

# A HISZTAMIN, MINT A TH2 IRÁNYÚ IMMUNREGULÁCIÓ RÉSZÉ; POSZTGENOMIKUS KILÁTÁSOK A METABOLOMIKA IRÁNYÁBAN

Falus András

az MTA levelező tagja, egyetemi tanár, intézetveze-  
tő igazgató, Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt-  
és Immunbiológiai Intézet – faland@dgci.sote.hu

Kozma Gergely

PhD hallgató, Semmelweis Egyetem  
Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai  
Intézet

Wiener Zoltán

PhD hallgató, Semmelweis Egyetem Genetikai,  
Sejt- és Immunbiológiai Intézet –  
wieszol@dgci.sote.hu

Hegyesi Hargita

PhD, egyetemi adjunktus, Semmelweis Egyetem  
Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet –  
hegyhar@dgci.sote.hu

Pós Zoltán

PhD hallgató, tudományos segédmunkatárs,  
Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és  
Immunbiológiai Intézet – poszol@dgci.sote.hu

Szalai Csaba

PhD, tudományos munkatárs, Heim Pál Kórház  
Központi Laboratórium –  
szalai@heimpalkorhaz.hu

Buzás Edit

az orvostudomány kandidátusa, egyetemi docens,  
Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és  
Immunbiológiai Intézet – buzedi@dgci.sote.hu

## Összefoglalás

Az immunválasz szabályozásának számos, részben feltárt mechanizmusa közül a szabályozó T limfociták határozzák meg döntően az immunválasz mértékét és irányultságát. Ezek a limfociták citokintartalmuk alapján is csoportosíthatók, és főleg sejt- (Th1) vagy inkább antitest- (Th2) közvetített irányban hatnak az immunválasz kimenetére. Ez a helyi folyamatokban döntő reguláció igen jelentős úgy az élettani immunválaszban, mint egyes, az immunreguláció eltéréseivel kapcsolatos betegségekben. A Th1/Th2 polarizációra számos biológiailag jelentős hatású

vegyület hat, ezek egyike az igen kis molekulatömegű (112 dalton) hisztamin. Irodalmi adatok és saját eredmények arra utalnak, hogy a hisztamin az immunregulációt Th2 irányba tolja el. Ezt a feltételezést a genetikailag hisztaminhiányossá tett egerek immunválaszának tanulmányozása is megerősítette. Kiderült, hogy a hisztamin hiányában (tehát a Th2 irányú hatás kiesésével) a sejt-közvetített immunreakciók (pl. kontakt szenzitivitás) fokozódik, jelentősen emelkedik a Th1-jellegű (pl. interferon-g, IL-12) és csökken a Th2-típusú (pl. IL-10, IL-4, IL-9, IL-13) citokinek bioszintézise. Az eredmények tük-

rében egyrészt kiderült, hogy a hisztaminhiányos, genetikailag modifikált egerek modellként szolgálnak a Th1/Th2 egyensúly eltolódásával járó élettani állapotok (pl. terhesség), illetve betegségek (pl. autoimmun kórképek, krónikus bélgyulladások, allergia, tumorkok) esetén. Másrészt, egyértelműen bizonyítást nyert a hisztamin Th2 irányban ható szerepe a Th1/Th2 egyensúlyban, tehát az, hogy ennek a kis molekulatömegű és a szervezetben gyakorlatilag mindenütt előforduló biogén aminnak jelentős lokális hatása van az immunfolyamatok szabályozásában. Ez a tény új lehetőségeket nyit meg a Th1/Th2 egyensúlyi eltéréseket mutató betegségek gyógykezelésében, továbbá a széles körben alkalmazott hisztamin-antagonisták esetleges mellékhatásaira hívja fel a figyelmet.

### *Bevezetés*

Az immunválasz mechanizmusait tekintve fajlagos, szerzett (adaptív) és veleszületett (természetes) komponensekből áll. Előbbit, az ún. „specifikus” immunválaszt antigénreceptorokat hordozó limfociták és egyes oldékony termékeik (antitestek a B limfociták esetében) képviselik. A T és B limfociták hatalmas készletét, tehát az immunválasz fajlagos sokféleségét géntárendeződés és más diverzitást emelő molekuláris folyamatok biztosítják, majd a periférián az antigének, illetve azok peptidjei klonálisan szelektálják és osztódásra készítik a B és T sejteket, amelyek így az immunválasz specifikus részét képviselik. A veleszületett immunválaszban rendkívül sokféle sejtet (pl. falósejtek, dendritikus sejtek, granulociták, hízósejtek, endotél sejtek) és ezek receptorait, oldékony molekulát (pl. komplementfehérjék, citokinek, transzmitterek, hormonok, intracelluláris jelmolekulák) ismerünk, és ezek az adaptív immunválasszal sokszorosan kapcsolt komplex kapcsolatrendszerrel jelentenek.

A szervezetben óriási számban található kis molekulású, ám nagy hatású anyagok,

a peptidektől a monoszaharidokig, a zsírsavaktól a prosztanoidokig, az oxigén gyököktől (pl. NO) a vitaminokig. Ezek képezik a *metabolomot*, amely „közegként” szolgál a nagyobb méretű, biológiai relevanciájú anyagok, a fehérjék, nukleinsavak, lipidek és a poliszaharidok működése során. A biogén aminok is a metabolom részét képezik, zömük aminosavak dekarboxilálásával keletkezik. Ide tartozik többek között a jelentős biológiai hatású putrescin, a spermin/spermidin, a kadaverin, illetve a hisztamin is.

A hisztamin (b-iminazol etilamin) majd száz éve ismerjük (Dale, 1910), hatását elsősorban az allergiával hozzák kapcsolatba. Ez nem véletlen, hiszen az ún. azonnali típusú túlérzékenységekben a robbanásszerűen a szövetközi térbe kerülő hisztamin igen gyorsan értágulatot, a simaizmok kontrakcióját idézi elő, amelyek vezető tünetei az allergiás reakcióknak. A markáns élettani és kóreltani reakció hátterében az áll, hogy az adaptív (IgE), illetve a természetes immunválasz (pl. egyes komplementfragmensek) közreműködésével bazofil festődésű hízósejtekből és bazofil granulocitákból lökészerűen nagy mennyiségű hisztamin kerül a sejtek közötti térbe. Az allergiás folyamatok mellett hamar kiderült, hogy a hisztamin alapvető szerepet játszik a gyomor sósavtermelésében is, a gyomor- és nyombélfekély (tüneti) kezelésének egyik leghatásosabb eszköze a hisztaminreceptorok (lásd később) gátlása megfelelő antagonistá vegyületekkel. Később kiderült, hogy egyes, a köztiagyban található és többek között az étvágy szabályozásért felelős idegsejtek transzmittere is a hisztamin. Az elmúlt huszonöt évben (részben saját munkánk alapján is) kiderült, hogy a hisztamin hat az immunválasz számos sejt és szolubilis komponensére is. A 90-es évek egyik váratlan, nagy jelentőségű felismerése volt az, hogy a hisztamin receptorközvetített úton erősen hat a sejtosztódásra, lényegében minden ismert élettani (embriónális fejlődés,

hematopoezis, regeneráció) és patológiás (tumoros burjánzás) folyamatban a hisztamin szabályozó szereppel rendelkezik.

A hisztamin bioszintézisét egyetlen enzim a hisztiidin dekarboxiláz (HDC) végzi, ez az enzim jelen van a hízósejtokban, a bazofil granulocitákban, a gyomor egyes sejtjeiben, az idegsejtokban, kisebb mértékben számos, az immunválaszban szereplő sejtben és kisebb-nagyobb mértékben lényegében minden osztódó sejtben. Egyes daganatokban (pl. melanoma-festékes bőrrák) a HDC mennyisége és aktivitása igen magas lehet. A hisztamin lebontását két enzim a diamono-oxidáz, illetve a hisztamin-N-metil transzferáz végzi.

A hisztamin a sejtek membránján receptorokhoz kapcsolódik; a tudomány 2002 végén négyféle, G-proteinnel kapcsolatos sejt-felszíni hisztaminreceptort ismer immár molekulárisan klónozott formában is, ezek sejtenkénti száma, sejteloszlása és jelátviteli mechanizmusa eltérő. Felvetődött egy ötödik, sejtben belüli, citokróm p450-szerű hisztaminreceptor létezésének lehetősége is, a bizonyítékok itt csupán indirektsek még.

A szakirodalmi és korábbi saját adataink egyértelműen arra utalnak, hogy a hisztamin szerepet játszik a helyi immunszabályozásban, mégpedig úgy, hogy azt Th2 irányban tolja el.

Munkánk egy része jelenleg elsősorban egy olyan, kanadai és japán kollaborációval létrehozott génmodifikált egértörzs fenotípusának kutatására irányul, amelyből az embrionális őssejt szintjén kiütöttük (*knock-out*), illetve inaktívtá tettük a HDC gént. A genetikailag hisztaminhiányossá tett egér immunválaszát vizsgálva egyértelműen kiderült, hogy a hisztaminhiányos egér (amely esetén nem működik a Th2 hatás) immunregulációs sajátosságai Th1 irányba vannak eltolva, szemben a teljesen hasonló genetikai háttérrel rendelkező, de ép HDC-t tartalmazó egerekkel. Ez a több oldalról is bizonyított tény megerősíti, hogy a hisztamin, amely egy ele-

me a metabolomnak, a Th1/Th2 immunreguláció egyik jelentős tényezője.

Az alkalmazott kísérletes módszereket nem részletezve, azokról csak egy-egy tájékoztató mondatot írunk.

A HDC-génkiütött (HDC<sup>-/-</sup>) egér előállításához az egerek őssejtjeibe vittük be a működésképtelenné tett HDC gént (Hegyi et al, 2001; Ohtsu et al, 2001). A HDC-kiütött egerek szövetei nem tartalmaztak hisztamin, tehát valóban a HDC a hisztamin termelésért felelős egyetlen enzim. Mivel a táplálékban adott, exogén hisztamin lényeges mértékben felszívódik, tehát a kísérletek során a hisztaminhiány vizsgálatához hisztaminmentes tápot kellett alkalmaznunk. Különleges sajátossága e modellnek, hogy a fentiek miatt a teljes hisztaminhiány (és annak következményei) így a normális egértáp hisztaminhiányos tápra való kicserélésével indítható, így kívülről történő, „kondicionált knock-out” valósítható meg.

A HDC<sup>-/-</sup> és a normál (HDC<sup>+/+</sup>) egereket azonos körülmények között vizsgáltuk minden kísérleti rendszerben.

A citokineket génexpressziós (mRNSt) és fehérjeszinten analizáltuk. Az egerek hízósejtjeit csontvelőből differenciáltattuk megfelelő faktorok jelenlétében (Wiener et al, 2002) és aktiválódásukat egy citokinnel (IL-9) értük el.

Kísérletes asztma-modellt úgy hoztunk létre, hogy a tojásalbuminnal előérzékenyített egereket annak belélegeztetésével provokáltuk, ezt követően elemeztük a tüdőszövet sejtösszetételét és citokintartalmát (Kozma et al, 2003, megjelenés alatt).

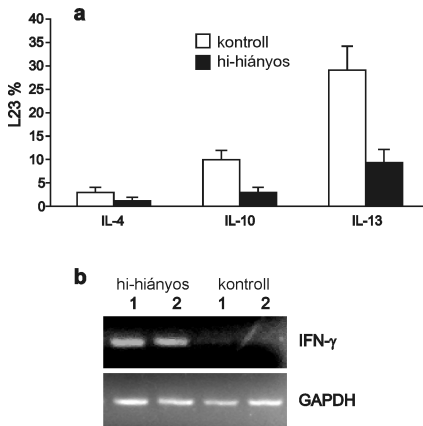
### *Eredmények*

1. A hízósejtokban IL-9 indukcióval számos citokin termelődése provokálható. Egyértelmű azonban, hogy a hisztaminhiányos egerekben sokkal kevesebb IL-4, IL-10 és IL-13 keletkezik, mint a genetikailag nem módosított, de amúgy teljesen hasonló társaikban

(1/a ábra). Valamennyi mért citokin a Th2 csoportba tartozik, tehát ezek termelődése a HDC<sup>-/-</sup> állatokban csökkent.

2. Az egerek tojásalbuminnal való oltása nyomán, a HDC<sup>-/-</sup> egérben a lépből származó limfocitákban sokszorososan magasabb az interferon- $\gamma$  génexpresszió, mint a teljesen azonosan tartott és kezelt kontrollállatok sejteiben, utóbbiakban külső indukció nélkül, gyakorlatilag elhanyagolható mennyiségben található. (1/b ábra). Minthogy az IFN- $\gamma$  az egyik legmarkánsabb Th1 citokin, ezúttal is egyértelmű a Th1 „shift”.

3. A hisztaminmentes és a kontrolllegyekben kísérletes asztmát kiváltva megállapítható volt, hogy hisztamin hiányában az asztma (tehát pl. eosinofil sejtek bevándorlása a tüdőbe) jelentősen enyhébb volt (az allergia tipikusan Th2-jellegű betegség!), a tüdőszövetben sokkal kevesebb eosinofil granulocita található, és a citokinek összeté-

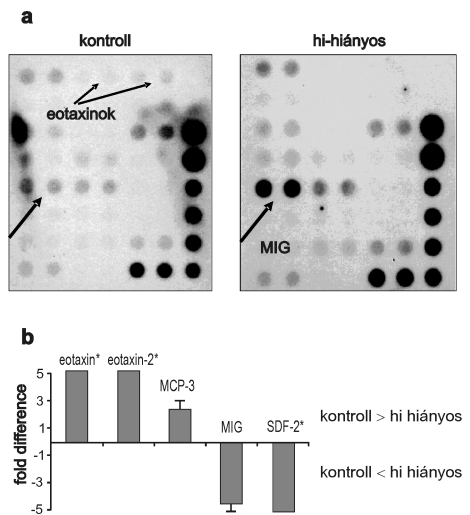


1. ábra, a • A hízósejtek Th2 citokinszintje (IL-4, IL-10 és IL-13) genetikailag hisztaminhiányossá tett egerekben (hi-hiányos) jóval (statistikailag szignifikánsan, a számítást itt nem részletezzük) alacsonyabb mint a (hasonló genetikai háttérű, de ép hisztamintermeléssel rendelkező) kontrollállatokban. b • A lép limfociták alapszintű interferon  $\gamma$  génexpressziója genetikailag hisztaminhiányossá tett egerekben jelentősen magasabb, mint a kontrollállatokban.

tele ezúttal is jelentős Th1 túlsúlyt mutatott. A tüdőszövet génexpressziós mintázatát *microarray* technikával is vizsgáltuk, itt is olyan citokinek (pl. MIG) illetve kemokinek felszaporodása volt kimutatható, amelyek Th1 irányba tolják az immunegyensúlyt (2/a és 2/b ábra).

### Az eredmények megbeszélése

Számos korábbi eredmény sugallja, hogy a testszerte szinte mindenhol termelődő hisztamin a helyi immunregulációs egyensúlyt Th2 irányba tolja el, illetve módosítja a lokális gyulladás paramétereit. Korábbi eredményeink szerint a hisztamin egyértelműen gátolja az interferon termelődését (Horváth et al, 1999), illetve annak hatását (Falus et al,



2. ábra, a • Citokin és kemokin-génexpresszió kontroll- és genetikailag hisztaminhiányossá tett egerekben *microarray* technikával (kiemelt képrészlet a *Superarray* analizisből). Az eotaxin hiánya az eosinofil granulociták alacsony számát, a MIG citokin magas szintje pedig a Th1 eltolódást magyarázza a HDC *knock-out* állatokban. b • A legjelentősebben változó citokinek és kemokinek változásai kontroll- és genetikailag hisztaminhiányossá tett egerekben (hi-hiányos). Az eredményeket relatív egységekben mutatjuk.

1990). Hasonló következtetésre jutottak azok a kutatók (Elenkov et al, 1998; Van der Pouw Kraan et al, 1998), akik hisztamin hatására az IL-10 szint emelkedését, és az IL-12 termelés csökkenését regisztrálták. Sokan találták úgy, hogy a hisztamin gátolja az NK sejtek működését és a sejtközvetített T sejt immunválaszt, a késői típusú túlérzékenységet. Munkacsoportunk egyéb tevékenysége az emberi festékes bőrökben található hatalmas mennyiségű hisztamin biológiai jelentőségének megértésére irányul (Falus et al, 2001). Kiderült, hogy a melanoma – sajnálatos módon – számos megoldást „használ” a környéki immunválasz csökkentésére, ami a tumor túlélését biztosítja (Horváth et al, 2000; Heninger et al, 2000; Lázár et al, 2002). Ezek egyike éppen a közvetlen környezetbe kibocsátott hisztamin, amely gátolja a környéki IFN- $\gamma$ -t termelő T és NK sejtek működését.

Jelen kutatásaink a genetikailag módosított egereken egyértelműen megerősítik ezeket a nézeteket: hisztamin hiányában az egerek Th1/Th2 immunregulációs egyensúlya a Th1 irány felé mozdul el. A cikkben bemutatott adatok mellett a dr. Szekeres Júlia professzorral és dr. Pár Gabriellával (Pécsi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Intézet) együtt végzett kísérleteink is magasabb IFN-g termelődést mutatnak a terhes HDC<sup>-/-</sup> egér nőstényekben, amit fokozott embrióvesztés kísér.

Hasonló következtetés vonható le azokból a dr. Bene Lászlóval (Péterfy Kórház, Budapest) közös kutatásokból, ahol kísérletes bélgyulladás kiváltásával és a betegség immunpatológiai jellemzésével kísérletezünk a hisztaminhiányos állaton. Minthogy a megfelelő emberi betegségcsalád (*inflammatory bowel disease* – IBD) jellegzetes Th1 irányultságot mutat, az előző adatok fényében nem is meglepő, hogy hisztaminmentes egereink bélszöveve gyakorlatilag nem tartalmaz IL-10-et, szemben a hasonlóan kezelt

kontrollerekével, ahol a hisztamintartalom normális.

Eredményeink közvetlen jelentősége az általánosan előforduló hisztamin immunregulációs jelentőségének bizonyítása egy transzgenikus egérmodellen.

*Konklúzió: posztgenomikai gondolatok, metabolomika*

A két másik, közvetett, de talán hasonló súlyú konklúzió közül az első az lehet, hogy tudomásul kell vennünk: az elsősorban allergiás és gyomor-bélrendszeri (pl. fekély) betegségekre alkalmazott, a hisztamin kötődését gátló gyógyszerek hatására az immunreguláció lokális egyensúlya megváltozhat. Ez a téma megéri a további kutatást, és jelentős segítség lehet újabb, hatékonyabb és esetenként pontosabban ható, az esetleges mellékhatások tekintetében veszélytelenebb gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésében.

A másik következtetés, hogy egy egészen kis molekulásúlyú hatóanyag, a 112 daltonos hisztamin jelenléte, illetve hiánya „hegyeket mozgathat meg”. Éppen ez a metabolomika lényege.

Korunk legjelentősebb biológiai-orvosi áttörése a genomika, illetve proteomika, ez a teljesen újszerű gondolkodási paradigma, amely összes génünk megismerésével és azonosításával genom-alapú biológiát jelent. A genetikailag determinált makromolekulák (nukleinsavak, fehérjék) világának mozaikossága, „összhangzattanának” vizsgálata komplex, globális szemléletet és elképesztően nagy teljesítményű technikák bevezetését jelenti, amelyek a bioinformatikával kiegészülve átformálják világképünket a biológiai anyag, a betegség és egészség kérdéseiben.

A metabolom az a milliő, ahol a genom-proteom szereplői megnyilvánulnak. Véleményünk szerint a hisztaminkutatás igazi folyamánya az az üzenet, hogy ezen anyag hiányának jelentőségéből, a HDC<sup>-/-</sup> egerek

fenotípusának elemzéséből olyan nem várt eredmények születnek, amelyek a kis molekulatömegű biológiai anyagok jelentőségének teljesebb megértéséhez vezet.

Szerzők szerint előrevetíthető, hogy a tudományos futrológia részeként a metabo-

lomika lesz a genomika korszakának új szakasza, amelyhez – ebben az értelemben – a hisztamin kutatás is hozzájárul.

Kulcsszavak: *hisztamin, immunválasz, immunreguláció, Th2*

#### IRODALOM

- Dale, H. H. – Laidlaw, P. P. (1910): The Physiological Action of Beta-imidazolylethylamine. *The Journal of Physiology (London)*. 41. 318-44.
- Elenkov, Ilija J. – Webster, E. – Papanicolaou, D. A. – Fleisher, T. A. – Chrousos, George P. – Wilder, Ronald L. (1998): Histamine Potently Suppresses Human IL-12 and Stimulates IL-10 Production via H2 Receptors. *The Journal of Immunology*. 161. 2586-2593.
- Falus András – Rokita, H. – Walcz, E. – Merétey K. (1990): Hormonal Regulation of Complement Biosynthesis in Human Cell Lines. II. Upregulation of the Biosynthesis of Complement Components C3, Factor B and C1 Inhibitor By Interleukin-1 and Interleukin-6 in Human Hepatoma Cell Line. *Molecular Immunology*. 27. 197-203.
- Falus András – Hegyesi H. – Lázár-Molnár E. – Pósz Z. – László V. – Darvas Zs. (2001): Paracrine and Autocrine Interactions in Melanoma; Histamine Is a Relevant Player in Local Regulation. *Trends in Immunology (formerly Immunology Today)*—. 22. 648–652.— IF: 17.13
- Hegyi Krisztina – Fülöp A. K. – Tóth S. – Buzás E. – Watanabe, T. – Ohtsu, H. – Ichikawa, A. – Nagy A. – Falus A. (2001): Histamine Deficiency— Suppresses Murine Haptoglobin Production and Modifies Hepatic Protein Tyrosine Phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58, 850-854.
- Héninger Erika – Falus A. – Darvas Zs. – Szalai Cs. – Zsinkó M. – Radvány Zs. – Hegyesi H. (2000): Interferon (IFN)  $\alpha$  and IFN $\gamma$  Inhibit Histidine-decarboxylase Expression and Cell Proliferation of the HT168 Human Melanoma Cell Line. *Inflammation Research*. 49. 393-397.
- Horváth B. V. – Szalai Cs. – Mándi Y. – László V. – Radvány Z. – Darvas Zs. – Falus A. (1999): Histamine and Histamin-Receptor Antagonists Modify Gene Expression and Biosynthesis— of Interferon  $\gamma$  in Peripheral Human Blood Mononuclear Cells and in CD19 Depleted Cell Subsets. *Immunology Letters*. 70. 95-99.
- Horváth Barbara – Héninger E. – Hegyesi H. – Lázár E. – Radvány Zs. – Szalai Cs. – Darvas Zs. – Falus A. (2000):— Reciprocal Inhibitory Interactions Between Interferon  $\gamma$  and Histamine in Melanoma. *Inflammation Research*. 49. S1. 27-28.
- Kozma Gergely T. – Losonczy G. – Keszei M. – Komlósi Zs. – Buzás E. – Pállinger É. – Appel J. – Szabó T. – Magyar P. – Falus A. – Szalai Cs. (2003): Histamine Deficiency in Gene-Targeted Mice Strongly Reduces Antigen-Induced Airway Hyperresponsiveness, Eosinophilia and Allergen Specific Ige. *The Journal of Immunology*. (megjelenés alatt)
- Lázár-Molnár E. – Hegyesi H. – Pállinger É. – Tóth S. – Fitzsimons, C. – Cricco, G. – Martin, G. – Bergoc, R. – Darvas Zs. – Rivera, E. – Falus A. (2002): Inhibition of Human Primary Melanoma Cell Proliferation by Histamine is Enhanced by Interleukin-6. *European Journal of Clinical Investigation*. 32, 10), 743-749.
- Ohtsu, Hiroshi – Tanaka, S. – Terui, T. – Hori, Y. – Makabe-Kobayashi, Y. – Pejler G. — Tchougounova, E. – Hellman, L. – Gertsenstein, M. – Hirasawa, N. – Sakurai, E. – Buzás E. – Kovács P. – Csaba Gy. – Kittel A. – Okada, M. – Hara, M. – Mar L. – Numayama-Tsuruta, K. – Ishigaki-Suzuki, S. – Ohuchi, K. – Ichikawa, A. – Falus A. – Watanabe, T. – Nagy A. (2001): Mice Lacking Histidine Decarboxylase Exhibit Abnormal Mast Cells. *FEBS Letters*. 502, 1-2. 53-56.
- Van der Pouw Kraan, Tineke C. T. M. – Sniijders, A. – Boeije, L. C. M. – de Groot, E. R. – Alewijnse, A. E. – Leurs, R. – Aarden, L. A.— (1998): Histamine Inhibits the Production of Interleukin-12 through Interaction with H2 Receptors. *The Journal of Clinical Investigation*. 102, 10. 1866-1873.
- Wiener Zoltán – Andrásfalvy M. – Pállinger É. – Kovács P. – Szalai Cs. – Erdei A. – Tóth S. – Nagy A. – Falus A. (2002): Bone Marrow-derived Mast Cell Differentiation Strongly Reduced in Histidine Decarboxylase Knockout, Histamine-free Mice. *International Immunology*, 14, 4), 381-387.