

# DOKTORI DISSZERTÁCIÓ ÖSSZEFOGLALÁSA

Doktori disszertáció címe: The role of cytokines and pattern-recognition receptors in inflammatory gastrointestinal diseases: clinical and *in vitro* investigations

(A citokinek és a mintázatfelismerő receptorok szerepe a gasztrointesztinális rendszer gyulladásos megbetegedéseiben: klinikai és *in vitro* vizsgálatok)

Doktorjelölt neve: Hofner Péter

Doktori iskola: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola / Orvosi Mikrobiológia program

Témavezető: Prof. Dr. Mándi Yvette

A mintázatfelismerő receptorok (Pattern recognition receptors, PRRs) a mikroorganizmusok jellemző molekuláris mintázatait (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), valamint a fertőzés során felszabaduló endogén veszély szignálokat ismerik fel. A mintázatfelismerő receptorok két típusát emlősökben a membránkötött Toll-like receptorok (TLRs) és a citoplazmatikus NOD (Nucleotide-binding oligomerisation domain) proteinek képezik. Az ezek által közvetített szignálok gyulladásos citokinek, kemokinek termelődéséhez és gyulladásos sejtek aktiválásához vezetnek. Mind a citokintermelés, mind a receptor-expresszió többszintű kontroll alatt áll, amely magyarázhatja az egyéni válaszreakciók közötti különbségeket. A citokineket, ill. a receptorokat kódoló géneken megjelenő egynukleotidos polimorfizmusok (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) többek között a termelődő fehérje mennyiségét, aminosav szekvenciáját, biológiai funkcióját is meghatározhatják.

Vizsgálataink célja az *interleukin-8 (IL-8)*, *TLR4* és a *CARD4/Nod1* gének egynukleotidos polimorfizmusainak vizsgálata volt olyan gasztroenterológiai kórképekben, ahol a szervezet természetes immunválasza nagymértékben determinálhatja a betegség súlyosságát. Így *H. pylori*-asszociált gastritiszben és duodenális fekélyben, Crohn-betegségben, valamint akut pankreatitiszben szenvedő betegek genotipizálását végeztük el. Ezenkívül a HMGB-1 jelentőségét vizsgáltuk akut pankreatitiszben, ill. *in vitro* bakteriális fertőzést követően.

A *Cag* patogenitási szigetet hordozó *H. pylori* baktériumok négyes típusú szekréción rendszerük segítségével a CagA proteint és peptidoglikán fragmentumokat juttatnak a gyomornyálkahártya epitélisejtjeibe. Utóbbiakat a citoplazmatikus NOD1 és NOD2 receptorok ismerik fel. Mind a CagA fehérje hatására, mind a NOD receptoroktól kiinduló jelátviteli folyamatok eredményeként, az NF-

$\kappa$ B transzkripciós faktor aktiválásán keresztül IL-8 szabadul fel. A TLR4 szerepe a *H. pylori* érzékelésében nem pontosan tisztázott.

Az IL-8 egy olyan neutrofil granulocita aktiváló és kemoattraktáns hatású citokin, melynek akut pankreatitiszes betegekben emelkedett szérumszintjeit mérték. A pankreasz nekrozisához esetlegesen társuló bakteriális fertőzés miatt a TLR4-en keresztüli jelátvitel fontos szerepet játszhat az akut pankreatitisz patomechanizmusában.

Ismert, hogy a *CARD15/Nod2* gén egynukleotidos polimorfizmusai hajlamosíthatnak a Crohn-betegség kialakulására. Mivel ezek a polimorfizmusok a Crohn betegek egy részénél nem fordulnak elő, indokoltnak látszott annak felderítése, hogy a hasonló szerkezetű és funkciójú NOD1 receptort kódoló gén SNP-i mennyiben járulnak hozzá a betegség kialakulásához.

A HMGB-1 (High mobility group box-1) protein a sejtmagban szekvencia-specifitás nélkül kötődik a DNS-hez, elősegítve a transzkripciós faktorok kapcsolódását. Aktivált monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, vaszkuláris simaizomsejtek, tumorsejtek a HMGB-1 aktív szekréciójára is képesek. Az extracelluláris HMGB-1 a gyulladás késői mediátora: szérumszintje a korai gyulladásos citokinekénél (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) csak jóval később, 16 órával a fertőzést követően emelkedik meg, s még 32 óra múlva is jelentősen emelkedett marad. Nekrotizáló sejtekből a HMGB-1 passzívan szabadul fel - apoptotikus sejteknél ez a folyamat elmarad. Mindezen tulajdonságai miatt feltételezhető, hogy szerepe van az akut pankreatitiszben.

Kutatásaink célja az alábbi konkrét kérdések megválaszolása volt:

1. A *CARD4/Nod1*, *IL-8* és *TLR4* gének egynukleotidos polimorfizmusai rizikófaktorként szerepelnek-e a gasztritisz és duodenális fekély kialakulásában *Helicobacter pylori*-fertőzött betegeknél?
2. Az *IL-8* és *TLR4* gének egynukleotidos polimorfizmusai befolyásolják-e az akut pankreatitisz kialakulását?
3. Van-e jelentősége a *CARD4/Nod1* gén egynukleotidos polimorfizmusának Crohn-betegségben?
4. Indukálódik-e a HMGB-1 *in vitro* bakteriális fertőzés hatására, valamint pankreatitiszben?

Vizsgálatainkba *Cag*-pozitív *H. pylori*-fertőzött betegeket vontunk be: 85 duodenális fekélyben szenvedő és 136 gasztritiszes beteget. Kontrollként *Cag*-pozitív *H. pylori*-fertőzött, tünetmentes véradók korban illesztett 75 fős kontroll csoportját alkalmaztuk.

Az akut pankreatitiszben szenvedő 92 beteget a Ranson-féle pontrendszer szerint két csoportra osztottuk: gyenge lefolyású (n=42) és súlyos (n=50) pankreatitiszes csoportokra. A súlyos pankreatitiszben szenvedők között különbséget tettünk aszerint, hogy a pankreasz nekrozisához társult-e bakteriális fertőzés (n=22) vagy nem (n=28). A kontroll csoportot 200, korban illesztett egészséges véradó személy alkotta.

Összesen 434 Crohn beteg DNS mintáit dolgoztuk fel. Kontrollként 200, korban és nem szerint illesztett egészséges véradó személyt vontunk be. Második kontroll csoportként *Cag*-pozitív *H. pylori*-fertőzött gasztritiszes betegek 136 fős csoportja szolgált.

A genotipizáláshoz szükséges DNS-t perifériás vér leukocitákból izoláltuk. A *CARD4/Nod1* 796 G→A SNP-jét polimeráz láncreakció – restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerrel vizsgáltuk. A *TLR4* két vizsgált polimorfizmusának (896 A→G; 1196 C→T) meghatározása valós idejű PCR-ral, fluoreszcensen jelölt próbák segítségével, olvadáspont analízissel történt. Az *IL-8* -251 T→A polimorfizmusát allél-specifikus amplifikációval (ARMS) jellemeztük.

Párhuzamos kísérletekben arra is választ kerestünk, hogy a HMGB-1 fehérje szekréciója humán monocitoid sejtekben milyen indukerek hatására következik be. Mivel a kereskedelmi forgalomban a HMGB-1 koncentráció mérésére alkalmas kit nem állt rendelkezésre, reliábilis ELISA és Western blot módszert fejlesztettünk ki. A később elérhetővé vált gyári HMGB-1 ELISA-t alkalmazva pankreatitiszes betegek plazmájában mértük a HMGB-1 koncentrációját. Összefüggést kerestünk a HMGB-1 szint és a betegség, ill. annak súlyossága között.

Eredményeink, a fenti célkitűzéseknek megfelelően, az alábbiakban foglalhatók össze:

1. – A *CARD4/Nod1* 796 AA genotípusú, *H. pylori*-fertőzött betegeknél szignifikánsan nagyobb a duodenális fekély kialakulásának valószínűsége.

(OR<sub>duodenális fekélyben szenvedők vs. kontroll csoport</sub>=3.500)

– A *TLR4* gén vizsgált polimorfizmusai nem befolyásolják jelentősen a betegség kimenetelét *H. pylori*-fertőzött személyekben.

– A NOD1 – a TLR4-től eltérően – jelentős szerepet játszik a gyomornyálkahártya epithelsejtjei esetében a *H. pylori* érzékelésében.

– Az *IL-8* -251 AT genotípus, ill. a -251 A allél hordozása hajlamosító tényező mind a gasztritisz, mind a duodenális fekély kialakulására *H. pylori*-fertőzött egyéneknél.

(OR<sub>gasztritiszes betegek vs. kontroll csoport</sub>=1.900; OR<sub>duodenális fekélyben szenvedők vs. kontroll csoport</sub>=2.042)

2. – Az *IL-8* -251 A allélt hordozó betegeknél szignifikánsan nagyobb annak a valószínűsége, hogy az akut pankreatitisz súlyos komplikációkkal jár.  
( $OR_{\text{súlyos akut pankreatitiszes csoport vs. kontroll csoport}}=1.915$  )
3. – A *CARD4/Nod1* 796 A allél hordozása a magyar populációt tekintve jelentős kockázati tényező a Crohn-betegség kialakulásában ( $OR_{\text{Crohn betegek vs. kontroll csoport}}=2.07$ ).
4. – Házilag *in vitro* módszereket (ELISA, Western blot) dolgoztunk ki a sejtkultúrák felülszóiban lévő HMGB-1 mennyiségének meghatározására.
  - Kimutattuk, hogy a *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro* indukálja a HMGB-1 fehérje szekrécióját.
  - Akut pankreatitiszes betegek plazmájában jelentősen emelkedett a HMGB-1 koncentrációja, alátámasztva, hogy ez a késői gyulladáshoz szükséges citokin jelentős szerepet játszik az akut pankreatitisz patomechanizmusában.