Ph.D. értekezés

Tubak Vilmos

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2008

A TL1A/VEGI gén expressziójának vizsgálata

differenciálódó csirke porcszövetben és

humán autoimmun folyamatokban

Ph.D. értekezés

Tubak Vilmos
Témavezető Dr. Duda Ernő

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biologiai Központ, Biokémiai Intézet

2008
Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék ... 4
Rövidítések jegyzéke ... 5
Irodalmi áttekintés ... 6
A TNF géncsalád tagjainak azonosítása ... 6
A TL1A a TNFα legközelebbi rokona ... 7
A TL1A/VEGI biológiai hatásai ... 8
Citokinek expressziója a bőrben ... 11
Transzkripciós faktorok szerepe a pikkelysömör pathomechanizmusában ... 12
Célkitűzések ... 15
Anyagok és módszerek ... 16
In silico lépések ... 16
Sejtek kinyerése ... 16
Sejtvonalak ... 16
Szövetminták ... 17
Biológiai tesztek ... 17
cDNS készítés ... 18
PCR primerek és PCR körülmények ... 18
Valós idejű (Real-Time) PCR ... 19
Klónozás, szekvenálás ... 20
A csirke TL1A fehérje termeltetése bakteriális és bakulovírusos rendszerben ... 20
Affinitás kromatográfia ... 22
Western blot ... 23
Immunhisztokémia ... 23
Eredmények ... 24
A humán TNFα gén legközelebbi rokonának azonosítása a csirke genomban ... 24
Génszerkezet és kromoszómális lokalizáció ... 25
A promoter analízis eredménye ... 27
A csirke TL1A expressziója az osztódó porcsejtekhez lokalizálható ... 29
A csirke DcR3 cDNS jelenlétének igazolása a végtagporc-kezdeményben ... 30
A csirke TL1A biológiai aktivitásának mérése ... 32
A csirke TL1aA expressziója ... 32
A TL1A fokozott mértékű kifejeződése pikkelysömörben ... 35
Eredmények összefoglalása ... 40
Eredmények megvitatása – diszkusszió ... 41
Lehetőségek a krónikus gyulladásos kórképek kezelésére ... 42
A TL1A/VEGI szerepe a dendritikus sejtek érésében ... 45
Tervek a jövőre nézve… ... 49
Köszönetnyilvánítás: ... 50
Referenciák ... 51
A disszertáció témájához kapcsolódó elsőszerzős közlemény ... 57
Egyéb, nem a disszertáció tárgyához tartozó közlemények ... 57
Összefoglaló ... 58
Summary ... 61

Rövidítések jegyzéke

TNF:	Tumor Necrosis Factor
TL1A:	TNF Like Factor 1A
DR3:	Death Receptor 3
DcR3:	Decoy Receptor 3
TNFSFx:	Tumor Necrosis Factor Superfamily – TNF Szupercsalád, amelynek tagjai a TL1A, FasL, LIGHT, stb. Nevezéktanilag az adott ligand a TNFSF előtaggal kezdődő és arab számmal végződő jelölődik.
TNFRSFx:	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily
NF-kB:	Nuclear Factor Kappa B
IRF:	Interferon Regulated Factor
STAT:	Signal Transducer and Activator of Transcription
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PCR:	Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció
EST:	Expressed Sequence Tag – kifejeződő szekvencia, amely valamely szövetben vagy szervben fejeződik ki
PBS:	Phosphate Buffered Saline
KO:	Knock Out – génkiütött
OPG:	Osteroprotegerin: TNFRSF11B

Irodalmi áttekintés[1]

A TNF géncsalád tagjainak azonosítása

A Tumor Nekrózis Faktor (TNF) felfedezése még 1893-94-re nyúlik vissza, amikor William Coley New York-i sebész leírt egy daganatos betegek bakteriális fertőzésekor fellépő jelenséget, amely a daganat bevérzéses elhalásához[2] vezetett [1]. Ekkor azonban még nem azonosították a molekulát, csak tudták, hogy léteznie kell egy ilyen hatású faktornak. Az áttörés később történt meg, miután a fehérjét [2] és annak génjét azonosították, ekkor nagy figyelmet kapott mint az egyik lehetséges tumorellenes terápiára felhasználható molekula. Ez az elképzelés azonban megdőlt, mivel kiderült, hogy alkalmazása súlyos mellékhatásokkal jár. A kutatások előrehaladtával felfedezték a TNF szerkezetileg homológ rokon fehérjéit, amelyeket egy családba lehetett sorolni. Ezek a fehérjék többféle élettani hatással rendelkeznek, és ma már tudjuk, hogy szinte minden életfolyamatban részt vesznek.

Mivel halakban sikerült azonosítani a TNFα-t [3], a cél, hogy csirkében azonosítsuk a TNF-et vagy a TNF-fel rokon fehérjéket (illetve azok génjeit) kézenfekvő, hiszen egyrészt ennek a molekulacsaládnak az eredete szinte teljesen ismeretlen, másrészt tanulmányozva a különböző fajokból származó molekulákat új ismereteket szerezhetünk azok szerkezetéről és funkciójáról. Korábban csirke eredetű makrofágok esetében írták le, hogy azok bakteriális lipopoliszaccharid hatására kibocsájottak egy kb. 17 kDa molekulasúlyú fehérjét, amely keresztreagált egy poliklonális anti-humán TNFα ellenanyaggal [4].

Mai tudásunk szerint génduplikációkkal jöhetett létre ez az emberben mintegy 20 tagot számláló, szerteágazó hatásokkal bíró molekulacsalád, illetve azok receptorai. A legtöbb ismeret az emberi- és a rágcsáló TNF-családtagokról áll rendelkezésünkre, de ismertek más fajokban is TNF-családtagok. Az elmúlt 15 évben a TNF géncsalád jelentős számú tagját

[1] Az áttekintett adatok elsősorban a humán- és egér, illetve patkány eredetű TNF-re és a TNF-családra (fehérjékre, illetve génjeikre) vonatkoznak
[2] Bevérzéses elhalás: Haemorrhagic necrosis

azonosították csirkében azok receptoraival együtt. Közéjük tartozik a DcR3 (AY251406), OPG (AY251407), DR6 (AF349908), FAS (AF296874), TNFR1 (AW355430), CD30 (NM_204409), CD40 (NM_204665).

A TL1A a TNFα legközelebbi rokona

A humán TL1A (TL1A= TNF Like 1…, VEGI=Vascular Endothelial Growth Inhibitor) a Tumor Necrosis Factor SuperFamily (TNFSF) tagja, nevezéktanilag: TNFSF15. A tagok között szerkezeti homológia mutatható ki, amit röntgen-krisztallográfiai vizsgálatok bizonyítanak, valamint aminosav-sorrend szintjén rövid, de nagyon hasonló szakaszok, ún. szubdomének azonosíthatók [5]. A TL1A és a TNFα közötti hasonlóságot még élettani hatások is alátámasztják. A TNF biológiai hatásai közül az egyik legismertebb, hogy egér fibroblaszt sejteken (L929) képes apoptózist kiváltani. Ezen alapszik egy viszonylag egyszerűen kivitelezhető módszer, amely a TNF molekula biológiai hatásának tesztelésére alkalmas [6, 7].

Az emlős TNF-család tagjainak lényeges jellemzője, hogy a TNFα-hoz hasonlóan trimer formában fejtik ki hatásaikat az ugyancsak trimerizált receptoron keresztül. A TL1A esetében ez a receptor a DR3 (Death Receptor 3, LARD, TNFRSF25), amiről – a ligandhoz hasonlóan – az ismert, hogy az egyik TNF-receptor (TNF.R1) legközelebbi rokona [8]. A DR3 receptor jellemző biológiai tulajdonsága, hogy azonos vagy közeli rokonságban álló fajokból származó sejtekben fokozott expresszió a ligand nélkül is apoptózist vált ki. Fontos még megemlíteni a DcR3 gén termékét, amely ugyancsak homotrimer formában kötődik a TL1A-hoz, de ez a molekula – a DR3-mal ellentétben – nem membránhoz kötött, hanem szabadon keringő formában képződik. A daganatsejtek által termelt DcR3 képes befolyásolni a tumorszövet immunoprivilégiumát [9]. Ennek jelentősége abban áll, hogy pl. a termelődő TL1A-hoz kötődve módosítja, mintegy csillapítja annak hatását azáltal, hogy verseng a célsejtek felszínén lévő DR3 receptorral, így azon keresztül nem tud az aktiváló szignál

létrejönni. Az emlős DcR3 azonban kötődik még két másik TNF-családtaghoz is, mégpedig a LIGHT (TNFSF14) és a FasL (TNFSF6) molekulákhoz, bár eltérő mértékben [10]. A DcR3 termelődése megfigyelhető tumorokban, és bizonyítottan részt vesz a tumorszövet immunoprivilegizált helyzetének kialakításában, továbbá szerepe van a dendritikus sejtek differenciálódásában, érésében [11]. A DcR3 által kiváltott hatások egyik lehetséges mechanizmusa a reverz szignál, amelyet a ligandot termelő/prezentáló sejtben válthat ki a keringő trimerizálódó receptor [12]. A reverz szignál lényege, hogy a ligand receptorhoz való kötődése nemcsak a receptort hordozó sejtben, hanem a ligandot hordozó sejtben is jelfolyamatot válthat ki azáltal, hogy a molekula sejten belüli része, vagy annak egy darabja az extracelluláris domén levágódását követően vagy közvetlenül a sejtmagba vándorol és különböző gének aktiválódását váltja ki, vagy pedig adaptormolekulák révén indít el sejten belüli folyamatokat. Ez egy finom szabályozó rendszert alkot, amelyben a ligandot termelő sejt is „értesül" arról, hogy az általa termelt felszíni molekula levágódott és elindult valamely receptorához. A reverz szignált korábban a CD30 liganddal [13] és a TNF-fel kapcsolatban már leírták [14]. A DcR3 szöveti differenciálódásban betöltött szerepére utal az a megfigyelés, hogy részt vesz a csontleépülésben és csontátalakulásban fontos szerepet betöltő oszteoklaszt sejtek fejlődésében [15, 16], illetve a fentebb említett (tumorellenes) Th1 immunválasz modulálásában. Csirkében bizonyított a DcR3 létezése [17], ám funkciójáról kevés adat áll rendelkezésre.

A TL1A/VEGI biológiai hatásai

A humán TL1A-t kódoló gén a 9. kromószóma hosszú karján helyezkedik el (9q32), egy 16.8 kilobázis hosszú DNS szakaszon és 4 exonból áll. A fehérjének 3 izoformája ismert, amelyek alternatív promoterről képződnek [18, 19], továbbá jelentős megjegyeznünk, hogy a fehérje poszttranszlációs modifikáción megy keresztül [20]. Az izoformák biológiai hatásairól tudjuk, hogy a 174 aminosav hosszú variánsa (VEGI-174) gátolja a vérerek endotél sejtjeinek

osztódását [21], a 192 aminosav hosszú izoforma (VEGI-192) viszont a tumornövekedést gátolja azáltal, hogy a tumor endotélsejteket pusztítja [22]. Ugyancsak erről az izoformáról derült ki, hogy az antigénprezentáló funkcióval rendelkező naiv dendritikus sejtek (DC) érését és antigénprezentáló aktivitását indukálja, ami a T-sejtek jelentős aktiválódásához vezet [23]. Ez a lépés alapvető fontosságú az immunreakció kifejlődéséhez, mivel ez az antigénfelismerés vezet a T-sejtek specifikussá éréséhez. A harmadik, legnagyobb mennyiségben termelődő 251 aminosav hosszú izoforma a TL1A, amely a DR3 receptoron keresztül a T-sejtek effektor funkcióját serkenti [24]. A három izoforma közül csak a 251 aminosav hosszú TL1A-ról sikerült eddig egyértelműen bizonyítani, hogy kötődik a DR3 és DcR3 molekulákhoz, a másik két izoformával kapcsolatban nincs publikálva olyan adat, amely azt sugallná, hogy egyáltalán próbálkoztak-e azok receptorának meghatározásával.

A TL1A pathológiás viszonyok között fokozottan termelődik a perifériás szövetekben, amelyet elsőként a *Crohn-betegségben* (OMIM 266600)[3] írtak le [25]. A gyulladásos bélszakasz *lamina propria* rétegében a $CD11c^+$ dendritikus sejtek termelik [26]. A TL1A gén jelentőségére világít rá az a tény, hogy Crohn-betegségben egyes polimorfizmusainak halmozódása figyelhető meg [27].

A *Reumatoid artritisz* (OMIM 180300) (RA) a kisízületek ismeretlen eredetű krónikus gyulladásos megbetegedése. Lefolyására jellemző, hogy akut szakaszokkal is tarkított klasszikus gyulladásos tünetek is megjellenek, az ízületi térben gyulladásos sejtek és mediátorok szaporodnak fel. Jellemző még a szérumban az immunkomplexek megjelenése, amelyek immunoglobulin-fragmensekből (Fc) és egyéb reaktív fehérjékből, köztük reumatoid faktorból (RF) állnak. A TL1A fokozott termelődését mutatták ki az IgG1 Fc fragmentjének hatására humán monocita és dendritikus sejtekben [28]. A DR3 receptor génjével kapcsolatban korábban már leírtak többek között olyan SNP-t is [29, 30], amely halmozottan

[3] OMIM™ – Online Mendelian Inheritance in Man™, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM

fordul elő RA-s betegekben és aminosav cserével is jár, de funkcionális adat nincs ezzel kapcsolatban publikálva. Érdekes még, hogy a DR3 receptor egy részének duplikációja is előfordul ugyancsak RA-s populációban, amely egy DcR3-hoz hasonlító molekulát eredményez.

A *Szklerózis multiplex* (Multiple sclerosis, OMIM 126200) egy súlyos idegrendszeri betegség, amely főleg a perifériás idegrostokat támadja meg. Az ismeretlen antigén által kiváltott autoimmun gyulladást a perifériás idegrostok myelinhüvelyét megtámadó auto-reaktív T-sejtek közvetítik. A TL1A-hiányos kísérleti egérben a szklerózisos tünetek kb. csak 50%-ban válthatók ki [31], ami azt jelzi, hogy ez a fehérje vagy ennek receptora fontos szerepet játszik a kórkép kialakításában.

A *pikkelysömör* (psoriasis, OMIM 177900) a bőr T-sejt mediálta autoimmun betegsége, amelyet ismeretlen eredetű tényezők váltanak ki, de bizonyos genetikai adottságok elősegítik kifejlődését. Jelentős szerepe van a betegség fenntartásában a gyulladásos mediátoroknak, így a TNFα-nak, az interferon gammának (IFNγ), több más kemokin molekulának és mindezek receptorainak [32, 33]. A TNFα-t és az IFNγ-t az aktivált $CD4^+CD25^+$ T-sejtek termelik és ez nem csak az adott szövetben mérhető, hanem az aktivált sejtek periférián is megjelennek [34]. Fontos ezt kiemelni, mivel a bőr keratinocitái immunsejtnek tekinthetőek és hordoznak citokin receptorokat, ezekre a génexpressziós mintázatuk megváltozásával reagálnak. Fontos elem lehet a betegség eredetének tisztázásában, hogy melyek azok a gének, amelyek a betegség létrejöttében és melyek azok, amelyek a betegség fennmaradásában játszanak kulcsszerepet, mivel ezek kiiktatása egy specifikus gátlószerrel megakadályozhatja a progressziót és/vagy hosszú ideig tünetmentességet biztosíthat a beteg számára.

A *Crohn-betegség*, a *Pikkelysömör*, a *Reumatoid artritisz* és a *Szklerózis multiplex* T-sejt (Th1) mediálta betegségek. Tünetegyütteseik néha „átfednek”, tehát egyes tüneteik

előfordulnak a másik betegségben is. Így ismert a *Pszoriatikus artritisz* kórkép, amelyben a beteg pikkelysömörben szenved, de artritisze is van. Mindhárom betegség kezelésében a TNFα-elleni célzott terápia több év óta bevezetésre került és jó eredményekről tesznek jelentést, a sajnálatos és jelentős mellékhatások ellenére.

Citokinek expressziója a bőrben

A bőr az egyik legfontosabb védekező szervünk, amely megvéd a külső környezet káros behatásaitól. Így a káros UV sugárzástól, mechanikai behatásoktól, kórokozóktól, a hőmérséklet ingadozásaitól. A kórokozókkal szembeni védekezés legfontosabb, nagy számuk miatt legjelentősebb sejtjei a keratinociták. Ezek a kültakaró mélyebb, epidermális rétegében található bazális sejtek folyamatos osztódása révén képződnek és maguk is képesek bizonyos immunfeladatok ellátására. Ezen felül a bőrben is, mint általában minden szervben az adaptív immunválasz fontos elemei is megtalálhatóak. Így megfigyelhető a naív, myeloid eredetű dendritikus sejtek (DC) jelenléte, amelyek aktiválódása például kórokozók által jön létre és professzionális antigén-prezentálási képességük révén a központi nyirokszervek felé közvetítik a vészjelzést a testidegen ágens jelenlétéről. A nyirokutakon keresztül bejutva a nyirokcsomóba a DC sejtek a naív T sejteket aktiválják, amelyek ezt követően szövetspecifikus jelleggel az immun-inger kiindulási helyére vándorolnak. Ezt a jelenséget, hazavándorlásnak (homing) vagy ha a másik irányból nézzük „toborzásnak" (recruitment) nevezik. A bőrben tehát a homing szignál révén odavándorolt aktivált, $CD4^+$ Th1-sejteket találunk, amelyek TNFα-át és IFNγ-át termelnek. Ezek a citokinek tehát helyben (a bőrben) a keratinocitákra (KC) hatva a génexpressziós-mintázat megváltozását is eredményezik, és gyulladást is generálnak.

Ismert, hogy az epidermális keratinociták génexpressziós mintázata TNFα indukció hatására megváltozik. Az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy ez kb. 1300 gént jelent [35].

Transzkripciós faktorok szerepe a pikkelysömör pathomechanizmusában

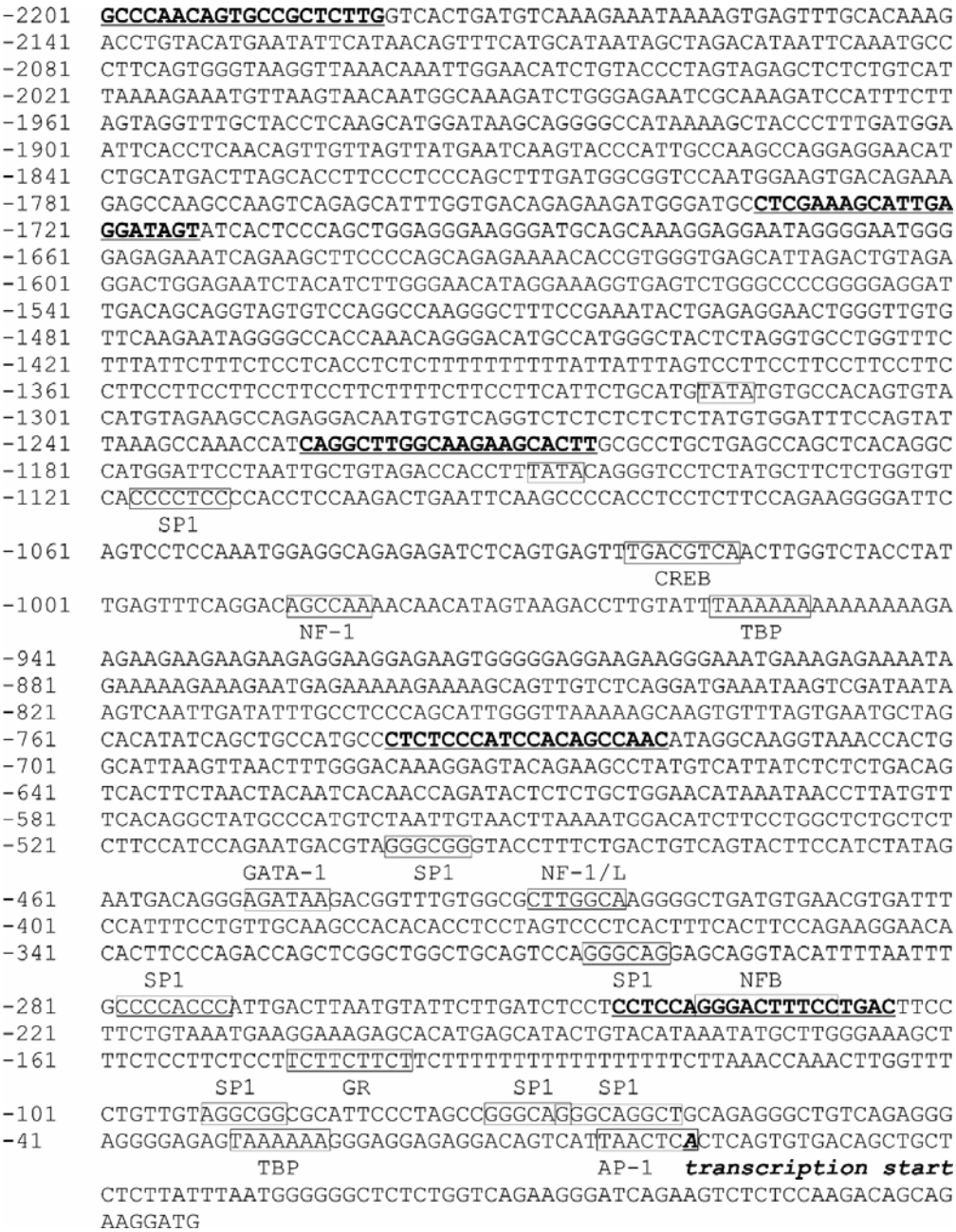
A pikkelysömör létrejöttében szerepet játszó transzkripciós aktiváló faktorok közül az Interferon Regulált Faktorokat (IRFs=Interferon Regulated Factors), a STAT faktorokat (STAT=Signal Transducer and Activator of Transcripton) és az NF-kB-t, mint mester regulátort kell megemlítenünk.

Az IRF-ek közül az IRF1 és IRF2-vel foglalkozom részletesen, de a pikkelysömörben jelentős még az IRF7 szerepe is. Az IRF1 transzkripciós aktivátor fehérje jelentős szerepet tölt be az immunrendszer működésének szabályozásában [36]. Irodalmi adatok szerint keratinocitákban az IRF1 transzkripciós faktor kifejeződik és aktív [37, 38]. Pikkelysömörben a két, egymáshoz képest rokon fehérje szintje egymáshoz képest megváltozik.

Az immunsejtek IFNγ-indukcióra adott válasza több szinten valósul meg. Az „Elsődleges Génszinten" vannak olyan transzkripciós faktorok génjei, amelyek aktiválódásukat követően más gének kifejeződését segítik elő, amelyeket így „Másodlagos Génszintnek" nevezhetünk. Az Elsődleges Gének között találjuk többek között az IRF és STAT transzkripciós faktorok génjeit, amelyek a Másodlagos Génszinten lévő gének közül olyanokat aktiválnak, amelyeknek cisz-reguláló promoter-elemei között megtalálhatóak az IRF és STAT kötőhelyek [39]. Ilyen gének többek között az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) és az interleukin-8 (IL-8), amelyek részvétele a pikkelysömörre jellemző Th1-típusú klinikai kép kialakításában ugyancsak ismert tény.

Az NF-kB és az IRF1 transzkripciós faktorok kötőelemei sok gén promoterében megtalálhatóak, általában egymás közelében [40-42]. Ez azért fontos adat, mert kimutatták szinergista hatásukat is, tehát a két faktor egyidejű jelenléte és aktivált állapota a célgének expressziós szintjében megsokszorozódást eredményezhet. A szinergista hatás hátterében áll egyebek között a NEMO nevű fehérje, amely az IRF1/NF-kB közötti kapcsolat létrehozásában játszik szerepet [43]. A TL1A gén promoterét korábban alaposan

feltérképezték [44], amely alapján magyarázható a TL1A különböző citokinekkel történő indukálhatósága. A szabályozó elemek közt megtalálhatjuk többek között az AP-1, SP1, GATA és NF-kB transzkripciós faktorok kötőhelyeit (1. ábra)



1. ábra: Az egér TL1A gén promoterének transzkripciós szabályozó elemei [44].

A TL1A génexpresszióját a TNFα és az IL-1β indukálják, míg IFNγ nem vagy csak kis mértékben! A pikkelysömör tanulmányozásának szempontjából fontos azt is megjegyezni,

hogy az egyik elfogadott modell [45, 46] az IRF2$^{-/-}$ egér, ahol a faktor génjének teljes hiánya az állatban spontán pikkelysömörös tünetek kifejlődéséhez vezet. Pikkelysömör betegség esetében kapcsoltság mutatható ki egy, az IRF2 gént is tartalmazó kromoszómális lokusszal [47], továbbá eltérés tapasztalható az IRF1/IRF2 traszkripciós faktorok szintjében az egészségesekhez képest [38], amely az epidermisz alsó, bazális rétegének megfelelően figyelhető meg. A fenti adatok alapján a kórkép kialakulásának kutatása során olyan gének szerepének tisztázása, amelyekben megtalálhatóak az IRF transzkripciós faktorok kötőhelyei (és ezek funkcionális mivolta bizonyítható) elvezethet a betegség alaposabb, részletesebb megértéséhez. Ilyen gének pl. az iNOS, ami makrofágokban aktiválódik bakteriális fertőzéskor [48], a vCAM-1[49] és az IL-12p40 is [50], amelynek fontos szerepe van a Th1 típusú immunválasz kialakulásában.

Az is ismert tény, hogy a STAT3 pikkelysömörben fokozottan aktivált, továbbá hogy a STAT3 egy aminosav cserével létrehozott konstitutíven aktivált formájának (STAT3C) szövetspecifikus túlexpresszáltatásával kísérletesen pikkelysömörös állatmodellt lehet létrehozni [51]. A STAT3 közvetlen kapcsolatban áll az IRF-1 transzkripciós faktorral [52] azáltal, hogy annak génexpresszióját szabályozza. A STAT faktorok többféle citokin, pl. IFNγ, IL4, stb. receptor/ligand kötődése során aktiválódnak adapter molekulák (Janus Kinases=JAKs) közvetítésével. Ezt követően többszintű génexpressziós változást idéznek elő az adott sejtben. Mivel az IRF1 és az IRF2, az IFNγ által aktivált gének első szintjén helyezkednek el, és a STAT3 végzi ezen gének expressziójának aktiválását, ezért egyértelműnek látszik az összefüggés a pikkelysömör és a két faktor, valamint az általuk aktivált gének szerepe között. Természetesen nehéz kimutatni egyik vagy másik ilyen génről annak kizárólagos és kitüntetett szerepét az adott betegség, – jelen esetben a pikkelysömör kialakulását illetően –, de mindenképpen fontos lehet ezen gének kifejeződésének az ismerete és jelenlétük bizonyítása.

Célkitűzések

Eredeti célkitűzésünk az volt, hogy ***(1)*** bizonyítsuk a Tumor Nekrózis Faktor (TNF) génjének vagy a ***(2)*** TNF-fel rokon gének létezését a csirke (*Gallus gallus)* genomban. Feladatként tűztük ki a gének klónozását, jellemzését, a géntermékek kifejeztetését és biológiai aktivitásuk igazolását. Munkahipotézisünk az volt, hogy mivel már halakban is igazolták a TNFα gén létezését, ezért kézenfekvő volt annak fellelhetősége a madarakban is.
A későbbiekben ez a feladat módosult és konkrétabbá vált az eredmények tükrében. Így célunk lett a ***(3)*** csirke végtag növekedési porckorongjában expresszálódó TL1A gén vizsgálata, valamint a humán TL1A lehetséges szerepének tanulmányozása pikkelysömörös betegmintákon és reumatoid artritisz modellben.

Mivel pikkelysömörben ismert, hogy kapcsolat van a kórkép és bizonyos transzkripciós szabályozó faktorok aránya, illetve aktiváltsága között, ezért megpróbáltunk adatokat nyerni pikkelysömörös betegmintákból a TL1A expressziója és a betegség összefüggését illetően. Továbbá megkíséreltük a kapott adatokat magyarázni a transzkripciós faktorok kifejeződésének mértékével, real-time PCR-kísérletek segítségével.

Anyagok és módszerek

In silico lépések

Egy *tblastx* keresést (BLOSUM45 paraméterrel) hajtottunk végre egy, az interneten keresztül elérhető csirke porcsejt EST könyvtár adatbázison (http://www.chickest.udel.edu/), az emberi (P01375) és a szivárványos pisztráng *(Onchorhynchus mykiss)* TNFα fehérjeszekvencia (CAC16408) kereső motívumként történő felhasználásával, és így azonosítottuk a csirke TL1A-t.

A humán TL1A gén promoterének analízise: Különböző emlős fajok TL1A génjének transzlációs iniciátor kodonjától számított 3000 bp-os upstream promoter szekvenciáját a DoOP adatbázisból töltöttük le [53]. Ezeket a szekvenciákat és a csirke TL1A hasonló régióját a DIALIGN2 programmal illesztettük egymás mellé [54]. Ismert transzkripciós faktor-kötőhelyek kereséséhez a MATCH programot [55] használtuk a TRANSFAC® PROFESSIONAL 9.2 adatbázison [56].

Sejtek kinyerése

14,5 napos csirke embriók végtagkezdeményeiből kimetszettük a növekedési porckorongokat. Ezeket 18 órán keresztül tripszineztük (0,05% Tripsin + 0,02% EDTA) (Sigma-Aldrich Kft.) PBS-oldatban, majd a kinyert porcsejteket (kondrocitákat) Petri-csészékbe osztottuk szét és további 48 óráig tenyésztettük DMEM + 5% borjúsavó (Sigma-Aldrich Kft.) tápoldatban.

Sejtvonalak

A humán eredetű SW1353 jelű kondroszarkóma sejtvonalat általánosan használják a reumatoid artritisz kutatásában [57], amelyet az MTA SZBK Biokémiai Intézetében Dr. Kiss Ibolya bocsájtott rendelkezésre. A biológiai aktivitás teszteléséhez a csirke eredetű immortalizált REV-T jelű vonalat használtuk, amelyhez Bernd Kaspers (Institute for Animal

Physiology, University of Munich, München, Németország) révén jutottunk hozzá [58]. Ez a sejtvonal a T-sejtekre jellemző IFNγ termelését megtartotta és különböző indukciók (pl. LPS) hatására ezt fokozza.

Szövetminták

A helyi etikai bizottság beleegyezése és útmutatásai alapján pikkelysömörös betegek tünetes és tünetmentes bőréből vettünk 6 mm-es punch biopsziákat. Az egészséges kontroll bőrmintákat plasztikai sebészeti beavatkozáson átesett egyénektől nyertünk. A szubkután szövet eltávolítását követően a biopsziákat 4°C-on Dispase oldatban (Grade II, Roche Molecular Biochemicals) inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd a dermiszt és az epidermiszt szétválasztottuk. A szövetmintákat Trizol reagensben (Invitrogen, Carlsbad, USA) tároltuk -70^{o}C-on, majd a gyártó utasításainak megfelelően totál RNS-t izoláltunk belőlük. Kontroll (egészséges egyénből származó) mintából 4 db; pikkelysömörös tünetmentes mintából 3 db; pikkelysömörös tünetes mintából 5 db került felhasználásra a kísérletekhez.

Biológiai tesztek

A citokinekkel történő indukciós kísérletekhez a laboratóriumunkban előállított rekombináns humán TNFα-t (100 U/ml), IFNγ-t (10 pg/ml) és IL-1β-t (400 U/ml) használtunk tápoldatban hígítva. A citokinek aktivitását gyári standard készítményekkel szemben validáltuk. A humán TL1A expressziójának vizsgálatát SW1353 sejten 24 órás citokin indukciót követően végeztük el. Ehhez méréspontonként 2x10^{6} sejtet lemezeltünk ki 35 mm-es Petri csészékbe MIXMEM tápoldatban, 10% borjúsavó mellett. Ezt követően a tápoldatot eltávolítottuk, a sejteket 2x mostuk PBS oldattal, majd rövid cenrifugálást követően felhasználásig -80°C-on tároltuk.

cDNS készítés

A sejtszuszpenziókból össz-RNS preparátumot készítettünk guanidium-tiocianát extrakcióval [59]. A kinyert RNS mennyiségét UV spektrofotométerrel határoztuk meg, minőségét denaturáló gélelektroforézissel ellenőriztük. A cDNS-t egy módosított S.M.A.R.T. (Clontech, USA) módszerrel készítettük el[60]: 5 µl reakcióelegyben 1 µg RNS, 10 µM CDS III 3'-primer [5'-dATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d$(T)_{30}$VN-3'], 10 µM SMART III oligonukleotid [(5'-dAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCr(GGG)-3'] inkubálva 70 °C-on 2 percig, majd jégen áll 5percig. Rövid centrifugálás után az elegyet kiegészítjük 2 µl 5x Reverse Transcriptase pufferrel (Fermentas, Litvánia), 1 µl dNTP-vel (10 µmol), 1 µl (200 U) „RevertAid RNase H Minus" reverz transzkriptázzal (Fermentas) és 1 µl (20U) RNasin-nal (Fermentas). Inkubálás 37 °C-on 1 óra 15 percig. Az így elkészült cDNS-t használtuk fel real-time és normál PCR-es kísérletekhez.

PCR primerek és PCR körülmények

Az *in silico* keresést követően a hasonlóságot mutató EST szekvenciákból kiválasztottunk egy kb. 470 bp-os konszenzus szakaszt. Sense primernek a 5'–GCCGTGCTGCTCTGCCTGCT–3' szekvenciát, míg antisense-nek a 5'–CACTGAGGGTCTTGGTGCTGGTCAG–3' oligonukleotidot választottuk ki, a Vector NTI 6.0 program (Invitrogen) segítségével. Ezeket az MTA SZBK Oligonukleotid Szintézis Laboratóriumában szintetizálták meg és a PCR reakciókhoz a következő reakcióelegyet összeállítva használtuk: 25 µl-es reakcióelegyben 30-50 ng cDNA, 25-25 pmol PCR primer, 200 µM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 5 unit Taq Polymerase (Fermentas, Litvánia). A PCR reakciókat MJ Research gyártmányú PTC-100-96V típusú készülékkel végeztük a következő beállításokat használva: 94 °C 3 perc kezdeti denaturálás, majd 35 ciklusban [93 °C 30 mp denaturálás, 65 °C 30 mp oligohibridizáció, 72 °C 30 mp elongáció], végül 72 °C, 5 perc befejező elongáció. A bakteriális expressziós plazmidba történő klónozáshoz sense

primerként egy BamHI restrikciós enzim felismerőhellyel meghosszabbított oligonukleotidot (5'-CGGGATCCGCCGTGCTGCTCTGCCTGCT-3'), míg antisense primerként egy XhoI restrikciós enzim felismerőhellyel meghosszabbított oligonukleotidot (5'-CCGCTCGAGCCACAAAGCTGCTGCCAGAGACCTACAG-3') használtunk. A bakulovírusos expresszióhoz később felhasznált konstrukcióhoz mindkét primert tudtuk használni.

A csirke DcR3 mRNS expressziójának igazolásához a következő primereket szintetizáltattuk meg: chDcR3_sense 5'–ATGCTGTTCTGTCCCGACCCG–3', chDcR3_antisense 5'–TTGGTTTCCTGGCACATTGG–3'.

Valós idejű (Real-Time) PCR

A humán TL1A expressziójának vizsgálatához génspecifikus TaqMan assay-t vásároltunk az Applera cégtől (Hs00270802). A mi esetünkben 5'-végi jelöléshez 6-FAM (494/518 nm), 3'-végi jelöléshez TAMRA (565/580 nm) festéket használtak. A vizsgálatokat Bio-Rad gyártmányú iCycler készüléken folytattuk le, a szokásos TaqMan körülmények között, amely 93 °C 3 perc, majd 35-40x [60 °C 1 perc, 93 °C 30 mp].

Az IRF1 (NM_002198) és IRF2 (NM_002199) gének expressziójának vizsgálatához a Roche Probe Library termékét használtuk. A gyártó honlapjáról elérhető szoftver segítségével PCR primereket terveztünk. Az IRF-1-et kimutató próba a 36. számú könyvtár tagja, míg az IRF-2 próbát az 56. számú könyvtár tartalmazta. A rendszer által javasolt oligonukleotidokat (IRF1_sense: GAGCTGGGCCATTCACAC, IRF1_antisense: 5'–TTGGCCTTCCACGTCTTG–3'; IRF2_sense: 5'–AAGTGGATAGTACGGTGAACATCA–3', IRF2_antisense: 5'–GCGGATTGGTGACAATCTCT–3') megszintetizáltattuk, majd azok megbízhatóságát előzetesen kontroll PCR reakciókban ellenőriztük humán keratinocita cDNS preparátumból felhasználásával. Belső kontrollként a béta-aktint és a 18S RNS génjét használtuk.

Klónozás, szekvenálás

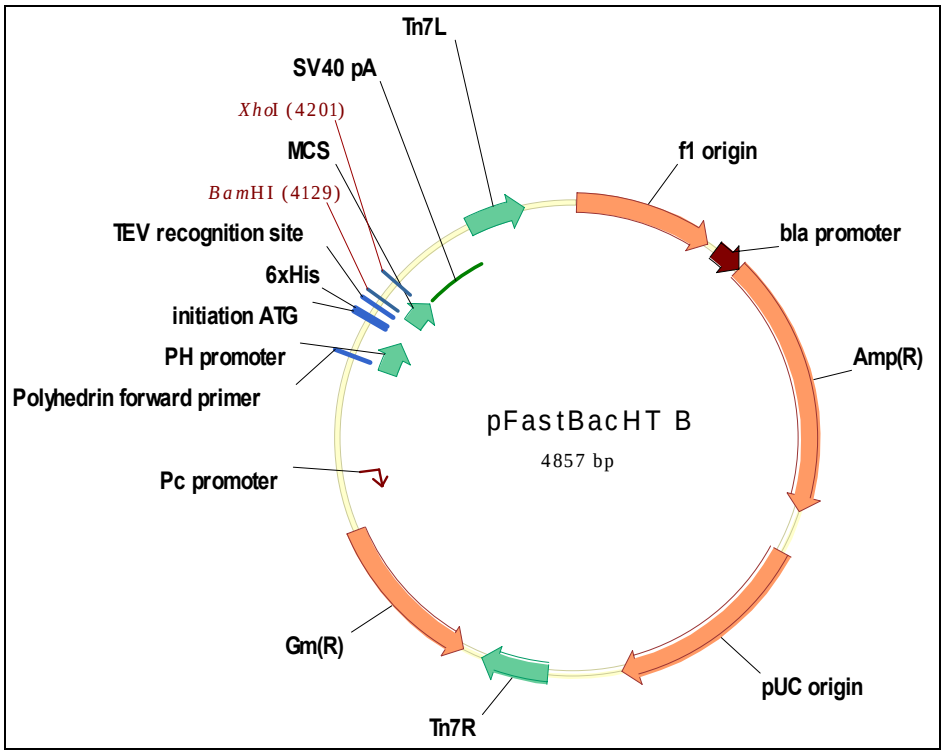
A PCR amplikonokat agaróz gélelektroforézissel analizáltuk, a fragmenteket agaróz gélből tisztítottuk és Promega gyártmányú TA-klónozó kit segítségével építettük be pGEM-T Easy vektorba, a gyártó utasításai szerint. A ligátumot a továbbiakban kompetens XL-1Blue *E.coli* baktérium sejtekbe transzformáltuk Hanahan módszerével [61]. A szélesztés 100 µg/mL ampicillin tartalmú Luria-Bertani (LB) + 1.5% agar táptalajos lemezekre történt. Csak a transzformánsok képeztek telepeket, amelyekből ezt követően 2 mL LB folyadékkultúrát indítottunk, ugyancsak 100µg/mL ampicillin koncentráció mellett. Az éjszakán át 37 °C-on rázatott kultúrákból plazmid miniprepeket tisztítottunk. A kapott plazmid DNS-t megszekvenáltattuk. A szekvencia-adatokat összehasonlítottuk azzal az EST adatbázissal, amelyből kiindultunk.

A csirke TL1A fehérje termeltetése bakteriális és bakulovírusos rendszerben

A klónozáshoz a PCR amplifikációval kinyert, gélből kitisztított, majd megemésztett fragmentet a pET28a jelű (Novagen) bakteriális expressziós vektor *BamHI-XhoI* helyére építettük be. A ligátummal az *E. coli* DH5α bakteriális törzs sejtjeit transzformáltuk, majd a miniprepekből kinyert plazmid DNS bázissorrendjét a klónozóhely mindkét oldaláról kiindulva (T7 és T7Term primerek) meghatároztuk (MTA SZBK DNS Szekvenáló Laboratórium).

A csirke TL1A fehérje bakteriális rendszerben történő termeltetéséhez az ellenőrzött plazmiddal a kompetens BL21/RIL (Stratagene) *E.coli* törzset transzformáltuk és 25 µg/ml Kanamycin tartalmú LB lemezre szélesztettük. Vektorunk IPTG indukálható T7/Lac promotert tartalmaz, a gyártó ajánlása szerint 1 mM IPTG-vel (Fermentas, Vilnius, Litvánia)12 órán át indukáltuk az előzőleg OD_{600}: 0,4 -ig növesztett 100 ml térfogatú kultúrát.

A bakulovírus alapú fehérjetermeléshez a pFastBacHTB (Invitrogen, Carlsbad, USA) vektort használtuk (2. ábra).



2. ábra: A baculovírus alapú expressziós rendszer "entry" vektora. A PCR fragment irányított beépítése a BamHI és XhoI restrikciós helyek közé történt. A termelő sejtvonal létrehozása a Tn7R és Tn7L jelű transzpozon karok segítségével történt.

Ennek lényege, hogy a termeltetni kívánt gént a plazmidon lévő transposon segítségével rekombináció révén a DH10Bac jelű *E. coli* gazdába juttatjuk, amely kromoszómálisan tartalmaz egy provírust. A rekombinánsok a fertőzőképes rekombináns „bakmid"-ot termelik extrakromoszómálisan. A bakmidot E.Z.N.A. ENDO-Free plazmidtisztító kittel (Omega Bio-tek, USA) nyertük ki, meghatároztuk koncentrációját és tisztaságát és ezután került sor az Sf9 rovarsejt transzfekciójára a gyártó által javasolt módon. A pFastBacHTB plazmidba a bakteriális plazmidhoz használt primerek segítségével irányított PCR alapú klónozással illesztettük be a csirke TL1A 670 bp-os darabját, a leolvasási keretnek megfelelően. Az Sf9 rovarsejtet a gyártó útmutatásainak megfelelően 1:10 arányú

léptéknövelésű lépéseken keresztül fertőztük a rekombináns vírus-felülúszóval. A rovarsejtek tenyésztéséhez TNMFH tápoldatot (Sigma-Aldrich Kft.) használtunk, ugyancsak a gyártó útmutatásainak megfelelően. A sejteket kb. 5x107 sejt/ml koncentrációban gyűjtöttük össze centrifugálással, 50 ml-es centrifuga csövekben és felhasználásig -70 °C-on tároltuk

Affinitás kromatográfia

A bakteriális expressziót követően a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd jégen PBS oldatban szuszpendáltuk. Ezután a sejteket ultrahangos feltárással szolubilizáltuk, Branson Sonifier (Danbury, CT, USA) B-30 készülékkel (beállítás: 50% Duty Cycle, Output:2, Timer: 3 perc). A feltárást egy 50 mL-es Falcon (BD, USA) műanyag csőben, 25 mL térfogatú PBS oldatban, jégen végeztük. A bakulovírusos rendszerből származó sejteket ugyancsak 25 ml PBS-ben szuszpendáltuk fel, jégen és ezt követően a fentiekhez hasonlóan ultrahangos feltárást végeztünk (beállítás: 50% Duty Cycle, Output:2, Timer: 1 perc). Ezt követően a bakteriális sejtfal-törmeléket centrifugálás révén távolítottuk el az oldatból (10.000 rpm, 20 perc, 4 °C), JA-20 (Beckmann, USA) rotorban. A vízszerűen átlátszó, feltisztult oldatot elkülönítettük a törmeléktől és perisztaltikus pumpa segítségével egy 0,8 cm átmérőjű és 1 ml térfogatú, előzetesen PBS-sel ekvilibrált Talon (Clontech, USA) oszlopra vittük fel, 2 ml/perc sebességgel, éjszakán át, hidegszobában. Ezt követően 5 ml PBS oldattal mostuk az oszlopot, 1-1 ml-es frakciókat szedve, majd lineáris grádienst alkalmazva eluáltuk a megkötődött fehérjéket 0,5 ml-es frakciókat szedve. A mosó és eluált frakciókból 15-15 µl-t vittünk fel 15%-os poliakrilamid gélre. A gélt Coomassie festékoldattal [2,5 g Coomassie Brillant Blue R-250 (Serva, Németország) 450 ml metanol, 100 ml 96%-os ecetsav, 400 ml víz] festettük, majd differenciáló oldatban (450 ml metanol, 100 ml 96%-os ecetsav, 400 ml víz) differenciáltattuk.

Western blot

A Western blotting kísérletet a standard eljárásoknak megfelelően végeztük el, nitrocellulóz membránon. A rovarsejtek „crude extrakt”-jából és az affinitás kromatográfia frakcióiból 15 µL-es mintákat vettünk, összekevertük 2x-es koncentrációjú SDS minta pufferrel (Roche Applied Science, USA) és egy 15%-os SDS-poliakrilamid (Serva, Germany) gélre vittük, majd minitankban futtattuk 150 V feszültség és 35 mA áramerősség mellett, SDS futtató pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS). A gélfuttatást követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk egy műanyag tartályban, konstans 31 mA áramerősség mellett, 4 °C-on 16 órán át a következő pufferben: 25 mM Tris, 192 mM glicin, pH: 8.3, 15% metanol. A membránt desztillált vízzel mostuk 5 percig síkrázón, majd Tris-pufferelt fiziológiás sóban oldott (TBS: 125 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8.0, 0,1% Tween 20) 5%-os tejporral telítettük 1 órán át, 4 °C-on. Elsődleges (kecske anti-VEGI ellenanyag: P18, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) és másodlagos (tormaperoxidáz-konjugált nyúl anti-kecske IgG, Fc fragment specifikus, Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) ellenanyagokat alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően. A peroxidáz aktivitás detektálását a SuperSignalWestPico Chemiluminescent kit segítségével végeztük el (Pierce, USA), ugyancsak a felhasználási útmutató szerint.

Immunhisztokémia

A TL1A protein kimutatása a rutin immunohisztokémiai detektálási módszerrel történt formalinnal fixált, paraffinba ágyazott csirke-combcsont mintán, amelyet egy 14,5 napos csirke embrióból nyertünk. A kimutatáshoz kecske anti-TL1A (humán/egér/patkány) (goat anti-VEGI antibody P18, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) és nyúl anti-kecske immunoglobulint (Ig) (DakoCytomation) használtunk, amelyet polimer-tormaperoxidázzal jelölt anti-nyúl Ig ellenanyaggal (EnVision^{+}, DakoCytomation) hívtunk elő.

Eredmények

A humán TNFα gén legközelebbi rokonának azonosítása a csirke genomban

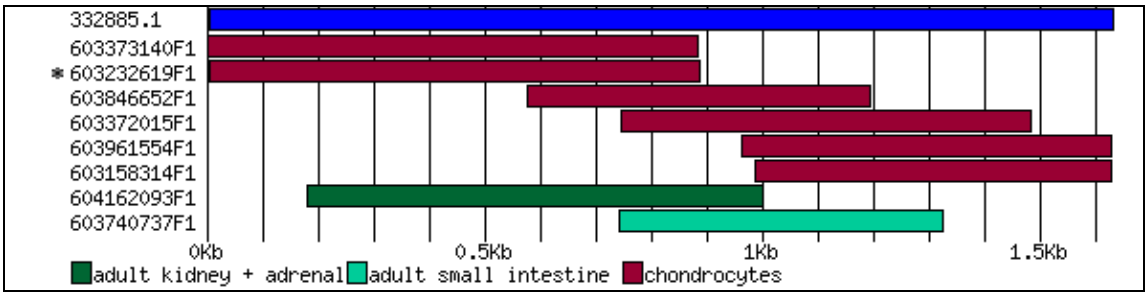
Az eredeti célkitűzésünk az volt, hogy a csirke Tumor Nekrózis Faktor (TNF) génjét megklónozzuk, amelynek létezésére csak funkcionális adatokon alapuló indirekt bizonyítékok álltak rendelkezésre.

Az egyik megközelítésben degenerált PCR primerekkel – amelyeket humán és más fajok TNFα szekvenciáinak legkonzerváltabb szakaszai alapján terveztünk meg – PCR reakciókat végeztünk csirke genomi DNS-en, illetve csirke T-sejt-specifikus cDNS bankon. A kapott amplifikátumokat plazmid vektorba építettük, majd meghatároztuk a nukleotid sorrendjüket. A szekvencia adatok alapján azonban ezek egyike sem volt azonosítható a TNFα-val, (eredmények és adatok nincsenek bemutatva). A másik megközelítésben az emberi és a szivárványos pisztráng *(Onchorhynchus mykiss)* TNFα fehérjeszekvenciáját használtuk mintaként a GenBank[4] adatbázisban történő *in silico* kereséshez. A csirke növekedési porckorong EST szekvenciák között így találtuk meg egy TNF-rokon fehérje cDNS szekvenciát, amely az eredeti bejegyzés szerint ChEST230f6 néven szerepelt (3. és 4. ábra).

```
>603232619F1 cloneID='ChEST230f6' chicken Chondrocytes isolated from growth
plates
CGGGGGCGGCGCGCCCTGCAGTTCTCCCTTCCCTGAGCTAGGTTTCTATTGTAGGCGGTGCATTCCTCGGGAGGG
AGGGTGTGTGTGTGTCGGTGCCTTCCCACACTTCGGGCAGCTCTTATTTAATGGGGGTCTCCATGCAGGGCAGAA
GGCAGAGGAGGTTTAGCCGTTGCCAGGCTCAGCGGCAGCTCGTACGCCAATTGCCGGCATGGATCACGGGGCTGA
AATAACCCTGGAAGAGGCTTCGGCGACCGGCCAAGCCTCCAGGATGCACATCAAGGAGGACCTGCGGAGGATGCG
CTGCGCCGTGCTGCTCTGCCTGCTGGCCGTGCTGCTGCTGGCGCTGCCCATCGCATACCTGCTGGCCGGGAACCT
GAGAGCACCCACCTCCTGCCCCCAGGTCGTGGATGAGAGGAGCTCTCACTTTCTGAAGCAGCGAGCAGTAGCTGC
TGTTACAGACACGCTTCCCAGCGCCGAGAAGCCAAGAGCACACCTGACAGTGAAGAAACAAGAACCCTCCAGCAC
CACGGGAAGCCATCTGCCCATCCTGCAGTGGGAAGACAAGCGAGGCTTGGCCTTTACCAAGAACAACCTGAGTTA
TTCCAGCAACGCACTGGTGATACCTGTGTCTGGGGATTACTATGTCTATGCTCAGGTCACTTTCCGAGGGCCCAG
TGACACTTCAAGTAAAACCAGTTCTGTCACTGCAGTCATCACTAAAGTCACTGACAGCTACCCCGAGCCCACCCA
GCTGCTGACCAGCACCAAGACCCTCAGTGAAGAAAGGAACAACTGGTTCCAGCCCATTTATCTGGGAGCTTGTGG
TTCCTTAGAGATAGGAGACAAGCTAATGGTCAACGTTAGTGACATCAAGGCTGGGGAAAAAA
```

3. ábra: a csirke EST adatbázisból kiválasztott szekvencia és az amplifikáláshoz használt primerek helye

[4] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi



4. ábra: A csirke különböző szerveiből izolált átfedő EST szekvenciák. Az általunk amplifikálásra kiválasztott, a humán TL1A/VEGI szekvenciájával rokonságot mutató ChEST230f6 EST ∗-gal jelölve.

Ezt a DNS bázissorrendet visszakeresve a humán genom szekvencia adatbázisán (BLAST keresés) az derült ki, hogy ez azonos a korábban VEGI-ként (Vascular Endothel Growth Inhibitor) leírt, később TL1A néven ismertté vált fehérje génjével, csirkében.

A csirke genom bázissorrendjének megállapítása és publikálása (http://genome.wustl.edu/projects/chicken/) világított rá, hogy a csirkében nincs meg a TNFα génje, ezért hozzáláttunk a csirke TL1A génjének jellemzéséhez. Az irodalmi adatok alapján ismert volt , hogy a humán illetve egér TL1A fehérje aktív, trimerizálódásra már képes, illetve biológiai funkcióval rendelkező része a 72. aminosavtól a 251. aminosavig terjed [24]. A fehérjeszekvenciák egymásra illesztésével meghatároztuk a klónozáshoz használható primerek helyzetét. A porcból készült cDNS-t felhasználva amplifikáltuk a csirke TL1A cDNS egy 670 bp-os szakaszát, amely az említett fehérjét kódolja. Az általunk klónozott szekvenciarészletet közzétettük a GenBank adatbázisban (AY954626).

Génszerkezet és kromoszómális lokalizáció

A csirke kromoszómális szekvencia-adatbankot 2004-ben tették nyilvánosan elérhetővé[5]. A ChEST230f6 szekvencia felhasználásával BLAST keresési módszerrel beazonosítottuk a gén kromoszómális lokalizációját. Ennek alapján a csirke VEGI/TL1A a 17. kromoszómán található, egy 13 kilobázispár (kbp) hosszú szegmensen. A géncsalád génduplikálódásra visszavezethető keletkezését mutatja, hogy például a szomszédos CD30L

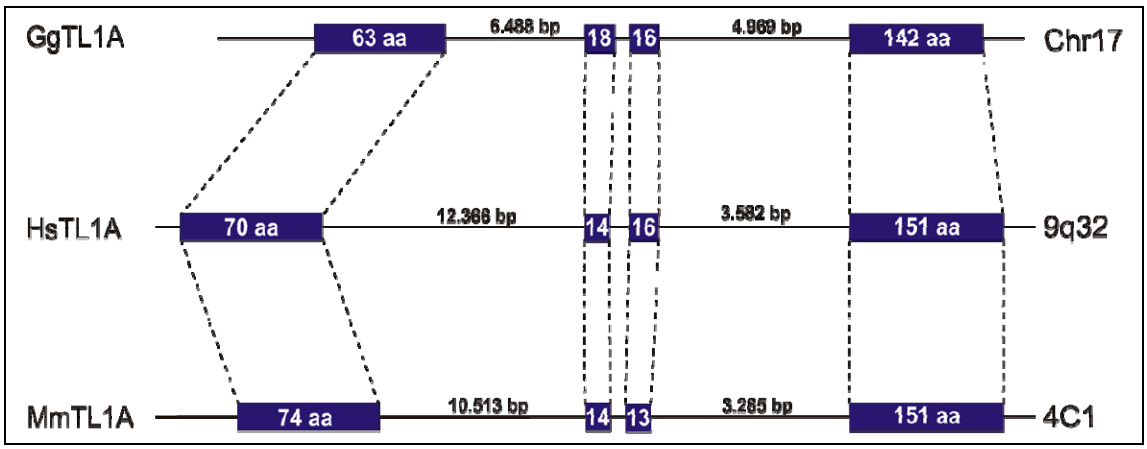
[5] http://genome.wustl.edu/projects/chicken/

gén, amely ugyancsak a TNF géncsalád tagja az emlős fajokhoz hasonlóan ugyanezen a kromoszómán helyezkedik el. Az eddig ismert TNF családtagok kromoszóma-lokalizációjának összehasonlítása az **1. táblázatban** található.

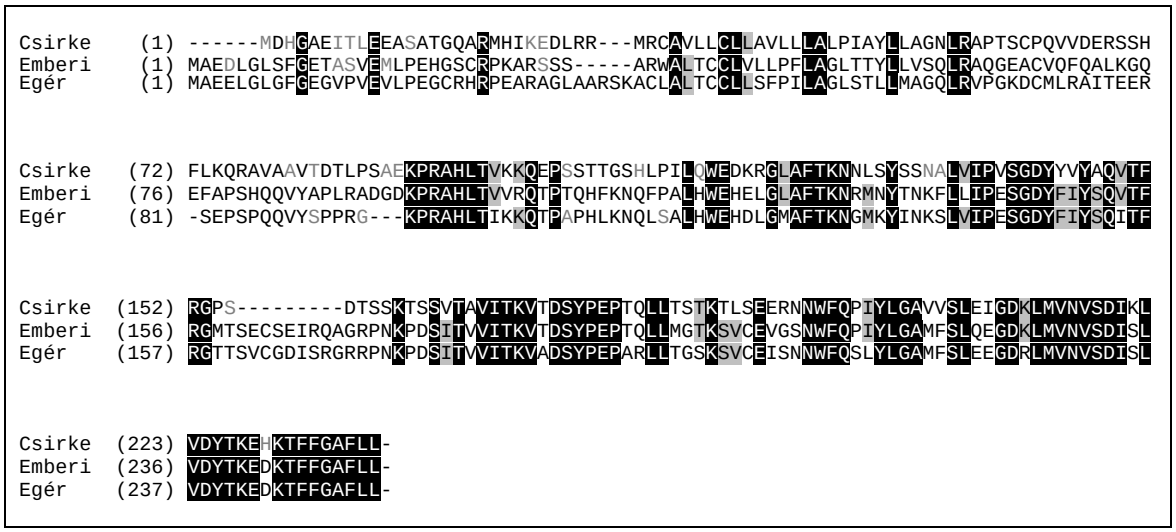
		Kromoszómális lokalizáció vagy referencia			
TNFSF tag	**Gén**	**Humán**	**Egér**	**Csirke**	**GenBank**
18	GITRL	1q23	1H2.1	-	
6	FASL	1q23	1H2.1	6	AJ890143
4	OX40L, CD134L	1q25	1H2.1	-	
10	TRAIL	3q26	3A3	[62]	AB114678
1	LTα	6p21.3	17B1	-	
2	TNFα	6p21.3	17B1	-	
3	LTβ	6p21.3	17B1	-	
8	CD30L	9q33	4C1	[62]	AB105911
15	TL1A/VEGI	9q32	4C1	[63]	AB194710
				Saját eredmény	AY954626
11	OPGL/RANKL/TRANCE	13q14	14D3	1	XM_425625
13B	BLys/BAFF/TALL1	13q32-34	11B4	1	AF506010
12	TWEAK	17p13	11	-	
13 (izoformák)	APRIL/TALL2	17p13.1	11B4	-	
14	LIGHT	19p13.3	17D-E1	-	
7	CD27	19p13	17C-D	-	
9	4-1BB-L	19p13.3	17D-E1	-	
5	CD40L	Xq26	XA5	[64]	AJ243435
	EDA	Xq12-q13.1	XC3	4	

1. táblázat: A TNF géncsalád tagjainak kromoszómális lokalizációja emberben, egérben és csirkében. Látható, hogy a három fajban az egyes gének kromoszómális helyzete egymáshoz képest megegyezik.

A gén exon/intron szerkezete szinte teljesen megegyezik más emlős fajok TL1A génjének felépítésével (5. ábra). A csirke TL1A fehérje szekvenciájának összehasonlítását a 6. ábra mutatja.



5. ábra: TL1A gének exon-intron szerkezetének összehasonlítása. GgTL1A: *Gallus gallus* (csirke), HsTL1A: *Homo sapiens* (emberi), MmTL1A: *Mus musculus* (egér) eredetű TL1A. A fekete boxokban az adott exon által kódolt peptidszakaszok hossza van feltüntetve. Látható, hogy a különböző fajokban a TL1A gén szerkezete nagyon hasonló.



6. ábra: A csirke, az egér és az emberi TL1A fehérjék szekvenciájának összehasonlítása. Az azonos aminosavak inverzen, a konzervált cserék szürke hátérrel vannak megjelenítve.

A promoter analízis eredménye

A TL1A promoterében az eddig ismert szabályozó régiókon felül feltételezünk egy új, mások által eddig még fel nem fedezett transzkripciós aktivátor szekvenciát, amely szinte teljesen megegyezik a konszenzus IRF-1 kötőhellyel. Az analízist 6 különböző faj TL1A szekvenciájának egymáshoz illesztésével kezdtük, majd ezt összevetettük olyan adatbankokkal, amelyek szisztematikusan tartalmazzák az eddig ismert összes szabályozó faktor felismerő-szekvenciáját. Az eredményt a 7. ábra jeleníti meg.

7. ábra: Hat gerinces faj TL1A génjének promoter-összehasonlítása. **Gg:** Gallus gallus – csirke; **Mm:** Mus musculus – háziegér; **Rn:** Rattus norvegicus – vándorpatkány; **Hs:** Homo sapiens – ember; **Pt:** Pan troglodytes – csimpánz; **Cf:** Canis familiaris – Házi kutya A dolgozatban tárgyalt promoterelemek sárga háttérrel vannak jelölve.

A tény, hogy a TL1A promoter régiójában sok fajra kiterjeszthetően fellelhető egy szekvencia mutatja, hogy evolúciósan fontos szabályozó elvről lehet szó, mivel ugyanezen fajokban ismert az IRF-1 fehérjék létezése is (8. ábra). Érdekes tény, hogy az IRF-1 faktort csirkében is azonosították, mint az IFNγ-ra adott válasz fontos alkotóeleme [65]. A humán IL4 gén promoterében az IRF elemek több példányban találhatóak meg, létezésüket funkcionális kísérletekkel bizonyították[66].

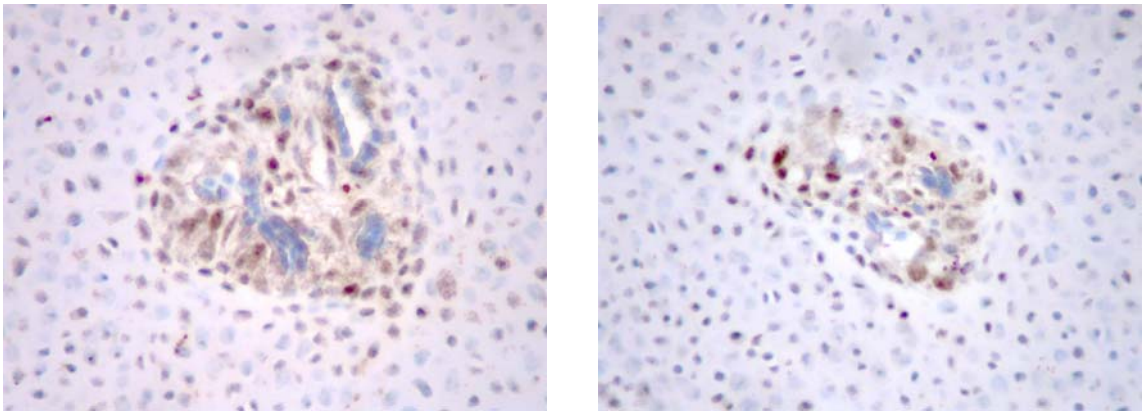
1.	IL4	-92/-112	TGGCCCCAAGTGACTGACAA,
2.		-180/-200	AAAGGTTTCATTTTCCTATT,
3.		-280/-304	CTATGCAAAGCAAAAAGCCAGCAGCAGCCCCAAGCT,
4.	Consensus		TCACTTTCACTTTCACTT
5.	huTL1A promoter		TCACTTTCACTTCCA

8. ábra: A TL1A promoter elemei. A feltételezett IRF-1 kötőhely szürkével satírozva.

A csirke TL1A expressziója az osztódó porcsejtekhez lokalizálható

Az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséhez a kereskedelemben nem volt kapható olyan ellenanyag, amely kifejezetten a csirke TL1A ellen készült volna (mivel akkor még nem is ismerték azt). Ezért a prediktált protein-szekvencia alapján más fajok TL1A fehérjéivel homológ szakaszokat kerestünk az általunk azonosított TL1A fehérjében. Ennek alapján a Santa Cruz cég P-18 jelzésű poliklonális ellenanyagát választottuk ki további kísérleteinkhez

(ld. Anyagok és Módszerek), amely már első próbálkozásra jelet adott csirke növekedési porckorongból készült metszeten (9. ábra).



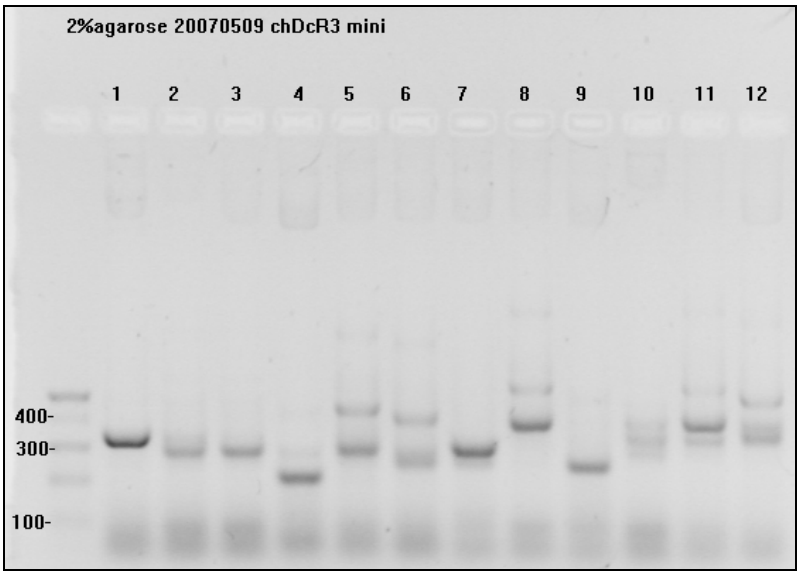
9. ábra: Immunhisztokémiai festés anti-VEGI (Santa Cruz P-18) ellenanyaggal, csirke végtagporc kezdeményeken

Jogosan merül fel a kérdés, hogy mi alapján lehetett megbízni az eredményben, ha egyrészt a gyártó nem adta meg a használt peptidantigén szekvenciáját, másrészt ha nem is volt ismert addig a csirke TL1A génje és az általa kódolt fehérje szekvenciája. A kérdés megválaszolásához – tehát, hogy azonos-e a porcsejtek által termelt fehérje a feltételezett TL1A fehérjével – a TL1A gént meg kellett klónozni a porcsejtből származó cDNS mintából, majd expresszáltatni bakteriális rendszerben. Ehhez több lépésen keresztül jutottunk el, de a végén sikerült megklónozni egy 670 bp-os géndarabot, amely az irodalmi adatok alapján feltételezhetően kódolja a fehérje biológiailag aktív részét és vélhetően egybeesik azzal a köztes darabbal, ami az ellenanyaggal is reagál.

A csirke DcR3 cDNS jelenlétének igazolása a végtagporc-kezdeményben

A porcsejtekből készült RNS (illetve cDNS) tartalmazhatja a TL1A keringő receptorának, a DcR3-nak az mRNS-ét, ami a TL1A szerepének tisztázásához adhat segítséget. Ennek lehetőségét először *in silico* ellenőriztük úgy, hogy BLAST összehasonlítást végeztünk el ugyancsak azon a nyilvános csirke génbankon, amelyben a TL1A gént megtaláltuk. Ebben az esetben viszont az ismert csirke DcR3 szekvenciát használtuk kereső

motívumként (AY251406). A keresés eredményeként egy EST[6] szekvenciát kaptunk (603222417F1), és ezért ugyanabból az RNS preparátumból kiindulva RT-PCR reakciót végeztünk el, amelyhez a primereket ezen EST szekvencia alapján terveztük meg. A várható amplikon mérete 339 bp. Az ígéretes amplifikációt követően a PCR fragmentet plazmid vektroba építettük és meghatároztuk nukleotid sorrendjét (10. és 11. ábra).



10. ábra: csirke DcR3 cDNS-darabjának PCR-klónozásából származó miniprepek visszaellenőrzése. Az 1. sz. miniprep került megszekvenálásra.

```
                          1                                                  50
          603222417F1     (1) TCTGTTCTGTCCGACCCGACCGTGCGGCGGCTGCCAAGCGGGCGTTCGCT
chDcR3 candidate clone    (1) -------------------------------------------------
                          51                                                 100
          603222417F1    (51) CCTCTCCTCCTGCTGCTGGCAGAGCTGGGCTGCAGCTCCCCACCCACGTA
chDcR3 candidate clone    (1) -------------------------------------------------
                          101                                                150
          603222417F1   (101) CCAGTGGAGAGACGCTGGGACCAAGGAGAGGGTCACCTGCCAGCAGTGCC
chDcR3 candidate clone    (1) -CNNTGNNNAG-CGCTGGGACCNNGGAGAGGGTCACCTGCCAGCAGTGCC
                          151                                                200
          603222417F1   (151) CGCCGGGGACGTTCGTGGCACAGCACTGCACCAAGGAAAGGCCGACGGTG
chDcR3 candidate clone   (49) CGCCGGGGGCGTTCGTGGCACAGCACTGCACCAAGGAAAGGCCGACGGTG
                          201                                                250
          603222417F1   (201) TGCGCGCCCTGCCCCGACCTGCACTACACGCACTACTGGAACTACCTGGA
chDcR3 candidate clone   (99) TGCGCGCCCTGCCCCGACCTGCACTACACGCACTACTGGAACTACCTGGA
                          251                                                300
          603222417F1   (251) GAAGTGCCTCTACTGCAACGTCATCTGCGGGGAGCGGCAGGTGGAGGTGC
chDcR3 candidate clone  (149) GAAGTGCCTCTACTGCAACGTCATCTGCGGGGAGCGGCAGGTGGAGGTGC
                          301                                                350
          603222417F1   (301) AGCAGTGCAACGCCACCCACAACAGAGCGTGTCAGTGCCAGGAGGGCTTC
chDcR3 candidate clone  (199) AGCAGTGCAACGCCACCCACAACAGAGCGTGTCAGCGCCAGGAGGGCTTC
                          351                                                400
          603222417F1   (351) CATGCAGAGCTGGAGTTCTGTGTGCAGCACTCCGAGTGCCCGCCGGGCTC
chDcR3 candidate clone  (249) CATGCAGAGCTGGAGTTCTGTGTGCAGCACTCCGAGTGCCCGCCGGGCTC
```

11. ábra: A csirke DcR3 jelenlétének igazolása kiválasztott 1. sz. miniprep nukleotid sorrendjének meghatározásával kapott szekvencia.

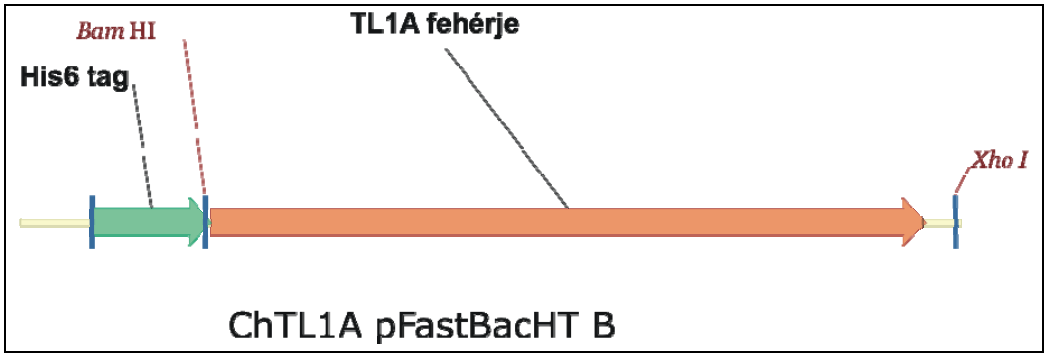
[6] EST= Expressed Sequence Tag (kifejeződő szekvencia darab, részlet)

A csirke TL1A biológiai aktivitásának mérése

Mivel hosszú ideig nem sikerült előállítani hosszabb darabot a csirke TL1A cDNS-éből, ezért kezdetben a tenyésztett csirke-kondrociták felülúszóját használtuk biológiai tesztkísérletekben, hogy el tudjuk dönteni, hogy hasonlóan a humán ortológhoz ez is képes-e T-sejteket aktiválni. Ehhez csirkéből származó immortalizált T-sejteket használtunk (REV-T), amelyek IFNγ termelését vizsgáltuk. A teszthez a csirke porcsejtek felülúszójának hígításait inkubáltuk célsejtekkel. A célsejt egy olyan stabil transzfektáns fürj fibroblaszt sejtvonal, amelyben a luciferáz riporter gén kifejeződése a guanilát kötőfehérje (GBP) transzkripciós faktor kontrollja alatt áll. A csirke T-sejtek által a tápfolyadékba kiválasztott IFNγ a fürjsejtek tenyészetéhez adva indukálja a GBP-t. Tehát a fürjsejtek feltárása után mért luciferáz aktivitás a T-sejtek IFNγ termelésének függvénye. [67, 68]. A mi tesztrendszerünkben a luciferáz gén kifejeződését is elindítja a módosított fürj fibroblaszt sejtekben. Ugyanaz az elem képes nemcsak csirke, hanem egér- és humán eredetű sejtekben is működni [69].

A csirke TL1aA expressziója

A bakteriális expresszióval előállított fehérje tisztításakor technikai akadályokba ütköztünk. Már az ultrahangozást követően a fehérje gélelektroforézis eredménye révén észleltük, hogy az izolálni kívánt fehérje jelentős része zárványtestekben található, illetve a szolubilis része pedig kicsapódik rövid ideig tartó állás során is.



12. ábra: A chTL1A/pFastBacHTB expressziós plazmid vázlata

Ezért döntöttünk úgy, hogy áttérünk a bakulovírus alapú expressziós rendszer alkalmazására (12. ábra) és a későbbi kísérletekben az így nyert fehérjét használtuk fel. A

csirke TL1A a klónozási kísérlet során kapott egy affinitás-kromatográfiás tisztításra alkalmas His6-tag-et (toldalékot).

Az így nyert fehérjeszekvencia kezdete a következő: MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGSAVLLCLL. A teljes szekvencia a 13. ábrán látható.

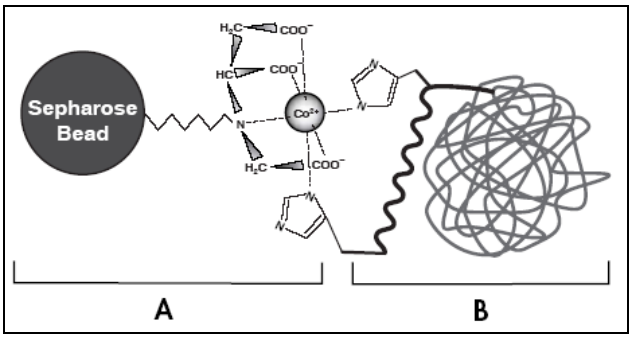
```
                                M  S  Y  Y  H  H  H  H  H  H  D  Y  D
                               ATGTCGTACTACCATCACCATCACCATCACGATTACGAT
      I  P  T  T  E  N  L  Y  F  Q  G  A  M  G  S  A  V  L  L  C
121   ATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCCGCCGTGCTGCTCTGC
      L  L  A  V  L  L  L  A  L  P  I  A  Y  L  L  A  G  N  L  R
181   CTGCTGGCCGTGCTGCTGCTGGCGCTGCCCATCGCATACCTGCTGGCCGGGAACCTGAGA
      A  P  T  S  C  P  Q  V  V  D  E  R  S  S  H  F  L  K  Q  R
241   GCACCCACCTCCTGCCCCCAGGTCGTGGATGAGAGGAGCTCTCACTTCCTGAAGCAGCGA
      A  V  A  A  V  T  D  T  L  P  S  A  E  K  P  R  A  H  L  T
301   GCAGTAGCTGCTGTTACAGACACGCTTCCCAGCGCCGAGAAGCCAAGAGCACACCTGACA
      V  K  K  Q  E  P  S  S  T  T  G  S  H  L  P  I  L  Q  W  E
361   GTGAAGAAACAAGAACCCTCCAGCACCACGGGAAGCCATCTGCCCATCCTGCAGTGGGAA
      D  K  R  G  L  A  F  T  K  N  N  L  S  Y  S  S  N  A  L  V
421   GACAAGCGAGGCTTGGCCTTTACCAAGAACAACCTGAGTTATTCCAGCAACGCACTGGTG
      M  P  V  S  G  D  Y  Y  V  Y  A  Q  V  T  F  R  G  P  S  D
481   ATGCCTGTGTCTGGGGATTACTATGTCTATGCTCAGGTCACTTTCCGAGGGCCCAGTGAC
      T  S  S  K  T  S  S  V  T  A  V  I  T  K  V  T  D  S  Y  P
541   ACTTCAAGTAAAACCAGTTCTGTCACTGCAGTCATCACTAAAGTCACTGACAGCTACCCC
      E  P  T  Q  L  L  T  S  T  K  T  L  S  E  E  R  N  N  W  F
601   GAGCCCACCCAGCTGCTGACCAGCACCAAGACCCTCAGTGAAGAAAGGAACAACTGGTTC
      Q  P  I  Y  L  G  A  V  V  S  L  E  I  G  D  K  L  M  V  N
661   CAGCCCATTTATCTGGGAGCTGTGGTTTCCTTAGAGATAGGAGACAAGCTAATGGTCAAC
      V  S  D  I  K  L  V  D  Y  T  K  E  H  K  T  F  F  G  A  F
721   GTTAGTGACATCAAGCTGGTGGATTACACTAAGGAGCACAAAACCTTCTTCGGTGCCTTT
      L  L  STOP
781   TTACTGTAGGTCTCTGGCAGCAGCTTTGTGGCTCGAG
```

13. ábra: A csirke His-teg-gel ellátott fúziós csirke TL1A fehérje és kódoló DNS szekvenciája

Ha ezt összevetjük a GenBank adatbázisban található fehérjeszekvenciával (XM_415523 transzlációja), akkor látszik, hogy a kívánt fehérje van a kezünkben:

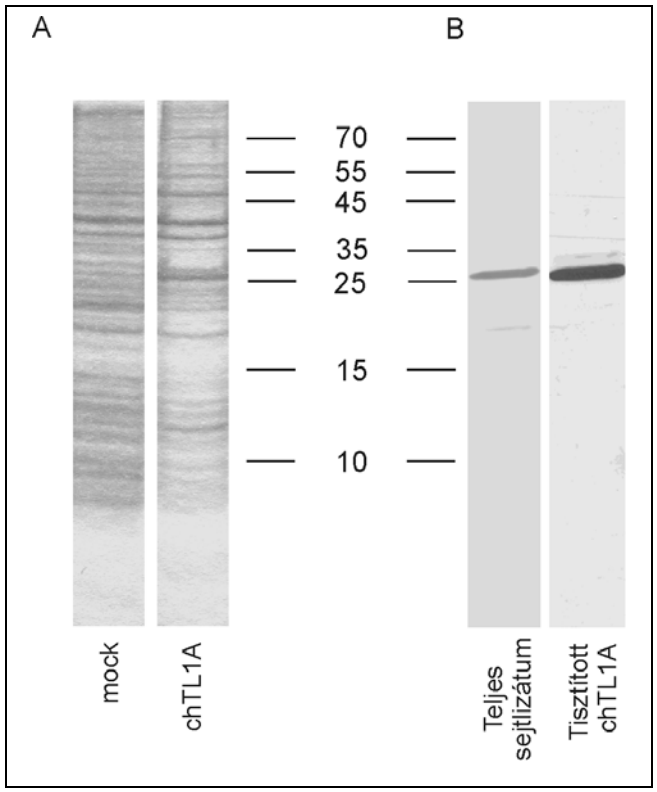
```
XM_415523 : (1) MDHGAEITLEEASATGQASRMHIKEDLRRMRCAVLLCLLAVLLLALPIAY
chTL1A_670: (1)     MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGSAVLLCLLAVLLLALPIAY
```

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



14. ábra: A TALON kromatográfiás mátrix szerkezete. **A:** szefaróz gyöngy az orientált Co^{2+} ionnal; **B:** a kötődő rekombináns fehérje. [Forrás: Talon Felhasználói útmutató (Clontech, USA)]

A kromatográfiás tisztítás azon az elven alapszik, hogy a csirke TL1A fehérje N-terminális végén elhelyezkedő 6 darab hisztidin molekula (14. ábra) erős kötést képes létesíteni a metál-kelát mátrix-szal, amely így mintegy magával „húzza" a fúziós fehérjét, elősegítve annak nagymértékű tisztulását (15. ábra).



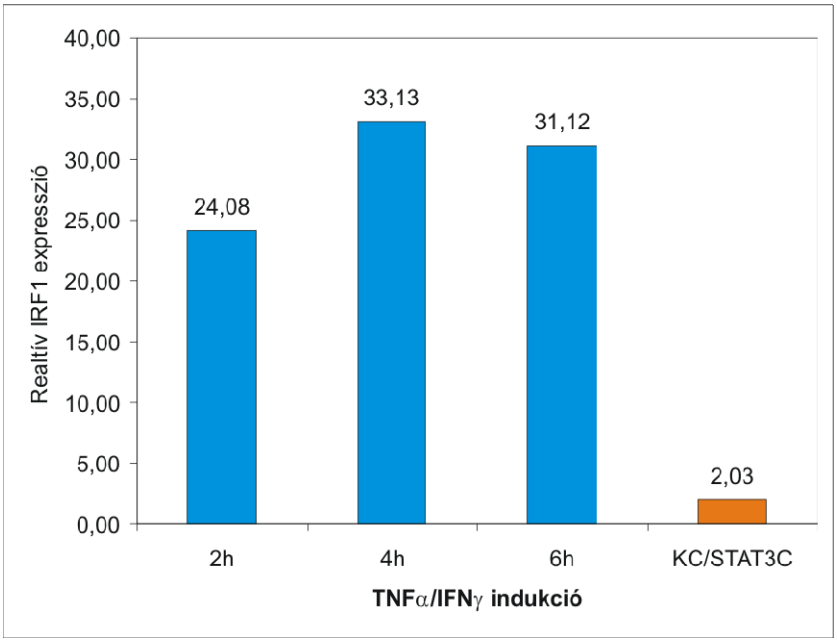
15. ábra: Bakulovírus rendszerből származó chTL1A fehérje analízise. **A:** Poliakrilamid gélelektroforézis és **B:** Western blot az affinitás kromatográfiával tisztított frakciókból.

A TL1A fokozott mértékű kifejeződése pikkelysömörben

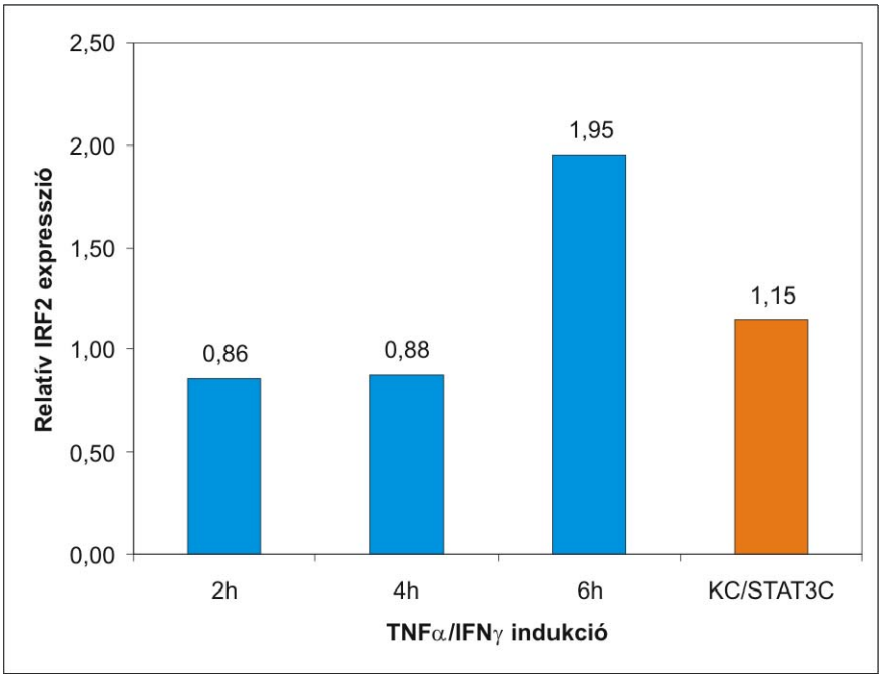
A feltételezésünk – hogy a TL1A esetleg jelen van proliferáló keratinocitákban – abból a megfigyelésből indult ki, hogy csirkében az osztódó porcsejtek termelik a TL1A fehérjét. Ugyan a két sejttípus igen távol áll egymástól, de mivel ***(1)*** pikkelysömörre is jellemző a fokozott – keratinocita – proliferáció (parakeratózis) és hogy ***(2)*** a keratinocita tulajdonképpen immunsejt.

Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a TL1A indukciója bekövetkezik többek között TNFα és IL-1β hatására is [70]. A TNFα-val történő indukció esetében ez az indukció egy NF-kB transzkripciós faktor/kötőhely révén valósul meg. Egy NF-kB/Luc konstrukcióval stabilan transzfektált keratinocita (HaCaT) sejtvonalon igazoltuk, hogy TNFα hatására NF-kB aktiválódás történt. Normál, tenyésztett keratinocitákon végzett génindukciós kísérleteink ugyanakkor azt mutatták, hogy a TL1A nem indukálható annak ellenére, hogy azok a transzkripciós faktorok, amelyeknek szerepet tulajdonítunk a TL1A gén expressziójában jelen vannak és feltehetőleg indukálhatóak. Ezek a gének az IRF1 és IRF2. Korábban publikált irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a pikkelysömörös bőrben az IRF1/IRF2 faktorok mennyiségének aránya eltolódik az előbbi javára [38, 71]. Ezzel összhangban áll az egyik egérmodell esetében megfigyelt jelenség, ahol az $IRF2^{-/-}$ egérben az emberi pikkelysömörre jellemző tüneteket lehet kiváltani [72].

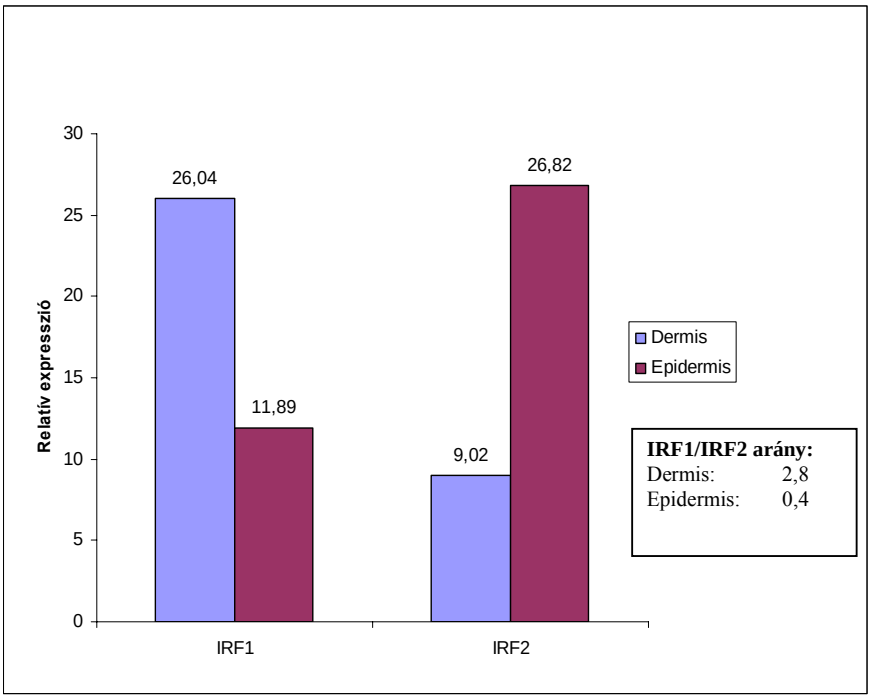
Az IRF1 (16. ábra) és IRF2 (17. ábra) gének relatív expressziójának vizsgálatához egészséges emberből származó keratinocita szuszpenziót használtunk, amelyet különböző koncentrációjú citokinekkel indukáltunk.



16. ábra: Az IRF1 faktor relatív expressziója citokinekkel indukált humán keratinocitákban, Real-Time PCR kísérletben. Az oszlopdiagramon feltüntetett értékek a megsoszorozódás mértékét jelzik. Belső kontrollként a 18S RNS cDNS-e, normál kontrollként a kezeletlen sejt szolgált. Látható, hogy 2 órás kezelésnél már bekövetkezik az IRF1 expressziójának megsokszorozódása, ami a 6 órás mintában elkezd csökkenni.

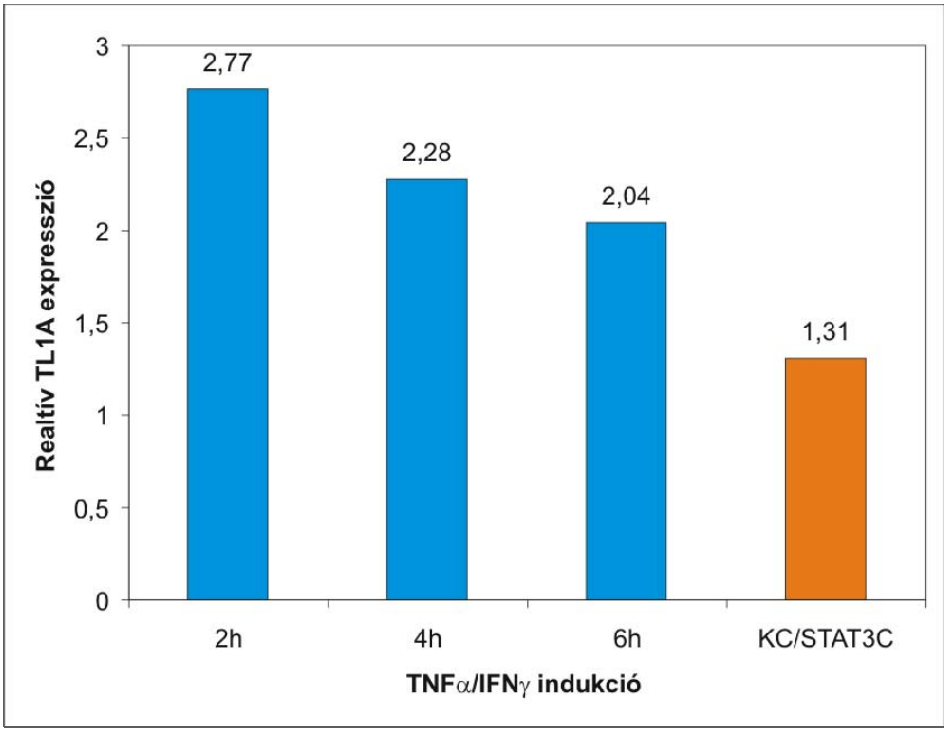


17. ábra: Az IRF2 faktor relatív expressziója citokinekkel indukált keratinocitákban, Real-Time PCR kísérletben. Az oszlopdiagramon feltüntetett értékek a megsoszorozódás mértékét jelzik. Normál kontrollként a kezeletlen sejt szolgált. Látható, hogy 2 órás kezelésnél már bekövetkezik az IRF2 expressziójának megsokszorozódása, ami a 6 órás mintában elkezd csökkenni.

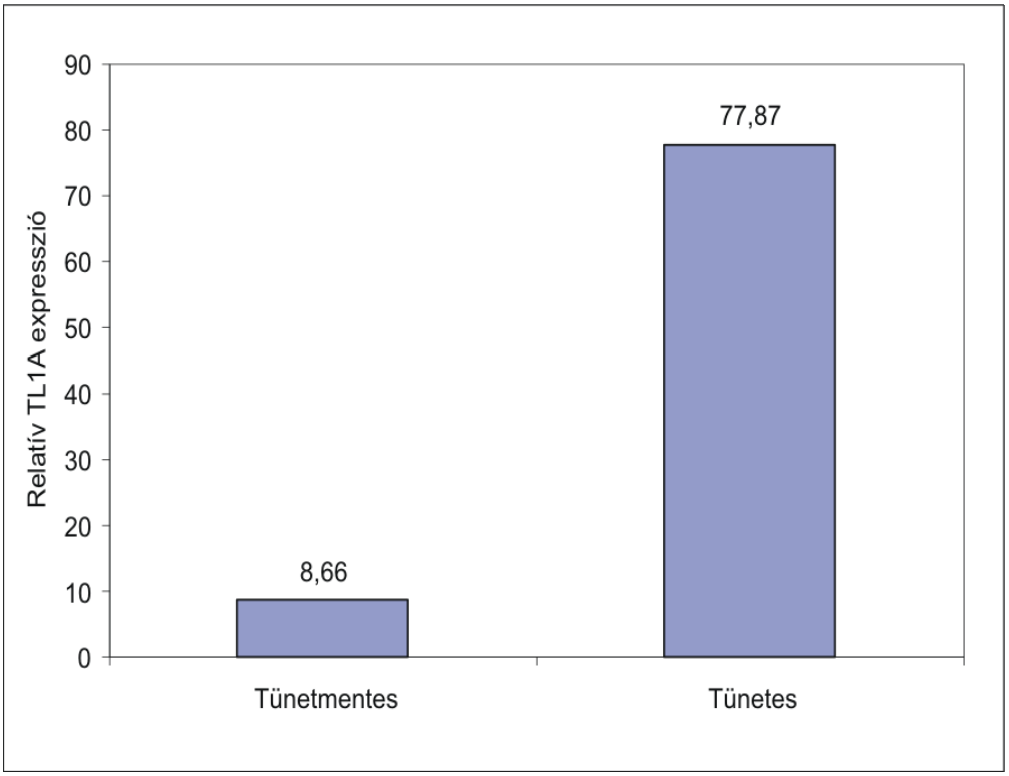


18. ábra: Az IRF1 és IRF2 transzkripciós faktor cDNS-ek relatív expressziójának meghatározása pikkelysömörös bőr dermisz és epidermisz rétegében. A két faktor expressziójának mértéke lényeges jellemzője a pikkelysömörös bőrnek, mivel ismert hogy a két faktor egymással ellentétesen szabályozza azoknak a géneknek az expresszióját, amelyekben felismerőhelyük előfordul.

Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk ugyanezen gének expresszóját pCMV-STAT3C konstrukcióval stabilan transzformált keratinocita sejtekben és az ebből nyert adatokat ugyancsak ezekre az ábrákra vetítettük rá, mivel így azok összehasonlíthatóak az indukciós adatokkal. A TL1A génexpressziójának vizsgálatában összehasonlítottuk a tenyésztett és indukált keratinocitákban, valamint pikkelysömörös betegekből származó keratinocitákban a relatív expresszió mértékét. Ennek eredményeit a 19. és 20. ábrán mutatom be.



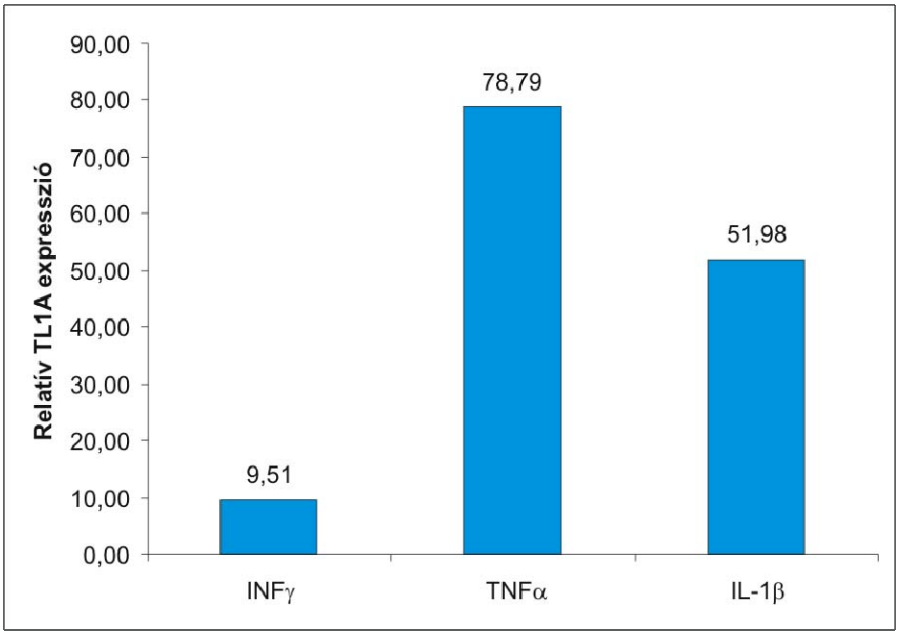
19. ábra: A TL1A relatív expressziójának összehasonlítása citokinekkel indukált és STAT3C konstitutiven aktivált transzkripciós faktort stabilan expresszáló keratinocitákban



20. ábra: A TL1A cDNS-ének relatív expressziója pikkelysömörös bőrben. Az oszlopdiagramm értékei a cDNS megsokszorozódásának mértékét mutatják, a normál egészséges bőrmintához képest.

A TL1A expresszióját vizsgáltuk még az SW1353 jelű humán kondroszarkóma sejtekben, citokin indukciókat követően (21. ábra).

Felmerül, hogy a génexpressziós vizsgálatok mellett érdemes a fehérjét is kimutatni, amit megpróbáltunk, de nem sikerült detektálnunk a TL1A-t a rendelkezésre álló ellenanyagokkal. A sikertelenség magyarázható vagy az ellenanyagok használhatósága, vagy pedig a tenyésztett sejtek által termelt TL1A fehérje kis mennyiségével.



21. ábra: A humán TL1A cDNS-ének relatív expressziója különböző citokinekkel történt indukciót követően, humán SW1353 sejtben. A TNFα (100 egység/mL) és IL-1β indukálhatóság kb. 79x-es és kb. 52x-es mértékű, míg az IFNγ (100 pg/mL) által kiváltott indukció jóval kisebb (9,51x) mértékű. A kapott értékek az irodalmi adatokkal nagyságrendileg megegyeznek.

Eredmények összefoglalása

1. A TNF géncsalád tagjai klaszterekben helyezkednek el az egyes kromoszómákon. A csirke TL1A kromoszómális lokalizációja ugyancsak konzervált és megfelel ennek a klaszterszabálynak.
2. A TL1A kifejeződik a fejlődő, 14,5 napos csirke embrió végtagjainak növekedési porckorongjaiban.
3. Több faj esetében megfigyelhető, hogy a TL1A gén promoterében megtalálható a konszenzus IRF kötőhely. Az NF-kB kötőhellyel meglévő szomszédsága okot ad arra, hogy kísérleteket tervezzünk annak kiderítésére, hogy vajon TNFα és IFNγ együttes indukciója szinergizál-e a TL1A gén expressziójának indukálásában.
4. Sikerült kimutatni a TL1A fokozott expresszióját a reumatoid artritisz modelljekent használt emberi sejtvonalban.
5. Sikerült kimutatni a TL1A fokozott expresszióját pikkelysömörben szenvedő betegekből származó mintákban, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy ennek szerepe lehet a kórkép kialakulásában és fenntartásában.
6. Sikerült azt is igazolni, hogy az általunk vizsgált beteganyagban megfigyelhető az IRF1 és IRF2 faktorok eltérő aránya a bőr különböző rétegeiben, és ez megfelel a szakirodalomban található adatoknak

Eredmények megvitatása – diszkusszió

Mivel a csirkében nincs TNFα ortológ [63], ugyanakkor a csirke TL1A az L929 sejten képes hasonló módon apoptózist kiváltani, ez arra enged következtetni, hogy a TNFα által kifejtett biológiai funkciót csirkében a TL1A látja el, amit munkacsoportunk hasonló típusú előkísérleti eredményei alapján magunk is feltételeztünk.

Kísérleteinkben sikerült meggyőzően bizonyítani a TL1A gén kifejeződését ***(1)*** csirke eredetű osztódó porcsejtekben, ***(2)*** emberi eredetű kondroszarkóma sejtekben és ***(3)*** pikkelysömörben szenvedő betegek bőrének keratinocitáiban, mRNS szinten. Az első esetben a kifejeződő fehérje jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel is igazolni tudtuk, míg a másik két esetben ez nem sikerült. Ennek okaként a rendelkezésünkre álló és felhasznált ellenanyagok eltérő specificitása tehető felelőssé.

A csirke porcsejtben kifejeződő TL1A/VEGI fehérjének egyrészt ***(1)*** szerepe lehet a porcra jellemző szöveti szerkezet kialakulásában, másrészt ***(2)*** hozzájárulhat a porcszövetre jellemző viszonylagos érszegénységhez, hiszen gátolja az érújraképződést. A morfológiai szerepkört alátámasztja, hogy kimutattuk a DcR3 gén kifejeződését mRNS szinten, ami azért lehet fontos, mert a porcsejtek differenciálódását csontszövet képződése követi az endokondrális csontosodás folyamatában és ennek része az oszteoklasztok megjelenése, amit viszont – irodalmi adatok szerint – a DcR3 molekula elősegít [16].

Jogosan merül fel a kérdés az olvasóban, hogy mi lehet a funkciója a csirke TL1A-nak az osztódó porcsejtekben? A kérdés nehezen válaszolható meg, hiszen két receptora közül csirkében csak a DcR3 ortológ létezése bizonyított, ám erről is kevés kísérleti adat áll rendelkezésre [17]. Mivel az emlősökben megtalálható DcR3-ról tudjuk, hogy képes makrofág sejteket oszteoklaszt sejtekké differenciáltatni, ezért fennáll annak a lehetősége, hogy a porcsejtekben a TL1A esetleg a DcR3 által kiváltott reverz szignál mechanizmuson keresztül vesz részt a porcból kiinduló endokondrális csontosodás folyamatában. Ennek

bizonyítására megpróbáltuk a DcR3 jelenlétét detektálni a csirke végtag növekedési porckorongjából készült cDNS-en, amely azonban önmagában csak fogódzónak tekinthető későbbi kísérletekhez. Terveink szerint a csirke DcR3-hoz hasonlóan először az egér ortológ jelenlétét próbáljuk bizonyítani, majd olyan immortalizált emlős sejtet előállítani, amely termeli az egér DcR3 fehérjét. A sejtfelülúszóból affinitás-„teg" segítségével kis mennyiségben előállítva egér porcsejteken differenciáltatási kísérleteket lehetne így elvégezni.

Lehetőségek a krónikus gyulladásos kórképek kezelésére

Az emberi eredetű kondroszarkóma sejtvonal (SW1353) a kísérletes reumatoid artritisz-kutatások kedvence, széles körben használják. A TL1A kifejeződésének, továbbá indukálhatóságának abban rejlik a jelentősége, hogy mivel ezt a sejtvonalat tekintik a reumás ízületi porc kísérletes megfelelőjének, az általa termelt citokinek és biológiailag aktív molekulák szerepe a gyulladásos kép kialakulásában és fenntartásában ezen keresztül vizsgálható. Mivel a gyulladt ízületi folyadékban (izzadmányban) – az immunkomplexek alkotóinak betudhatóan – a TL1A-nak emelkedett a szintje, ez a jelenlévő aktivált T-sejtek helybenmaradását és aktivált állapotát tartja fenn. Az indukálhatóságot ebben a sejtvonalban sikerült bizonyítani, ami részben megfelel az irodalmi adatoknak, illetve átfed azokkal.

A TL1A gén indukálhatósága citokinekre – hasonlóan az irodalmi adatokhoz – a mi kísérleteinkben is igazolható volt. Ezt egészítettük ki az aktiválódásban szerepet betöltő promoter elemekre vonatkozó kísérletekkel, továbbá a humán eredetű keratinocitákon végzett kísérletekkel.

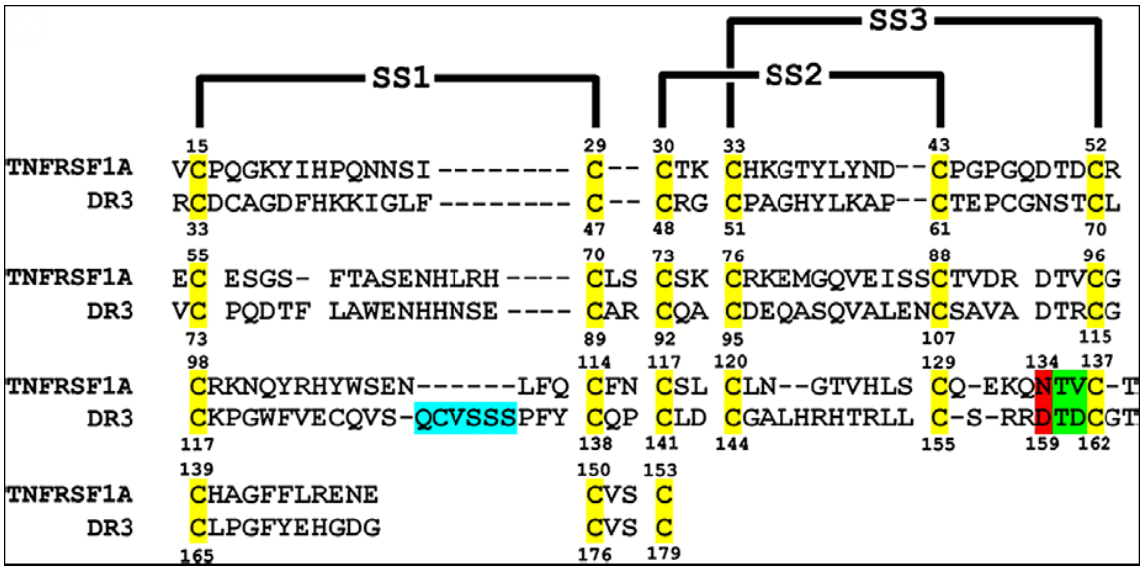
A STAT3 transzkripciós faktor aktivált állapota jellemzője a keratinociták differenciálódásának [73] és pikkelysömörben ehhez hozzájárul a sejtek folyamatos osztódása. A STAT3, mint mesterregulátor más gének aktiválódásáért felelős. Ilyen pl. az ICAM molekula, amelynek fokozott expressziójáért részben az IRF elemet teszik felelőssé

[51]. A konszenzus IRF felismerő-helyet – saját *in silico* adatainkra alapozva – fellelhetjük a TL1A gén promoterében is, ám ennek kísérleti igazolása várat magára.

A pikkelyömör esetében fontos tényező a bőr keratin rétegének elvékonyodása, ami megkönnyítheti gyógyszerek bejutattatását. Fehérje-természetű anyagoknak a bőrön, mint barrier-en keresztül történő bevitele jelenleg még nem megoldott, illetve csak az inzulin esetében történtek bizonyos próbálkozások korábban. Fehérjék bőrbe történő bevitele egy hidrogéles kenőcsben, illetve ezt kombinálva iontoforetikus v. ultrahangos kezeléssel elképzelhetőnek tűnik és alkalmazása széles körben elterjedhet. A helyi anti-TL1A kezelés megvalósítása – a beviteli módszer kidolgozásával – a mellékhatások kiküszöbölésének egyik módja lehet, amely teljesen úttörő jellegű elképzelés. Ezt kombinálva anti-TNFα adással jelentős sikerrel kecsegtet a pikkelysömör kezelését illetően.

A receptor fehérjeszekvenciájának egyetlen aminosav eltérése gyengítheti a ligand kötődésének erősségét, amelyre példa az osteoprotegerin (OPG, TNFRSF11B) 4. számú, ún. cisztein-gazdag doménjében (CRD[7]) felfedezett mutáció. Ezt teszik felelőssé az öröklődő, juvenilis Paget kór kialakulásáért [74]. Szerkezet-homológiai meggondolásból ered az az elképzelés, hogy más, a TNF receptor családba tartozó fehérjéknél egy ugyanebbe a doménbe eső mutáció okozhat funkcióbeli eltérést. A DR3 receptor ilyen D159G aminosavcserét eredményező mutációja (22. ábra) halmozottan fordul elő reumatoid artritiszes betegekben [29, 30], amelynek kísérletes bizonyítás még várat magára, mindössze egy szerkezet-vizsgálatra alapozott közlemény jelent meg [75] erről. A D159G cseréről azt gondolják, hogy a DR3 glikoziláltságában játszhat szerepet, ami egyrészt azért kérdéses, mert az aminosav-sorrend ezen a helyen nem felel meg a konszenzus szabálynak (N-X-S, N-X-T vagy N-X-C), másrészt mivel nincs olyan közlemény az irodalomban, amelyben a DR3 glikoziláltságát vizsgálták volna.

[7] CRD= Cystein Rich Domain



22. ábra: A humán TNF-R1 és DR3 aminosav sorrendjének összehasonlító ábrája. Jelölések: SS1, SS2, SS3: intramolekuláris cisztein-hidak; **Piros szín** jelöli a ligandkötésben fontos szerepet játszó aminosavakat: **N134** (TNF-R1) és **D159** (DR3). (Forrás: [75])

Elképzelésünk szerint a DR3 receptor ezen polimorfizmusa (SNP[8]) rávilágít egy kismolsúlyú inhibitor fejlesztésének lehetőségére, mivel feltételezhető, hogy a receptor ezen régiója – amennyiben ez nem egy esetleges alternatív glikozilációs hely – közvetlenül vesz részt a receptor-ligand kölcsönhatás kialakításában. Ennek alapján létrehozható egy sejtes tesztrendszer, amelyben a ligand kötődését a mutáns receptorhoz összehasonlítjuk a normál receptorhoz való kötődésével, illetve ehhez pl. NF-kB/luciferáz rendszert kapcsolunk. A vizsgált anyag inhibítor jellegére a luciferáz aktivitás változása alapján következtethetünk.

A TL1A fehérje szintje megemelkedett a reumatoid artritiszes gyulladásos ízületi folyadékban [76]. Az indukcióért az ellenanyagok Fc részét, mint kiváltó tényezőt teszik felelőssé.

A *Sclerosis multiplex* állatmodelljében ha a TL1A-ra nézve KO egeret használnak, akkor a szokásos gyulladás csak kb. 50%-ban váltható ki [31].

[8] Single Nucleotide Polymorphism

Mindezek az adatok azt sugallják, hogy a TL1A lehet egy majdani gyógyszerfejlesztési célmolekula, amely hatásának neutralizálása csökkentheti vagy megszűntetheti az T-sejt mediálta betegségek tüneteit. A legmodernebb gyakorlat erre az, hogy humanizált monoklonális ellenanyaggal gátolják az adott molekula hatásait. Erre példa az anti-TNF hatású Infliximab vagy a T-sejtek által expresszált CD20 nevű molekula ellen kifejlesztett Rituximab. Sajnos, mivel ezek alkalmazása általában szisztémásan, tehát a teljes test vonatkozásában történik – a mellékhatások előfordulása jelentős.

A TL1A/VEGI szerepe a dendritikus sejtek érésében

Az antigénprezentáló funkcióval rendelkező naív dendritikus sejt szerepe az, hogy bemutassa az antigént a naív, nyugvó T-sejtnek és így aktiválja azt. Ebben az aktiválási folyamatban a TL1A egyik izoformájának, a VEGI-192-nek fontos szerepet tulajdonítanak. Azonban az eddigi eredmények saját kísérleteinkben történő felhasználása óvatosságra int bennünket. A rendelkezésre álló források alapján nem tudjuk, hogy vajon kötődik-e és ha igen, milyen mértékben ez a ligand a DR3 receptorhoz, mivel receptorkötési kísérleteket nem tettek közzé. A fehérje-szerkezeti információkat szolgáltató adatbankban[9] is találhatóak röntgenkrisztallográfiai adatok a TL1A-ról (2QE3, 2RE9, 2O0O), de a molekula azon része, amely a különbséget jelenti a két izoforma között – hiányzik!

A beavatkozás lehetősége ebben a lépésben tehát – a TL1A hatásának specifikus gátlása – adott és indokolt lehet. Ez jelentheti egyrészt ***(a)*** az antigén-inger bevezető (afferens) szárának gátlását, mivel a dendritikus sejtek aktiválódása és antigénprezentáló képessége blokkolódhat, másrészt ***(b)*** a szövetekbe kivándorló aktivált T-sejtek effektor funkciójának (efferens) gátlását. Az afferens út sikeres gátlására van már példa is, az Efalizumab (Raptiva® – Genentech) nevű, a CD11a molekula ellen létrehozott humanizált monoklonális ellenanyagról szóló közleményekben [77, 78]. Az effektor funkció gátlását

[9] http://www.rcsb.org/pdb/home/home.doc

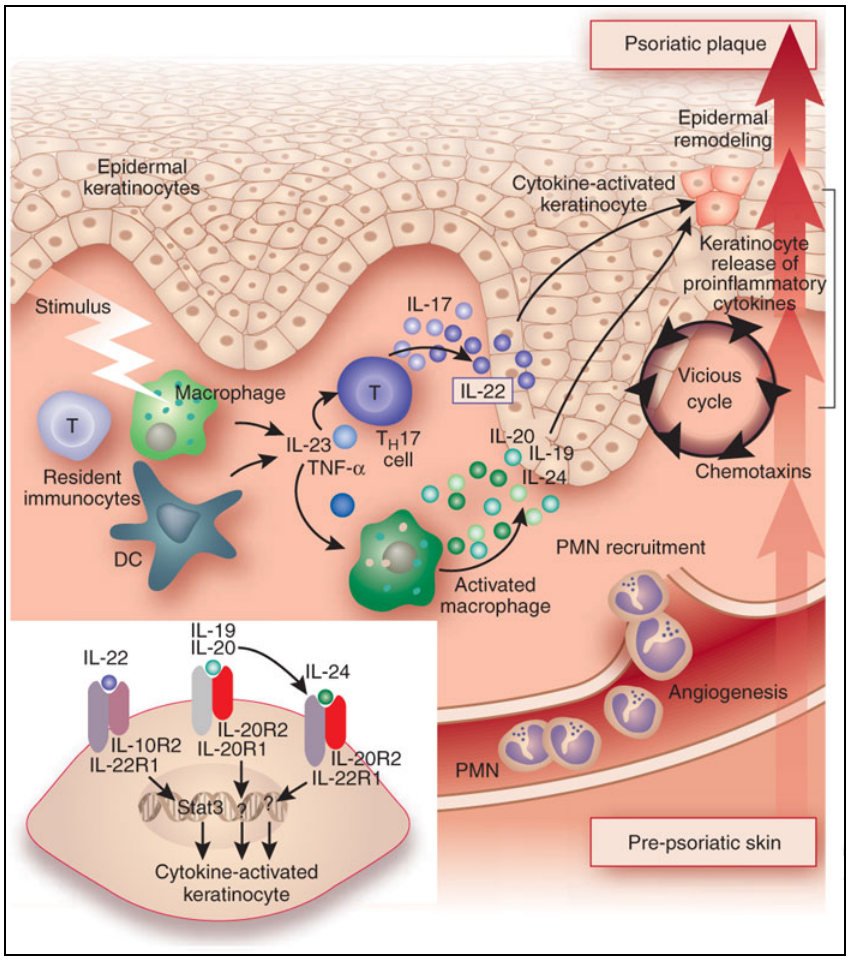
valósítja meg az Infliximab (Remicade® – Centocor) nevű humanizált monoklonális ellenanyag gyógyszer, a T-sejtek által termelt TNFα blokkolása révén.

Az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a TL1A/DR3 molekulapáros fontos szerepet tölt be az immunrendszer folyamataiban. Jelentőségüket számos közlemény bizonyítja, de a teljes összefüggés-halmaz még nincs felderítve, hiszen egyre gyakrabban jelennek meg érdekes eredmények az autoimmunitással kapcsolatos témakörökben. A talány, hogy miként változhat az egyébként normális immunműködés túlfokozottá, hogyan válik egy saját – többé-kevésbé ismeretlen – antigén súlyos, élethosszig tartó betegség forrásává, még mindig nyitott! Korunk medicinájának egyik sokat kutatott betegségcsoportja a krónikus, T-sejt mediálta betegségek sok-sok embert érintenek szerte a világban, ezért méltán érdemelték ki nemcsak a szaksajtó, de a bulvárlapok figyelmét is. Ha valahol a világban leírnak egy olyan gyógymódot, amely csak egy kicsit is képes ezeket a beteségeket érdemlegesen befolyásolni, óriási figyelem összpontosul rá!

A 2004-ben az FDA által engedélyezett szisztémás Infliximab kezelésről ma már tudjuk, hogy igen hatásos pikkelysömörben, de a mellékhatások sajnos nem elhanyagolhatóak. Ezek közül a legjelentősebb a TBC fertőzés és bizonyos limfoproliferatív kórképek fokozott előfordulása. A betegség magas előfordulási gyakorisága indokolja az alternatív gyógymódok, alternatív célpont molekulák keresését, és az ezeken alapuló új és hatékony gyógyszerek fejlesztését.

A keratinocitákban történő STAT3C fehérje kifejeztetése ezért eredményre vezethet az IRF1 termelődés, illetve a fokozott TL1A kifejeződés igazolásában. Itt érdemes megjegyeznünk, hogy a Tapazol® nevű pajzsmirigy-túlműködésben használt gyógyszer képes a pikkelysömört tünetmentessé tenni [79]. Ez a szer a STAT3 foszforilációjának gátlásán keresztül fejti ki hatását.

Ennek az a jelentősége, hogy ha a feltételezett (putatív) IRF1 kötőhely a TL1A promoterében irodalmi adatok alapján fejti ki hatását, akkor magyarázhatóvá válik az az „ördögi kör”[10], amelynek a létezését régóta sejtik (23. ábra) [80, 81]. Az ördögi kör alatt egy öngerjesztő folyamatot értünk, amelyben az egyik sejt által termelt gyulladásos mediátor egy másik sejtet arra késztet, hogy ugyancsak valamilyen másik mediátor termelésével az első sejt gyulladást elősegítő működését serkentse. Erre jó példa az aktivált T-sejtek által termelt TNF vagy IFNγ. A bőr keratinocitái pedig elsősorban kemokineket, például CXCL8 molekulát, illetve IL-8-at termelnek ezek hatására.



23. ábra: A pikkelysömörben szerepet játszó citokinek és az általuk kiváltott öngerjesztő folyamatok [80].

[10] „Ördögi kör”: a latin *Circulus vitiosus*, illetva az angol *Vicious circle* megfelelője.

DNS chip-alapú génexpressziós kísérletekből tudjuk, hogy TNF hatására a keratinocitákban hogyan változnak meg az egyes gének mintázatai: melyik mennyisége növekszik és melyeké csökken vagy stagnál. Ennek a megközelítésnek azonban megvan az a hátránya, hogy csak a chip-en lévő génekre nézve kapunk adatokat, ha viszont lemarad 1-2 gén, akkor az nyilvánvalóan elkerülheti a vizsgáló figyelmét. Az előzőekben említett konkrét kísérletben ez történt. A chip-en számos TNF-családbeli tag referencia szekvenciája megtalálható, de pl. a TL1A génje nem. Az ellenőrzéshez a fenti cikkben említett annotált táblázatot (Affimetrix, HGU95Av2) letöltöttük. A keresést a TNFSF*, VEGI, TL1A kulcsszavakkal végeztük el és ezalapján elmondható, hogy ezen a DNS-chip-en nem volt rajta a TL1A génnek megfelelő próba, „csak" majdnem az összes többi TNF-családbeli tag. Egy korábbi munkában a pikkelysömörre jellemző génszint-változásokat ugyancsak hasonló módszerrel vizsgálták [82]. Levonható tehát az a következtetés, hogy ha valaki olyan géneket keres, amelyek keratinocitákban expresszálódnak gyulladásos folyamatok során, akkor az irodalom áttekintő keresése során ezt a cikket nagy valószínűséggel megtalálja, elolvassa és későbbi kísérleteiben ezekre az adatokra épít. Ennek eredményeként elkerülheti figyelmét a TL1A, mint jelentős immunmodulátor fehérje jelenléte.

Tervek a jövőre nézve….

Összefoglalásként elmondható, hogy a feladat tehát adott: az egyre növekvő ismeretanyag birtokában a modern orvosi biotechnológia tárházát felhasználva új, kedvezőbb tulajdonságú gyógyszereket kifejleszteni és azt minél előbb a gyógyítás szolgálatába állítani! Erre jó lehetőségnek látszik a TL1A hatását neutralizálni képes humanizált ellenanyag kifejlesztése és terápiás alkalmazásának kidolgozása.

A gyógyszerfejlesztés azonban több nagyságrenddel nagyobb mennyiségű pénzt igényel, mint amivel ma Magyarországon a kutatási szektor számolni tud, ezért reális cél lehet

1. állatmodell létrehozása, akár az eddigiekben leírtakra építve,
2. sejtes tesztrendszer kidolgozása:
    a. a receptor-mutáció jelentőségének vizsgálatára – igazolására és
    b. egy alap neutralizáló ellenanyag molekula neutralizáló képességének tesztelésére
3. üzletfejlesztés a technológiára, amely utána tudja finanszírozni a további kutatásokat.

Köszönetnyilvánítás:

Monostori Éva vagy ahogy mindenki ismeri, Monos elindított és végig terelt azon az úton, aminek a végén elfogadták az elsőszerzős cikkünket és így én el tudtam kezdeni a doktori disszertáció megírását! Tanácsaival, bíztatásával és pozitív gondolkodásával nem hagyott csüggedni! Ezért hálás köszönetet mondok érte!

Tiszteletteljes köszönetemet fejezem ki Dr. Széll Mártának, aki a pikkelysömörrel kapcsolatos kísérletek megvalósításában lelkes és pótolhatatlan segítséget nyújtott!

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Bottka Sándornak a rengeteg oligonukleotid megszintetizálásáért, amely nemcsak a kémiai szintézist, hanem azokat a jótanácsokat is jelentette, amit az oligonukleotidok tervezésekor figyelembe kell venni.

A TL1A promoterének mélyreható *in silico* tanulmányozásában és analízisében Barta Endre segített – köszönet érte!

Rauch Tibornak külön köszönetet mondok – a napi biztatásért és szakmai tanácsokért, amit a klónozások során nyújtott.

Tiszteletteljes köszönetet mondok Dr. Udvardy Andor Tanár Úrnak, aki a fehérjetisztítás rejtelmeibe próbált beavatni és végülis neki köszönhetően a rekombináns fúziós fehérjéket sikerült természetes formájuknak megfelelően kitisztítani.

Dr. Vizler Csaba gyakorlati szakmai tanácsaival, meglátásaival segítette érlelődni elképzeléseimet – köszönet érte!

Kusz Erzsébet nem csüggedő lelkes segítséget nyújtott a szövettenyésztésben, a rekombináns klónok transzformációjában és a fehérjék biológiai hatásának tanulmányozásában – Köszönet érte!

Köszönetet mondok Határvölgyi Erikának és Kovács Ritának pótolhatatlan és fáradhatatlan segítségükért, amit a klónozásokban és minden laboratóriumi munkában nyújtottak!

Köszönöm Dr. Katona Róbertnek a dolgozatot érintő kritikus megjegyzéseit és tanácsait.

Végül, de nem utolsó sorban Prof. Duda Ernőnek mondok köszönetet, aki helyet biztosított a munka elvégzéséhez, továbbá ötleteimet helyrerakta és mindig az eredeti gondolatokra ösztönzött!

Referenciák

1. Coley, W., *Treatment of inoperable malignant tumors with toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus.* Trans Am Surg Assoc, 1894. **12**: p. 183-212.
2. Aggarwal, B.B., W.J. Kohr, P.E. Hass, B. Moffat, S.A. Spencer, W.J. Henzel, T.S. Bringman, G.E. Nedwin, D.V. Goeddel and R.N. Harkins, *Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization.* J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2345-54.
3. Laing, K.J., T. Wang, J. Zou, J. Holland, S. Hong, N. Bols, I. Hirono, T. Aoki and C.J. Secombes, *Cloning and expression analysis of rainbow trout Oncorhynchus mykiss tumour necrosis factor-alpha.* Eur J Biochem, 2001. **268**(5): p. 1315-22.
4. Rautenschlein, S., A. Subramanian and J.M. Sharma, *Bioactivities of a tumour necrosis-like factor released by chicken macrophages.* Dev Comp Immunol, 1999. **23**(7-8): p. 629-40.
5. Bodmer, J.L., P. Schneider and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily.* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
6. Grooten, J., V. Goossens, B. Vanhaesebroeck and W. Fiers, *Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity.* Cytokine, 1993. **5**(6): p. 546-55.
7. Tsujimoto, M., Y.K. Yip and J. Vilcek, *Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7626-30.
8. Screaton, G.R., X.N. Xu, A.L. Olsen, A.E. Cowper, R. Tan, A.J. McMichael and J.I. Bell, *LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4615-9.
9. Bai, C., B. Connolly, M.L. Metzker, C.A. Hilliard, X. Liu, V. Sandig, A. Soderman, S.M. Galloway, Q. Liu, C.P. Austin, and C.T. Caskey, *Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster.* PNAS, 2000. **97**(3): p. 1230-1235.
10. Hsu, T.-L., Y.-Y. Wu, Y.-C. Chang, C.-Y. Yang, M.-Z. Lai, W.B. Su and S.-L. Hsieh, *Attenuation of Th1 Response in Decoy Receptor 3 Transgenic Mice.* J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5135-5145.
11. Hsu, T.L., Y.C. Chang, S.J. Chen, Y.J. Liu, A.W. Chiu, C.C. Chio, L. Chen and S.L. Hsieh, *Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3.* J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4846-53.
12. Hsu, M.J., W.W. Lin, W.C. Tsao, Y.C. Chang, T.L. Hsu, A.W. Chiu, C.C. Chio and S.L. Hsieh, *Enhanced adhesion of monocytes via reverse signaling triggered by decoy receptor 3.* Exp Cell Res, 2004. **292**(2): p. 241-51.
13. Wiley, S.R., R.G. Goodwin and C.A. Smith, *Reverse signaling via CD30 ligand.* J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3635-9.
14. Domonkos, A., A. Udvardy, L. Laszlo, T. Nagy and E. Duda, *Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF.* Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(3): p. 411-9.
15. Tang, C.H., T.L. Hsu, W.W. Lin, M.Z. Lai, R.S. Yang, S.L. Hsieh and W.M. Fu, *Attenuation of bone mass and increase of osteoclast formation in decoy receptor 3 transgenic mice.* J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2346-54.
16. Yang, C.R., J.H. Wang, S.L. Hsieh, S.M. Wang, T.L. Hsu and W.W. Lin, *Decoy receptor 3 (DcR3) induces osteoclast formation from monocyte/macrophage lineage precursor cells.* Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S97-107.

17. Bridgham, J.T. and A.L. Johnson, *Characterization of chicken TNFR superfamily decoy receptors, DcR3 and osteoprotegerin.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **307**(4): p. 956-961.
18. Chew, L.-J., H. Pan, J. Yu, S. Tian, W.-Q. Huang, J.Y. Zhang, S. Pang and L.-Y. Li, *A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor.* FASEB J., 2002: p. 01-0757fje.
19. Zhai, Y., J. Ni, G.W. Jiang, J. Lu, L. Xing, C. Lincoln, K.C. Carter, F. Janat, D. Kozak, S. Xu, L. Rojas, B.B. Aggarwal, S. Ruben, L.Y. Li, R. Gentz, and G.L. Yu, *VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo.* Faseb J, 1999. **13**(1): p. 181-9.
20. Kim, S. and L. Zhang, *Identification of naturally secreted soluble form of TL1A, a TNF-like cytokine.* J Immunol Methods, 2005. **298**(1-2): p. 1-8.
21. Zhai, Y., J. Yu, L. Iruela-Arispe, W.Q. Huang, Z. Wang, A.J. Hayes, J. Lu, G. Jiang, L. Rojas, M.E. Lippman, J. Ni, G.L. Yu, and L.Y. Li, *Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEGI, a novel cytokine of the TNF superfamily.* Int J Cancer, 1999. **82**(1): p. 131-6.
22. Hou, W., D. Medynski, S. Wu, X. Lin and L.-Y. Li, *VEGI-192, a New Isoform of TNFSF15, Specifically Eliminates Tumor Vascular Endothelial Cells and Suppresses Tumor Growth.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(15): p. 5595-5602.
23. Tian, F., S. Grimaldo, M. Fugita, J. Cutts, N.L. Vujanovic and L.Y. Li, *The endothelial cell-produced antiangiogenic cytokine vascular endothelial growth inhibitor induces dendritic cell maturation.* J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3742-51.
24. Migone, T.S., J. Zhang, X. Luo, L. Zhuang, C. Chen, B. Hu, J.S. Hong, J.W. Perry, S.F. Chen, J.X. Zhou, Y.H. Cho, S. Ullrich, P. Kanakaraj, J. Carrell, E. Boyd, H.S. Olsen, G. Hu, L. Pukac, D. Liu, J. Ni, S. Kim, R. Gentz, P. Feng, P.A. Moore, S.M. Ruben, and P. Wei, *TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator.* Immunity, 2002. **16**(3): p. 479-92.
25. Bamias, G., C. Martin, 3rd, M. Marini, S. Hoang, M. Mishina, W.G. Ross, M.A. Sachedina, C.M. Friel, J. Mize, S.J. Bickston, T.T. Pizarro, P. Wei, and F. Cominelli, *Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease.* J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4868-74.
26. Bamias, G., M. Mishina, M. Nyce, W.G. Ross, G. Kollias, J. Rivera-Nieves, T.T. Pizarro and F. Cominelli, *Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8441-6.
27. Yamazaki, K., D. McGovern, J. Ragoussis, M. Paolucci, H. Butler, D. Jewell, L. Cardon, M. Takazoe, T. Tanaka, T. Ichimori, S. Saito, A. Sekine, A. Iida, A. Takahashi, T. Tsunoda, M. Lathrop, and Y. Nakamura, *Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease.* Hum. Mol. Genet., 2005. **14**(22): p. 3499-3506.
28. Prehn, J.L., L.S. Thomas, C.J. Landers, Q.T. Yu, K.S. Michelsen and S.R. Targan, *The T Cell Costimulator TL1A Is Induced by Fc{gamma}R Signaling in Human Monocytes and Dendritic Cells.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4033-8.
29. Shiozawa, S., A. Hashiramoto, K. Osawa, N. Takami, Y. Miura, M. Kurosaka, S. Yoshiya, K. Koyama, Y. Terashima, S. Abe, N. Nakagawa, Y. Saegusa, Y. Tanaka, K. Shiozawa, and T. Iguchi, *[Susceptibility genes in rheumatoid arthritis: mutation in DR3 gene].* Nippon Rinsho, 2005. **63 Suppl 1**: p. 122-6.
30. Shiozawa, S., K. Komai, H. Kawasaki, M. Sato, M. Nakatsukasa, T. Nakashima, R. Okayama and C. Sakai, *[The molecular genetics of rheumatoid arthritis disease gene].* Nippon Rinsho, 2002. **60**(12): p. 2269-75.

31. Pappu, B.P., A. Borodovsky, T.S. Zheng, X. Yang, P. Wu, X. Dong, S. Weng, B. Browning, M.L. Scott, L. Ma, L. Su, Q. Tian, P. Schneider, R.A. Flavell, C. Dong, and L.C. Burkly, *TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease.* J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1049-62.
32. Lowes, M.A., A.M. Bowcock and J.G. Krueger, *Pathogenesis and therapy of psoriasis.* Nature, 2007. **445**(7130): p. 866-873.
33. Sabat, R., S. Philipp, C. Hoflich, S. Kreutzer, E. Wallace, K. Asadullah, H.-D. Volk, W. Sterry and K. Wolk, *Immunopathogenesis of psoriasis.* Experimental Dermatology, 2007. **16**(10): p. 779-798.
34. Szegedi, A., M. Aleksza, A. Gonda, B. Irinyi, S. Sipka, J. Hunyadi and P. Antal-Szalmas, *Elevated rate of Thelper1 (T(H)1) lymphocytes and serum IFN-gamma levels in psoriatic patients.* Immunol Lett, 2003. **86**(3): p. 277-80.
35. Banno, T., A. Gazel and M. Blumenberg, *Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18973-80.
36. Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka and N. Tanaka, *IRF family of transcription factors as regulators of host defense.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 623-55.
37. Odanagi, M., Y. Kikuchi, T. Yamazaki, T. Kaneko, H. Nakano, K. Tamai, J. Uitto and K. Hanada, *Transcriptional regulation of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene expression by interferon regulatory factor 1 and interferon regulatory factor 2 in normal human epidermal keratinocytes.* Exp Dermatol, 2004. **13**(12): p. 773-9.
38. van der Fits, L., L.I. van der Wel, J.D. Laman, E.P. Prens and M.C. Verschuren, *Psoriatic lesional skin exhibits an aberrant expression pattern of interferon regulatory factor-2 (IRF-2).* J Pathol, 2003. **199**(1): p. 107-14.
39. Lew, W., A.M. Bowcock and J.G. Krueger, *Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and `Type 1' inflammatory gene expression.* Trends in Immunology, 2004. **25**(6): p. 295-305.
40. Morris, K.R., R.D. Lutz, H.S. Choi, T. Kamitani, K. Chmura and E.D. Chan, *Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide.* Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1442-52.
41. Saura, M., C. Zaragoza, C. Bao, A. McMillan and C.J. Lowenstein, *Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthase transcription.* J Mol Biol, 1999. **289**(3): p. 459-71.
42. Pine, R., *Convergence of TNFalpha and IFNgamma signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kappaB promoter element.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(21): p. 4346-54.
43. Zhao, T., L. Yang, Q. Sun, M. Arguello, D.W. Ballard, J. Hiscott and R. Lin, *The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways.* Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 592-600.
44. Xiao, Q., C.Y. Hsu, H. Chen, X. Ma, J. Xu and J.M. Lee, *Characterization of cis-regulatory elements of the vascular endothelial growth inhibitor gene promoter.* Biochem J, 2005. **388**(Pt 3): p. 913-20.
45. Gudjonsson, J.E., A. Johnston, M. Dyson, H. Valdimarsson and J.T. Elder, *Mouse models of psoriasis.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(6): p. 1292-308.
46. Zollner, T.M., H. Renz, F.H. Igney and K. Asadullah, *Animal models of T-cell-mediated skin diseases.* Bioessays, 2004. **26**(6): p. 693-6.
47. Matthews, D., L. Fry, A. Powles, J. Weber, M. McCarthy, E. Fisher, K. Davies and R. Williamson, *Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q.* Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 231-233.

48. Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S.I. Koh, T. Kimura, S.J. Green, and et al., *Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages.* Science, 1994. **263**(5153): p. 1612-5.
49. Jesse, T.L., R. LaChance, M.F. Iademarco and D.C. Dean, *Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where It regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1.* J Cell Biol, 1998. **140**(5): p. 1265-76.
50. Taki, S., T. Sato, K. Ogasawara, T. Fukuda, M. Sato, S. Hida, G. Suzuki, M. Mitsuyama, E.H. Shin, S. Kojima, T. Taniguchi, and Y. Asano, *Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1.* Immunity, 1997. **6**(6): p. 673-9.
51. Sano, S., K.S. Chan, S. Carbajal, J. Clifford, M. Peavey, K. Kiguchi, S. Itami, B.J. Nickoloff and J. DiGiovanni, *Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model.* Nat Med, 2005. **11**(1): p. 43-9.
52. Sato, T., C. Selleri, N.S. Young and J.P. Maciejewski, *Inhibition of interferon regulatory factor-1 expression results in predominance of cell growth stimulatory effects of interferon-gamma due to phosphorylation of Stat1 and Stat3.* Blood, 1997. **90**(12): p. 4749-58.
53. Barta, E., E. Sebestyen, T.B. Palfy, G. Toth, C.P. Ortutay and L. Patthy, *DoOP: Databases of Orthologous Promoters, collections of clusters of orthologous upstream sequences from chordates and plants.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Database issue): p. D86-90.
54. Morgenstern, B., *DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment.* Bioinformatics, 1999. **15**(3): p. 211-8.
55. Kel, A.E., E. Gossling, I. Reuter, E. Cheremushkin, O.V. Kel-Margoulis and E. Wingender, *MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3576-9.
56. Matys, V., E. Fricke, R. Geffers, E. Gossling, M. Haubrock, R. Hehl, K. Hornischer, D. Karas, A.E. Kel, O.V. Kel-Margoulis, D.U. Kloos, S. Land, B. Lewicki-Potapov, H. Michael, R. Munch, I. Reuter, S. Rotert, H. Saxel, M. Scheer, S. Thiele, and E. Wingender, *TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 374-8.
57. Pei, Y., A. Harvey, X.P. Yu, S. Chandrasekhar and K. Thirunavukkarasu, *Differential regulation of cytokine-induced MMP-1 and MMP-13 expression by p38 kinase inhibitors in human chondrosarcoma cells: potential role of Runx2 in mediating p38 effects.* Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(8): p. 749-58.
58. Gobel, T.W., B. Kaspers and M. Stangassinger, *NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken.* Int Immunol, 2001. **13**(6): p. 757-62.
59. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
60. Puskas, L.G., A. Zvara, L. Hackler, Jr., T. Micsik and P. van Hummelen, *Production of bulk amounts of universal RNA for DNA microarrays.* Biotechniques, 2002. **33**(4): p. 898-900, 902, 904.
61. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
62. Abdalla, S.A., H. Horiuchi, S. Furusawa and H. Matsuda, *Molecular cloning and characterization of chicken tumor necrosis factor (TNF)-superfamily ligands, CD30L*

and TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). J Vet Med Sci, 2004. **66**(6): p. 643-50.
63. Takimoto, T., K. Takahashi, K. Sato and Y. Akiba, *Molecular cloning and functional characterizations of chicken TL1A.* Dev Comp Immunol, 2005. **29**: p. 895-905.
64. Tregaskes, C.A., H.L. Glansbeek, A.C. Gill, L.G. Hunt, J. Burnside and J.R. Young, *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate.* Dev Comp Immunol, 2005. **29**(4): p. 361-74.
65. Sick, C., U. Schultz, U. Munster, J. Meier, B. Kaspers and P. Staeheli, *Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes.* J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9749-54.
66. Elser, B., M. Lohoff, S. Kock, M. Giaisi, S. Kirchhoff, P.H. Krammer and M. Li-Weber, *IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2.* Immunity, 2002. **17**(6): p. 703-12.
67. Briken, V., H. Ruffner, U. Schultz, A. Schwarz, L.F. Reis, I. Strehlow, T. Decker and P. Staeheli, *Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 975-82.
68. Lew, D.J., T. Decker, I. Strehlow and J.E. Darnell, *Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(1): p. 182-91.
69. Schwemmle, M., B. Kaspers, A. Irion, P. Staeheli and U. Schultz, *Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines.* J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10304-8.
70. Tan, K.B., J. Harrop, M. Reddy, P. Young, J. Terrett, J. Emery, G. Moore and A. Truneh, *Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells.* Gene, 1997. **204**(1-2): p. 35-46.
71. Jackson, M., S.E. Howie, R. Weller, E. Sabin, J.A. Hunter and R.C. McKenzie, *Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1alpha activation in response to gamma-IFN.* Faseb J, 1999. **13**(3): p. 495-502.
72. Hida, S., K. Ogasawara, K. Sato, M. Abe, H. Takayanagi, T. Yokochi, T. Sato, S. Hirose, T. Shirai, S. Taki, and T. Taniguchi, *CD8+ T Cell-Mediated Skin Disease in Mice Lacking IRF-2, the Transcriptional Attenuator of Interferon-[alpha]/[beta] Signaling.* Immunity, 2000. **13**(5): p. 643-655.
73. Hauser, P.J., D. Agrawal, J. Hackney and W.J. Pledger, *STAT3 activation accompanies keratinocyte differentiation.* Cell Growth Differ, 1998. **9**(10): p. 847-855.
74. Cundy, T., M. Hegde, D. Naot, B. Chong, A. King, R. Wallace, J. Mulley, D.R. Love, J. Seidel, M. Fawkner, T. Banovic, K.E. Callon, A.B. Grey, I.R. Reid, C.A. Middleton-Hardie, and J. Cornish, *A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(18): p. 2119-27.
75. Borysenko, C.W., W.F. Furey and H.C. Blair, *Comparative modeling of TNFRSF25 (DR3) predicts receptor destabilization by a mutation linked to rheumatoid arthritis.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(3): p. 794-9.
76. Cassatella, M.A., G.P. da Silva, I. Tinazzi, F. Facchetti, P. Scapini, F. Calzetti, N. Tamassia, P. Wei, B. Nardelli, V. Roschke, A. Vecchi, A. Mantovani, L.M. Bambara, S.W. Edwards, and A. Carletto, *Soluble TNF-Like Cytokine (TL1A) Production by Immune Complexes Stimulated Monocytes in Rheumatoid Arthritis.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7325-7333.

77. Leonardi, C.L., *Efalizumab in the treatment of psoriasis.* Dermatol Ther, 2004. **17**(5): p. 393-400.
78. Joshi, A., R. Bauer, P. Kuebler, M. White, C. Leddy, P. Compton, M. Garovoy, P. Kwon, P. Walicke and R. Dedrick, *An Overview of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Efalizumab: A Monoclonal Antibody Approved for Use in Psoriasis.* J Clin Pharmacol, 2006. **46**(1): p. 10-20.
79. Hasegawa, M., M. Abe, K. Ohnishi, C. Shoji and O. Ishikawa, *Clinical usefulness of a long-term treatment with an antithyroid drug for psoriasis vulgaris.* J Dermatol, 2004. **31**(10): p. 794-7.
80. Nickoloff, B.J., *Cracking the cytokine code in psoriasis.* Nat Med, 2007. **13**(3): p. 242-4.
81. Terui, T., M. Ozawa and H. Tagami, *Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop.* Exp Dermatol, 2000. **9**(1): p. 1-10.
82. Zhou, X., J.G. Krueger, M.C. Kao, E. Lee, F. Du, A. Menter, W.H. Wong and A.M. Bowcock, *Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array.* Physiol Genomics, 2003. **13**(1): p. 69-78.

A disszertáció témájához kapcsolódó elsőszerzős közlemény

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

Egyéb, nem a disszertáció tárgyához tartozó közlemények

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

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

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

Összefoglaló

A Tumor Nekrózis Faktor (TNF) szupercsalád (Tumor Necrosis Factor Superfamily = TNFSF[11]) a gerincesekben megtalálható pleiotróp hatású molekula család, amely több mint 20 tagot számlál. Megjelenésük a halak valamely ősében jöhetett létre. A gének egész kromoszómális lokuszokra kiterjedő génduplikációval vagy multiplikációval keletkezhettek. Tagjai részt vesznek az immunrendszer működésében, befolyásolják az egyedfejlődést, a sejt- és szöveti proliferációt. A TNF maga a magasabbrendű gerincesekben az egyik legfontosabb immunmodulátor, a család tagjai közül a legjobban jellemzett és jelenleg is kutatott fehérje.

A TL1A molekula (TL1A=TNF Like Factor 1) a TNF szupercsalád tagja, nevét a TNF-fel meglévő nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlósága miatt kapta. Ebből adódóan biológiai feladatát homotrimer formában fejti ki. Három izoformája ismert, amelyek alternatív transzlációs iniciáció révén termelődnek. A legnagyobb mennyiségben termelődő forma humán endotél sejtekben a 251 aminosav hosszú TL1A, amelynek T sejt koindukáló hatása van $CD4^{+}CD25^{+}$ sejtekre. A másik 192 aminosav hosszú izoformát eredetileg érnövekedést gátló hatása révén fedezték föl, de leírták dendritikus sejtekre (DC) ható aktiváló hatását is. A 174 aminosav hosszú izoforma ugyancsak rendelkezik érnövekedést gátó hatással. A csirke genom teljes nukleotid szekvenciájának meghatározásáig a TNF biológiai hatásaihoz hasonló hatású fehérje létezését csak annak hatásai révén tételezték fel. Később ismertté vált a genom és az a tény, hogy meglepő módon csirkében nincs kódolva a TNF ortológ génje és az is kiderült, hogy nagy valószínűséggel ezt a funkciót a TL1A látja el.

A TL1A receptorai közül az egyik (DR3/LARD/TNFRSF25) sejtfelszínhez kötött, a másik (DcR3/TR6) szabadon szekretált formában termelődik. Mindkettőre jellemző, hogy ligandjukat homotrimer formában kötik. Számos emlősben leírták a receptorok jelenlétét és

[11] Valójában ligand család, mivel receptoraik ugyancsak szupercsaládot alkotnak, de a ligandok esetében a nevezéktan a „ligand” szót nem használja, míg a receptorok esetében igen (TNFRSF=Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily)!

vizsgálták hatásukat, hiányukat vagy emberben a túltermelődésük által okozott patológiás változásokat. Így itt meg kell említenünk, hogy több emberi daganatféleségről leírták, hogy óriási mértékben termelnek DcR3 fehérjét, amely jelenségről feltételezik, hogy pontosan a TL1A/VEGI hatását csökkenti, ami viszont az érendotél növekedést lenne hivatott csökkenteni. Ezzel a daganatsejt elősegítheti saját érhalózatának kialakulását. Eddig a TL1A izoformáinak egyikéről sem sikerült megállapítani, hogy a lehetséges receptorok melyikéhez kötődik és hogy milyen jellemzőkkel. Csirkében ezzel szemben csak az vált ismertté, hogy a TL1A expresszálódik a bakteriális poliszacchariddal (LPS) kezelt állat szérumában és hogy rendelkezik a TNF-re jellemző, egér eredetű fibroblaszt apoptózisát kiváltó hatással.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy adatokat szerezzünk a TL1A-nak a csirkeporc fejlődésében betöltött szerepéről, illetve ennek segítségével emberi autoimmun megbetegedésekről nyerjünk további információkat. Választásunk ezért a reumatoid artritiszre és a pikkelysömörre esett, mivel az első esetben feltételeztük, hogy a porcsejtek hozzájárulhatnak a helyi gyulladás kialakulásában. A pikkelysömör esetében pedig a keratinocitákra jellemző túlfokozott osztódás hívta fel arra a lehetőségre a figyelmet, hogy ilyen körülmények között termelődhet több TL1A!

Kísérleteinket két csoportba oszthatjuk. Az elsőben a 14,5 napos csirke embrió végtag növekedési porckorongjából származó cDNS-ből megklónoztuk majd bakteriális és bakulovírusos rendszerben sikeresen expresszáltattuk a csirke TL1A fehérjét. Immunhisztokémiai módszerekkel igazoltuk a fehérje nagyfokú hasonlóságát emlős fajok TL1A fehérjéivel, továbbá igazoltuk a fehérje termelődését a porckorongban. Ugyancsak kimutattuk a csirke DcR3 receptor cDNS-ének jelenlétét. A csirke TL1A gén promoteréből kiindulva, majd azt összehasonlítva 5 másik faj TL1A génjének hasonló régiójával felfedeztünk egy mások által eddig le nem írt transzkripciós kötőhelyet, amely megfelel az Interferon Regulált Faktor (Interferon Regulated Factor =IRF) konszenzus nukleotid

sorrendjének. Ez a kísérleti rendszer rámutat a TL1A lehetséges szerepére a porcból kiinduló endokondrális csontosodásban, s a DcR3 jelenléte ezt megerősítheti, mivel a DcR3-ról magasabbrendű gerincesekben leírták differenciálódásban betöltött szerepét (makrofág eredetű sejtből képes oszteoklasztot differenciáltatni).

A második kísérleti megközelítésben pikkelysömörös betegekből származó mintákban igazoltuk a TL1A cDNS fokozott jelenlétét a tünetekkel érintett területeken, továbbá igazoltuk az irodalomból ismert IRF1/IRF2 faktorokra vonatkozó eltéréseket. A TL1A cDNS különböző citokinekkel fokozható jelenlétét sikerült kimutatni humán SW1353 sejtvonalban, ami megfelel az irodalomban fellelhető adatoknak. A második megközelítésnek a jelentősége abban áll, hogy mindkét vizsgált betegségmodell ún. T sejt mediálta kórkép és a TL1A immunológiai szerepét is egy Th1 típusú kórképben, a Crohn betegségben tisztázták. Az eredmények rámutatnak arra a lehetséges magyarázatra, hogy a TL1A/DR3 páros okozó tényező és nem csak okozati jelenség, mint ahogy ezt a legtöbb közlemény állítja. Bár célmolekulaként is emlegetik őket, tehát semlegesítésüktől ezekben a kórképekben jelentős javulás várható, mégis talán korai ezt kijelenteni a hipotézisek megfelelő állatmodellen történő igazolása nélkül. A $DR3^{-/-}$ egérben a kísérletes artritiszt, a $TL1A^{-/-}$ egérben pedig a kísérletes szklerózis multiplex-et nem lehet kiváltani, tehát a TL1A/DR3 ligand/receptor páros nagy valószínűséggel fontos szerepet tölt be ezeknek a kórképeknek a kialakításában.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy kísérleti adataink egy kutatási szempontból nagy érdeklődésre számot tartó területről származnak és megfelelnek azoknak a tendenciáknak, amit mások eredményei sugallnak. A pikkelysömör és a TL1A kapcsolatáról a szakirodalomban ez idáig nem közöltek hasonló eredményeket. Eredményeink hozzájárulhatnak a gyulladásos kórképek, ezen belül a pikkelysömör kialakulásában szerepet játszó folyamatok mélyebb megértéséhez.

Summary

Vertebrate's Tumor Necrosis Factor Superfamily consists of more then twenty members with pleiotropic functions. Evolutionary appearance of the family may happened in an ancestor fish. Members of the family could have been generated by gene multiplication or duplication spanning whole chromosomal loci. They participate in immune processes, effect ontogenesis and cell- and tissue differentiation, as well. TNF itself is one of the most important immunomodulator proteins in higher vertebrates and the most completely characterized and currently still studied member of the family.

TL1A molecule (TL1A= TNF Like Factor 1) is a member of TNF Superfamily, which gained its name after having related structure and function to TNF. According to its relationship with TNF, TL1A exerts its biological functions in a trimerized form. There are three isoforms described, which are produced by alternate translation initiation. The most abundantly produced form is the 251 amino acid long TL1A, which has coinducer activity on CD4+CD25+ T cells. Other isoform consisting of 192 amino acid was originally described as a vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), however, it was reported to have activating effect on dendritic cells (DC). The isoform with 174 amino acid has also vascular endothelial growth inhibiting activity. The existence of a protein in chicken having TNF-like biological activity was presumed based on its biological effects. Later the genome sequence came to be public and as well as the surprising fact that a TNF orthologue is not encoded in chicken, however the function is fulfilled by TL1A.

One of the receptors of TL1A is membrane bound (DR3/LARD/TNFRSF25), the other one (DcR3/TR6) is circulating in a soluble, secreted form. Both of them forms trimers and bind ligand in a trimerized complex. Receptors have been described in several mammalians and they have been studied in pathological cases as overexpression or deficiency. Tumours producing increased amount of DcR3 have been described in an immunoprivileged status and

good vascularization, perhaps due to TL1A/VEGI binding activity. However, there are no experimental evidence supporting the isoforms' receptor identity and features, yet! Besides above described knowledge, there are newly published data suggesting that TL1A in chicken is produced by LPS (bacterial polysaccharide) induction in the blood and featured with biological (apoptotic) effects on mouse fibroblast cells, similar to TNF.

Aims of our study were to gain information on the role of TL1A in chicken cartilage development and data on its presence in human autoimmune diseases. In selecting available models our choice came to be rheumatoid arthritis and psoriasis. Cartilage tissue is involved in inflammatory processes of the joints. Also, abnormal keratinocyte proliferation is one of the important feature in the epidermal layer psoriatic of the skin.

Our experiments can be divided into two groups. First, we have cloned the TL1A/VEGI cDNA from the cartilage growth disc of a 14.5 days old chicken embryo. The cDNA was expressed in bacterial and baculoviral expression systems, purified to homogenity and checked in Western blotting experiments by commercially available multispecies specific polyclonal antibody. The same antibody was applied to sections from the same aged embryo in immunohistochemical experiments, proving TL1A expression in developing cartilage tissue. Presence of DcR3 cDNA in developing cartilage was also proved. A consensus Interferon Regulated Factor (IRF) binding site has been found by comparing the upstream activator regions of TL1A genes originated from five different species. Results of this experimental approach may show a possible role of TL1A in endochondral ossification, because DcR3 effects on differentiation of macrophage cell line into osteoclasts has been approved in higher mammals.

In the second experimental study we have shown the expression of TL1A cDNA in psoriatic lesional keratinocytes and proved the existence of imbalance in cDNA levels of Interferon Regulated Factors IRF1/IRF2 in the psoriatic epidermal and dermal keratinocytes.

This latter data is in congruence with data in the literature. TL1A cDNA inducibilty was also showed in human chondrosarcoma cell line SW1353, the model of rheumatoid arthritis. The importance of these results is that both of the diseases are Th1 mediated pathological processes, similarly to Crohn-disease, in which the role of TL1A was first published. The receptor (DR3) and ligand (TL1A) are mentioned as a pharmacological target by most of the papers, so by their neutralisation a remarkable amelioration can be achieved, however, there are no experimental animal model results published, yet! Supporting data are available on $DR3^{-/-}$ mouse where artificial arthritis can not be evoked and on $TL1A^{-/-}$ mouse, where experimental encephalomyelitis, a widely accepted model of multiple sclerosis can not be generated.

Summarizing our results we could state, that these are in accordance with data already published in a highly competitive field of science. Also, we generated novel data on genes expressed by psoriatic keratinocytes which give addendum to existing ones.