként szerepel a daganatos betegek 30%-a esetén (von Haehling and Anker 2013). Ismert az is, hogy néhány neurológiai kórkép (Dowlati, Herrmann et al. 2010), (Brietzke and Kapczynski 2008), a keringési rendszer egyes megbetegedései (Levine, Kalman et al. 1990), néhány tüdő betegség (Matera, Calzetta et al. 2010), illetve az inzulin rezisztencia

(Hotamisligil, Shargill et al. 1993) is a fokozott TNF termelés következménye. Mindezek a megbetegedéseken túl bizonyított továbbá, hogy számos, krónikus gyulladásal járó kórképben így a pikkelysömörben (Nickoloff, Xin et al. 2007), (Schottelius, Moldawer et al. 2004), a rheumatoid arthritisben (Feldmann and Maini 2001), (Bradley 2008) és a Crohn betegségben (Chey, Hussain et al. 2001) is hibás a termelő TNF mennyiségének szabályozása, azaz túltermelődik a TNF, amely a súlyos tünetek kialakulásához, végső soron pedig a betegek életminőségének jelentős romlásához vezet.

A krónikus gyulladásal járó autoimmun folyamatok kezelése korábban drasztikus, a szervezet egészére ható ún. konvencionális kezelési eljárásokat, pl.: szisztémás szteroid kezelést alkalmaztak. Ezek az eljárások az immunrendszer egészének gátlásán alapulnak, éppen emiatt alkalmazásuk során akár súlyos mellékhatások is felléphetnek (Nagpal, Lu et al. 2001), (Lebwohl, Ast et al. 1998), (Stern, Liebman et al. 1998), (Zachariae, Kragballe et al. 1997). A fellépő súlyos mellékhatások miatt napjainkra a biológiai terápiás szerek fokozódó térhódítása figyelhető meg. Ezek az eljárások azon az elven alapulnak, hogy a krónikus gyulladás során extrém mennyiségben termelő citokinek/kemokinek (így a TNF) ellen termeltetett ellenanyagok képesek megkötni a fent említett gyulladások mediátorokat, így a tünetek jelentős enyhülése, de akár teljes klinikai remisszió is elérhető (Tracey, Klareskog et al. 2008). Mára a fent említett betegségek esetén hazánkban is rutinszerűen alkalmaznak különböző, TNF ellen termeltetett monoklonális ellenanyagokat (5. ábra).



5. ábra. Kereskedelmi forgalomban kapható, hazánkban is széles körben alkalmazott TNF elleni biológiai terápiás szerek szerkezeti felépítése. (Horiuchi, Mitoma et al. 2010)

A különböző TNF elleni ellenanyagok közül az infliximabot (IFX, kereskedelmi nevén Remicade), alkalmazzák legszélesebb körben. Szerkezetét tekintve az IFX egy kiméra ellenanyag, amely a humán immunglobulin G (IgG) konstans, és az egér anti-TNF ellenanyag variábilis régiójából áll (Aggarwal, Gupta et al. 2012). Bizonyították azonban, hogy a hosszan tartó IFX kezelés következtében a kezelt betegek mintegy 43%-ában anti-IFX ellenanyag keletkezett, ami mellett, hogy hatástalanná teszi az egyébként igen költséges terápiát, súlyos mellékhatások kialakulásához is vezet (Hsu and Armstrong 2013). Ez a felismerés újabb monoklonális ellenanyagok fejlesztésére sarkallta a kutatókat; ennek eredményeképpen került kifejlesztésre a teljes mértékben humanizált anti-TNF ellenanyag (adalimumab, golimumab; kereskedelmi néven Humira és Simponi), a II. típusú TNF receptorból és a humán IgG1 Fc fragmentből álló fúziós protein (etanercept; kereskedelmi néven Embrel), valamint a humán monoklonális anti-TNF ellenanyag Fab' fragmentjének polietilén glikollal (PEG) fuzionáltatott változata, a certolizumab pegol (CZP; kereskedelmi nevén Cimzia). Napjainkra igazolódni látszik, hogy a forgalomban lévő biológiai terápiás szerek közül a CZP alkalmazása a legbiztonságosabb, mivel teljes mértékben humán molekuláról van szó, ellene gyógyszer elleni ellenanyag (anti-drug antibody; ADA) nem termelődik. A PEG citotoxikus hatással nem rendelkezik, viszont növeli az ellenanyag féléletidejét a keringésben, ezáltal csökkenthető a kezelések gyakorisága (Horiuchi, Mitoma et al. 2010). A CZP másik előnyös tulajdonsága az IgG (vagyis az Fc fragment) hiánya: mivel az IgG képes átjutni a placentán (Kane and Acquah 2009), ezért a CZP biztonsággal alkalmazható várandós nők esetén is, hiszen a CZP kizárólag passzív diffúzióval jut át a placentán, ami magyarázza a CZP alacsonyabb koncentrációját a köldökzsinórvérben (Mahadevan, Wolf et al. 2013).

2. Célkitűzések

Mindezek alapján, és figyelembe véve azt a tényt, hogy a reverz jelfolyamat TNF ellen termeltetett monoklonális ellenanyagokkal is kiváltható (Eissner, Kirchner et al. 2000), a következő kérdések megválaszolását tűztük ki:

1. Hogyan hat a CZP által indukált reverz jelfolyamat gyulladásos körülmények között az immunológiai szempontból jelentőséggel bíró gének kifejeződésére humán monocita sejtvonalakon?
2. Kiváltható-e CZP kezeléssel a reverz jelfolyamat egér makrofág sejteken, és hogyan változnak a gyulladásban kulcs szerepet játszó gének kifejeződése?
3. Aktivált humán T limfociták génexpressziós mintázata hogyan változik a CZP által kiváltott reverz jelfolyamat hatására?
4. Hogyan változnak a reverz jelfolyamat hatására a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződése M1 (klasszikus) és M2 (alternatíván aktivált) humán makrofág sejtekben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejttenyésztés

A kísérleteink során a következő monocita és makrofág sejt kultúrákat alkalmaztuk:

Egér professzionális immunsejtek (RAW 264.7, J774):

A sejteket DMEM (Lonza) tápoldatban tenyésztettük melyet kiegészítettünk 2 mM L-glutaminnal (Lonza), 10% hő inaktivált FBS-sel (foetal bovine serum; PAA Gold) és 10 µg/ml kanamycinnel (Sigma). A sejtek nevelését standard sejt kultúra kondíciók között végeztük, vagyis 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom valamint 100%-os párateltségben. A sejt tenyészetek konfluencia értéke nem haladta meg a 70-80%-ot.

Humán professzionális immunsejtek

Monociták, makrofágok (MonoMac6, THP-1, U937), valamint T limfociták (Molt-4):

A sejteket 10% hő inaktivált FBS-sel (foetal bovine serum, PAA Gold), 2 mM L-glutaminnal (Lonza) valamint 10 µg/ml kanamycinnel (Sigma) kiegészített RPMI-1640 (Lonza) tápoldatban tenyésztettük. A sejtek nevelését standard sejt kultúra kondíciók között végeztük, vagyis 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom valamint 100%-os párateltségben. A sejt tenyészetek konfluencia értéke nem haladta meg a 70-80%-ot.

A kísérletek során a következő kezeléseket alkalmaztuk:

Infliximab (IFX; Remicade, Schering-Plough), gyógyászatban rutinszerűen használt monoklonális ellenanyag. Az IFX tartalmazza a humán immunglobulin G konstans régióját, valamint az egér TNF monoklonális ellenanyag variábilis régióját. Kísérleteink során 10 µg/ml végkoncentrációban adtuk a sejt kultúrához.

Certolizumab pegol (CZP; kereskedelmi nevén Cimzia; UCB Pharma): A CZP anti-TNF ellenanyag Fab fragmentjének polietilén-glikollal (PEG) fuzionáltatott változata, melyet gyógyászati célokra széles körben alkalmaznak. Az ellenanyagot 10 µg/ml végkoncentrációban adtuk a sejt tenyészetekhez.

Immunglobulin G (IgG; Human Bioplasma Kft.), segítségével meghatározható, hogy a kezelés által indukált válaszreakciót IgG-re is jellemző Fc fragment váltja-e ki. Az IgG kezelés 10µg/ml végkoncentrációban történt.

Lipopoliszacharid (LPS; Sigma): Gram negatív baktériumok sejt falában található hő stabil toxin, melyet a kísérletek során 100 ng/ml végkoncentrációban alkalmaztunk a sejtek aktiválásához.

Forbol 12-mirsztol-13-acetát (PMA, Sigma): naiv sejtek illetve T limfociták aktiválására használtuk, 100 nM-os végkoncentrációban adtuk a sejtekhez.

LEAF-purified OKT-3 (Bio-Legend) humán T limfociták aktiválására használtuk 1 µg/ml végkoncentrációban illetve 100 nM PMA-val (Sigma) kiegészítve a sejtek kezelése előtt 24 órával annak érdekében, hogy az MHC és TCR közötti kölcsönhatást imitáljuk.

LEAF-purified IFN-γ (Bio-Legend): M1 (klasszikusan aktivált) humán makrofágok differenciáltatására alkalmaztuk 20 ng/ml végkoncentrációban.

LEAF-purified IL-4 (Bio-Legend): M2 (alternatíván aktivált) humán makrofágok differenciáltatásához szükséges egyik faktor. A kezelést 20 ng/ml végkoncentrációban végeztük.

LEAF-purified IL-13 (Bio-Legend): szintén M2 típusú makrofágok differenciáltatására használtuk 20 ng/ml végkoncentrációban.

3.2. RNS tisztítás és reverz transzkripció

A sejtek kezelést követően meghatározott időpontokban össz RNS-t tisztítottunk. Az RNS tisztításhoz GeneJet Kit-et (Thermo Scientific) használtunk. Az RNS tisztítást a gyártó utasításai szerint végeztük el. A tisztított RNS-t nukleáz mentes vízben vettük fel. Az így kapott mintákat -80 °C-on tároltuk a további felhasználásig. A kapott össz RNS-en minőségi és mennyiségi meghatározást végeztünk spektrofotométer (BioPhotometer, Eppendorf) segítségével. Az RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzése után 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) készülékkel a gyártó utasításainak megfelelően.

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

A relatív gén expresszió meghatározásához Luminaris Color HiGreen Low ROX QPCR Master Mixet (Thermo Scientific) valamint exon-exon határookra tervezett primereket (1. táblázat) használtuk. CFX 96 (Bio-Rad) készülék segítségével végeztük a relatív gén expresszió meghatározását. A kapott gén expressziós értékeket a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz génhez (GAPDH) képest normalizáltuk. Az összes kísérletet legalább két technikai és három független biológiai párhuzamoson végeztük el. A relatív gén expressziót delta-delta Ct módszer segítségével határoztuk meg.

A

Gének	Forward primer (5'→3')	Reverz primer (3'→5')
GAPDH	TGCAACCGGGAAGGAAATGA	GCCCAATACGACCAAATCAGAGA
TNF	GCCTCTTCTCCTTCCTGATCG	GCTTGAGGGTTTGCTACAACAT
CKIP-1	ACCTGCAACCGACGATTCTT	CATTCCATGAAGTCAGCGATATGT
IL-8	ACTCCAAACCTTTCCACCCC	TTCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTC
IL-10	GGCACCCAGTCTGAGAACAG	GGCAACCCAGGTAACCCTTAAA
IL-1β	CCACCTCCAGGGACAGGATA	TTTGGGATCTACACTCTCCAGC
CXCL10	ACACTAGCCCCACGTTTTCT	GAGAGGTACTCCTTGAATGCCA
CCL1	CTTCACCAGGCTCATCAAAGCTG	TCTGGAGAAGGGTACCTGCATG
TNFAIP3	GCTGAAAACGAACGGTGACGG	AGAGACTCCAGTTGCCAGCGG
TNFAIP6	GCTGGATGGATGGCTAAGGG	TCCTTTGCGTGTGGGTTGTAG
IL-17A	ATTGGTGTCACTGCTACTGCT	TTCCAAGGTGAGGTGGATCG
Gas6	AAAAACTCAGGCTTCGCCAC	TCGTTGACATCTTTGTGCGCAG
ProS	TGCCCCGAAGGCTACAGATA	GCACACTGAAACAACCTCACAA

B

Gének	Forward primer (5'→3')	Reverz primer (3'→5')
GAPDH	CTGGAAAGCTGTGGCGTGAT	ATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG
TNF	TAGCCACGTCGTAGCAAAC	GCAGCCTTGTCCTTGAAGA
CKIP-1	GGATGAGGTCACCGTTGAGG	CGGAAGCTCTCAGCACAAGA
IL-1β	AACCTTTGACCTGGGCTGTC	CAGAGGATGGGCTCTTCTTCAA
CXCL10	TCATCCTGCTGGGTCTGAGT	TCATCGTGGCAATGATCTCAACA
IL-10	AAGGGTTACTTGGGTTGCCA	GAGAAATCGATGACAGCGCC
IL-6	GCCTTCTTGGGACTGATGCT	TGCCATTGCACAACCTTTTTCT
TGF-β	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTATCAGTGGGGGTCAGCAG
TNFAIP6	GATGGTCGTCCTCCTTTGCT	ACATGGAATCCAATTTTTCTGGCT
ICAM1	TCCGTGGGGAGGAGATACTG	TAGCTGGAAGATCGAAAGTCCG
Gas6	GAACCTGCCAGGCTCCTACTCT	GGAGTTGACACAGGTCTGCTCA
ProS	TGGCAAGGAGACAGGTGTCAGT	GAGCAGTGGTAACCTCCAGGAG

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

3.4. Statisztikai analízis

Az ábrákon feltüntetett adatok legalább három, független biológiai párhuzamos átlagai és szórásai. A biostatisztikai analízis elvégzésére a GraphPad for Windows szoftvert használtuk. A statisztikai szignifikancia megállapítása egy tényezős ANOVA módszerrel, valamint Student-féle páros t-próbával történt. Az eredményeinket abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, ha teljesült, hogy $n \geq 3$; * ha $p \leq 0,05$.

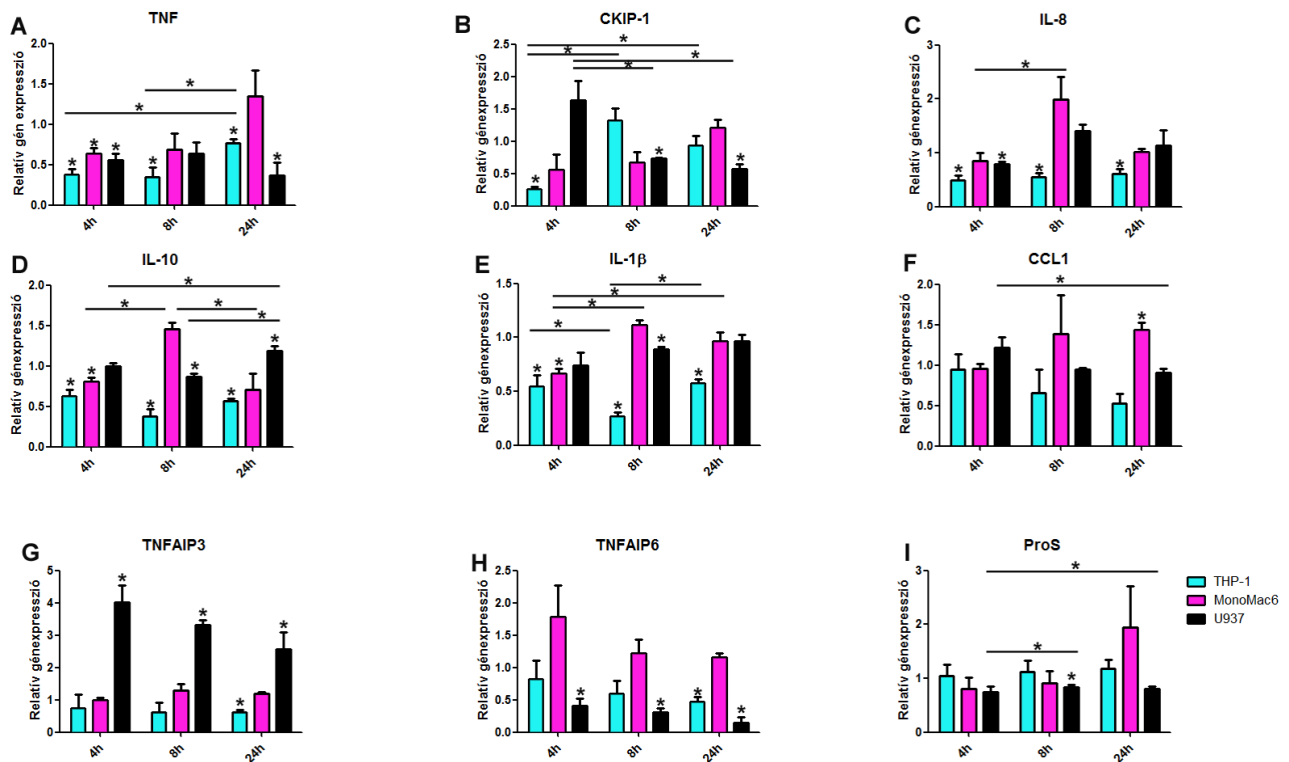
4. Eredmények

4.1. A CZP által indukált reverz jelfolyamat hatása a humán monociták génexpressziójára gyulladásos körülmények között

Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy humán és egér monocita és makrofág sejtvonalakon gyulladásos körülmények között kiváltható a reverz jelátvitel IFX kezeléssel (Sipos Orsolya, Török Annamária TDK dolgozata, 2014), továbbá, az IFX relatív génexpressziót módosító hatása jól elkülöníthető az Fc fragment és az Fc receptor közötti kölcsönhatás általi hatástól.

Annak érdekében, hogy a monoklonális ellenanyagok által kiváltott reverz jelfolyamatot még alaposabban tanulmányozzuk gyulladásos körülmények között, humán (THP-1, MonoMac6 és U937), valamint egér monocita és makrofág (RAW264.7 és J774) sejteket kezeltünk elő az *Escherichia coli* 055:B5 törzséből származó LPS-sel. Az LPS kezelést követően 2 órával a sejteket mostuk, és a számukra megfelelő tápoldatban szuszpendáltuk fel. Ezzel egyidejűleg reverz jelátvitelt indukáltunk CZP kezeléssel. A reverz jelátvitel indukcióját követően 4, 8 és 24 órával össz RNS-t tisztítottunk és QRT-PCR-rel megállapítottuk különböző, a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződését az Anyagok és módszerek című fejezetben leírtak szerint. Kontrolként csak LPS kezelésben részesített mintákat alkalmaztunk. Megállapítható, hogy a gyulladásos folyamatok fenntartásában szerepet játszó mediátorok, így a TNF (6A ábra), az IL-8 (6C ábra), az IL-1 β (6E ábra), a CCL1 (6F ábra), a TNFAIP6 (6H ábra) és a ProS (6I ábra) a reverz jelátvitel indukciója, azaz a CZP-vel történő kezelés a csak LPS-sel kezelt mintákhoz képest jelentős relatív génexpresszió csökkenést eredményezett már 4 órával az indukciót követően valamennyi, általunk vizsgált sejtvonal, így a THP-1 (kék), MonoMac6 (rózsaszín), valamint az U937 (fekete) sejtek esetében. A kezelést követően 8 és 24 órával a génexpresszió csökkenés THP-1 sejtek esetén még kifejezettebb volt a 4 órás mintákhoz képest, azaz a reverz jelátvitel génexpressziót moduláló hatása időbeli függést mutat. Hasonló tendenciát mutatott a génkifejeződés U937 sejtek esetében. A MonoMac6 sejtek génexpressziós mintázata azonban némi eltérést mutatott; e jelenség hátterében nagy valószínűséggel az a tény áll, hogy a kísérleteinket különböző leukémia sejtvonalakon végeztük el, melyek a malignus transzformáción differenciálódásuk eltérő szakaszain estek át. Érdekes módon hasonló

kifejeződési mintázatot mutat az IL-10 (6D ábra) és a TNFAIP3 (6G ábra, THP-1 és MonoMac6 esetében), noha mindkét citokin gyulladásgátló hatású (Ouyang, Rutz et al. 2011), (Turer, Tavares et al. 2008). Érdekes módon azonban U937 sejtek esetében a TNFAIP3 relatív génexpressziója az LPS kontrolhoz képest szignifikánsan emelkedett CZP kezelés hatására, amely magyarázhatja a CZP kezelés tünetekre gyakorolt jótékony hatását krónikus gyulladásos folyamatokban, így az Bevezetésben felsorolt autoimmun kórképekben. Kutatócsoportunk korábbi eredményeihez hasonlóan (Juhasz, Zvara et al. 2013) megállapítottuk, hogy a reverz jelátvitel indukciója U937 sejtek esetében a CKIP-1 relatív génexpresszióját fokozza az indukciót követően 4 órával (6B ábra), és ez a molekula kölcsönhatva a tmTNF N terminális doménjével közvetlenül is részt vesz a reverz jelfolyamat kiváltásában, bizonyítva ezzel azt, hogy a CZP kezelés génexpresszióra gyakorolt hatása valóban a reverz jelfolyamat indukciójának a következménye.

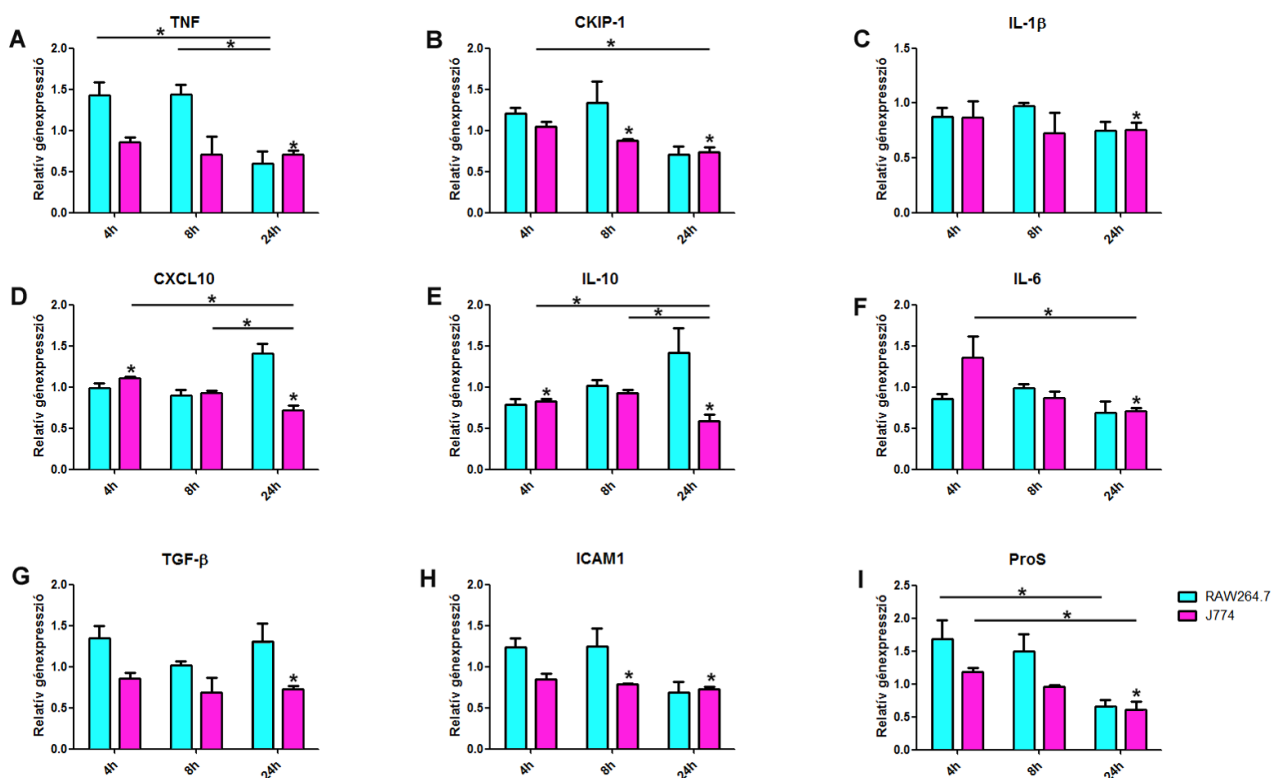


6. ábra. A CZP által kiváltott reverz jelátvitel gyulladásos körülmények között csökkenti a gyulladásos folyamatokban kulcs szerepet játszó gének kifejeződését humán monocita sejtvonalakon (A: TNF, B: CKIP-1, C: IL-8, D: IL-10, E: IL-1 β , F: CCL1, G: TNFAIP3, H: TNFAIP6, I: ProS). LPS: 100 ng/ml; CZP: 10 μ g/ml; n $\geq$ 3; * ha p $\leq$ 0,05 (One-Way ANOVA, Neuman-Keuls post-hoc test)

4.2. A CZP által kiváltott reverz jelfolyamat módosítja az egér makrofágok génexpresszióját

Annak érdekében, hogy a CZP által kiváltott reverz jelfolyamat génexpresszióra gyakorolt hatását még alaposabban tanulmányozhassuk, egér makrofág sejtvonalakat (RAW264.7; kék oszlopok, és J774; rózsaszín oszlopok) részesítettünk 2 órás LPS kezelésben a humán sejtvonalakon végzett eljárással megegyező módon. Ezt követően történt meg a CZP kezelés, amely után 4, 8 és 24 órával vizsgáltuk a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződését a korábban leírtaknak megfelelően.

A humán sejtvonalakon végzett kísérletekhez hasonlóan az egér sejtvonalak esetében is megfigyelhető volt, hogy a CZP által kiváltott reverz jelátvitel jelentős csökkenést okozott a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó effektor molekulák, így a TNF (7A ábra), az IL-1 β (7C ábra), a CXCL10 (7D ábra), az IL-6 (7F ábra), az ICAM1 (7H ábra) és a ProS (7I ábra) kifejeződésében. Általánosságban elmondható, hogy a J774 sejtvonalon bekövetkezett változások időbeli függést mutattak, vagyis a génkifejeződés a kezelést követően 24 órával érték el a minimum szintet. Hasonló tendencia RAW264.7 makrofágok esetén nem volt megfigyelhető, e jelenség hátterében is vélhetően az a tény áll, hogy a leukémia sejtek transzformációja differenciációjuk különböző szakaszában történt meg. Akárcsak humán sejtek esetén, itt is megfigyelhető volt, hogy az IL-10 (7E ábra) kifejeződése a gyulladáskeltő mediátorokhoz hasonló mintázatokat mutat. Ez alól kivételt képez a RAW264.7 24 órás mintája, ugyanis ebben az esetben enyhe génexpresszió fokozódást tapasztaltunk. Fontos megemlíteni ugyanakkor, hogy a szintén gátló hatású TGF- β (7G ábra) kifejeződése mindkét sejtvonalban csökkent a CZP kezelés hatására. A CKIP-1 (7B ábra) esetén azonban jelentős változást a génkifejeződésben nem tapasztaltunk.



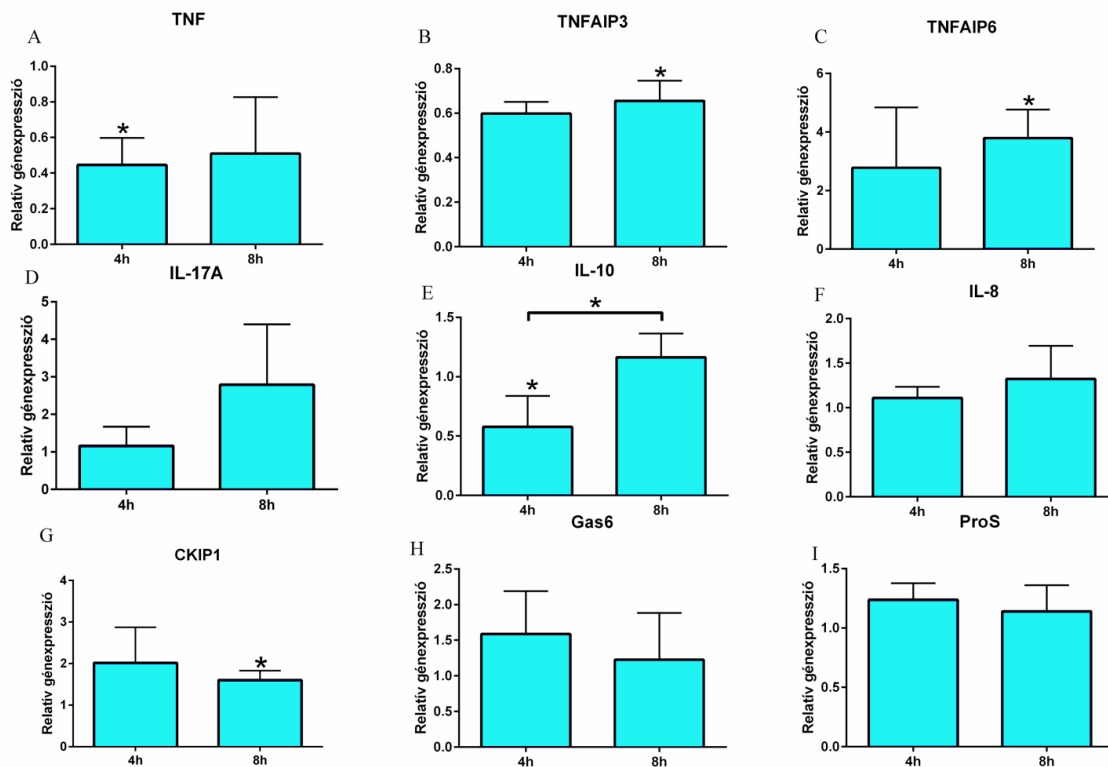
7. ábra. A CZP által kiváltott reverz jelátvitel markáns relatív génexpresszió csökkenést okozott egér makrofág sejtvonalakon (A: TNF, B: CKIP-1, C: IL-1 β , D: CXCL10, E: IL-10, F: IL-6, G: TGF- β , H: ICAM1, I: ProS) LPS: 100 ng/ml; CZP: 10 μ g/ml; $n \geq 3$; * ha $p \leq 0,05$ (One-Way ANOVA, Neuman-Keuls post-hoc test)

4.3. A reverz jelátvitel humán T limfociták esetében csökkenti a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződését

A gyulladás fenntartásában, illetve az adekvált immunválasz kialakításában a monociták és makrofágok mellett kulcs szerepet kapnak a T limfociták is. Az adaptív immunválaszban betöltött szerepük mellett azonban az autoimmun folyamatokban is részt vesznek a T limfociták; ismeretes, hogy pikkelysömörös betegek bőr biopszia mintáiban az egészséges bőrből származó mintákhoz képest - a számos egyéb elváltozás mellett – fokozott T limfocita beszűrődés figyelhető meg (Lowe, Bowcock et al. 2007). Mivel gyulladásos körülmények között kimutattuk, hogy monociták és makrofágok esetében a CZP által indukált reverz jelátvitelnek markáns hatása van a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének expressziójára, ezért a következőkben megvizsgáltuk, hogy hogyan hat a reverz jelátvitel az aktivált T limfociták génexpressziójára. Annak érdekében, hogy vizsgálatainkat aktivált sejteken végezhessük el, Molt-4 humán T limfocita sejtvonalat kezeltünk PMA-val (100 nM) és OKT-3-mal (1 μ g/ml). Az egy éjszakán át tartó kezeléssel történt meg a sejtek aktiválása, azaz az MHC és a TCR közötti kölcsönhatások modellezése. A kezelést követően a korábban

leírtak szerint történt a reverz jelátvitel indukciója, majd az indukciót követően 4 és 8 órával vizsgáltuk az egyes gének kifejeződését. Kontrollként a CZP kezelésben nem részesült mintákat használtuk.

TNF (8A ábra) esetén megállapítható volt, hogy a reverz jelátvitel indukcióját követően 4 órával a gén relatív expressziója szignifikáns csökkenést okozott a kontrollhoz képest. Ugyan a kontrollhoz viszonyítva a kezelés után 8 órával a TNF kifejeződése még mindig alacsonyabb volt, a 4 órás mintához viszonyítva azonban minimális expresszió fokozódást figyeltünk meg. A makrofágokon végzett kísérleteinkhez hasonlóan a T limfociták esetében is az IL-10 (8E ábra) a TNF-hez hasonló mintázatot mutatott, vagyis 4 órával a CZP kezelést követően jelentős kifejeződésbeli csökkenés volt tapasztalható, de a kezelés után 8 órával már szignifikáns emelkedést tapasztaltunk, ami azonban a kontrollhoz képest nem volt jelentős változás. A szintén gyulladást gátló TNFAIP3 (8B ábra) esetén azonban mindkét általunk vizsgált időpillanatban kifejezett génexpresszió csökkenés volt tapasztalható a kontrol mintákhoz képest. Fontos megemlíteni azonban, hogy a gyulladás kialakulásában és fenntartásában szerepet játszó mediátorok, így a TNFAIP6 (8C ábra), IL-17A (8D ábra), IL-8 (8F ábra), Gas6 (8H ábra) és a ProS (8I ábra) a reverz jelátvitel kiváltása nem okozott jelentős eltérést a gének kifejeződésében a kontrolokhoz viszonyítva egyik időpillanatban sem. Korábbi megfigyeléseinkhez hasonlóan a T limfocitákon végzett kísérleteinkben is megállapítottuk, hogy a detektált változások valóban a reverz jelátvitel indukciójából származik, hiszen a CKIP1 (8G ábra) kifejeződése a kontrollhoz képest szignifikánsan emelkedik a kezelés után 4 órával. Ugyan a 4 órás mintához viszonyítva 8 órával a kezelést követően csökkent a CKIP1 kifejeződése, a kontrollhoz viszonyítva még mindig szignifikáns emelkedést tapasztaltunk.

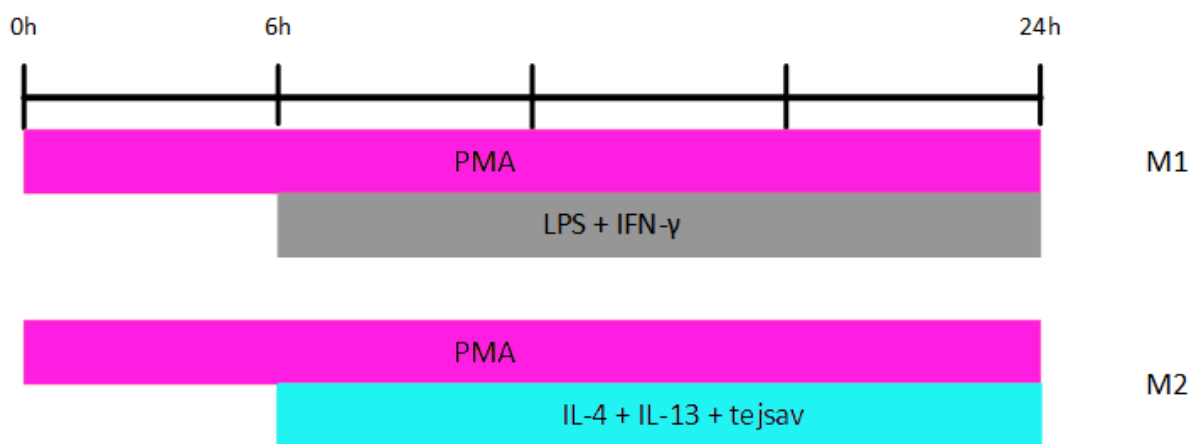


8. ábra. A CZP által kiváltott reverz jelátvitel hatását gyakorol az aktivált T limfociták relatív génexpressziójára (A: TNF, B: TNFAIP3, C: TNFAIP6, D: IL-17A, E: IL-10, F: IL-8, G: CKIP1, H: Gas6, I: ProS) PMA: 100 nM, OKT-3: 1 µg/ml, CZP: 10 µg/ml; n≥3; * ha p≤ 0,05 (One-Way ANOVA, Neuman-Keuls post-hoc teszt)

4.4. M1, M2 makrofágok relatív génexpressziós vizsgálata CZP kezelés hatására

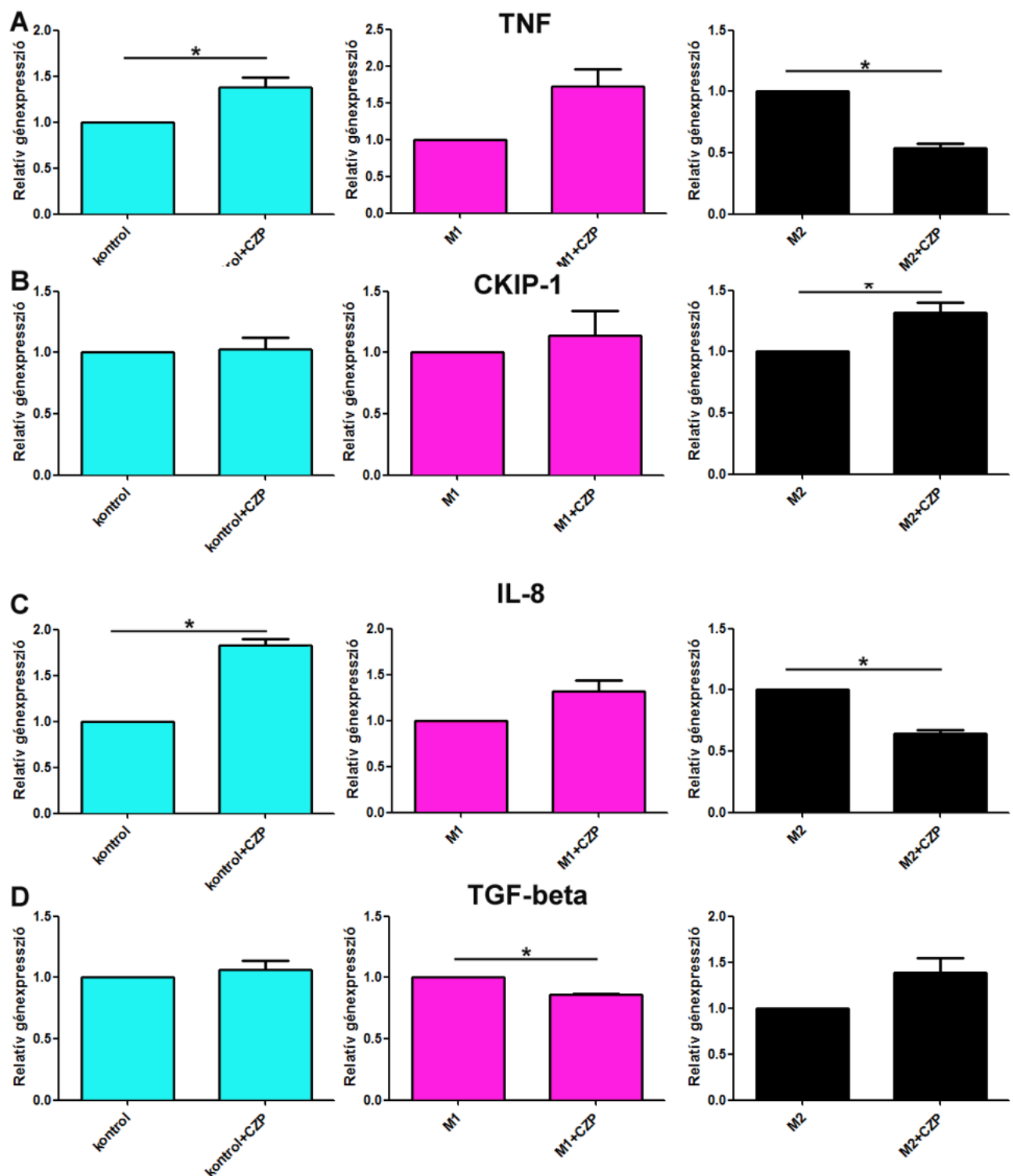
Ismert, hogy aktiváció módjától függően, a T limfocitákhoz hasonló módon, a makrofágokat is különböző csoportokba sorolhatjuk. Az M1 típusú (klasszikusan aktivált) makrofágok alapvető feladata a kórokozókkal szembeni védekezés megvalósítása (Gordon and Taylor 2005), (Sica and Mantovani 2012), (Van Dyken and Locksley 2013), addig az M2 (alternatíván aktivált) makrofágok általában gyulladásgátló hatásúak és fontos feladatuk a szöveti homeosztázis fenntartása (Mosser and Edwards 2008), (O'Neill, Sheedy et al. 2011). Igazolták továbbá, hogy az ún. tumor-asszociált makrofágok is az M2 típusba sorolhatóak. Ezeknek a sejteknek fő funkciói közé tartozik a tumor növekedésének elősegítése, az áttétek képződésének segítése, illetve termelt faktoraik segítségével a tumor sejtek génexpresszióját képesek módosítani (Chen, Yao et al. 2003; Lewis and Pollard 2006). Mivel korábbi közlemények beszámoltak arról, hogy a teljes tmTNF ellen termeltetett monoklonális ellenanyag képes gátolni emlő tumorok méretét (Yu, Zhou et al. 2013), ezért a következőkben M1 és M2 irányba differenciáltatott THP-1 sejteken vizsgáltuk a CZP által kiváltott reverz jelátvitel génexpresszióra gyakorolt hatását. A sejtek differenciáltatása a 9. ábrán

bemutatottak szerint történt. Röviden összefoglalva THP-1 sejteket kezeltünk 320 nM végkoncentrációban PMA-val. A kezelést követően 6 órával az M1 csoporthoz 100 ng/ml LPS-t és 20 ng/ml IFN γ -t adtunk. Az M2 sejtek differenciálása 20 ng/ml IL-4, 20 ng/ml IL-13 és 25 nM tejsav jelenlétében történt. A PMA kezelés után 24 órával adtunk 100 μ g/ml CZP-t a sejtekhez. A CZP kezelést követően 4 órával történt a relatív génexpresszió meghatározás a korábban leírtak szerint. A kísérletben kontrolként CZP kezelésben nem részesült naiv THP-1 sejteket, valamint M1 és M2 irányba differenciáltatott makrofágokat használtunk.



9. ábra. M1 és M2 típusú makrofágok differenciálása THP-1 sejtekből. PMA: 320 nM; LPS: 100 ng/ml; IFN- γ : 20 ng/ml; tejsav: 25 nM; IL-4: 20 ng/ml; IL-13: 20 ng/ml (Tjiu, Chen et al. 2009), (Colegio, Chu et al. 2014)

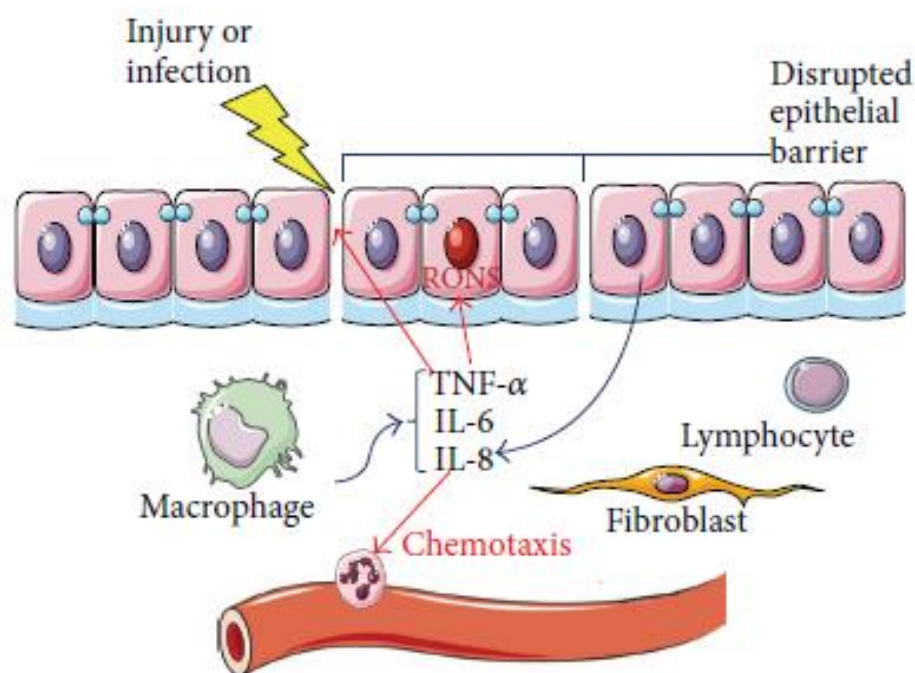
A relatív génexpressziós vizsgálatokból megállapítható, hogy naiv THP-1 sejteken (10. ábra, kék diagram) a reverz jelátvitel indukciója nem okoz különösebb változást a gének kifejeződésében. M1 típusú makrofágok esetén (10. ábra rózsaszín diagram) minimális, de nem szignifikáns expresszió fokozódás volt tapasztalható TNF, CKIP-1 és IL-8 tekintetében, ugyanakkor a TGF- β kifejeződése a kontrolhoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb volt. Kísérleteink során különös figyelmet fordítottunk a 10. ábrán fekete diagrammal jelölt M2 típusú makrofágokra: megállapítható, hogy a gyulladásos folyamatokban kulcs szerepet kapó TNF és IL-8 kifejeződése a kontrolhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent. Ezzel párhuzamosan a reverz jelátvitelben kulcs szerepet játszó CKIP-1 expressziója szignifikánsan fokozódott, így vélhetően a tapasztalt változások hátterében valóban a reverz jelátvitel indukciója áll. Eredményeink alapján továbbá az is elmondható, hogy az elsősorban gyulladásgátló hatású TGF- β kifejeződése a kontrolhoz viszonyítva kis mértékben, de csökkent.



10. ábra. A CZP által kiváltott reverz jelátvitel szignifikánsan csökkenti a proinflammatorikus citokinek (TNF, IL-8) relatív génexpresszióját. A: TNF; B: CKIP-1; C: IL-8; D: TGF- β $n \geq 3$; * ha $p \leq 0,05$ (Student-féle páros t próba)

5. Diszkusszió

Emlős szervezetekben a gyulladás kiváltásában és fenntartásában kulcs szerepet játszik a TNF, hiszen már közvetlenül a szervezetet veszélyeztető patogén érzékelését követően mennyisége jelentősen emelkedik. A fokozott TNF termelődése elősegíti más, az immunválasz kialakítása szempontjából fontos mediátorok képződését, valamint a fertőzés helyszínére toboroznak olyan professzionális immunsejteket, melyek közvetlenül is képesek a kórokozó elpusztítására.



11. ábra. Szöveti sérülést, vagy fertőzést követően a makrofágok és a neutrofilek TNF-et, IL-6-ot és IL-8-at termelnek, melyek egyrészt átjárhatóvá teszik az epithel sejtek közötti kapcsolatot, másrészt reaktív oxigén gyökök képződését segítik elő, amely még több professzionális immunsejtet toboroz a fertőzés helyére, elősegítve ezzel a kórokozóval szembeni immunválaszt (Landskron, De la Fuente et al. 2014)

A gyulladás folyamatának, így a termelődő TNF mennyiségének, szabályozása azonban túlélésünk egyik záloga (Karin, Lawrence et al. 2006), hiszen a kontrolálatlanul szintetizálódó TNF olyan patofiziológiás elváltozások kialakulásához vezethet, amelyek akár a gazda szervezet halálát is okozhatják (Medzhitov 2008). A közvetlen halál kiváltásán túl azonban, a korábban említetteknek megfelelően, krónikus gyulladással járó autoimmun folyamatok kiváltásában is részt vehet a kontrolálatlanul termelődő TNF.

Napjainkban a krónikus gyulladással járó autoimmun megbetegedések esetében már hazánkban is a különböző biológiai terápiás szerek (az adott megbetegedésben fokozott

menyiségben termelődő citokinek és kemokinek ellen termeltetett monoklonális ellenanyagok) használatának preferenciája figyelhető meg (Feldmann and Maini 2001), (Rigby 2007). Ugyanakkor fontos hangsúlyozni azt a tényt, hogy a biológiai terápiás szerek, különösen a TNF ellen termeltetett monoklonális ellenanyagok, pontos hatásmechanizmusa még mindig nem teljesen tisztázott. Kezdetben azt tételezték fel, hogy a TNF ellen termeltetett ellenanyagok az sTNF közvetlen blokkolása következményeként fejtik ki hatásukat, mivel igazolták, hogy a CZP és az IFX mellett az adalimumab és az etanercept is nagy affinitással képes az sTNF megkötésére (Ramos-Casals, Brito-Zeron et al. 2008). Más tanulmányok azonban arról számolnak be, hogy a célsejteken lévő Fc receptorok polimorfizmusa nagyban befolyásolhatja a biológiai terápia sikerességét, hiszen mind az IFX, mind pedig az adalimumab és a golimumab is hordozza a humán IgG molekula egy részletét (Tutuncu, Kavanaugh et al. 2005). Kutatócsoportunk azonban már korábban igazolta, hogy az Fc fragment által kiváltott hatás élesen elkülönül más egyéb lehetséges hatásmechanizmustól, hiszen az IgG kezelés önmagában teljesen eltérő relatív génexpressziós értékeket eredményezett, összehasonlítva az IFX-el kezelt monocitákkal és makrofágokkal (Sipos Orsolya, Török Annamária TDK dolgozata, 2014). Jelen dolgozatban bemutatott génexpressziós értékek is alátámasztják azt a megfigyelésünket, hogy az Fc fragment – Fc receptor közötti kölcsönhatás jól elkülöníthető: ugyan a CZP nem tartalmaz IgG-t, a vele való kezelés, az IFX-hez hasonló módon, jelentősen csökkenti az LPS által indukált humán és egér eredetű monociták és makrofágok TNF, IL-6, IL-1 β és CCL1 kifejeződését, melyeknek a patogénnel szembeni immunválaszon túl egyes autoimmun folyamatok, így a pikkelysömör kialakulásában is szerepük van (Filkor, Hegedus et al. 2013).

Szintén elterjedt az a feltételezés, hogy a monoklonális ellenanyagokkal történő kezelés lehetséges hatásmechanizmusa a krónikus gyulladás során aktivált makrofágok és limfociták apoptózisának indukciója, noha ezt a jelenséget ez idáig csak IFX esetén figyelték meg. Mivel a többi, kereskedelmi forgalomban kapható ellenanyag esetében nem írták le, ezért vélhetően ennek a folyamatnak nincsen közvetlen szerepe a biológiai terápia sikerében (Nesbitt, Fossati et al. 2007).

Kísérleteink szerint azonban a tmTNF-en kiváltott reverz jelátvitel magyarázhatja a TNF elleni monoklonális ellenanyagok pontos hatásmechanizmusát. Megfigyeltük, hogy valamennyi, az általunk vizsgált humán és egér monocita és makrofág sejtvonalban, valamint T limfocitában a CZP kezelés hatására a CKIP-1 relatív génexpressziója a kontrolhoz viszonyítva megemelkedik. Ez az eredmény jól korrelál kutatócsoportunk korábbi

megfigyeléseivel: azaz a reverz jelátvitel hatására a CKIP-1 kölcsönhat a tmTNF N terminálisával és a plazma membránból intracelluláris kompartmentekbe vándorolva fontos élettani folyamatok szabályozásában vehet részt (Juhasz, Zvara et al. 2013).

A krónikus gyulladás és a tumorok kialakulása közötti kapcsolatot már 1863-ban leírta Rudolf Virchow (Balkwill and Mantovani 2001), majd később igazolódott, hogy számos esetben közvetlen kapcsolat van egyes patogénekkel való fertőzés, néhány krónikus gyulladással járó kórkép és bizonyos daganat típusok kialakulása között (Hussain and Harris 2007). A korábban említetteknek megfelelően a TNF-nek közvetlenül is szerepe van a fiziológiás és a patológiás gyulladás fenntartásában így nem meglepő módon a tumorok keletkezésében, erek képződésében, illetve az áttét képződés folyamataiban (Popa, Netea et al. 2007), (Moore, Owens et al. 1999), (Szlosarek, Grimshaw et al. 2006). M2 típusú makrofágokon végzett génexpressziós vizsgálataink alapján egyértelműen látható, hogy a CZP által indukált reverz jelátvitel következményeként a TNF génexpressziója jelentős csökkenést mutatott. Az IL-8, mint a gyulladásos folyamatok másik kulcs szereplője is hasonló kifejeződésbeli mintázatot mutatott, így vélhetően ennek a kemokinek is kulcs szerepe lehet a tumoros folyamatok kialakulásában.

Eredményeink összefoglalásaképpen megállapíthatjuk, hogy a többi TNF ellen termeltetett ellenanyaghoz hasonlóan a CZP kezeléssel is kiváltható a reverz jelátvitel, amelynek mind humán, mind pedig egér monociták és makrofágok esetében jelentőségük van a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződésének módosításában. Megállapítottuk továbbá azt, hogy aktivált T limfociták esetében is megfigyelhető a génexpressziót módosító hatás. Munkánk legfontosabb eredménye azonban az, hogy a CZP által indukált reverz jelátvitel igen jelentős módon csökkenti az M2 (alternatíván aktivált, tumor-asszociált) makrofágokban a gyulladáskeltő citokinek kifejeződését, így vélhetően a TNF reverz jelátvitelnek tumor ellenes hatása is van.

