

**Allergia genomika: ismert és teljes genomszűréssel
kiemelt asthmára hajlamosító gének vizsgálata
emberben és transzgenikus állatmodellen valamint
európai összevetésre alkalmas hazai asthma biobank
létrehozása (44707.sz. kutatás)**

TS2 2003-2005.

**BESZÁMOLÓ ZÁRÓJELENTÉS
44707.**

Témavezető: Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Résztevők:

dr. Tulassay Tivadar	SE I. sz. Gyerekgyógyászati Klinika
dr. Magyar Pál	SE Pulmonológiai Klinika
dr. Szalai Csaba	Heim Pál Kórház
dr. Losonczy György	SE Pulmonológiai Klinika
dr. Müller Veronika	SE Pulmonológiai Klinika
dr. Buzás Edit	SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet
dr. Dérfalvi Beáta	SE I. sz. Gyerekgyógyászati Klinika
Kozma Gergely	SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet (PhD hallg.)

Jelen beszámolóban részletezett munka alapján PhD fokozatot szerzett

2004. június 30-án

Keszei Márton	SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet (PhD hallg.)
---------------	--

*Jelen beszámolóban is említett munka alapján meghívást kapott a Harvard Egyetemre,
jelenleg Bostonban dolgozik*

A jelentés során az elért eredményeket az eredeti munkaterv pontjainak sorrendjében tárgyaljuk.

ELSŐ RÉSZ

Eredeti terv: Öt már klónozott és annotált, de funkciójában még kevésbé ismert, asthmával kapcsolatos gének genetikai variánsait és expresszióját vizsgáljuk.

Eredmények:

1. T-bet, GATA-3 illetve az SCCA-1,2 gének esetében, szemben néhány irodalmi adattal a hazai populációban (n= 350) nem sikerült szignifikáns korrelációt találnunk a gén variánsok frekvenciája és az asztma között. A látszólag negatív eredményt hozó munka „nem-várt” eredménye viszont az eddig ismeretlen funkciójú GATA-2 (A 9 tagú GATA család egyik tagja) több genetikai változatának kimutatása. Minthogy ez a gén első (publikálás alatt) eredményeink szerint a melanoma angiogenezisét szabályozza, a funkciót érintő (enhancer) mutációk leírása jelentős eredménynek látszik a tumorterápia targetek kijelölése szempontjából.

2. A galectin-1 (Gal-1) szint ovalbuminnal immunizált kontroll és hisztaminhiányos (HDC knock-out) egerek tüdejében és bronchoalveoláris mosófolyadékában (BAL) másképpen változik. Tüdőszövet esetében csak vad (kontroll) egerekben a BAL sejtekben (makrofágok) csak a hisztaminhiányos állatokban nő. Makrofág sejtvonalakban LPS hatására ugyancsak nő a galectin szint, de csak, ha a hisztaminszintézist előzőleg gátolták (FMH). Mindez a galectin-1 szerepét igazolja az asztma patogenezisében

A publikációs listán megadottakon kívül két további közlemény készül.

További terv: A későbbiekben a galectin géncsalád szerepére fogunk koncentrálni asztmában

MÁSODIK RÉSZ

Eredeti terv: kiválasztott „candidate” gének pontmutációinak (SNP) vizsgálata

1. A CCR5 Δ 32 mutáció gyakoriságában a nemzetközi tudományos irodalomban közölt adatokkal ellentétben nem találtunk különbséget asztmás, allergiás és kontroll gyermekcsoportokban.

2. A kemokin MCP-1 szabályozó régiójában található -2518G mutáció szignifikánsan gyakrabban fordult elő asztmás gyermekekben, mint nem-asztmás atópiás, illetve kontroll gyermekekben (34.4% vs 20.9% ,illetve 21,1%). A G homozigótáknál az aszma tünetei súlyosabbak voltak, és a vér eozinophil számuk is szignifikánsan magasabb volt. Nem találtunk ilyen összefüggéseket a RANTES promoter polimorfimuszok esetében.

3. Számos, a nemzetközi szakirodalomban szereplő allergia/asztma megbetegedésekkel kapcsolatba hozott polimorfizmust vizsgáltunk magyar populációban. Ilyenek például az SUMO, CCR2, GATA-3, CC16, GSTM, GSTT, Fc ϵ RI- β Ile181Leu, T-bet, és a TNF α -308A asztmában és allergiában, az MCP-1 -2518A, a RANTES -403G, -28G atópiás ekcéma/dermatitis szindrómában. A vizsgált polimorfizmusok közül egyiknél sem lehetett igazolni, hogy a magyar populációban fokozott hajlamot okoz a vizsgált megbetegedésekre.

4. A TNF α -308A allélja jelentősen megnöveli annak az esélyét, hogy a Chlamydia pneumoniae (CP) fertőzött gyermekekben asztma alakuljon ki (Odds ratio (OR)=3.52(1.52-7.53); P=0.005). Az MCP-1 -2518G polimorfizmusa önmagában növeli az asztma kialakulásának az esélyét, azonban a fertőzés ezt az esélyt nem módosítja. A krónikus CP fertőzött RANTES -403A hordozóknak sokkal nagyobb esélyük van, hogy asztmásak legyenek, összehasonlítva őket a G/G (vad) homozigóta, hasonló fertőzöttségű gyermekekkel (OR=4.32(1.19-15.56)); P = 0.03).

További terv: A Beckman Coulter SNPstream (Orchid rendszer) készülékkel

(Simmelweis Egyetem-Richter Gedeon Gyógyszergyár közös nagyteljesítményű (3 millió SNP/24 óra) genotipizáló rendszere a SE Genetikai-, Sejt és Immunbiológiai Intézetben) az emberi genom teljes területén szeretnénk vizsgálni az SNP-k hatását asztma tüneteire. A készülék adta lehetőségeket kihasználva 2006. márciusától mintegy 2000 gént gént és génenként több (10-150) SNP-t tervezünk vizsgálni. Megfelelő bioinformatikai háttérrel vizsgálni fogjuk a gén-gén kölcsönhatások szerepét asztmában. Tervezzük továbbá, hogy olyan genom területen, amelyet több genom szűrés is megjelölt, mint asztmában szerepet

játszó régiót, de még nem sikerült egyértelműen tisztázni, hogy milyen genomvariációk játszhatnak szerepet a betegségben, a HapMap projekt és az SNP adatbank adatait felhasználva SNP-szűrést végzünk. A munka kezdeteként a 11q13 régióban mintegy 400 gént vizsgálunk, hiszen ezt a génszakaszt több független genomszűrésen is asztma-régióként jelölték meg, eddig nem sikerült egyértelműen bizonyítani egyik polimorfizmusnak, vagy génnek a szerepét sem.

A publikációs listán megadottakon kívül egy cikk nyomdában van és két további közlemény készül.

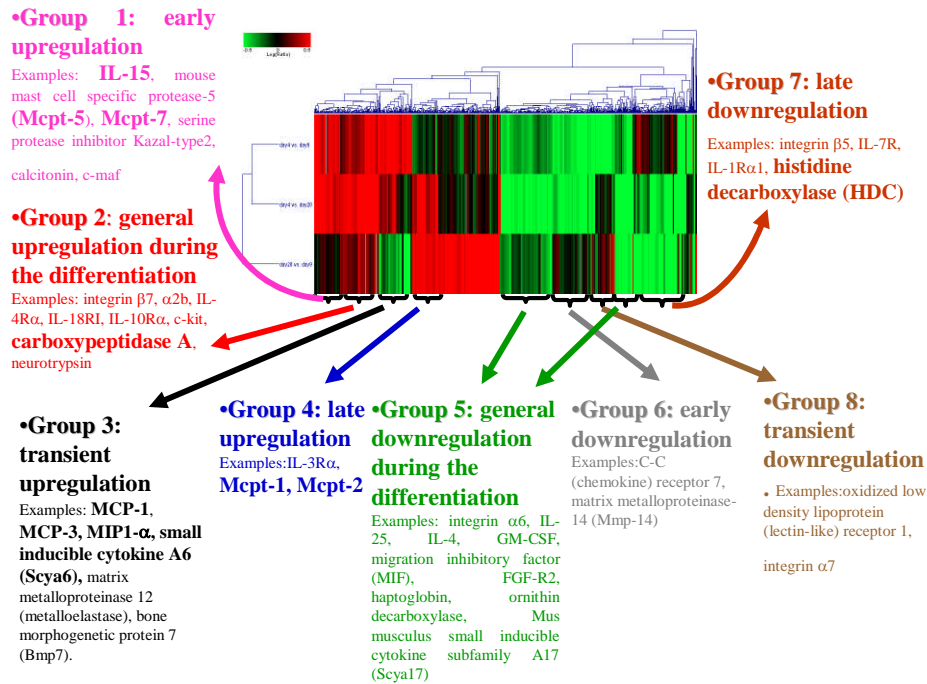
HARMADIK RÉSZ

Eredeti terv: Génexpressziós mintázat vizsgálata cDNS chip-ek segítségével nagyszámú emberi gént tartalmazó chip-en

Az expressziós array vizsgálatokat a GVOP pályázaton elnyert Agilent gén chip rendszeren hajtottuk végre, mely a SE Genetikai-, Sejt és Immunbiológiai Intézet tulajdonában van és 2006-tól a budapesti régió egyik genomikai core-facility-jeként funkcionál.

Munkánk korai tervezése során azt a döntést hoztuk, hogy az expressziós kutatást az allergiás patofiziológiás folyamat egyik legfontosabb sejtjén, a hízósejteken hajtuk végre.

I. A mukozális hízósejtek in vitro differenciálódásának nyomon követése DNS-microarray módszerrel (1. ábra)



Célkitűzés:

A hízósejtek az azonnali típusú túlérzékenységi reakciókban betöltött fontos szerepük révén váltak ismertté, de azóta más folyamatokban is igazolódott jelentőségük, mint pl. a baktériumok és férgek elleni immunválaszban. Egérben a hízósejtek két alapvető típusát lehet elkülöníteni, melyek mind szöveti lokalizációjukban, mind szekréciós tulajdonságaikban eltérnek egymástól: a kötőszöveti- és a mukozális hízósejteket. Ez utóbbi típusra jellemző – többek között - az Mcpt1 és Mcpt2 kimázok expressziója.

A hízósejtek granulumai különböző mediátorokat tartalmaznak: hisztamin, proteoglikánokat (heparin, kondroitin-szulfát), IL-16-ot, TNF- α -át, proteázokat, melyek a sejtek stimulálása során a környezetbe kerülnek. A hízósejtek által termelt proteázok két alapvető csoportba sorolhatók: triptázok és kimázok.

A mukozális hízósejtek a tüdőben, valamint a bélrendszer mukóza rétegében találhatóak, s feltételezések szerint a paraziták elleni immunvédekezésben jelentősek. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a mukóza epitélsejtjei által konstitutívan szecernált TGF- β mellett IL-9, SCF és IL-3 szükséges érett formájuk in vitro előállításához.

Trichinella spiralis féregfertőzés hatására a bél mukóza epitélrétegében a hízósejtek felgyülemelése (hiperplázia) figyelhető meg. A fertőzés kezdete után 5-10 nappal emelkedett Mcpt-1 és Mcpt-2 szint figyelhető meg a vérben. Hízósejt-, vagy Mcpt-1-deficiens egerekben megfigyelték, hogy a parazitától való megszabadulás késleltetett, illetve nem történik meg.

Ezen irodalmi adatok alapján feltételezhető volt, hogy a hízósejtek lokális differenciálódása során létezik egy átmeneti stádium, mely jellegzetes funkcióval rendelkezik.

Kísérleti módszerek:

Az izolált RNS mennyiségi és minőségi vizsgálata Agilent Bionalyzer-en, az RNA Nano kit segítségével történt. Csak $>8,0$ RIN minőségű RNS-t használtunk fel (150-150 ng-ból indult a lineáris amplifikáció). A lineáris amplifikáció után kapott cDNS-t Cy3-vel vagy Cy5-vel jelölt cRNS-sé írtuk vissza ($>8,0$ pmol festék/ μ g DNS), majd 1-1 μ g jelölt cRNS-t hibridizáltattunk Agilent mouse 22K oligonucleotide (Toxicology) microarray-ek felszínére. A 17 órás hibridizáció után SSPE-vel mostunk az ózon károsító hatásának kivédése érdekében. A szkennelt microarray-eket az Agilent Feature Extraction szoftver segítségével analizáltuk. A kapott adatok elsődleges minőségi kontrollja után a további statisztikai analízis a Rosetta Luminator program segítségével történt.

A pusztán a véletlen folytán kapott szignifikáns expressziós különbségek (fals pozitív találatok) számának minimalizálása érdekében szigorú statisztikai paraméterekkel dolgoztunk, és csak azokat az expressziós különbségeket fogadtuk el, melyek expressziós különbsége legalább 1,8-szeres volt $p < 0,0001$ szinten. Az adatok csoportosításához a hierarchikus csoportosítási eljárást használtuk euklideszi távolságméréssel. A kapott expressziós mintázathoz biológiailag értelmezhető „idealizált” mintázatokot rendeltünk (pl: korai expressziós emelkedés: d20/d4 és d9/d4 összehasonlításokban emelkedés, a d20/d9 esetén satgnálás figyelhető meg).

A vizsgálatok során 2-2 biológiai párhuzamost, valamint festékcserével technikai párhuzamosokat is alkalmaztunk a megbízhatóság növelése érdekében. Előbb a technikai, majd a biológiai párhuzamosokat összegeztük a Rosetta Luminatorral.

A valós idejű PCR-t a TaqMan rendszerrel végeztük.

Eredmények:

1. Az alapkoncepció helyességét bizonyítja, hogy a gének expressziós dinamikájukat tekintve csoportokba sorolhatók, léteznek korán fel, korán le, későn fel regulálódott géneket tartalmazó csoportok, ami jelzi, hogy a mukozális hízósejtek differenciálódása diszkontinuus lépésekben történik.

2. Néhány érdekes kiemelt példa:

Késői up-regulált gének: Mcpt1 és 2,(ezek jellegzetesek az érett mukozális hízósejtekre)
Korai up-regulált gének Mcpt5 és 7 (triptáz). A T memória fenotípus fentartásáért felelős IL-15 a korai gének közé tartozik. A Carboxypeptidase A génexpresszió végig emelkedik és a hisztamintermelésért felelős HDC gén a kései időben leregulálódó gének közé tartozik. Valósidejű PCR-relsikerült alátámasztani a microarray eredményeinek megbízhatóságát.

3. Külön említést érdemel egy géncsoport, mely átmeneti expressziós emelkedéssel jellemezhető a fejlődés 9. napja környékén. Feltűnő, hogy ez a csoport igen sok kemokint tartalmaz (MCP1, MCP3, Scya6, stb) –ez felveti annak a lehetőségét, hogy a kemokinek autokrin vagy parakrin szabályozó faktorokként szerepelhetnek a mukozális hízósejtek differenciálódásában. Valóban, irodalmi adatok szerint a humán hízósejtek in vitro érése során a kemokin receptorok expressziója jellegzetesen változik. A microarray adatokat az MCP-1 valósidejű PCR-vizsgálata is megerősítette.

A továbbiakban a hízósejtekre jellemző génekre irányult a figyelmünk, ezért csak azon géneket vizsgáltuk, melyek esetében a d20/d4 összehasonlításban szignifikáns emelkedés volt kimutatható.

II. Az egér hízósejtek proteáz és proteáz inhibitor expressziójának összehasonlító elemzése emberben, a mukozális hízósejtekre nézve új HtrA1 szerin proteáz azonosítása

Célkitűzés

Míthogy a hízósejtek egyik legfontosabb jellegzetessége gazdag proteáztartalmuk, ezért a proteázok és inhibitorok expressziós mintázatát részletesebben is jellemeztük.

Célunk volt olyan proteázokat találni, amelyek hízósejtben való előfordulásáról kevés adat áll rendelkezésre, valamint hogy ezen proteázok éretlen, mukozális, ionomicinnel (Ca-ionofór) stimulált mukozális, valamint kötőszöveti típusú hízósejtekben való expresszióját összehasonlítsuk.

A DNS-microarray adatok közül olyan géneket válogattunk ki, melyek:

- expressziója magasnak bizonyult,
- valamint szignifikánsan nagy expressziós emelkedést mutattak a két szélső időpont (d20/d4) összehasonlításakor.

Ezen megfontolások alapján az általunk elsőként talált alábbi 4 proteázzal, illetve proteáz inhibitorral dolgoztunk:

- Tmprss8 (Tmsp-1) (Disp): új proteáz, szerepe még nem tisztázott.
- Tpsg1 (tryptase gamma1): hízósejtekre jellemző transzmembrán-triptáz. A légúti hiperreaktivitást serkenti IL-13/IL-4 receptoron keresztül.
- Spink2 (serine protease inhibitor Kazal-type 2): akrozin-tripszin inhibitor. A genitális traktusra jellemző.
- HtrA1 (Prss11): a szerin-proteáz család tagja, szerepet játszik az extracelluláris mátrix bontásában, valamint gátolja a TGF- β család egyes tagjainak hatását.

Kísérleti módszerek:

A nem végdifferenciálódott mukozális hízósejtek ("éretlenek") előállításakor a tápoldat csak SCF-et és IL-3-at tartalmazott. Ezen sejtek alciánkék-safraninnal kékre festődtek.

A kötőszöveti hízósejteket a peritoneum kimosásával, majd a CD117-re nézve pozitív sejtek kétszeres mágneses szeparálásával nyertük. A kapott hízósejtek pirosra festődtek alciánkék-safraninnal, továbbá a FACS-analízis igazolta a tisztaságot (B220: B-sejtekre, CD11b: monocitákra/makrofágokra marker).

A humán hízósejteket az I. sz. Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinika Neonatális Intenzív Centrumával kollaborációban állítottuk elő. A levett köldökvért Ficoll-on fracionáltuk, majd a CD34+ őssejteket mágnesesen szeparáltuk. A sejteket SCF, IL-6 és lizofoszfatisav jelenlétében 5 hétig tenyésztettük, majd CD117 alapján ismét szeparáltunk. A sejt kultúra tisztaságát FACS-szal (CD117) és toluidinkék festéssel ellenőriztük. A hízósejteket további 8 napig TGF- β jelenlétében/hiányában tenyésztettük, majd RNS-t, ill. Fehérjét izoláltunk.

Felhasznált módszerek: microarray, FACS, valósídejű PCR, Western-blot, az intézetünkben beállított HtrA1-re nézve specifikus ELISA, mágneses izoláció.

Eredmények:

1. A proteázok és inhibitorok összehasonlító elemzése. Ennek során számos új gén annotálást végeztük el.
2. Egy új, a mukozális hízósejtekre nézve specifikus proteáz vizsgálata. Elsőként mutattuk ki a HtrA1 szerin proteáz jelentőségét hízósejtekben.
3. A HtrA1 vizsgálata valósídejű PCR-rel kötőszöveti hízósejtekben: eredményeink alapján az expressziója mind az éretlen, mind pedig a kötőszöveti hízósejtekben nagyon alacsony szintű.

4. A HtrA1 kimutatható mind valósidejű PCR-rel, mind pedig Western-blottal a köldökvérből differenciáltatott humán hízósejtekben is, és szintje mind mRNS, mind pedig fehérjeszinten TGF- β kezelés hatására megemelkedik.
5. HtrA1-re nézve specifikus, az intézetünkben beállított ELISA alapján a humán stimulálatlan hízósejtek felülúszójában a HtrA1 koncentrációja a detektálási határérték közelében mozgott (1-2 ng/ml).
6. Jelenleg arra vagyunk kíváncsiak, hogy degranuláció után a hízósejtek felülúszójában megemelkedik-e a HtrA1 koncentráció, azaz ez a proteáz vajon tárolódik-e a granulomokban. Azt is vizsgáljuk továbbá, hogy a HtrA1-nek milyen hatása van az LA4-es egér tüdő epiteliális sejtvonalra nézve (a tüdő és a légutak mukozális epitéliumában ugyanis az asztma során megemelkedik a mukozális hízósejtek száma).
7. A kísérleti eredmények alapján létezik egy jól elkülöníthető köztes érési stadium (9. nap), mely Mcpt5 és 7-et, valamint Tpsg-t és Spink2-t már expresszál, HtrA1-et és Mcpt1-et azonban még nem. Ez azt jelenti, hogy ez a fejlődési stadium jellegzetes és körülírható proteáz/inhibitor expresszióval jellemezhető. Továbbá, jellegzetessége még a magas szintű és széles spektrumú kemokin expresszió, mely alapján feltételezhető, hogy a köztes mukozális hízósejt érési stadium különleges szereppel bír a féregfertőzés, illetve az asztma során a többi sejtípus (granulociták, limfociták, monociták) helyszínre történő odavonzásában).

III. A TGF- β I serkenti a human MC(T) sejtek kialakulását. A TGF- β I hatásának génexpressziós analízise

Célkitűzés:

A humán hízósejteket két alapvető csoportba lehet besorolni: az MC(TC) típus kimázt, cathepsin G-t és triptázt tartalmaz, elsősorban a bőrben és a tüdő, valamint a bélrendszer szubmukóza rétegében található; az MC(T) sejtek csak triptázt expresszálnak, és a tüdő, légutak és a bélrendszer mukozális epitélirétegében fordulnak elő nagy számban. Az MC(T) szöveti lokalizációja alapján tehát megfeleltethető az egér mukozális hízósejt típusának.

Köldökvérből, in vitro IL-6 és SCF jelenlétében éretlen hízósejtek állíthatók elő (morfológiai jellegzetességeik alapján). Érett humán hízósejtek kialakulását kokultúrákban figyelték meg: a hízósejt-fibroblaszt együtt-tenyésztés az MC(TC), míg a hízósejt-légúti epitelsejtek kölcsönhatása MC(T) típushoz vezetett.

Mint ahogy az egér mukozális hízósejtek kialakulásához a TGF- β I szükséges, ezért feltételeztük, hogy ez a citokin serkenti a humán MC(T) sejtek érését is. Továbbá, a TGF- β I által indukált géneexpressziós változásokat is elemeztük.

Módszerek:

1. DNS-microarray: 4-4 biológiai párhuzamos összehasonlítása, mindig a kezeletlent a hozzá tartozó TGF- β I-gyel kezelttel hasonlítottuk (2 ng/ml, 8 napon keresztül). Az egyik összehasonlításnál festékcserét is alkalmaztunk (technikai párhuzamos).
2. Valósídejű PCR
3. Western-blot
4. FACS

Eredmények:

1. Mind a kontroll, mind pedig a kezelt hízósejt kultúránkban csak a triptázt tudtuk kimutatni, a kimázt nem (FACS), mely megerősíti, hogy nem differenciálódtak MC(TC) sejtek. Ez összhangban áll azzal az irodalmi adattal, hogy viszonylag alacsony SCF-koncentráció (kb. 50 ng/ml, mi 40 ng/ml-t használtunk) az MC(T) típusnak kedvez.
2. TGF- β I hatására a CD117 expresszió csökkent, mely igazolja, hogy a TGF- β I hatásos volt.
3. A párhuzamos microarray összehasonlítások esetében magas súlyozott korrelációs együttható értékeket kaptunk, mely a mérések reprodukálhatóságát igazolja.
4. A biológiai párhuzamosok és a gének csoportosítása után világos, hogy a legtöbb gén konzekvensen viselkedett valamennyi összehasonlítás során (csak azon géneket csoportosítottuk, melyek legalább egy összehasonlításban, $p < 0,0001$ szinten $> 2,0$ expressziós eltérést mutattak).
5. A legnagyobb expressziós eltérést mutató géneket listáztattuk.
6. Ezek alapján a kiválasztott gének, melyek expressziós eltéréseinek igazolása valósídejű PCR-rel, Western-blottal, FACS-szal folyamatban van:
 - Cathepsin G, a leukotrién szintézis két kulcsfontosságú enzimje –leregulálódnak, mely azt bizonyítja, hogy a TGF- β I tényleg stimulálja az MC(T) sejtek terminális érését.

- BAMBI: sejtfelszíni pszudo-TGF- β receptor, a TGF- β hatását gátolja, a negative visszacsatolásban lehet szerepe.
- GDF-15: a makrofágok funkcióit gátolja
- TIM-3: a Th1-es sejtek felszínén van jelen, az immunválasz irányának központi szabályozója.
- Sejtfelszíni adhéziós molekulák: CD49d, CD44.

További terv: Új, hízósejtek proteázgének kiemelése, a géntermékek szerepének azonosítása és szerepének vizsgálata asztmában és a hízósejt-tumor kölcsönhatás (pl. matrix fellazítás, metasztázis) során.

Funkcionálisan aktív proteázok farmakogenomikai analízise, új gyógyszertergetek kijelölése.

A publikációs listán megadottakon kívül három további közlemény készül.

NEGYEDIK RÉSZ

Eredeti terv: a magyar asthma biobank létrehozása

A magyar biobank rendszert (www.biobank.hu) az Országos Genomikai Konzorcium keretében Dr. Falus András hozta létre és koordinálja (segítői: Dr. Vásárhelyi Barna –SE I. sz. Gyerekgyógyászati Klinika és Dr. Bencsik Péter, PhD hallgató)

A Magyar Biobank létrehozásával számos nemzetközi szervezet (pl. P3G) tagjai lett az ország. Ennek során az Egyesült Királyság biobankjával (www.dna-network.ac.uk) való kapcsolatfelvétel eredményeképpen további 2300 DNS mintához jutottunk. Ez a kohort szám már jelentős nagy allergia/asztma genomikai kutatást tesz lehetővé minden magyar kutató számára.

Az asztma biobank állapota: jelenleg 564 magyarországi asztmás gyerektől van DNS-ünk, vagy Guthrie-n beszárított vércseppünk. Közelítőleg ezer kontroll DNS minta áll rendelkezésünkre.

Eredmény: létrehoztuk az országos asztma biobankot.

További terv: Nagy nemzetközi multicenter vizsgálatokban való aktív részvétel biztosítása a bioban révén. Publikus hazai honlap létrehozása. Csatlakozás (folyamatban) az ALLERGOM nemzetközi hálózathoz (<http://www.allergome.org>).

ÖTÖDIK RÉSZ

Eredeti terv: egérmodellen asztma-rezisztenciáért felelős gének kiválasztása

Eredmények:

1. Egér asztma modellt állítottunk be ovalbumin immunizálással és inhalációval.
2. Az ovalbumin indukált asztma-modell a „vad”, BALB/c egereken jelentősen megnövelte a porlasztott methacholinra adott légúti érzékenységet a kontroll csoporthoz képest, míg a HDC KO egereken szinte semmiféle légúti túlérzékenység nem volt megfigyelhető.
3. A tüdő szövettani vizsgálata szerint, az asztmára jellemző perivascularis és peribronchialis eosinophil infiltráció csak a vad, asztmás egerekben volt egyértelmű, az asztmásított KO állatok tüdő-metszeteit általános szövettani festés után a kontroll állatok metszeteire hasonlítottak, tehát nem vagy alig mutattak eosinophil beszűrődést.
4. OVA-indukálta légúti gyulladásban összesen 92 gén expresszióváltozását követtük nyomon vad és HDC KO egerekben. A tanulmányozott 23 kemokin gén közül 18 volt detektálható a tüdőben, melyek közül 10-nek az expressziója csökkent, vagy növekedett összehasonlítva az OVA-val, illetve a PBS-sel kezelt egereket. A vad egerekben 5 kemokin expressziója mutatott szignifikáns növekedést OVA hatására: eotaxin, eotaxin-2, IP-10, MCP-1, MIG; 5 mutatott expressziócsökkenést: 6-Ckine, MIP-1 α , PF4, SDF-1 α , SDF-2; míg a HDC KO állatokban 6 kemokin expressziója növekedett: IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , PF4, SDF-2; és kettőnek az expressziója csökkent: 6-Ckine, SDF-1 α . Az OVA kezelt vad és a HDC KO állatokat összehasonlítva, 5 kemokin expressziója különbözött szignifikánsan: a vad egerek

tüdejében az eotaxin, az eotaxin-2 és az MCP-3 mRNS szintje volt magasabb, míg az SDF-2 és a MIG expressziója a HDC KO állatokban volt magasabb.

5. A többi tanulmányozott gén közül 6 citokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, INF- γ), 3 citokinreceptor (IL-1R, IL-9R IL-10R), és egy kemokinreceptor (CCR1) expressziója növekedett a vad OVA kezelt egerek tüdejében. Az OVA-kezelt HDC KO állatokban 2 citokin (IL-1 β , and IL-4) és egy citokin receptor (IL-10R) mRNS szintje emelkedett szignifikánsan. A vad és a HDC KO állatok összesen 7 gén expressziójában különböztek szignifikánsan: IL-5, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, és INF- γ expressziója magasabb volt a vad állatokban, az IL-10 expressziója magasabb volt a HDC KO állatokban.
6. galectin-1 kísérletek: lásd ELSŐ RÉSZ

Ezen munka alapján írta és védte meg PhD értekezését Kozma Gergely *summa cum laudae* minősítéssel.

További terv: farmakogenetikai vizsgálatok az egér asztmamodellen, szabadalmi tervek teljes vizsgálati workflow kialakítására az egérrendszeren.

A publikációs listán megadottakon kívül egy további közlemény készül.

HATODIK RÉSZ

Eredeti terv: asthma-rezisztenciával kapcsolatba hozható egérgének emberi megfelelőit szeretnénk klónozni és jellemezni lehetséges, új gyógyszer célpontok kiemelése érdekében..

I. Lásd HARMADIK RÉSZ II. és III. pontja, ahol az egér mukozális hízósejt génexpressziós eredmények alapján emberi köldökzsínórvérből differenciáltatott hízósejtek proteázgénjeit sikerült felismerni (eredményeket itt nem ismételjük meg, részletesen lásd HARMADIK RÉSZ-ben). Ezek szerepének analízise (pl. tumor-hízósejt kölcsönhatás) egy 2006-tól PhD-jét kezdő fiatal munkája lesz.

Ezen eredmények alapján további tervek:

1. Melanoma modellen (egér és emberi), melyhez humán hízósejtek szükségesek, az általunk azonosított proteázgének funkcionális vizsgálata (Cél: Tumor-hízósejt kölcsönhatás).
2. A DNS-microarray adatok alapján a hízósejtekben detektált, és még kevésbé ismert sejtfelszíni receptorokon át megvalósuló új hízósejt-aktiválási mechanizmusok vizsgálata. Ilyen gének (G-fehérjéhez kötött felszíni receptorok): Gpr43, Gpr44, Gpr35, UDP-glükóz receptor. (Cél: új betegség“pathway”-ek azonosítása tumorban és eredeti gyógyszertargetek felismerése.)

II. Vizsgáltuk, hogy van-e különbség a szérumban MCP-1 szintben az asztmás és az egészséges gyerekek között, valamint a -2518 polimorfizmus befolyásolja-e a szérumban MCP-1 szintet? Eredményeink alapján az asztmásokban szignifikánsan alacsonyabb volt az MCP-1 szint, mint az egészségesekben. Az MCP-1 -2518 genotípus nem befolyásolta a szérumban MCP-1 szintet egyik csoportban sem.

Az MBL-nek leírták 3 gyakori polimorfizmusát, melyek megzavarják a fehérje háromdimenziós aktív szerkezetének a kialakulását. Mivel ezek domináns negatív mutációk, hatásukra, az MBL szérumban aktivitása a heterozigóta hordozókban 10%-ra csökken, míg homozigótákban kimutathatatlan lesz. Összehasonlítottuk a 3 polimorfizmus gyakoriságát az asztmás és az egészséges csoportban, és nem találtunk szignifikáns különbséget se az egyes genotípusok, se a mutáns/vad összehasonlítás vonatkozásában. Az asztmások között szignifikánsan több olyan gyermeket találtunk, akik hordoztak legalább egy MBL mutációt és pozitívak voltak CP ellenes IgG-re, mint a kontroll csoportban. Az IgA és IgM-re pozitív gyermekek között nem találtunk ilyen összefüggést. Ezután a vizsgált gyermekeket fertőzöttségük szerint csoportosítottuk, és összehasonlítottuk az asztmás és a kontroll csoportokat az MBL státuszuk alapján. A genotípusok eloszlása szignifikánsan különbözött egymástól az asztmás és a kontroll csoport között akik pozitívak voltak CP ellenes IgG-re, IgA-ra, vagy mindkettőre. A legnagyobb különbség a két csoport között akkor volt, ha azokat a gyerekeket vettük figyelembe, akik mind IgG-re, mind IgA-ra pozitívak voltak. A két antitest együttes előfordulása ismétlődő, krónikus CP fertőzésekre utal. Ezekben az esetekben az MBL mutációt hordozók aránya szignifikánsan magasabb volt az asztmás gyerekek között, mint a hasonló fertőzöttség állapotú kontroll gyerekek között. Ezek az eredmények arra

utalnak, hogy azoknak a krónikusan és ismétlődően CP-vel fertőzött gyerekeknek, akik hordozóik valamelyik hibás MBL allélnak szignifikánsan nagyobb esélyük van arra, hogy asztmásak legyenek, mint a mutációt nem hordozóknak.

További terv: Bioinformatikai eszközökkel (GeneSpring softver) az új gének mellett új génhálózatok kiemelése és csatolása egyes asztma endofenotípusokhoz. A megközelítés lényege a CGH (comparative genome hybridisation), SNP- és expressziós-, valamint a bibliográfiai adatbázisok komplex analízise.

A publikációs listán megadottakon kívül egy további közlemény készül.

TOVÁBBI, EREDETILEG NEM TERVEZETT TEVÉKENYSÉG

RNS interferencia kísérletek állatmodellen

Egér MCP-1 gén ellen siRNS-eket szintetizáltattunk. Jelenleg epitélsejtekbe transzfektáljuk őket és vizsgáljuk hatásukat. A szintetizáltatott siRNS-ek közül kiválasztottuk azt amelyik a legnagyobb mértékben csökkentette az MCP-1 expressziót. Továbbiakban az így kiválasztott siRNS-t in vivo kísérletekben szeretnénk felhasználni. Ki akarunk egy olyan módszert dolgozni, amelyikkel az siRNS-t be tudjuk juttatni az egér tüdejébe, és ott csökkenteni tudjuk vele az MCP-1 génexpressziót. Az így kidolgozott módszerrel azt szeretnénk vizsgálni, hogy befolyásolni tudjuk-e az allergiás légúti gyulladás tüneteit siRNS-sel egér asztma-modellünkön.

A microarray génexpresszió mérést szeretnénk alkalmazni az siRNS kísérleteinkben. Arra lennénk kíváncsiak, hogy asztma modellünkben hogyan befolyásolja az siRNS kezelés az asztma tüneteit és a tüdőben a génexpressziót? Az előzőekben említett MCP-1 mellett más gének in vivo módosítását és annak hatását is szeretnénk vizsgálni.

További terv: Beállítjuk az siRNS technikát olyan asztma-kapcsolt génekre, melyek in vivo módosítása egerekben reményt jelent egy későbbi emberi asztma génterápiás protokoll kidolgozására.

A első eredmények alapján egy közlemény készül.

Munkánkat és az eredményekből származó további terveket a 2. ábrán foglaljuk össze.

2. ábra Az eredmények és a lehetséges trendek összefoglalása

