

A Parkinson-kór protein-7, a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ és a tímusz sztrómális limfopoinetin szerepe gyermekkori cöliákiában

Doktori értekezés

Dr. Vörös Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vannay Ádám PhD tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Miheller Pál PhD egyetemi docens

Dr. Vajda Péter PhD, Med.habil egyetemi docens

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Nyirády Péter PhD egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Szijártó Attila PhD egyetemi tanár

Dr. Kriván Gergely PhD oszt. vez. főorvos

Budapest

2020

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR	8
1.1 A CÖLIÁKIA	8
1.1.1 A cöliákia definíciója, gyakorisága	8
1.1.2 A cöliákia patomechanizmusa	9
1.1.2.1 A gabonafehérjék szerepe a cöliákia patogenezisében.....	9
1.1.2.2 Genetikai tényezők szerepe	10
1.1.2.3 A szöveti transzglutamináz és az adaptív immunrendszer szerepe	12
1.1.2.4 A veleszületett immunrendszer és az IEL-ek szerepe	14
1.1.2.5 A glutén nem immunmediált citotoxicitása, az oxidatív stressz	16
1.1.2.6 Környezeti tényezők szerepe	18
1.1.3 Tünettan	19
1.1.4 Diagnózis	20
1.1.4.1 Szerológiai vizsgálatok, cöliákia specifikus antitestek kimutatása	21
1.1.4.2 HLADQ2 és HLADQ8 genetikai vizsgálatok	22
1.1.4.3 Szövettani vizsgálatok	22
1.1.4.4 Egyéb laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok.....	25
1.1.5 Terápia, terápiás célpontok.....	26
1.2 A PARKINSON-KÓR PROTEIN 7 (PARK7).....	28
1.2.1 A PARK7-gén és a Parkinson géncsalád.....	28
1.2.2 A PARK7-fehérje szerkezete.....	30
1.2.3 A PARK7 szöveti lokalizációja.....	30
1.2.4 A PARK7 főbb funkciói	31
1.2.4.1 A PARK7 redox-szenzitív citoprotektív hatásai	31
1.2.4.2 A PARK7 citoprotektív gének expresszióját szabályozó funkciója ...	33
1.2.4.3 A PARK7 citoprotektív és antiapoptotikus szerepe hipoxia-indukált stressz során.....	36
1.2.4.4 PARK7 szerepe az immunválasz szabályozásában	39

1.2.4.5	A PARK7 chaperon, deglikáz és egyéb funkciója	40
1.3	PEROXISZÓMA PROLIFERÁTOR AKTIVÁLT RECEPTOR (PPAR) γ	41
1.3.1	A PPAR molekulacsalád	41
1.3.2	A PPAR izoformák és fő funkcióik.....	43
1.3.3	A PPAR γ szerepe gyulladásos folyamatokban.....	45
1.4	A TÍMUSZ SZTRÓMÁLIS LIMFOPOIETIN (TSLP)	46
1.4.1	A TSLP-molekula felfedezése, receptora és szignalizációja.....	46
1.4.2	A TSLP expressziója, regulátorai és funkciója normál és kóros állapotokban.....	47
2.	CÉLKITŰZÉSEK	51
3.	MÓDSZEREK.....	53
3.1	BETEGCSOPORTOK.....	53
3.2	VALÓS IDEJŰ PCR	54
3.2.1	RNS izolálás	54
3.2.2	cDNS szintézis.....	55
3.2.3	Specifikus primerek tervezése	55
3.2.4	PCR reakciók.....	56
3.3	FEHÉRJE IZOLÁLÁS, WESTERN BLOT	57
3.3.1	Mintaelőkészítés	57
3.3.2	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	57
3.3.3	Fehérje blottolás	58
3.3.4	Immunoblotting	58
3.3.5	Immunoreaktív helyek detektálása, Western blotok kiértékelése	59
3.4	IMMUNFLUORESCENS FESTÉS.....	59
3.5	IMMUNHISZTOKÉMIA	60
3.6	STATISZTIKAI ANALÍZIS	61
4.	EREDMÉNYEK.....	62
4.1	PARK7 VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK	62
4.1.1	A PARK7-mRNS expressziója a duodenális mukózában	62
4.1.2	A PARK7 relatív fehérje mennyisége a duodenális mukózában.....	63
4.1.3	A PARK7 lokalizációja a duodenális mukózában.....	64

4.2	PPAR γ VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK	66
4.2.1	A PPAR γ -mRNS expressziója a duodénum nyálkahártyában	66
4.2.2	A PPAR γ relatív fehérje mennyisége a duodénum nyálkahártyában	67
4.2.3	A PPAR γ lokalizációja a duodénum nyálkahártyában	68
4.3	TSLP VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK	70
4.3.1	A TSLP-mRNS expressziója a duodenális mukózában	70
4.3.2	A TSLP relatív fehérje mennyisége a duodenális mukózában	71
4.3.3	A TSLP-receptor fehérje mennyisége a duodénum nyálkahártyában	72
4.3.4	A TSLP lokalizációja a duodénum nyálkahártyájában.....	73
5.	MEGBESZÉLÉS.....	75
5.1	PARK7 VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	75
5.2	PPAR γ ÉS TSLP VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	78
6.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	83
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	85
8.	SUMMARY.....	86
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	87
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	109
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	112

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Akt	Protein kináz B
AMPK	5'-adenozin monofoszfát-aktivált protein kináz
AP-1	Aktivátor protein-1
APC	Antigén prezentáló sejtek
ARE	Antioxidáns válaszelem
ASK1	Apoptózis-szignál szabályozó kináz-1
BNIP3	BCL2 interakciós protein-3
CD	a. Differenciációs klaszter b. Cöliákia, lisztérzékenység
CD71	Transzferrin receptor protein-1
CTLA4	Citotoxikus T-limfocita asszociált antigén-4
Daxx	Halál-domén asszociált fehérje
DGP	Deamidált gliadin peptidek
DIC	Differenciális interferencia kontraszt
Elk	ETS domént tartalmazó protein
ER	Endoplazmatikus retikulum
Erk	Extracelluláris szignál-regulált protein kináz
ESPGHAN	Európai Gyermek Gasztroenterológiai-, Hepatológiai- és Táplálkozási Társaság
GAPDH	Glicerín-aldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GCL	Glutamát cisztein-ligáz
GFD	Gluténmentes diéta
GSH	Glutation rendszer
HIF	Hipoxia indukálta faktor
HK-1	Hexokináz-1
HLA	Humán leukocita antigén
HRPO	Torma peroxidáz
HSP	Hősokk fehérje
ICAM-1	Intercelluláris adhéziós molekula-1
IEL	Intraepiteliális-limfocita

IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Indukálható nitrogén-monoxid szintáz
Jak	Janus tirozin kináz
JNK	c-Jun N-terminális kináz
kDa	kilodalton
Keap1	Kelch-szerű ECH asszociált protein-1
LDH	Laktát dehidrogenáz
LPS	Lipopoliszacharid
Maf	V-maf muskuloaponeurotikus fibroszarkóma onkogén homológ
MAPK	Mitogén-aktiválta protein kináz
MEKK1	Mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz-1
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex
MICA és MICB	MHC I osztály polipeptid-kapcsolatos szekvencia A és B
MKK4	MAP kináz kináz-4
MMP	Mátrix metalloproteináz
mTOR	Rapamicin emlős target
MYO9B	Myosin IXB
NF- κ B	Nukleáris faktor kappa B
NK	Természetes ölüsejt
NKG2D	Természetes ölücsoport 2D receptor
Nrf2	Nukleáris faktor eritroid 2 kapcsolatos faktor-2
PAI-1	Plazminogén aktivátor inhibitor-1
PARK7	Parkinson-kór protein-7
PDK1	Piruvát dehidrogenáz kináz-1
PEP	Prolil endopeptidáz
PI3K	Foszfatidil-inozitol 3-kináz
PON	Paraoxonáz/arylészteráz
PPAR γ	Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma
PPRE	Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor választék
PRAK	P38-regulált/aktivált kináz

PTEN	Proteinfoszfataz és tenzin homológ
ROS	Reaktív oxigényök
RT-PCR	Reverz transzkripció polimeráz láncreakció
RXR	Retinoid X receptor
sIGA	Szekretoros immunglobulin A
STAT5	Szignál transzducer és transzkripció 5 aktivátor
TCR	T-sejt receptor
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor béta
Th	Segítő T-sejt
TLR	Toll-szerű receptor
TNF- α	Tumor nekrozis faktor alfa
Treg	Regulátor T-sejt
Trx	Tioredoxin
TSC-1	Szklerózis tuberoza komplex-1
TSLP	Tímusz sztrómális limfopoietin
TSLPR	Tímusz sztrómális limfopoietin receptor
tTG	Szöveti transzglutamináz
Ub	Ubiquitin
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VHL	Von Hippel-Lindau

1. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR

1.1 A cöliákia

1.1.1 A cöliákia definíciója, gyakorisága

A cöliákia vagy lisztérzékenység, más néven gluténszenzitív enteropátia, egy elsősorban a vékonybeleket érintő szisztémás autoimmun betegség, melyet genetikailag fogékony egyéneknél a táplálékkal a szervezetbe jutó glutén fehérjékkel szembeni immunintolerancia okoz. Glutén hatására a vékonybél immunmediált károsodása alakul ki, melynek során a proximális vékonybélbolyhok pusztulása, Lieberkühn-kripta hiperplázia és limfocita beszűrődés jön létre. A betegség változatos gluténfüggő klinikai tünetek, enteropátia, specifikus antitestek, humán leukocita antigén (HLA)-DQ2, illetve DQ8 haplotípus különböző kombinációjaként jelenhet meg. A cöliákia nem gyógyítható, azonban a gluténtartalmú élelmiszerek étrendből való kihagyásával a kórfolyamat önmagától leáll és bélbolyhregeneráció következik be. A klinikai tünetek javulnak, illetve megszűnnek és a hosszú távú szövődmények kialakulásának esélye csökken.

A cöliákia tünetei genetikai predispozíció és az exogén provokáló ágens (glutén) együttes jelenlétében bármely életkorban jelentkezhetnek, leggyakoribb azonban a csecsemőkor második felében, kisdédkorban és a negyedik évtizedben levők körében. Összességében ma már a cöliákia gyakrabban jelenik meg felnőtt-, mint gyermekkorban. Klasszikus klinikai tünetek hiányában a cöliákias betegek többsége a korábbi évtizedekben nem került felismerésre. Egyes historikus felmérések a betegség prevalenciáját még csak 0,02%-ra becsülték, ma már tudjuk, hogy valójában az egyik leggyakoribb genetikai kórkép világszerte. A manifest cöliákia gyakorisága Európában és Észak-Amerikában kb. 1:500-1000 lakos, azonban a lisztérzékenység tényleges előfordulási aránya, ami magában foglalja a látens (szöveti eltérést legtöbbször nem mutató) és csendes (klinikai jelek nélküli bolyhkárosodás) cöliakiát is ennél jóval magasabb, országonként eltérő, 1% körüli (0,3%-2,4%) (1-4). Egyes autoimmun betegségek, mint az 1-es típusú diabétesz, illetve kromoszóma rendellenességek (Down-, Turner szindróma) esetén, részben egyes HLA egyezések miatt a gyakoriság ennél jóval magasabb (4,5%-20%) (3, 5). Hazánkban Korponay-Szabó és mtsai. 427 kisgyermeknél

végzett szerológiai szűrő vizsgálat alapján 1:85 arányú prevalenciát állapított meg (6). Az elmúlt három évtizedben a cöliákia prevalenciájának világszerte tapasztalt emelkedését a pontosabb és gyorsabb diagnosztikai módszerek elterjedése mellett környezeti tényezők is magyarázhatják. A betegek 85%-a azonban vélhetően napjainkban sem kerül felismerésre (7). A betegség genetikai predispozícióját bizonyítja, hogy a betegek elsőfokú rokonainál (szülő, testvér, gyermek) a kórkép kialakulásának esélye 10%, egypetéjű ikreknél legalább 80% kezdeti konkordancia van, amely az élet folyamán megközelíti a 100%-ot (8,9,10).

1.1.2 A cöliákia patomechanizmusa

1.1.2.1 A gabonafehérjék szerepe a cöliákia patogenezisében

A cöliakiát kiváltó és fenntartó főbb kórfolyamatokról, a betegség genetikai hátteréről valamint a veleszületett és szerzett immunitás szerepéről szerzett ismereteink az elmúlt másfél évtizedben jelentősen bővültek. A lisztérzékenységet a táplálékkal bevitt kalászos gabonafélék (búza, árpa, rozs, zab) magjaiban található raktározó fehérje-komplex, a glutén váltja ki. A gluténnal szemben normál egyéneknél az élet első éveiben tolerancia alakul ki. Egyelőre nem ismert, hogy a cöliakiás betegekben a glutén intolerancia primer módon, a tolerancia kialakulásának hiánya miatt, vagy egy korábbi tolerancia kóros elvesztése folytán keletkezik-e. A glutén összetétele a gabonafajtától függ. A glutén gluteninből és különböző magas glutamin- és prolintartalmú, alkoholban oldódó ún. prolamin típusú fehérjékből áll. Immunreakciót elsősorban a glutén prolamin komponensei váltanak ki: a búzában megtalálható gliadin, az árpában előforduló hordein, a rozsban lévő szekalin és a zabban jelen lévő avenin. A legtoxikusabb a búza gliadin α -frakciója, az árpában előforduló hordein és a rozs szekalinja. A lényegesen kevesebb prolint tartalmazó avenin toxicitása alacsony, kóroki szerepe cöliakiában kérdéses (3,11,12). Emésztés során a magas prolin tartalom ellenállóvá teszi ezen fehérjét a teljes proteolízissel szemben, mivel a gyomor, a hasnyálmirigy és a kefeszegély enzimek prolil-endopeptidáz aktivitása alacsony (3,11,13). Ennek eredményeképp a vékonybélben relatív nagy, akár ötven aminosav hosszú, magas prolin és glutamin tartalmú peptidek szaporodhatnak fel (3,11). A bélnyálkahártyában is megtalálható szöveti

transzglutamináz (tTG) számára ezek szubsztrátot jelentenek, az enzim jellemzően deamidációt végez rajtuk, megváltoztatva ezzel a szerkezetüket (3,11,13). A gliadin peptidek egy része (α 2-gliadin-56–88, ill. 57-68) az adaptív, mások (pl.: p31-43/49) a veleszületett immunrendszer stimulációján keresztül vezetnek bélfal károsodáshoz (3,13).

1.1.2.2 Genetikai tényezők szerepe

A cöliákia erős genetikai meghatározottsággal rendelkező, familiárisan halmozódó betegség. Jelen ismereteink szerint négy lókuszon (CELIAC1-4) elhelyezkedő gének hozhatók összefüggésbe a betegség kialakulásával. A kórképre hajlamosító legfőbb genetikai tényező a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) II-es osztályba tartozó molekulákat kódoló HLA-gének egyes genváltozatai (CELIAC1). A HLA komplexen kívüli gének (CELIAC2-4) egy része a gyulladásos folyamatok modulálásában, másik része a mukózális barrier integritás fenntartásában játszik szerepet. Jelentőségük, pontos szerepük a betegség manifesztálódásában még nem teljesen tisztázott.

Az MHC-II egy α és egy β láncból álló heterodimer, melyet a 6-os kromoszómán (6p21) található HLA-gének kódolnak. A cöliákiás betegek 98%-ban kimutatható a HLA-DQ2 és/vagy -DQ8 antigén, és többségükben jelen van a HLA-B8, -DR3 és -DR7, az érintettek egy csoportjában pedig a HLA-DR5 és -DR7 (14). A HLA-DQA1 lókuszon a HLA-DQ α láncát kódoló, a HLA-DQB1 lókuszon a DQ típusú MHC β láncát kódoló szakasz található. Mivel 2-féle α és 2-féle β lánc fejeződhet ki, egymással kombinálódva összesen 4-féle DQ izoforma jöhet létre. A cöliákiára hajlamosító HLA-DQ2 heterodimert a HLA-DQB1*02 (HLA-DQB1*0201 vagy *0202) allél által kódolt β lánc és a HLA-DQA1*0501 allél által kódolt α lánc alkotja. Ez a HLA-DQ2 heterodimer a betegek 90-95%-ban jelen van (3,11). A HLA-DQ8 heterodimert, mely a betegek 5-10%-ban mutatható ki, a HLA-DQB1*0302 és HLA-DQA1*0301 által kódolt β és α lánc alkotja (3). HLA-DQ2 vagy HLA-DQ8 negatív egyéneknél lisztérzékenység extrém ritkán fordul elő, ugyanakkor, ezen allélok jelenléte szükséges, de nem elégséges a cöliákia manifesztálódásához. Míg a HLA-DQ2 és HLA-DQ8 fenotípus az egészséges populáció 20-30%-ára jellemző, a cöliákia prevalenciája köztük csak 2-5%, a többségben nem alakul ki betegség (14).

A HLA-DQ lókuszon kívüli egyéb HLA régióban elhelyezkedő gének közül a tumor nekrozis faktor (TNF), az MHC I osztály polipeptid-kapcsolatos szekvencia A és B (MICA és MICB) gének egyes variánsai hajlamosíthatnak cöliákiára. A nem-HLA-gének szerepe kevésbé tisztázott, azonban ismereteinket az elmúlt évtized genetikai vizsgálatai számos részlettel gazdagították (15).

A 2q33 kromoszóma régióban (CELIAC3 lókuszt) elhelyezkedő egyes T-sejt immunreguláló gének közül a betegség kialakulásában szerepe lehet a differenciációs klaszter (CD)28, a citotoxikus T-limfocita asszociált antigén-4 (CTLA4) és az indukálható T-sejt kostimulátor génvariánsainak (3,16,15). A CD28 és CTLA4 az antigén prezentáló sejtek (APC) felszínén található B7 receptorokhoz kapcsolódva, az antigén specifikus T-sejt receptorokkal együtt szükségesek a T-sejt aktivációhoz.

Az antigén stimulált T-sejtek által termelt interleukin(IL)-2 és IL-21 kulcsfontosságú, növekedést és proliferációt szabályozó citokinek. A 4q27 kromoszómán elhelyezkedő IL-2 és IL-21 génpolimorfizmusok kapcsolatát cöliákiával számos tanulmány igazolta (17,18). Cöliákiás betegekben az intraepiteliális limfocitákban (IEL) az IL-2, a lamina propria CD4+ T-sejtjeiben az IL-21 fokozott expressziója mutatható ki (19).

Európai betegek metaanalízise kapcsán került a figyelem középpontjába az 5q31 régió (CELIAC2 lókuszt) (20), valamint a 19-es kromoszómán található Myosin IXB (MYO9B) (CELIAC4 lókuszt), melyek cöliákiában betöltött jelentőségét számos vizsgálat igazolta (21,22). A MYO9B génnek a citoskeletális aktin remodellációban, ezen keresztül egyrészt, a bélhám sejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúrák (tight junction) integritásának fenntartásában, másrészt számos sejt típus (bélhám sejtek, fagociták, T-sejtek) migrációjának, adhéziójának és aktivációjának szabályozásában van szerepe. A különböző sejtadhéziós molekulák, mint az adherens és a szoros sejtkapcsoló struktúrákat (tight junction) alkotó fehérjék (kadherine, klaudinok, occludin és junctionalis adhéziós molekulák) az epitheliális barrier funkció kulcsfontosságú szabályozói. A zonulin az epitheliális sejtek közti sejtkapcsoló struktúrák permeabilitásának ismert modulátora. A glutén paracelluláris transzportjára utal cöliákiában, hogy aktív betegségben emelkedett a zonulin expresszió, valamint segítő T-sejt (Th)1-indukált változások történnek az epitheliális junctionális fehérjék expressziójában, lokalizációjában és foszforilációjában (23,24). Ugyanakkor ismert,

hogy az immundomináns $\alpha 2$ -gliadin-33mer16 képes transzcelluláris úton, interferon (IFN)- γ függő transzcitózison keresztül is bejutni a lamina propriába (25). Ezenkívül a CD71 transferrin-receptoron keresztüli szekretoros IgA retrotranszcitózis is szerepet játszhat az intakt, toxikus gluténpeptidek beáramlásában (26). Összegezve, az intesztinális barrier károsodása, a bélfal permeabilitásának fokozódása lehetővé teszi a glutén peptidek mélyebb rétegekbe való bejutását, ami a manifeszt cöliákia kialakulásához vezető immunfolyamatok egyik kulcslépése.

1.1.2.3 A szöveti transzglutamináz(tTG) és az adaptív immunrendszer szerepe

Genetikai, immunológiai és epidemiológiai vizsgálatok sokasága igazolja, hogy a cöliákia alapvetően egy immuneredetű, T-sejt mediált kórkép, melyben központi szerepe van a CD4+ T-sejteknek és az MHC-II molekuláknak.

A táplálékkal bevitt glutén a bélnyálkahártyában kölcsönhatásba lép az ott található tTG enzimmel. A tTG egy kalciumdependens fehérje, amely a sérült szövetek regenerációját segíti elő extracelluláris proteinek glutamin és lizin maradványai közti izopeptid kötések kialakításával (11). A tTG azonban bizonyos körülmények között (alacsony pH, lizin maradványok hiánya) képes a gliadin és más prolaminek glutamin oldalláncait deamidálni is. A deamidált, negatív töltésű glutamátot tartalmazó gliadin peptidek (DGP) nagy erősséggel képesek kötődni az APC-k, azaz a monociták, makrofágok és dendritikus sejtek felszínén expresszálandó HLA-DQ2 és HLA-DQ8 típusú MHC-II molekulákhoz. Ezt követően antigénekként bemutatásra kerülnek a bélben található segítő T-sejteknek, előidézve azok aktivációját és végül egy Th1 túlsúlyú immunválasz alakul ki (3,11,27). A nagyobb méretű, több HLA-DQ epitópot tartalmazó glutén peptidek (pl.: $\alpha 2$ -gliadin-33mer16) T-sejt stimuláló aktivitása erősebb, mint a kisebb peptideké (28). Jelen ismereteink szerint a glutén emésztése során kb. 50 féle immunaktív DGP alakulhat ki (11).

A T-sejt aktiváció számos proinflammatorikus citokin termelődéséhez vezet, mint pl. az IFN- γ , a TNF- α , vagy az IL-4 (29,30). Az IFN- γ a humán intesztinális immunrendszer egyik fő szabályozó citokinje, cöliákiában központi szerepet játszik a nyálkahártya károsodás kialakulásában (31). Az IFN- γ stimulálja a monocitákat, a természetes ölő (NK)-sejteket és a neutrofil granulocitákat, elősegíti a

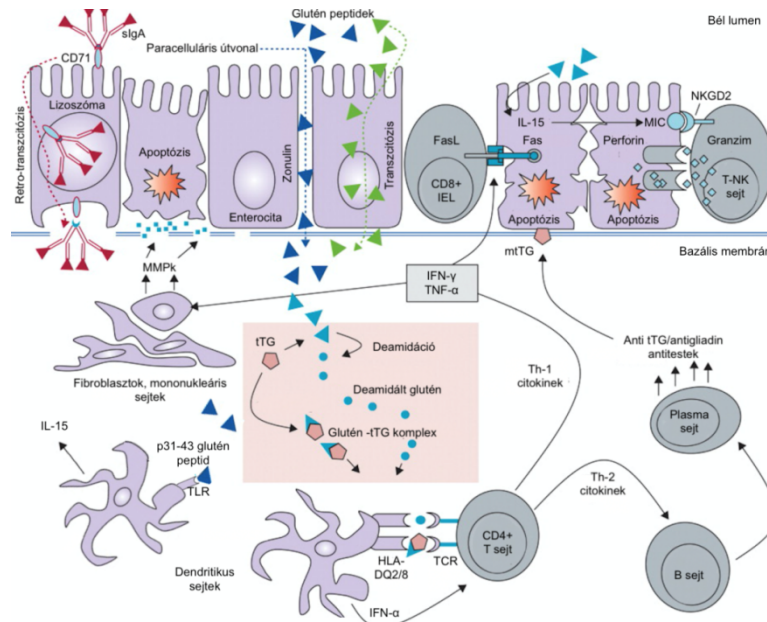
proinflammatorikus dendritikus sejtek differenciálódását, valamint intercelluláris adhéziós molekula-1 expresszió fokozó hatása révén a fehérvérsejtek adhézióját (32). Az IFN- γ hatására a bélfalban lévő APC-sejteken az MHC-II molekulák expressziója fokozódik, bizonyították, hogy gátlásával a glutén indukált nyálkahártya károsodás kivédhető (33).

A TNF- α aktiválja a citotoxikus CD8+ T-sejteket, melyek Fas/Fas ligand aktiváción keresztül, valamint granzim és perforin termelés révén az enterociták apoptózisát idézik elő (34). A TNF- α gátolja az I-es típusú kollagén és fokozza a fibroblasztok mátrix metalloproteináz (MMP)-1, -3 termelését, aminek eredményeképpen az extracelluláris mátrix és a bazális membrán degradációját indítja el (35).

Az IL-4 stimulálja a mucin képződést, növeli a B-sejtek MHC-II, B7, CD40, és felszíni immunglobulin (Ig)M, valamint a hízósejtek IgE-receptor expresszióját. Egyéb citokinek, mint például az IL-6, az IL-18 vagy az IL-21 termelődése szintén fokozott lehet aktív cöliákiában. Ugyanakkor érdekes, hogy például az IL-12 szintje (az IL-12 aktiválja és IFN- γ termelésre serkenti az NK-sejteket és így a Th0 sejtek további Th1 irányú differenciálódását segíti elő) nem emelkedik meg a betegségben (30).

A glutén-specifikus CD4+ sejtek központi szerepet töltenek be a cöliákia patogenezisében. A CD4+ Th-sejteken keresztül B-limfociták aktiválódnak, melyek anti-DGP és anti-tTG ellenanyagokat termelnek a bélfal lamina propriában (32). A tTG ellen termelt ellenanyagok egyrészt a transzformáló növekedési faktor (TGF)- β aktív formájának kialakulásának gátlásán keresztül az epiteliális sejtek proliferációjának és differenciálódásának gátlásával, másrészt a gliadin peptidek transzepiteliális transzportjának facilitálásával járulhatnak hozzá a bélfal károsodásához (36, 37).

A tTG elleni autoantitestek ugyan gátolhatják a tTG aktivitását, a gátlás azonban nem teljes és a reziduális enzimaktivitás is elegendő a patogén hatás kialakulásához (38). A tTG és az adaptív immunrendszer cöliákia patomechanizmusában betöltött szerepét az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. A cöliákia immunpatogenezise. Részletes leírás a szövegben. Rövidítések: IFN- γ : interferon gamma; TNF- α : tumor nekrosis faktor alfa; tTG: szöveti transzglutamináz; MMP: mátrix metalloproteináz; IEL: intraepiteliális-limfocita; T-NK: természetes ölősejt; sIgA: szekretoros immunglobulin-A; mTG: membránhoz kötött szöveti transzglutamináz; TLR: toll-szerű receptor; IFN- α : interferon alfa; IL-15: interleukin-15; FasL: Fas ligand; CD71: transferrin receptor protein-1, HLA: humán leukocita antigén; MIC: MHC I osztály polipeptid-kapcsolatos szekvencia; TCR: T-sejt receptor; NKG2D: Természetes ölőcsoport 2D receptor (módosított ábra 39).

1.1.2.4 A veleszületett immunrendszer és az IEL-ek szerepe

Bár az adaptív immunrendszer gluténre adott válaszai jobban ismertek, egyre többet tudunk a veleszületett immunitás cöliákiában betöltött szerepéről. Számos humán és állatkísérlet igazolja, hogy a CD4⁺ T-sejtek által mediált adaptív immunfolyamatok önmagunkban nem elégségesek a boholyatrófia és az aktív cöliákiában tapasztalt kiterjedt szövetkárosodás kialakulásához. A veleszületett immunitás aktiválódásának legfőbb jelenségei, a CD83 pozitív plazmocitoid dendritikus sejtek aktivációja, az IEL felszaporodás és a fokozott IL-15 termelés.

Egyes glutén peptidok, melyek közül az egyik legtöbbet vizsgált a p31-43/49, *in vitro* és *in vivo* toxicitása régóta ismert lisztérzékenységekben (40). Ugyanakkor a

p31-43/49 gliadin peptidek nem kötődnek a HLA-DQ2 vagy HLA-DQ8-hoz és nem stimulálják a CD4+ T-sejteket sem. Mauri és mtsai. igazolták először, hogy ezen glutén peptidek a veleszületett immunmechanizmusok aktiválásával fejtik ki hatásukat (41).

A lamina propria makrofágjai és dendritikus sejtjei toll-szerű receptorokon (TLR) keresztül ismerhetik fel a p31-43/49-, illetve az egyéb toxikus glutén peptideket. A TLR-ek aktiválása proinflammatorikus citokinek és kemokinek felszabadulását eredményezi (42,43). A TLR2 és TLR4 emelkedett expresszióját cöliákiában korábban munkacsoportunk igazolta elsőként (42).

Az IEL-ek nagymértékű felszaporodása (akár 80 IEL/100 duodenális epiteliális sejt) a bélfalban a cöliákiában látott egyik jellegzetes eltérés, mely a betegség aktivitásával és a boholyatrófia súlyosságával szoros összefüggést mutat (3,11,13). A döntően CD8+ citolitikus proteinekben (perforin, granzim, FASL) gazdag, jelentős mennyiségű IFN- γ -át is termelő IEL-ek az ellapult epitéliumban megfigyelhető apoptotikus folyamatok fő résztvevői (34). Aktivációt követően ezen sejtek természetes ölszerű sejtekké alakulnak át, melyek a bélhám sejteken expresszálódó stressz és gyulladás indukált molekulák felismerésére és az epiteliális sejteket károsító folyamatok modulálására képesek (32,39). Ebben a folyamatban a lamina propria APC-i és az epiteliális sejtek által termelt IL-15 központi szerepet tölt be. Az IL-15 a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) rendszer indukciója révén, a természetes ölcsoport (NKG)2D és a CD94 receptorok expressziójának indukálása révén alakítja természetes ölszerű citotoxikus sejtekké az IEL CD8+ sejteket (32,44). Az IL-15 fokozza a bélhám sejteken található olyan felszíni ligandok (pl.: MIC) expresszióját is, melyek célpontjai ezen citotoxikus nem T-sejt receptor (TCR) dependens természetes ölsejt-szerű sejteknek (13). Hatására az enterocitákban indukálódik az apoptotózis (Fas/FasL), a direkt „killing” reakció (citotoxikus proteinek, perforin, granzim-B), valamint gátlódik a TCR aktiváció (45). Az IL-15 fokozza az IEL-ek migrációját, IFN- γ szekrécióját és a granzim/perforin dependens enterocita ellenes citotoxikus aktivitást is (41,45). Emellett az IL-15 csökkenti az immunrendszer negatív szabályozásában fontos citokinek (pl. TGF- β) termelését (43). Az IL-15 által aktivált IEL-ek minden bizonnyal a cöliákiában látott nyálkahártya destrukció egyik legfőbb kiváltói. Az immunfolyamat, mely normálisan az intracelluláris patogének és az infektált epiteliális sejtek eliminációjáért felelős,

cöliákiában krónikusan emelkedett IL-15 szint mellett tartós epiteliális károsodáshoz, IEL hiperpláziához, hosszú távon akár limfóma kialakulásához is vezethet (13).

A veleszületett és szerzett immunfolyamatok számos ponton hatnak egymásra. Valószínű, hogy a glutén-specifikus CD4+ T-sejtek, amelyek IL-21-et és IFN- γ -át termelnek, részt vesznek az IEL-ek aktiválásában. Az IL-21 elősegíti a citotoxikus T-limfociták természetes ölösejt-szerű működését. Az IFN- γ hatására fokozódik a nem-klaszikus MHC-I osztályba tartozó HLA-E molekulák felszaporodása az epiteliális sejteken, valamint az IEL-ek citolitikus aktivitása (32,15).

1.1.2.5 A glutén nem immunmediált citotoxicitása, az oxidatív stressz

A veleszületett és szerzett immunmechanizmusok mellett ismert, hogy cöliákiában oxidatív stressz folyamatok is fontos szerepet játszanak a gliadin okozta toxicitás kialakulásában. Egyes α -gliadin peptidek, különösen a P31-43 képesek endocitózissal a bélhám sejtekbe internalizálódni, ahol felhalmozódnak a lizoszómákban és megnövelik az oxigén és nitrogén eredetű szabadgyökök szintjét (25,40,46,47). Lisztérzékeny betegek vérplazmájában és vékonybél biopsziás mintákban kimutatták az oxidatív stressz biomarkereként használt lipid-hidroperoxidok és karbonilcsoportok emelkedett szintjét (48,49,50). Igazolták, hogy a gliadin-expozíció az intracelluláris oxidatív egyensúly felbomlásához vezet, amelyet az oxidált/redukált glutation arányának növekedése jellemez (51). Biopsziás minták vizsgálata során kimutatták, hogy cöliákiás betegekben az antioxidáns hatású glutation-peroxidáz és reduktáz enzimek aktivitása csökkent (50). Az oxidatív stressz hatására megváltozik a sejtek morfológiája, befolyással van a sejtek proliferációjára, az apoptózisára, a sejtek életképességére (52,53).

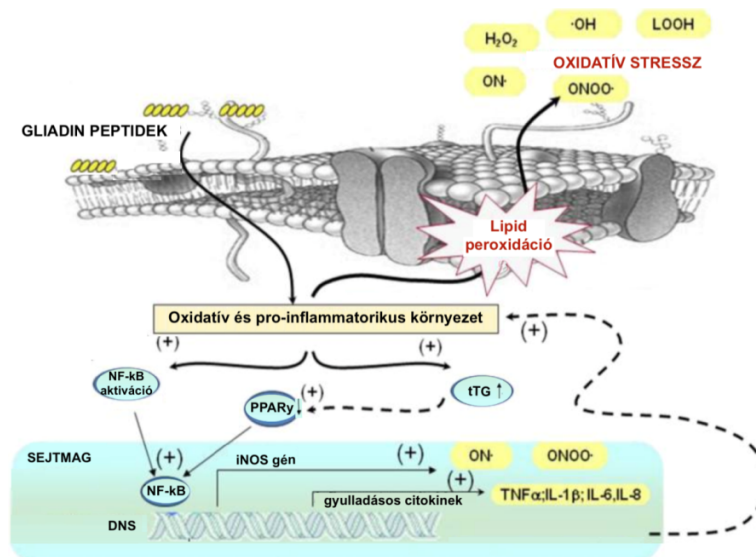
Kimutatták, hogy a humán duodenális enterocitákban konstitutívan expresszálódó indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) aktivitása megemelkedik kezeletlen cöliákiás betegek bélnyálkahártyájában, ami gluténmentes diéta (GFD) hatására részben korrigálódik (54,55). A cöliákiás betegek szérumában és vizeletében magas NO koncentrációt mértek, melynek szintje korrelál az iNOS fokozott expressziójával a vékonybélben (56,57,58).

A paraoxonáz (PON)1 számos szubsztrátummal rendelkező kalcium dependens észteráz, amely képes meggátolni a lipidek oxidációját, ezáltal részt vesz az oxidatív

stressz elleni védelemben, antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatású (59). A (PON)1 csökkent mRNS expresszióját Rothem és mtsai. írták le cöliákiában (60). A csökkent antioxidáns védelem mellett a gyulladt nyálkahártya érzékenyebbé válik az oxidatív szövetkárosodással szemben, zavart szenved az epiteliális sejtréteg integritásának helyreállítása.

A hő sokk fehérjék (HSP-k) chaperon molekulák, melyek antiapoptotikus hatásúak lehetnek és hozzájárulhatnak az epiteliális barrierintegritás megőrzéséhez. Egyes HSP-k szintje az enterocitákban már a cöliákia korai szakaszában emelkedett lehet. (61). A HSP72 fokozott expresszióját és megváltozott lokalizációját cöliákiában munkacsoportunk igazolta elsőként (62). A HSP70 család tagja a GRP78 chaperon molekula, mely az endoplazmatikus retikulum (ER) oxidatív stressz-markere. A GRP78 emelkedett szintjét írták le cöliákiás betegek enterocitáiban és a felszaporodott perinukleáris GRP78 aggregátumok kolokalizációt mutattak a MICA/B+ sejtekkel, mely az oxidatív stressz és a veleszületett immunfolyamatok közötti szoros interakcióra utal (63).

Sejttenyészetben végzett kísérletsorozatokban igazolták, hogy a gliadin peptideknek génexpresszió moduláló hatása is lehet (64,65). A cöliákiás betegek nyálkahártyájában tapasztalt emelkedett reaktív oxigéngyök (ROS) szint hozzájárul az ubiquitin-proteaszóma rendszer csökkent tTG lebontásához, ezáltal a tTG-fehérje felszaporodásához. A toxikus glutén peptidek által kiváltott ROS és tTG szaporulat a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma (PPAR γ) aktivációjának csökkentése révén a gyulladós folyamatok szabályozásának zavarához vezethet (66-68). Lisztérzékeny betegekből származó duodenális biopsziák proteomikai elemzése a PPAR γ szintjének csökkenését igazolta (66,68). Ismert, hogy több sejttípus, köztük az epiteliális sejtek által is termelt PPAR γ negatívan szabályozza a gyulladós génexpressziót és modulálja az oxidatív stressz okozta hatásokat (66,67). A gyulladós citokinek fokozott termelése károsíthatja a bélpermeabilitást és erősítheti a környezeti triggerok toxikus hatását. Ismert, hogy a cöliákiában is központi szerepű, számos gyulladós citokin (pl. IL-15), adhézios molekula és enzim génexpresszióját a nukleáris faktor (NF)- κ B szabályozza (64,69). A gliadin NF- κ B-vel járó mechanizmuson keresztül növeli az iNOS génexpresszióját is. (64). A PPAR γ csökkent aktivitása pedig hozzájárulhat az NF- κ B aktiválásához, ezáltal a szövetkárosító hatások felerősödéséhez (2. ábra).



2. ábra. A glutén oxidatív stresszt indukáló hatása. A gliadin-peptidek által az enterocitákban indukált oxidatív egyensúlyzavar részt vesz a nukleáris faktor (NF)-κB transzkripció faktor aktiválásában. Az NF-κB-aktiváció indukálja proinflammatorikus citokinek és enzimek, így az indukálható nitrogén monoxid szintáz (iNOS) transzkripcióját, ami prosztaglandinok és nitrogén-monoxid metabolitok felhalmozódásához vezet, ami hozzájárul az oxidatív stresszhez. A fokozott oxidatív stressz szerepet játszik a szöveti transzglutamináz (tTG) által közvetített peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR) γ downregulációjában, és ezen keresztül hozzájárulhat az NF-κB aktiválásához. További rövidítések: ONOO•: peroxinitrit; LOOH: lipid hidroperoxid; •OH: hidroxil gyök; H₂O₂: hidrogén-peroxid; TNF: tumor nekrozis faktor; IL: interleukin (módosított ábra 70).

1.1.2.6 Környezeti tényezők szerepe

Bizonyos környezeti faktorok, mint egyes fertőzések a bélfal permeabilitásának átmeneti fokozódásával tTG kiáramlást okozhatnak, növelve ezáltal a szervezetbe jutott glutén immunogenitását. Genetikailag fogékony gyermekek körében végzett longitudinális vizsgálat igazolta, hogy a többszöri rotavírus fertőzés növeli a cöliákia kialakulásának esélyét (71). A rotavírus felszínén elhelyezkedő strukturális VP-7 glikoprotein és a tTG közötti homológia magyarázatul szolgálhat a fertőzés és a cöliákia

kapcsolatára (72). A gasztrointesztinális infekciók közül szintén kiemelendő az adenovírus-12 fertőzés szerepe, mert egyik proteinjének 12 aminosav hosszúságú szekvenciája homológ a gliadin egy szakaszával (11). Kapcsolatot találtak egyes baktériumok (*Escherichia coli*, *Bacteroides* fajták) duodénumban való jelenléte és a cöliákia között is (73). Tjellström és mtsai. szerint némely mikroba anyagcsereterméke is szerepet játszhat a cöliákia patomechanizmusában (74). Régóta ismert, hogy egyes gyógyszeres kezelések (pl. IFN- α hepatitisben) fogékony személyekben a cöliákia aktiválódását okozhatják (75).

Az ismert környezeti faktorok közül kiemelendő a táplálás szerepe, úgy mint a glutén tartalmú ételek megfelelő időpontban és ütemben történő bevezetése csecsemőkorban. Jelen ismereteink szerint az anyatejes szoptatás mellett megkezdett kis és közepes mennyiségű gluténbevitelnek protektív hatása van a későbbi cöliákia kialakulásával szemben (76).

1.1.3 Tünettan

A cöliákiára ma már nem mint relatív ritka enteropátiára tekintünk, hanem egy genetikai predispozíció esetén gyakran manifesztálódó, több szervet érintő betegségként tartjuk számon, mely igen változatos klinikai tünetekkel járhat. A klinikai megjelenési formák gyakorisága az elmúlt évtizedek során megváltozott. A betegek többsége gyermekkorban általános panaszok, például fogyás, fáradékonyság, fejlődésben való lemaradás vagy enyhe gasztrointesztinális tünetek, mint haspuffadás, elhúzódó hasmenés, hasi diszkomfort miatt kerül kivizsgálásra. A korábban jellemzőnek tartott, cachexiával, haspuffadással és hasmenéssel járó klasszikus malabszorpciós tünetegyüttes ma már ritkán találkozunk. Gyakori a kedvetlenség, étvágytalanság, apátiás viselkedés. A betegek egy részénél a cöliákia emésztőszervi tünetek nélkül extraintesztinális manifesztációval vagy egyéb második autoimmun betegséggel (1-es típusú diabétesz, Sjögren-szindróma) jelentkezik. Az extraintesztinális tünetek egy része, mint például az anémia, az oszteopénia, a fogzománc hipoplázia, vagy a K-vitamin hiány okozta vérzékenység a felszívódási zavar okozta vitamin és nyomelem hiány következtében alakul ki. Egyéb tüneteket, mint pl. a dermatitisz herpetiformiszt, a cerebelláris ataxiát vagy a nefropátiát, a különféle szervekben a tTG elleni antitestek lerakódása okozza.

Klinikailag megkülönböztetünk manifeszt, csendes és látens cöliákiát. Az első esetben típusos klinikai kép és igazolt boholykárosodás mellett alakul ki teljes vagy részleges malabszorpció. A csendes cöliákiát klinikai tünetek hiánya, de pozitív cöliákia specifikus ellenanyagok, HLA fenotípus és szövettan jellemzi. Látens cöliákia esetén genetikailag hajlamos egyéneknél hullámzó tünetek és antitest pozitívítás alakul ki enteropátia nélkül.

1.1.4 Diagnózis

A cöliákia diagnózisának felállítása körültekintést igényel, mivel jelen ismereteink szerint életre szóló kezelési indikációt jelent. Kezelt állapotban, azaz GFD mellett, kórjelző eltérések nem mutathatók ki, a betegség diagnózisát megerősíteni már nem lehet. A diagnózis a tTG elleni immunreakció és a vékonybélben kialakuló boholyatrófia kimutatásán alapul. Fontos, hogy a klinikai kép és a gluténbevitel között egyértelmű összefüggés legyen. Ha a cöliákia diagnózisa igazolódik, célszerű a hozzátartozók szűrését is elvégezni. Ismert, hogy a cöliákia számos nem specifikus tünettel és panasszal jelentkezik. A nyilvánvaló gyomor-bélrendszeri tünetekben szenvedő gyermekek mellett, fontos a cöliákia felismerése kevésbé világos klinikai kép esetén is, mivel a nem diagnosztizált betegség egészségkárosodáshoz vezet.

Az Európai Gyermekek Gasztroenterológiai-, Hepatológiai- és Táplálkozási Társaság (ESPGHAN) ajánlása alapján indokolt cöliákia szerológiai vizsgálat elvégzése gyermekkorban bizonytalan eredetű krónikus vagy intermittáló hasmenés, fejlődésben elmaradás, súlycsökkenés, megkésett pubertás, amenorrea, vashiányos anémia, krónikus hasi fájdalom, puffadás, obstipáció, fáradékonyság, sztomatitis, dermatitisz herpetiformisz és kóros májfunkció esetén. Javasolt továbbá a betegség irányába történő kivizsgálás tünetmentes, de magas rizikó csoportba tartozó gyerekeknél is (pl.: 1-es típusú diabétesz, Down-szindróma, szelektív IgA hiány, elsőfokú rokonnál előforduló lisztérzékenység esetén) (77,78).

1.1.4.1 Szerológiai vizsgálatok, cöliákia specifikus antitestek kimutatása

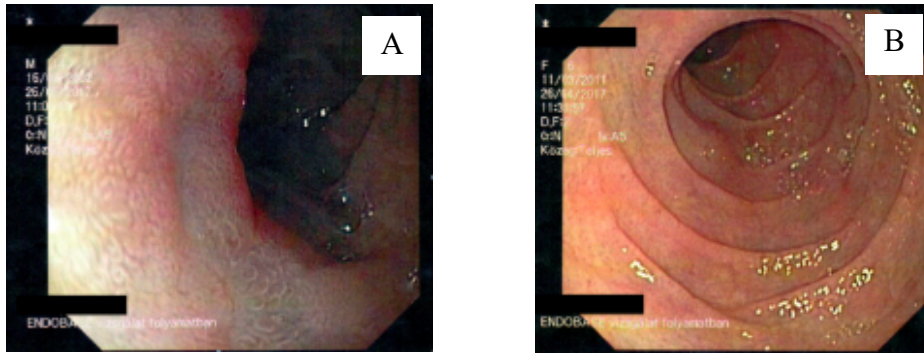
A szerológiai vizsgálatok során cöliákia specifikus ellenanyagok jelenlétét igyekszünk igazolni. Fontos, hogy a beteg normális, glutént tartalmazó étrenden legyen. Az elmúlt évtizedben a cöliákia specifikus, elsősorban anti-tTG antitest tesztek elérhetősége a betegség diagnosztikáját megkönnyítette, felgyorsította. Az ellenanyagok döntően IgA típusúak, de mivel a cöliakiás betegek kb. 5%-a IgA hiányos állapotban van, ezért az össz IgA szintet minden esetben meg kell határozni. Alacsony össz IgA (<0,2g/l) esetén IgG cöliákia antitesteket kell vizsgálni, mert az IgA tesztekkel álnegatív eredményt kaphatunk. A leggyakrabban végzett szerológiai vizsgálat a tTG és a DGP ellenes IgA és IgG antitestek kimutatása kvantitatív enzim-kapcsolt immunoszorbens vizsgálattal. Ritkábban endomízium ellenes (EMA) IgA antitest kvalitatív kimutatása történik indirekt immunfluoreszcenciával, a tTG-ben gazdag szövetekből készült metszetekhez való kötődésük alapján. A szerológiai vizsgáló módszerek nemcsak a diagnózis felállítására, hanem a terápia eredményességének nyomon követésére és a fokozott kockázati csoportba tartozók szűrésére is alkalmasak. Előzetes pozitívitás esetén a GFD betartásának ellenőrzésére leggyakrabban a tTG ellenes antitest titerének változását használjuk, de elviekben bármelyik vizsgálattal lehet követni a beteg állapotát, amely a diagnózis felállításakor pozitív volt. A tTG ellenes antitest kimutatása gyorseszt segítségével is történhet, teljes vérből a saját vörösvértestekből felszabadított tTG-hez való kötődés alapján. A DGP ellenes antitest teszteket elsősorban kiegészítő vizsgálatként, egyéb cöliákia specifikus ellenanyag negativitás esetén, elsősorban 2 éves kor alatt alkalmazzuk. Az Amerikai Gasztroenterológiai Kollégium ajánlása szerint két évesnél fiatalabb gyerekeknél az IgA anti-tTG és az IgA és IgG anti-DGP tesztek kombinációja, kétéves kor felett az IgA anti-tTG az elsőként választandó szűrővizsgálat cöliákia diagnosztizálására (79). Az anti-retikulin típusú antitest és a jejunum elleni antitest, specificitása nem éri el a fentiekét, ezért használata napjainkban háttérbe szorult csakúgy, mint a natív anti-gliadin antitest teszt. A nem cöliakiás glutén szenzitivitás laboratóriumi tesztjeként ez utóbbi új szerepet tölt be. Ép immunrendszerű, normálisan táplálkozó betegnél negatív eredményű cöliákia specifikus antitest vizsgálat gyakorlatilag kizárja a lisztérzékenység lehetőségét.

1.1.4.2 HLADQ2 és HLADQ8 genetikai vizsgálatok

A HLADQ2 és HLADQ8 genetikai vizsgálatok az elmúlt évtizedben szerves részei voltak a diagnosztikai protokolloknak. Az ESPGHAN 2012-ben megjelent módszertani ajánlása ezen vizsgálatok elvégzését emelkedett szérums IgA anti-tTG esetén a gasztro-duodenoszkópia kiváltása céljából, valamint a magas rizikó csoportba tartozó egyének szűrő vizsgálatának kezdeti lépéseként javasolta (77). Az ESPGHAN 2019 szeptemberében elfogadott új ajánlása cöliákia kivizsgálása során már sem a gasztro-duodenoszkópia kiváltása céljából sem szűrővizsgálatok kezdeti lépéseként nem javasolja HLA vizsgálatok elvégzését. Tünetmentes de magas rizikó csoportba tartozó gyermekeknél a cöliákia kivizsgálása ugyanazon módszerek alkalmazásával javasolt, mint a tüneteket mutató betegeknél (78).

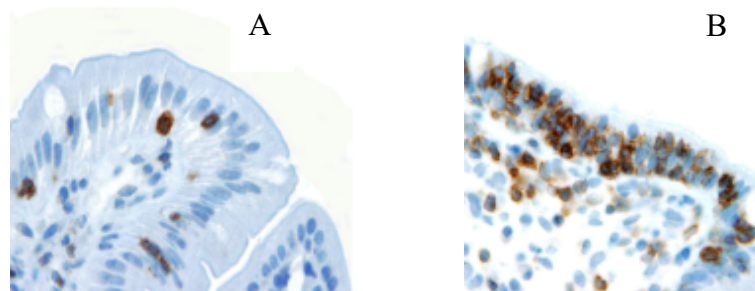
1.1.4.3 Szöveti vizsgálatok

Emelkedett szérums IgA anti-tTG titer (≥ 10 x normál érték) és egyidejű EMA-IgA pozitívitás esetén a betegség diagnózisa igazoltnak tekinthető. Azonban a betegek egy részénél, bizonytalan vagy ellentmondó szerológiai eredmények esetén a diagnózis megerősítéséhez vékonybél biopszia elvégzése javasolt (77,78). A szöveti mintavétel gasztro-duodenoszkópia vagy kapszula endoszkópia során a duodenum bulbusából és alsó haránt szarából történik, elsősorban azért, mert a gliadin a legkoncentráltabb formában a felső bélszakaszokkal érintkezik, így itt a legkifejezettebb a hisztológiai eltérés (3. ábra).



3. ábra. Egészséges gyermek ép bélnyálkahártyájának (A) és cöliákiás gyermek atrófiás nyálkahártyájának (B) endoszkópos képe. (Dr. Cseh Áron, Semmelweis Egyetem, I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika)

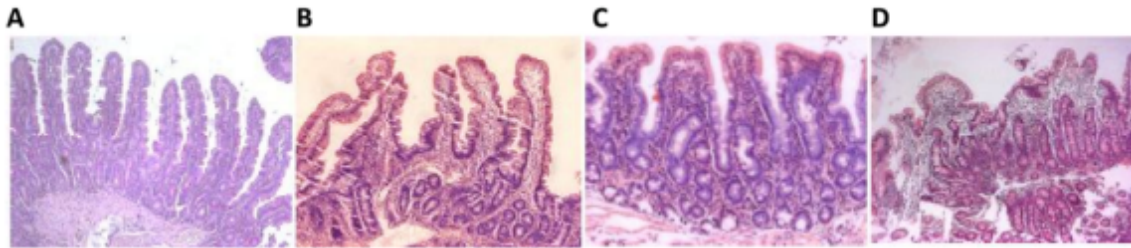
A szövettani vizsgálatnál fontos a minta megfelelő orientációja és a felszín tagoltságának megfigyelése. A kórszövettani leletnek ki kell térnie a bélbolyhok morfológiájára, az atrófia fokára, a kripta hiperpláziára, a villus-kripta arányra és az IEL-ek számának meghatározására. Az IEL felszaporodás (több mint 40 limfocita/100 enterocita) a gliadin indukálta kóros immunreakció egyik legérzékenyebb markere, egyben a legjellegzetesebb szövettani elváltozás a betegségben. Látens cöliákiában az IEL infiltráció az egyetlen kimutatható szövettani eltérés (4. ábra).



4. ábra. Intraepiteliális limfociták (IEL) kimutatása ép (A) és cöliákiás (B) gyermek duodenumából származó biopsziából készült szövettani metszeten CD3-immunhisztokémia segítségével. (Dr. Gyórfy Hajnalka, Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet)

A limfocitákon kívül a plazmasejtek és eozinofil granulociták számának

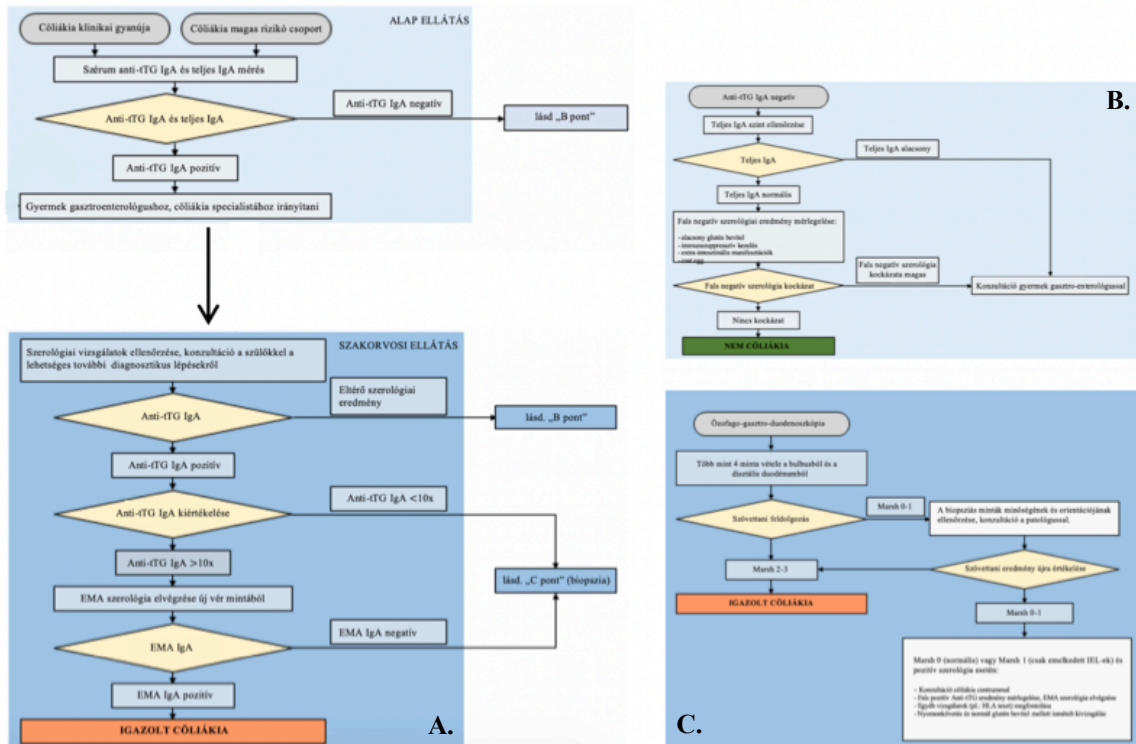
emelkedése a lamina propriában szintén jellemző szövettani eltérés cöliákiában. A boholyatrófia és a Lieberkühn-kripták hiperpláziája a bélnyálkahártya destrukció jelei, súlyos cöliákiában az enterociták károsodása is kimutatható: a sejtek megrövidülnek, a bazális membránról elválnak, citoplazmájuk vakuolizálttá válik. A szövettani értékelés az Oberhuber által módosított Marsh-kritériumok alapján történik (5. ábra).



5. ábra. A vékonybél szerkezeti átépülésének fokozatai. Marsh I: normál struktúra, fokozott intraepiteliális limfocitaszám (A), Marsh II: megtartott hosszúságú bolyhok, meghosszabbodott kripták, boholy/kripta arány 1.5-2 (B), Marsh IIIA: megrövidült bolyhok, boholy/kripta arány 1 körüli (C), Marsh IIIB: alacsony kiemelkedések, megnyúlt kripták, a boholy/kripta arány 0.5 alatt, szubtotális boholyatrófia (D). (Dr. Korponay-Szabó Ilma, Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum)

Amennyiben anti-tTG pozitivitás mellett a szövettani vizsgálat Marsh 2-3 stádiumot mutat, a diagnózis igazolt. Normális szövetten vagy infiltratív lézió (IEL felszaporodás) esetén (Marsh 0-1) további vizsgálatok szükségesek. Típusos tünetek és magas anti-tTG titer (>10x) esetén azonban a boholyatrófia (Marsh 3) esélye kifejezett, ezen esetekben ma már a gasztro-duodenoszkópia és a szövettani mintavétel elhagyása, illetve egyéb laboratóriumi tesztekkel való kiváltása javasolt. Amennyiben súlyos tünetek és kifejezett klinikai gyanú mellett az anti-tTG, EMA és anti-DGP szerológia is negatív, a vékonybél biopszia elvégzése megfontolandó. Egyes cöliákiás tüneteket mutató betegeknél jellemző lehet a fluktuáló (tranziensen pozitív) anti-tTG és anti-DGP szint, ezért az endoszkópia elvégzése ebben a csoportban nem kerülhető el. A diagnózis felállítását követően megkezdett GFD mellett az antitest titer normalizálódása 12 hónapon belül várható.

A cöliákia diagnózisának felállítása többlépcsős folyamat. Az ESPGHAN 2019-ben javasolt kivizsgálási algoritmusát gyermek- és serdülőkori betegség gyanúja esetén a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra. Az ESPGHAN által javasolt diagnosztikus algoritmus cöliákia gyanúja esetén. Rövidítések: EMA: endomízium antitest; HLA: humán leukocita antigén; Ig: immunoglobulin; tTG: szöveti transzglutamináz; GE: gastro-enterológia; (78).

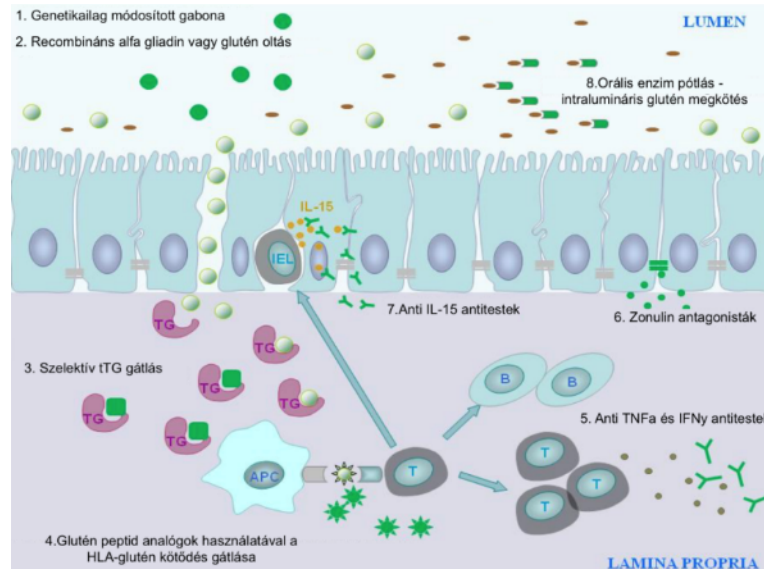
1.1.4.4 Egyéb laboratóriumi és képalkotó vizsgálatok

Számos laboratóriumi eltérés jellemző, de nem specifikus lisztérzékenységre. Gyakran találunk alacsony vas-, transferrin- és ferritin szintet, valamint alacsony szérum-összfehérje, albumin, kalcium, koleszterin és protrombin szintet. A vékonybél nyálkahártya aktív transzportjának zavarát mutatja a kóros d-xilóz teszt. A cöliákia diagnosztikájában a rutin képalkotó vizsgálatoknak (ultrahang, röntgen, CT) nincs szerepe. A hasi ultrahang lelet aspecifikus, esetenként ödémás, megvastagodott falú duodenum és jejunum kacsok ábrázolódhatnak. Elmaradt szomatikus fejlődés esetén csontkor meghatározásához kézcsont röntgenfelvétel, a szekunder oszteoporózis kimutatására csont-denzitometria használható.

1.1.5 Terápia, terápiás célpontok

A cöliákia egyetlen ma ismert, bizonyítottan hatásos kezelése a szigorú, élethosszig tartó gluténmentes diéta, melyet a diagnózis beigazolódását követően haladéktalanul el kell kezdeni és megtartani. A búzából, rozsból, árpából és a származékaikból készült élelmiszerek fogyasztása még kis mennyiségben is káros lehet. Glutén kontamináció gluténmentes élelmiszerekben is előfordulhat, de napi 10 mg glutén bevitele még tolerálható (39). GFD hatására a klinikai tünetek javulása heteken belül jelentkezik, azonban a morfológiai változáshoz legalább 6-24 hónap szükséges. A malignus betegségek fokozott kockázata tartós GFD mellett hosszú távon lecsökken. Fontos a beteg szoros utánkövetése, testsúlygyarapodását, növekedését folyamatosan ellenőrizni kell. A diéta betartását szerológiai vizsgálatokkal célszerű követni. A GFD betartása nem egyszerű feladat, komoly önfegyelmet és együttműködést igényel. A speciális diéta költséges és negatív hatással lehet az életminőségre. A beteg elégtelen együttműködése, mely akár a cöliákiások 40%-át is érintheti, a remisszió legfőbb akadálya. Ez elsősorban tizenévesekre és a szűrő vizsgálaton diagnosztizált betegekre jellemző. A betegek egy kis részénél (refrakter cöliákiások) szigorú GFD megtartása mellett sem következik be gyógyulás (39).

Az elmúlt években számos GFD-t kiváltó alternatív terápiás lehetőség került a kutatások fókuszába, új hatásmechanizmusú gyógyszerek kifejlesztése folyamatban van. Az elméleti lehetőségeket a 7. ábra foglalja össze. A genetikailag módosított, vagyis immunológiailag inert gabona előállítását az exogén provokáló faktort küszöbölné ki (81). Vannak próbálkozások a glutén intralumináris megkötésére is. Egyes nagy molekulású szintetikus polimerek (pl.:P-HEMA-co-SS) képesek szelektíven kötődni a gluténhez, így meggátolva lebontásukat, abszorpciójukat és az immunogén glutén peptidek interakcióját a szubmukóza immunsejtjeivel. Az orális enzimterápia elméleti lehetőség a humán gasztrointesztinális traktusban elégtelen mennyiségben jelenlévő, az immunogén prolinban gazdag glutén peptidek hidrolizálását végző prolin endopeptidáz (PEP) pótlását célozná. A módszer analóg az exogén laktáz pótlásával laktóz intolerancia kezelése esetén.



7. ábra. A cöliákia alternatív kezelési lehetőségei a betegség patomechanizmusának ismeretében. Rövidítések: tTG: szöveti transzglutamináz; IEL: intraepiteliális-limfocita; IL-15: interleukin-15; APC: antigén prezentáló sejt; HLA: humán leukocita antigén; T: T-limfocita; B: B-limfocita; TNF: tumor nekrozis faktor; IFN: interferon (módosított ábra 80).

Enzimatikusan aktív PEP-eket számos mikrobióta (Flavobaktériumok, Aspergillus, Myxococcus, stb.) képes előállítani és egyes készítmények már kereskedelmi forgalomban is elérhetők, habár egyértelmű hatásosságukat klinikai vizsgálatok még nem igazolták (82, 83). A cöliákiára jellemző fokozott intesztinális permeabilitás gátlásának egyik ígéretes hatóanyaga az AT-1001 elnevezésű oktatpeptid (Larazotid), mely a zonulin receptor aktiváció antagonizálásával az intesztinális szoros sejtkapcsoló struktúrák integritását segíti elő. Az első multicentrikus, több mint 300 beteg körében végzett vizsgálat eredményei biztatóak (84). A jelenleg is folyamatban lévő 2B fázisú vizsgálat a szer hatékonyságát GFD-t tartó, nem tünetmentes betegek körében vizsgálja (ClinicalTrials.gov,identifier:NCT01396213). A glutén peptid deamidálásának blokkolása tTG inhibitorok alkalmazásával, valamint a deamidált peptid kötődésének gátlása a HLA molekulákhoz HLADQ2 inhibitorok alkalmazásával *in vitro* kivitelezhető, azonban számos potenciális mellékhatásuk miatt klinikai alkalmazásukra nem történt kísérlet. A biológiai terápiák közül biztató klinikai vizsgálatok vannak folyamatban, többek között a sejtfelszíni kemokin receptor 9 antagonista Vercirnon, a TNF- α gátló

Infliximab, a humanizált anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin antitest Vedolizumab és az IL-15 gátló (Hu-Max IL-15) hatásáról (85, 83).

Az egyik legígéretesebb újszerű terápiának azonban a glutén eredetű vakcina tűnik (83). A hatásmechanizmus elve hasonló az allergiás állapotokban a teljes fehérjéket alkalmazó deszenzitizációs terápiának. A Nexvax2 vakcina három rövid gluténpeptid kombinációjából áll, amelyek immunaktív epitópok a HLA-DQ2.5-re. A biztató előzetes eredmények után, 2019 januárjában az USA Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala gyorsított eljárással engedélyezte a II-es fázisú klinikai vizsgálatok megkezdését. A szubkután beadott vakcina hatékonyságának kiértékelésére indított II-es fázisú, randomizált klinikai vizsgálat folyamatban van (ClinicalTrials.gov, identifier: NCT03644069).

1.2 A Parkinson-kór protein-7 (PARK7)

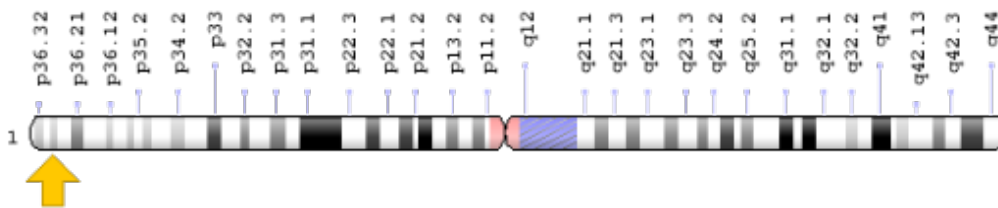
1.2.1 A PARK7-gén és a Parkinson géncsalád

A PARK7 vagy korábbi elnevezése szerint DJ-1 molekula génjét elsőként Arriga és munkatársai azonosították 1997-ben. NIH3T3 egér embrionális fibroblaszt sejteken végzett kísérleteik során kimutatták, hogy a DJ-1 transzformáló aktivitással rendelkezik és szerepe van a Ras mediált jelátvitel aktivációjában, egy új mitogén-dependens onkogént írták le (86). 2001-ben Heutink és mtsai. familiáris Parkinson-kórban szenvedő holland betegeknél egy addig azonosítatlannak vélt gén nagyméretű delécióját és missense mutációját fedezték fel és megállapították kóroki szerepét a betegség kialakulásában. Mindezek alapján javasolták az általuk leírt gén PARK-géncsaládba történő besorolását PARK7 néven (87). Két évvel később Bonifati és mtsai. igazolták, hogy a DJ-1 és a PARK7 ugyanaz a molekula kétféle elnevezéssel (88).

A fent említett PARK-géncsalád tagjai - amint arra nevük is utal - a második leggyakoribb progresszív neurodegeneratív kórképpel, a Parkinson-kórral asszociált molekulák. A Parkinson-kór a legtöbb esetben idiopátiás, időskorban manifesztálódik, pontos oka nem ismert, kialakulásában környezeti és genetikai tényezők egyaránt szerepet játszhatnak. A betegek 5-10%-ánál azonban a betegség korai kezdetű, családi

halmozódást mutat, és a kórállapot kialakulása egyes specifikus gének mutációira vezethető vissza. Ennek kapcsán eddig 19 gént és 23 lókuszt azonosítottak (89). Az első molekula, melynek familiáris Parkinson-kórban betöltött kóroki szerepét kimutatták, az α -szinuklein (PARK1/PARK4) volt. A fehérje facilitálja a szinaptikus transzmissziót, befolyásolja a neurotranszmitterek felszabadulását és a vezikulumok ürülését. A gén mutációit igazolták a betegség autoszomális domináns módon öröklődő formájában. A natív protein szerkezetében történő konformációváltozás oldhatatlan aggregátumok kialakulásához vezet, melyek zárványokká stabilizálódva Lewy-testeket képeznek, és citotoxikus hatást fejtenek ki (90,91). A Parkin (PARK2) és a proteinfoszfataz és tenzin homológ (PTEN)-indukált kináz-1 (PARK6) részt vesznek a normális mitokondriális működés szabályozásában, valamint a diszfunkcionális fehérjék megjelölésével hozzájárulnak az ubiquitin-proteaszóma rendszer zavartalan működéséhez (92). Mutációik autoszomális recesszív úton öröklődő, szintén fiatal felnőtt korban manifesztálódó betegséghez vezetnek. A PARK7 a harmadikként felfedezett autoszomális recesszív öröklésmentet mutató PARK-gén volt. Mutációi rendkívül ritkák, a korai kezdetű Parkinson-kóros esetek kevesebb, mint 1%-át teszik ki. Általánosságban elmondható, hogy a PARK7 mutációval rendelkező betegek klinikai megjelenése hasonló a PARK2 vagy a PARK6 mutációval összefüggő parkinsonizmushoz (93).

A PARK7-gén az 1-es kromoszóma rövid (p) karján a 36.23 pozícióban, a 7.961.654 és 7.985.282-es bázispárok között helyezkedik el (8. ábra).

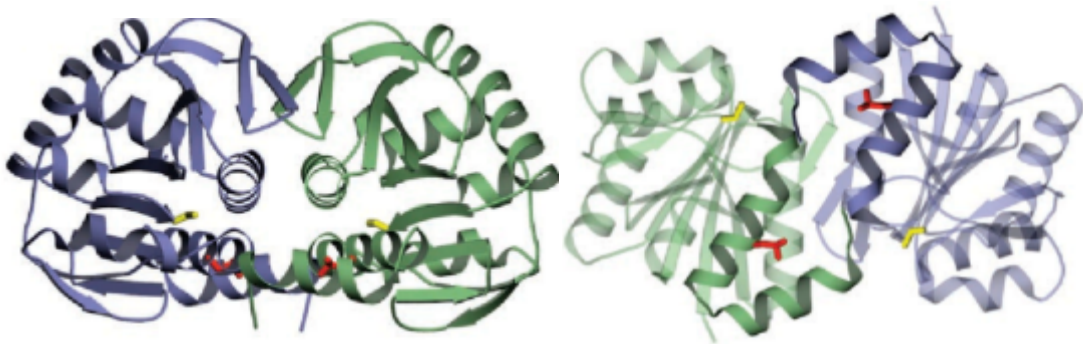


8. ábra. A PARK7-gén helye az 1. kromoszómán (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/>).

A génnek több mint 25 mutációja és deléciója ismert, melyek közül az L166P, M26I és A104T pontmutációk a fehérje súlyos strukturális károsodásához, destabilizálódáshoz és funkciójának kieséséhez vezetnek (94).

1.2.2 A PARK7-fehérje szerkezete

A PARK7-fehérje a DJ-1/Hsp31/PfpI “fehérje-szupercsalád” tagja, melyet szerteágazó sejtbiológiai funkciókat ellátó, de hasonló terciér strukturával rendelkező fehérjék alkotnak. A PARK7-gén által kódolt fehérje a C56 peptidáz proteincsalád tagja, mely jelentős konzervativitást mutat a prokariótáktól az eukariótáig (94,95). A PARK7-protein 189 aminosavból áll, homodimert képez és másodlagos struktúrájára jellemző, hogy 9 β -redőt, 11 α -hélixet és 3 β -görbületet tartalmaz (94). A fehérje térbeli szerkezetét a 9. ábra mutatja be.



9. ábra. A homodimer PARK7-molekula háromdimenziós szerkezete. A sárgával jelölt cisztein (Cys-106), valamint a piros színnel kiemelt leucin (Leu-166) mutációja Parkinson-kór kialakulásához vezet (96).

Filogenetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a Cys-106 helyen elhelyezkedő cisztein erősen konzervált és kulcsfontosságú szerepet játszik a fehérje zavartalan működésében, úgy mint a proteáz aktivitás vagy a chaperon funkció. Míg a Cys-106 ciszteint érintő mutációk a fehérje teljes funkcióvesztését eredményezik, a szulfonsavvá oxidálódott Cys-106-ot (Cys-SO₃H) tartalmazó fehérjét a PARK7 inaktív formájának gondolják (95).

1.2.3 A PARK7 szöveti lokalizációja

A PARK7 szinte valamennyi sejtben és szervben expresszálódik. Elsősorban a citoplazmában található, de fellelhető a sejtmagban és a mitokondriumokban is. Oxidatív

stressz hatására a citoplazmában elhelyezkedő PARK7 3 órán belül a mitokondriumokba, 12 óra elteltével a sejtmagba transzlokálódik, míg egyes mutáns formák (L166P, M26I) esetén monomerek formájában felszaporodik a mitokondriumokban (97). Sejtkultúrában és szövettényészetben a PARK7 szecernálódni is képes (98).

1.2.4 A PARK7 főbb funkciói

1.2.4.1 A PARK7 redox-szenzitív citoprotektív hatásai

A jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a PARK7 egy szerteágazó biológiai funkciókkal rendelkező redox-szenzitív citoprotektív fehérje.

Normál körülmények között az oxigén-metabolizmus melléktermékeként keletkező, főként a mitokondriumok által előállított ROS-ok a fiziológiás intracelluláris jelátviteli folyamatok fontos szabályozói. Excesszív módon megemelkedett ROS hatására azonban a sejtekben oxidatív stressz alakul ki, ami sejt- és szövetkárosodáshoz vezethet. A sejtek védekezéséppen antioxidáns rendszerek aktiválásával reagálnak a magas ROS szintekre. A két legfontosabb antioxidáns rendszer, a tioredoxin (Trx) és a glutation rendszer (GSH) mellett a sejtekben számos más antioxidáns funkciójú fehérje is van, melyek szintén szerepet játszanak a redox homeosztázis fenntartásában. Az elmúlt években számos kutatócsoport igazolta, hogy a PARK7 antioxidáns funkciókkal rendelkezik és citoprotektív hatása a fokozott oxidatív stresszel szemben. Emelkedett expresszióját és antioxidáns szerepét változatos oxidatív stressz-ingerek hatására különféle sejtípusokban és szövetekben is kimutatták (99,100).

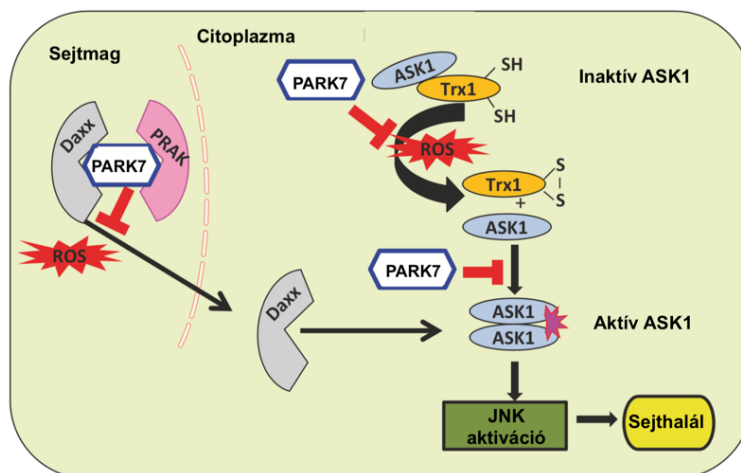
A PARK7 különböző oxidációs szintje a fehérje antioxidáns működésének indikátora, mely egyes betegségekben jellegzetes eltérést mutat. A fehérje három redoxérzékeny cisztein-maradékot tartalmaz, melyekből a Cys-106 alapvető fontosságú az oxidatív stressz elleni citoprotektív hatás tekintetében (101,102). Humán epiteliális sejtkultúrákon végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy oxidatív stressz hatására a PARK7 izoelektromos pontja savas irányba tolódik el. H₂O₂ hatására a fehérje szabad cisztein végződése, elsősorban a leginkább érzékeny Cys-106 pozícióban lévő ciszteinek, szulféná (Cys-SOH), szulfinná (Cys-SO₂H), végül szulfonsavvá (Cys-SO₃H) oxidálódnak (103). A Cys-106 oxidációs állapotától függően a fehérje különböző

sajátságokat mutat. Mai ismereteink szerint a PARK7 enyhe oxidált állapotban aktív, mely elengedhetetlen a normál mitokondriális lokalizációhoz és a fehérje működéséhez (104). Az érzékeny egyensúlyt mutatja, hogy a Cys-106 további oxidációjával viszont a fehérje elveszíti biológiai funkcióját (105).

Kimutatták, hogy a PARK7-fehérje Cys-106 oxidációja révén képes közvetlen módon eliminálni ROS-okat. Ez egy atipikus peroxidáz-szerű aktivitás, nem enzimkatalizált módon zajlik és ezáltal lényegesen kevésbé hatékony, közel 1000-szer lassabban történik, mint amire az antioxidáns rendszerek (Trx, GSH) képesek (106).

A PARK7-fehérje fő antioxidáns hatását tehát elsősorban nem az imént említett közvetlen módon, hanem a sejtek redox állapotát érzékelő szignál molekulaként fejt ki. A PARK7 ugyanis számos olyan fehérjéhez kötődhet, amelyek az oxidatív stressz által indukált sejthalál ellen védik a sejteket és szabályozza azok működését. Ilyenek többek között az apoptózis-szignál szabályozó kináz-1 (ASK1), a paraoxonase-2, a p38-regulált/aktivált kináz (PRAK) vagy a Trx (102,107,108). A PARK7 és ASK1 kapcsolat létrejöttében a PARK7 másik két ciszteinje, a Cys-53 és Cys-46 is jelentős szabályozó szerepet tölt be (102).

Az ASK1 egy olyan mitogén-aktivált protein kináz-kináz-kináz (MAPKKK), mely oxidatív stressz hatására aktiválódik, és a sejtek apoptózisához vezető folyamatokat indukál. Normál körülmények között az ASK1 a Trx1 redukált formájához kötődik, amely az ASK1-et inaktív állapotban tartja. Oxidatív stressz hatására a Trx1 oxidálódik, felszabadítja az ASK1-et, mely apoptózist vált ki. A PARK7 az ASK1 aktiválódását többféle módon is gátolja. Egyrészt, az ASK1-hez közvetlenül kötődve megakadályozza annak homodimerizációját, másrészt gátolja az ASK1-et inaktív formában tartó Trx1 disszociációját (109,102,110). Ezen felül a PARK7 gátolja az ASK1 aktivátoraként működő halál-domén asszociált (Daxx) fehérjét is. Nem stimulált sejtekben a Daxx általában a sejtmagban helyezkedik el, azonban oxidatív stressz körülmények között átjut a citoplazmába, ahol aktiválhatja az ASK1-et, mely folyamat végül apoptózishoz vezet. Kimutatták, hogy oxidatív stressz során a PARK7 a sejtmagban tartja a Daxx-ot, megakadályozva így az ASK1 aktiválódását a citoplazmában (102). Összességében tehát a PARK7 több ponton is gátolhatja az ASK1 által irányított apoptotikus útvonalakat, melyet a 10. ábra szemléltet (110). A PARK7 mutáns formái nem rendelkeznek ezen tulajdonságokkal.

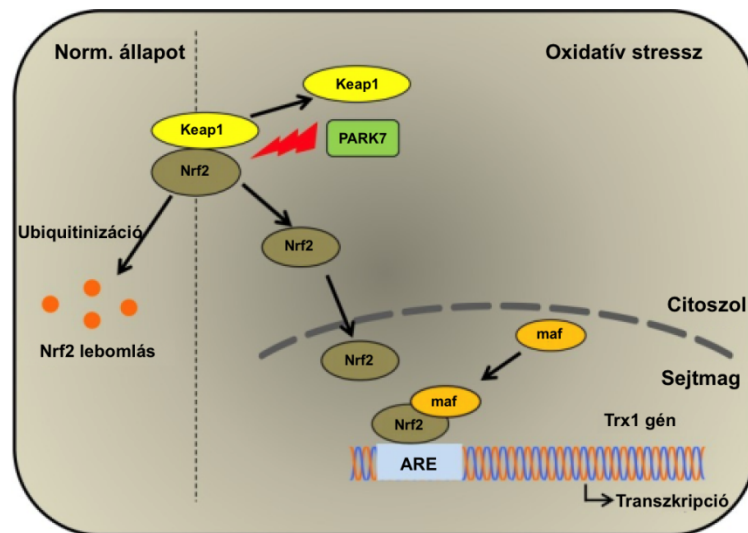


10. ábra. A PARK7 szerepe az apoptózis-szignál szabályozó kináz-1 (ASK1) aktivitásának szabályozásában. Oxidatív stressz okozta inger során a PARK7 gátolja a tioredoxin-1 (Trx1) disszociációját az ASK1-ről és megakadályozza az ASK1 dimerizációját. Gátolja továbbá a halál-domén asszociált (Daxx) fehérje citoplazmába vándorlását a sejtmagból, így az nem képes aktiválni az ASK1-et. A p38-regulált/aktivált kináz (PRAK) nukleáris fehérje is kötődik a PARK7-hez, amely szekvesztrálja a Daxx-ot a sejtmagban, és megakadályozza, hogy az bekerüljön a citoplazmába. JNK: c-Jun N-terminális kináz; ROS: Reaktív oxigéngyökök (111).

1.2.4.2 A PARK7 citoprotektív gének expresszióját szabályozó funkciója

A PARK7 citoprotektív hatását antioxidáns funkcióval rendelkező fehérjéket kódoló gének expressziójának serkentésével is elősegíti. Clements és mtsai kimutatták, hogy a PARK7 befolyásolja az antioxidáns válaszok fő regulátorának, a nukleáris faktor eritroid 2 kapcsolatos faktor-2 (Nrf2) stabilitását és transzkripció aktivitását (112). Az Nrf2 transzkripció faktor által aktivált antioxidáns sejtválasz a sejtek legjelentősebb védelmi reakciója az oxidatív stressz okozta citotoxikus hatásokkal szemben. A több mint 200 antioxidáns és II-es fázisú detoxifikáló enzim, valamint számos stresszválasz fehérje átírását moduláló és koordinált indukcióját szabályozó Nrf2-öt az oxidatív stressz által kiváltott sejtválasz fő szabályozójának tekintik. Az Nrf2 transzkripció faktor az antioxidáns fehérjéket kódoló gének (beleértve a Trx és a GSH számos tagját) promoter régiójában fellelhető antioxidáns válaszelemhez (ARE) kötődik. Nyugalmi állapotban a

citoplazmában elhelyezkedő, instabil Nrf2 komplexet alkot a Kelch-szerű ECH asszociált protein-1 (Keap1)-el, melynek hatására az kötődik a citoskeletális aktinhoz és ubiquitinizációt követően proteázok által degradálódik. Az Nrf2 aktivációjához és nukleáris transzlokációjához az Nrf2-Keap1-komplex disszociációja szükséges, melyet a Keap1 cisztein oldalláncainak oxidációja és/vagy a Keap1 proteozomális degradációja válthat ki. Igazolták, hogy a PARK7 gátolja az Nrf2 ubiquitinizálódását és az Nrf2-Keap1-komplex kialakulását, ily módon facilitálja az Nrf2 nukleáris transzlokációját. Később Cuevas és mtsai. *in vivo* egér kísérletei bizonyították, hogy a PARK7 jelenléte elengedhetetlen az Nrf2-fehérje ubiquitinizációjának megakadályozásához (113) (11. ábra).

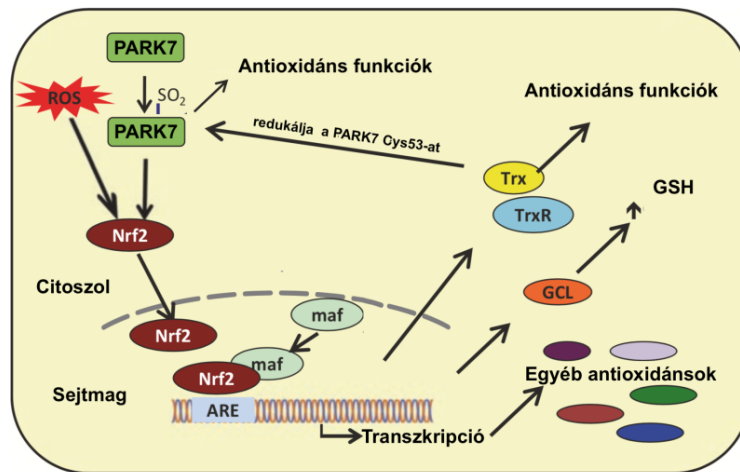


11. ábra. A PARK7 szerepe a nukleáris faktor eritroid 2-kapcsolatos faktor 2 (Nrf2) szabályozásában. Részletes leírás a szövegben. Rövidítések: ARE:antioxidáns válaszelem; Keap1: Kelch-szerű ECH asszociált protein 1; Ub: ubiquitin; Maf: v-maf muszkuloaponeurotikus fibroszarkóma onkogén homológ (114).

Malhotra és mtsai. krónikus obstruktív tüdőbetegségekben az oxidatív stressz által kiváltott Nrf2-dependens sejtválaszt vizsgálták Baes2B humán tüdő epitél, illetve PARK7 génkiütött egér embrionális fibroblaszt MEF sejtvonalakon. Kísérleteikben a

PARK7 hiány csökkentette az Nrf2-mediált cigarettafüst indukálta változásokat, és az Nrf2- dependens géntranszkripciót az oxidatív stressz során (115). Cheng és mtsai. a PARK7 gasztrointesztinális nyálkahártyára kifejtett protektív hatását igazolták ketofen-indukált oxidatív stressz során. Humán intesztinális epitél sejtvonalon és patkány gyomor nyálkahártyán végzett kísérleteik során kimutatták, hogy az exogén antioxidáns kávésav nyálkahártyavédő hatása az Nrf2 által szabályozott II-es fázisú antioxidáns enzimek aktiválása révén, PARK7-dependens módon megy végbe (116).

Im és munkacsoportja génkiütött egereken és sejt kultúrákon végzett kísérletei során az Nrf2-aktivációt követő Trx1-gén expresszióját vizsgálták. Igazolták, hogy a PARK7 fokozott jelenléte növeli az Nrf2-fehérje szintjét, elősegíti annak transzlokációját a magba és fokozza a Trx1-gén expresszióját és így végső soron citoprotektív hatást fejt ki (117). A Trx-hez hasonlóan ismertek a GSH és a PARK7 közötti közvetlen, valamint Nrf2-útvonalon keresztüli jelátviteli interakciók is. Oxidatív stressz körülmények között a glutamát cisztein-ligáz (GCL) enzim expressziójának és aktivitásának fokozásával a PARK7 növeli az intracelluláris glutationszintézisét. (12. ábra).



12. ábra. A PARK7 szerepe az antioxidáns tioredoxin (Trx) és glutation rendszerek (GSH) szabályozásában. Oxidatív stressz esetén a PARK7 aktiválja a nukleáris faktor eritroid 2 kapcsolatos faktor-2 (Nrf2)-t, amely fokozza az antioxidáns válaszelemmel (ARE) rendelkező gének, köztük a Trx, Trx receptor (TrxR), glutamát cisztein-ligáz (GCL) és egyéb antioxidánsok expresszióját. A Trx antioxidatív hatású a sejtben, valamint képes redukálni a PARK7 Cys53 maradékát, így szabályozva annak funkcióját.

A GCL fokozott GSH szintézist eredményez. Egyéb rövidítések: ROS: reaktív oxigéngyök; Maf: v-maf muszkuloaponeurotikus fibroszarkóma onkogén homológ (módosított ábra 111).

Összefoglalva: a PARK7 fontos szerepet játszik az Nrf2 szabályozásában, és ezáltal aktívan részt vesz az antioxidáns védekező rendszer megfelelő működésében.

1.2.4.3 A PARK7 citoprotektív és antiapoptotikus szerepe hipoxia-indukált stressz során

A hipoxia a rendelkezésre álló és a sejtek által felhasznált oxigén mennyisége közti egyensúlyhiány miatt fellépő állapot, mely jelentős szerepet játszik különféle kórfolyamatok kialakulásában és progressziójában. A hipoxia indukálta faktor (HIF)-1 egy α és β alegységből álló heterodimer transzkripciós faktor, melynek kiemelt szerepe van a sejteket érő hipoxiás körülmények károsító hatásának kivédésében. Normoxiás körülmények között a HIF-1 α szintje alacsony, ugyanis prolin-hidroxilázok hidroxilálják és a Von Hippel-Lindau (VHL) fehérje általi ubiquitinizációt követően végbemegy proteasomális degradációja. A VHL egy tumor szupresszor fehérje, melynek legjobban ismert biokémiai funkciója az aktivált E3 ubiquitin-ligáz komplexben való résztvétele, és a fehérje egyik fő szubsztrátja a HIF-1 α (118). Hipoxiás körülmények között vagy emelkedett ROS szintek mellett a HIF-1 α stabilizálódik, mennyisége jelentősen emelkedik és a sejtmagba transzlokálódik. Az aktív HIF-1 α és β alegységből álló heterodimer számos, a sejt hipoxiában és oxidatív stressz által kiváltott adaptációjában részt vevő gén expresszióját indítja be. Felfedezése óta több mint 60 génre kifejtett hatását igazolták. Paradox módon a HIF-1 ROS-aktivitást igényel, de a Trx szabályozása alatt is áll, amely redukálja a specifikus cisztein maradékait (119).

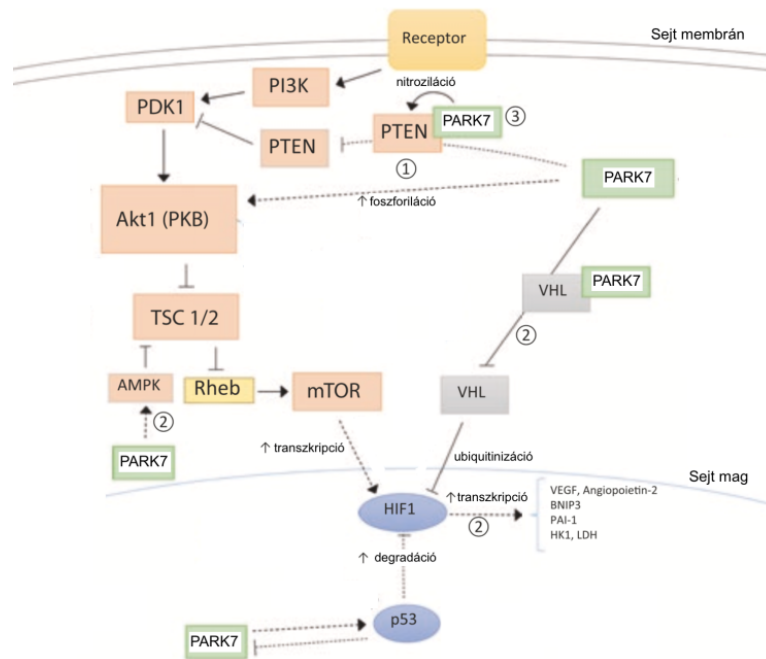
Az elmúlt években számos munkacsoport figyelme a PARK7 és a HIF-1 feltételezett interakciói felé fordult (107,118,120,121). Parsanejad és mtsai. humán neuroblasztoma SH-SY5Y sejtvonalon és L166P mutációt hordozó betegekből vett limfoblaszt kultúrán végzett kísérletei során kimutatták, hogy a PARK7 kötődik a VHL-fehérjéhez és oxidatív stressz hatására a kötődés fokozott affinitást mutat. Bizonyították, hogy PARK7 hiányában a hipoxiás körülmények között észlelt alacsony HIF-1 α -aktivitás poszttranszlációs szinten, a VHL ubiquitin ligáz fokozott aktivitásának

következtében alakul ki. A PARK7 tehát a HIF-VHL-interakció gátlásán keresztül megakadályozza a HIF-1 α lebomlását. A PARK7 hiánya vagy csökkent működése pedig alacsonyabb HIF-1 α -szintet eredményez (107).

Vasseur és mtsai. U2OS human oszteosarkóma sztóma és NIH3T3 egér fibroblaszt sejteken végzett kísérletsorozatban kimutatták, hogy hipoxiában a normál PARK7 funkció nélkülözhetetlen a HIF-1 által szabályozott gének transzkripciójához és igazolták a PARK7 citoprotektív hatását hipoxia indukálta apoptózissal szemben (121). Kimutatták, hogy a PARK7 nem csak a VHL-ubiquitin ligáz gátlásán keresztül befolyásolja a HIF-1 működését, hanem szignalizációs útvonalakat is modulálhat. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) – protein kináz B (Akt) – rapamicin emlős target (mTOR) jelátvivő útvonalnak központi szerepe van a sejtciklus, az apoptózis és a sejtek anyagcseréjének szabályozásában. A PI3K aktiválódása az Akt foszforilációjához vezet, ami azután számos egyéb fehérjét foszforilálva aktiválja az antiapoptotikus, és egyúttal gátolja a proapoptotikus folyamatokat, illetve serkenti a sejtosztódást. A HIF-1 alegységek stabilizálása és aktiválása hipoxiában részben a PI3K/Akt/mTOR útvonal irányítása alatt áll, melyet a PARK7 több ponton is modulál. A PARK7 egyrészt növeli a foszforilált Akt szintjét, másrészt közvetlenül is képes kötődni a PI3K/Akt útvonal negatív regulátoraként ismert PTEN fehérjéhez, gátolva annak enzimatis aktivitását (122,123). A PARK7 tehát a PI3K/Akt/mTOR útvonal aktivációja révén elősegíti a HIF-1 aktiválódását és citoprotektív hatást fejt ki (13. ábra).

Keyser és mtsai. a PARK7-gén egy olyan 16 bázispár deléciós variánsát azonosították, mely rendkívül fontos szerepet tölt be a transzkripció szabályozásában. Bioinformatikai analízis révén a PARK7-gén promoter régiójában potenciális kötőhelyet találtak három transzkripciós faktor, köztük a HIF-1 számára is (125). A PARK7 tehát a fent említett indirekt hatásai mellett közvetlenül a HIF-1-hez kötődve is szerepet játszhat a hipoxia elleni védelemben.

Továbbá a PARK7 fokozza az 5'-adenozin monofoszfát-aktivált protein kináz (AMPK) aktiválódást és közvetlen kötődés révén szabályozza a p53 aktivációját is. A p53 gén sejtciklus szabályzó és tumorszupresszor hatása mellett, részt vesz oxidatív stressz során a mitokondriális homeosztázis fenntartásában. A PARK7 a hipoxia indukálta apoptózissal szembeni citoprotektív hatását a p53 dependens proapoptikus gének expressziójának negatív regulációja révén is kifejtheti (121).



13. ábra. A PARK7 szerepe a hipoxia indukálta stressz során. 1. A PARK7 fokozza a protein kináz B (Akt1/PKB) foszforilációját, ezáltal aktiválja a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K)/Akt/ rapamicin emlős target (mTor) jelátviteli útvonalat, mely fokozza a hipoxia indukált faktor (HIF)-1 transzkripcióját (123,122). 2. Hipoxiás körülmények között a PARK7 elősegíti a HIF-1 aktiválódását, amely számos olyan gén expresszióját indítja be, amely a sejtek hipoxiás körülményekhez való alkalmazkodásához szükséges. Ezt a PARK7 a PI3K/Akt útvonal modulálásán keresztül az mTOR aktivitás fokozásával, a p53 aktiváció gátlásával, valamint a Von Hippel-Lindau (VHL)-hez kapcsolódva a HIF-VHL-kölcsönhatás gátlásával éri el (121,107). 3. A PARK7 a Cys-106 redox státuszától függően közvetlenül képes kötődni a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN)-hez és gátolja annak aktivitását (101). További rövidítések: PDK1: piruvátdehidrogenázkináz 1; TSC-1: szklerózis tuberoza komplex 1; AMPK: 5' adenozinmonofoszfát-aktivált protein kináz; VEGF: vaszkulárisendoteliális növekedési faktor; BNIP3: BCL2 interakciós protein 3; PAI-1: plazminogénaktivátor inhibitor 1; HK-1: hexokináz 1; LDH: laktát dehidrogenáz (módosított ábra 124).

A PARK7 ezen felül az extracelluláris szignál-regulált protein kináz (Erk)1-2/ETS domént tartalmazó protein (Elk1) útvonalon keresztül szabályozza a szuperoxid-diszmutáz termelését. PARK7 hiányában elmarad az Erk1 nukleáris transzlokációja és az

Elk1 aktiválása, mely oxidatív stresszben a szuperoxid-dizmutáz expresszió egyik fő induktora (126).

1.2.4.4 PARK7 szerepe az immunválasz szabályozásában

Számos adat utal arra, hogy a PARK7 a TLR-ek működésének modulálásán keresztül, szerepet játszhat a veleszületett immunválasz szabályozásában (127). A TLR-ek a veleszületett immunválaszban résztvevő sejtek felszínén illetve intracellulárisan megtalálható receptorok, melyek konzervált struktúrákat, kórokozókhoz kapcsolt molekuláris mintázatokat ismernek fel. A különféle TLR-ek változatosan expresszálódnak az immunsejteken és különböző exogén és endogén stimulusok hatására (lipopoliszacharidok (LPS), glikolipidek, HSPk, stb.) aktiválódnak (128). A TLR-ek aktiválódása során a proinflammatorikus citokinek és kostimulátor molekulák expressziója fokozódik, mely a beható ágenssel szembeni védekezés mellett, az adaptív immunrendszer aktiválódásához vezet (129).

A TLR család elsőként azonosított és a mai napig is egyik legtöbbet vizsgált tagja a TLR4. A TLR4 ligandkötése során aktiválódó intracelluláris jelátvitel alapvetően három úton megy végbe. Az aktivált TLR4 adapter molekulájához, a Myd88-hoz kapcsolódva az IRAK/TRAF6/MKK/JNK útvonalon keresztül a sejtmagban aktiválja az aktivátor protein 1-et (AP-1), mely proinflammatorikus gének transzkripciójához vezet. Ezen kívül a TLR4 a p38 MAPK-n keresztül, valamint egy Myd88 független úton is képes aktiválni az Nf- κ B transzkripciós faktort (130,131). A promoter régiókhoz kötődve a sejtmagban az Nf- κ B számos citokin, adhéziós molekula génjének transzkripcióját serkenti (pl. IL-1 β , IL-6, TNF- α). A TLR4 ugyancsak a p38 MAPK és az Nf- κ B útvonalalak aktiválásával részt vesz az iNOS transzkripciójának szabályozásában (132,133).

Waak és mtsai. a PARK7-fehérje TLR-ek működésére kifejtett hatását primer egér asztrocita sejt kultúrákon vizsgálták (134). Kísérleteikben TLR4-agonista LPS-al indukált PARK7-knock-out sejt vonalban több mint tízszeres mennyiségű NO termelést észleltek a kontrollhoz képest. Igazolták, hogy ha a PARK7 nem volt jelen, nem gátlódott az LPS által aktivált TLR4-ASK1-p38 MAPK kaszkád, és mindez az iNOS és következményesen a NO fokozott termelődéséhez vezetett. A PARK7 kiesése a vizsgált sejtek TLR4-aktiváció által kiváltott iNOS dependens apoptózist idézte elő.

Kim és mtsai kimutatták, hogy a PARK7-fehérje a sejtek membránján található ún. lipid-raft mikrodoménekekhez is kötődik. A mikrodomének nagy koleszterin és szfingomielin tartalmú speciális összetételű és funkciójú membrán részek, melyekhez a PARK7-fehérje a C-terminálisával kötődik és szükséges még a három cystein palmitoilációja is. A kötődést az LPS indukálja és PARK7-knock-out sejtekben a TLR4-endocitózis gátlódik, így az LPS indukálta TLR4-jelátvitel felerősödik (127). Összefoglalva: a PARK7 csökkenti az iNOS és NO képződést azáltal, hogy negatívan szabályozza a TLR4 aktivációját, így protektív és gyulladáscsökkentő hatású.

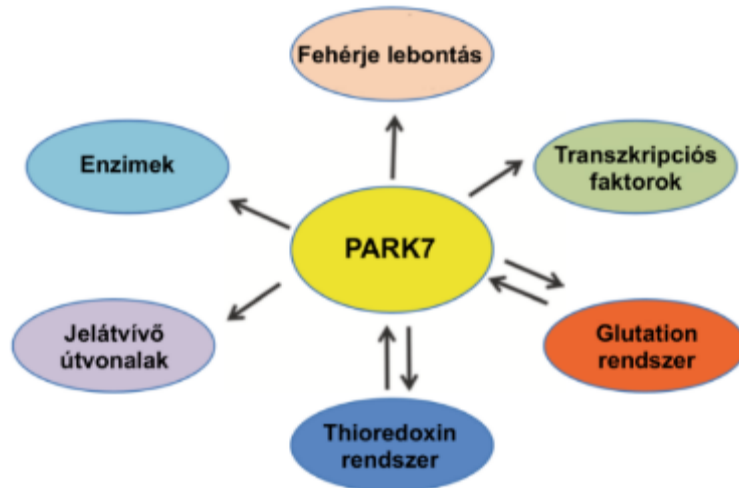
1.2.4.5 A PARK7 chaperon, deglikáz és egyéb funkciója

A megfelelően működő PARK7 oxidatív stressz által indukált chaperonként részt vehet a kisselektált fehérjék proteaszomához jutásában, és ezáltal a felesleges molekulák lebomlásában. A PARK7 elősegíti az újonnan képződő fehérjék háromdimenziós alakjának kialakulását, továbbá hozzájárul a sérült fehérjék újrarahajtogatódásához. Gátolja az PARK1/PARK4 konformációváltozását, mely oldhatatlan aggregátumok kialakulása révén károsítaná a neuronokat. A PARK7 mutációja viszont az α -szinuklein aggregálódása révén is hozzájárulhat a Parkinson-kór kialakulásához (104). A PARK7 szükséges továbbá a helyes mitokondriális morfológiához és működéshez, valamint a diszfunkcionális mitokondriumok autofágiájához (135). A PARK7 képes a réz és a toxikus higanyionok közvetlen megkötésére és fokozza az indukált fémtoxicitás elleni sejtvédő mechanizmusokat (136).

A glikáció egy nem-enzimikus kovalens reakció a redukáló monoszacharidok vagy glioxálok és aminocsoportot tartalmazó molekulák (fehérjék, DNS) között, amely inaktivációhoz, degradációhoz vezet. A glikáció során reaktív szabad gyökök és glikációs intermedierek képződnek, valamint előrehaladott glikációs végtermékek jönnek létre (137). A legújabb kutatások szerint a humán PARK7 alapvetően egy olyan fehérje deglikáz, amely a korai glikációs intermedierekre hatva képes helyreállítani a glioxál- és metilglioxál-glikált aminosavakat és fehérjéket és megakadályozza előrehaladott glikációs végtermékek felszaporodását. A fehérjékhez hasonlóan a PARK7 nukleotid deglikázként is működhet. Képes a szabad nukleotidkészletben, a DNS-ben és az RNS-

ben a glikált guanint kijavítani, és ezáltal az ún. guanin-glikációs helyreállító rendszer egyik legjelentősebb képviselője (138).

Összegezve tehát, a PARK direkt peroxidáz hatása mellett számos jelátviteli út szabályozása révén antioxidáns, antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatású, és védi a sejteket az oxidatív stressz okozta károsodással szemben (14.ábra).

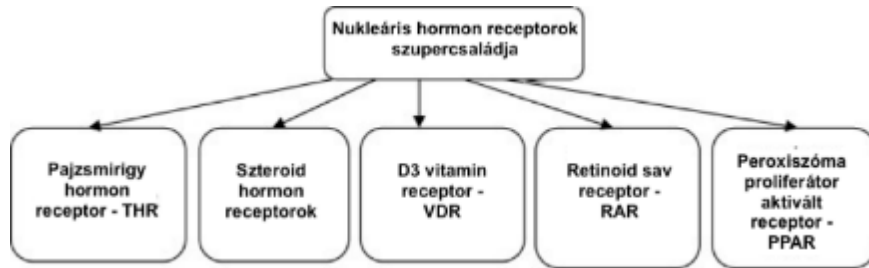


14. ábra. A PARK7 szerteágazó citoprotektív hatása. A PARK7 jelátviteli utakat modulál és transzkripciós faktorok, enzimek, antioxidáns rendszerek funkciójának szabályozása révén antioxidáns, antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatású lehet.

1.3 Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma (PPAR γ)

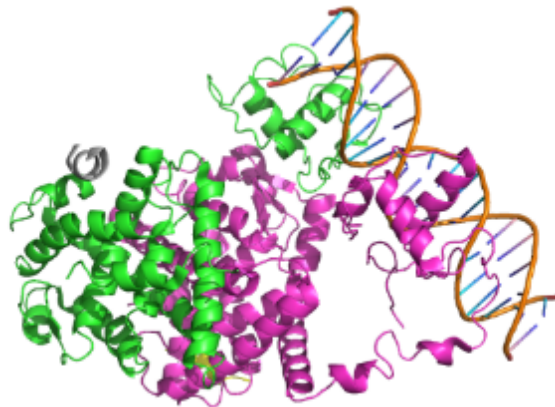
1.3.1 A PPAR molekulacsalád

A peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok a ligand aktiválta nukleáris hormon receptorok szupercsaládjába tartozó transzkripciós faktorok (139). A szupercsalád főbb tagjait a 15. ábra szemlélteti.



15. ábra: A nukleáris hormon receptor szupercsaládba tartozó főbb receptorcsaládok.

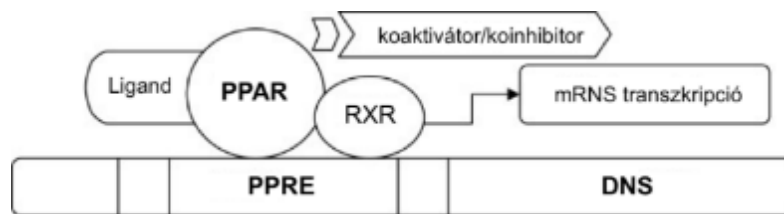
A PPAR molekulacsalád első tagját Issemann és mtsai. azonosították peroxiszóma proliferátorok alkalmazása révén rágsáló modellben és az új ligand-aktiválta transzkripció faktor klónozásával kapcsolatos eredményeiket a Nature folyóiratban tették közzé 1990-ben (140). Szerkezetét tekintve a PPAR-fehérje tartalmaz egy DNS-kötő domént az N-terminuson és egy ligand-kötő domént a C-terminuson. A DNS-hez kötődő PPAR γ háromdimenziós szerkezetét a 16. ábra szemlélteti.



16. ábra: A DNS-hez kötődő peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR) γ -fehérje háromdimenziós szerkezete. (commons.wikimedia.org)

A specifikus liganddal történő interakciót követően a PPAR a sejtmagba transzlokálódik, ahol egy másik nukleáris receptorral, a retinoid-X receptorral (RXR) heterodimert képezve strukturális változáson megy keresztül. Ezt követően a DNS specifikus régióján, a célgén promóter szakaszán található specifikus PPAR-válaszelemekhez (PPRE) kötődik és ily módon regulálja az adott gén transzkripcióját

(141). A PPAR funkcióját számos koaktivátor és korepresszor is módosíthatja (142) (17. ábra).

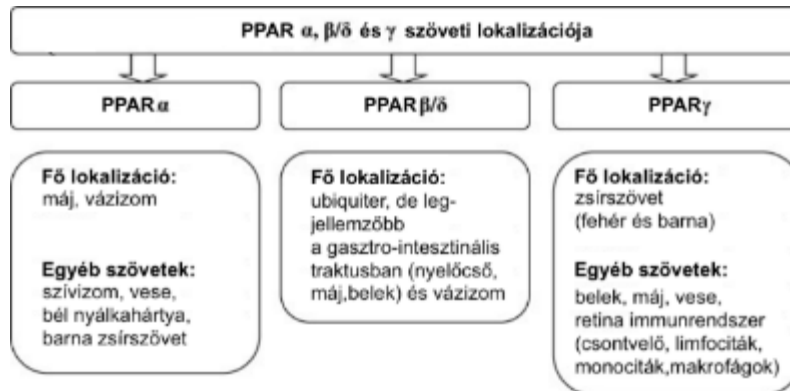


17. ábra: A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR) által indukált géntranszkripció. A ligand-PPAR-retinoid X receptor (RXR) komplex a célgént tartalmazó DNS szakasz specifikus PPAR válaszeleméhez (PPRE) kötődik és megkezdődik az mRNS transzkripció. A folyamatot a komplexhez kötődő koaktivátorok illetve koinhibitorok módosíthatják.

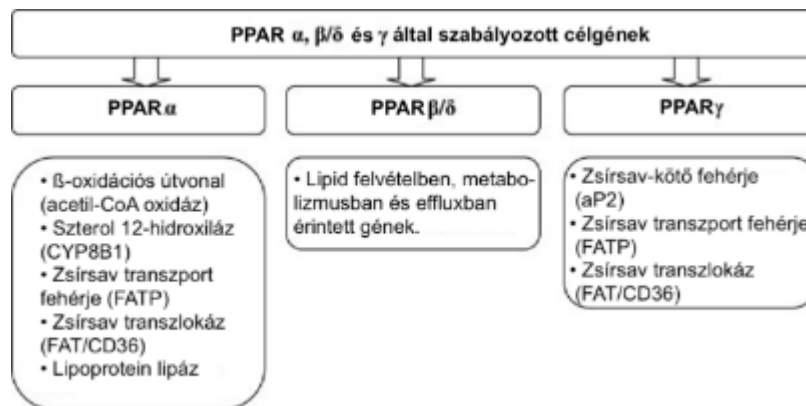
A PPAR-ok a fent leírt mechanizmus révén vesznek részt számos olyan gén szabályozásában, melyeknek fontos szerepük van a sejt differenciációban illetve metabolikus folyamatok regulációjában, különös tekintettel a lipid- és glükóz homeosztázisra (143). A különböző PPAR-ok főbb funkcióit lejjebb részletesebben bemutatom.

1.3.2 A PPAR izoformák és fő funkcióik

A PPAR molekulacsalád három izoformát foglal magában: PPAR α , PPAR β/δ és PPAR γ . A háromféle izoforma szöveti lokalizációban, ligand specificitásban és fiziológiai szerepük tekintetében egyaránt különbözik egymástól (18. és 19. ábra). A PPAR α leginkább metabolikusan aktív szövetekben, szervekben expresszálódik, úgy, mint májban, szívben, vázizomzatban, vesében, az intesztinális mukózában és a barna zsírszövetben, hasnyálmirigyben. Ez a receptor az energiaháztartás szabályozásában, a zsírsav metabolizmusban játszik fontos szerepet, aktivációja csökkenti a lipidek szintjét (144,145,146). Részt vesz a glükoneogenezisben, a ketontest, az aminosav és urea szintézisben, valamint egyes gyulladási folyamatokban (147).



18. ábra. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR) izoformák szöveti lokalizációja.



19. ábra. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR)-ok által regulált főbb folyamatok és célgének.

A PPAR β/δ a legkevésbé ismert funkciójú izoforma. Elsőként *Xenopus oocytes* izolálás során írták le a PPAR δ -gént, majd egérben is azonosították a humán PPAR β -val homológ PPAR δ -át (148,149). Legnagyobb mennyiségben olyan szervekben található, melyek aktívan részt vesznek a lipid metabolizmusban: májban, bélben, vesében, az abdominális zsírszövetben, vázizomban. Szerepe van a zsírsv oxidációban főleg a váz- és szívizomban, valamint szabályozza a vér koleszterol és glükóz szintjét (141,145,150,151).

A PPAR γ legnagyobb mértékben a fehér és a barna zsírszövetben, a vastagbélben és a lépben van jelen, expressziója bizonyítottan adipocitákban a legmagasabb. Kulcsfontosságú szerepet tölt be az adipogenezis, az energia egyensúly és a lipid bioszintézis szabályozásában, a lipoprotein metabolizmusban és inzulin szenzitivitásban

(146,152,153). A PPAR γ egyik jellemzője az ligandumok szerkezeti sokfélesége, amelyek lehetnek endogén metabolitok, táplálékkal bevitt vegyületeket és szintetikus gyógyszerek.

1.3.3 A PPAR γ szerepe gyulladásos folyamatokban

A PPAR γ a fent említett energiaháztartás szabályozásában betöltött szerepe mellett alapvető fontosságú szerepet játszik az immunfolyamatok szabályozásában, jelentős antiinflammatorikus hatással rendelkezik, számos gyulladástkeltő citokin expresszióját képes gátolni, elősegíti az immunsejtek differenciálódását gyulladásgátló fenotípusok irányába. (154). Így például kimutatták, hogy aktivált peritoneális makrofágokban és T-sejtekben a PPAR γ -specifikus ligandumok általi aktiválása az iNOS expresszióját gátolta (155). Humán koszorúér endotél sejtekben és fibroblasztokban a PPAR γ -agonisták hatására csökkent a ROS termelése (156, 157), stimulált humán perifériás monocitákban a PPAR γ -aktiváció az IL-1, IL-6 és TNF-alfa expresszió gátlását eredményezte (158). A reumatoid artritisz kollagén-indukálta egér modelljében leírták, hogy a PPAR γ aktivációja szignifikáns módon csökkentette a Th1 típusú citokinek, úgy mint a TNF- α , az IFN- γ és az IL-1 β expresszióját (159). Továbbá az atópiás dermatitisz rágcsálómódeljében kimutatták, hogy a szintetikus PPAR γ -agonista roziglitazon adása szuppresszálta a gyulladásos regulátorként ismert tímusz sztrómális limfopoietin (TSLP) expresszióját, mely ugyancsak részt vesz a TNF- α és az INF- γ regulációjában, fokozva azok szintjét a vér mononukleáris sejteiben (160, 203).

A PPAR γ cöliákiában betöltött szerepére vonatkozó tudásunk limitált. 2009-ben Simula és mtsai. két-dimenziós elektroforézissel és az azt követő tömegspektrometriás eljárással kimutatták, hogy a II. illetve III. Oberhuber-Marsh klasszifikációnak megfelelő szöveti képet mutató lisztérzékeny személyek bélmintáiban számos olyan fehérje (FABP1, FABP2, APOC3, HMGCS2, ACADM and PEPCK) szintje csökkent, melyek a PPAR γ szignalizációs úttal hozhatóak összefüggésbe (68).

De Re és mtsai. igazolták, hogy az intesztinális károsodás mértéke és a PPAR γ szintje negatív korrelációt mutat felnőtt cöliákiás betegek esetében. A gliadin-indukálta szöveti transzglutamináz fokozott expressziója pedig a PPAR γ ubiquitinizációjához és

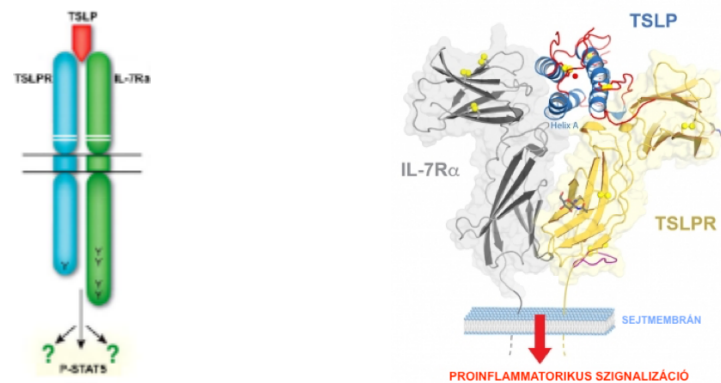
proteaszómális degradációjához vezetett. A gluténmentes diétát követő negatív IgA-tTG szint mellett a PPAR szignalizációs útvonal helyreállítását tapasztalták (66,67,68). Mindezek alapján felmerül a PPAR γ jelátviteli utat célzó új terápiás alternatívák szerepe a fiziológias bélaktivitás helyreállítására vonatkozóan.

1.4 A tímusz sztrómális limfopoietin (TSLP)

1.4.1 A TSLP molekula felfedezése, receptora és szignalizációja

A TSLP egy IL-7-szerű citokin, mely jelentős strukturális és funkcionális hasonlóságot mutat a hematopoietin molekulacsalád tagjaival. Amint arra az elnevezése is utal, a TSLP-t egér tímusz sztrómális sejtvonal felülúszójából azonosították T- és B-limfociták növekedését stimuláló faktorként 1994-ben (161). Néhány évvel később Quentmeier és mtsai. a TSLP hasonló funkcióval rendelkező humán ortológját is felfedezték. Kimutatták, hogy konstitutív módon expresszálódik a szívben, a tüdőben, a prosztatában és tesztiszekben is (162).

A TSLP-t kötő fehérjét, azaz a TSLP receptort (TSLPR) is sikerült izolálni egér és humán mintákból, azonban ez a számos interleukin (pl.: IL-2, IL-4, IL-15) receptor komplexben fellelhető γ -láncához leginkább hasonlító struktúra csak alacsony affinitással volt képes kötni a TSLP-t. Érdekes módon a γ -lánc génkiütött gamma c(-/-)- egerek esetében a TSLP továbbra is aktiválta a sejteket, viszont az IL-7 receptor- α hiányos IL-7R α (-/-) knock out állatokban nem tudta kifejteni hatását. Így derült fény arra, hogy a TSLP nagy affinitású kötődéséhez és a szignalizáció elindulásához elengedhetetlen az IL-7 α receptor jelenléte is (163). Ma már pontosan ismerjük a TSLP-t megfelelő affinitással kötő receptorkomplex szerkezetét, mely egy TSLP specifikus TSLPR láncból és egy IL-7R α láncból álló heterodimer (164) (20. ábra). A TSLP a heterodimer receptorhoz kötődve a szignál transzducer és transzkripció-3 aktivátor (STAT3) elnevezésű transzkripció faktor, valamint a STAT5 molekulát aktiválja. Kimutatták, hogy a Janus tirozin kináz (Jak)1 és Jak2 domináns negatív formája képtelen volt gátolni a TSLP-mediált STAT5 aktivációt, míg az IL-7 szignalizáció ezen negatív formák jelenlétében nem ment végbe. Vagyis az IL-7-tel ellentétben a TSLP-indukálta jelátvitelhez nem szükséges a Jak1 és Jak2 jelenléte (166).



20. ábra. A TSLP-t nagy affinitással kötő heterodimer receptorkomplex szerkezete.

A receptort egy TSLP specifikus TSLPR lánc és egy interleukin 7 receptor alfa (IL-7R α) lánc alkotja. A TSLP a heterodimer receptorhoz kötődve olyan szignalizációs utat indít el, mely a szignál transzducer és transzkripció 5 aktivátor (STAT5) molekula foszforilációját, aktivációját idézi elő (165).

1.4.2 A TSLP expressziója, regulátorai és funkciója normál és kóros állapotokban

A TSLP-t legnagyobb mértékben az epitel sejtek expresszálják a bőrben, a bélben, a tüdőben és a tonsillákban. Az epitel sejteken kívül azonban számos immunsejt (pl. hízósejtek, bazofil granulociták, dendritikus sejtek), sztromális sejtek, fibroblasztok és simaizom sejtek is kifejezik a TSLP-t (167).

A TSLP korlátozott expressziójához képest, a TSLPR-t sokkal többféle sejtípus és szövet is kifejezi. Jelenlétét számos immunsejten, úgy mint dendritikus sejteken, T- és B-limfocitákon, NK sejteken, monocitákon és hízósejteken is kimutatták, expresszióját a szívben, a vesében, a májban és a vázizomzatban is leírták. Mindez arra utal, hogy a TSLP számos sejtípuson keresztül sokféle szövetben kifejtheti hatását (164).

Normál körülmények között a TSLP konstitutív módon expresszálódik a barrier felszíneken, így intesztinális epitel sejtekben is. Ismert, hogy az epitélsejt eredetű faktorok létfontosságúak azoknak a noninflammatorikus, szövet-rezisztens dendritikus sejteknek a keletkezése és fennmaradása során, melyek központi szerepet töltenek be a

homeosztázis fenntartásában (168). Kimutatták, hogy a TSLP a dendritikus sejtek funkciójának modulálása révén serkenti az indukált Foxp3⁺ T-sejtek keletkezését (169). Ezt a folyamatot a TSLP expressziójának fokozása révén a kommenzális baktériumokkal történő interakció indukálja (170). Összegezve a fentieket, normál körülmények között a TSLP mint immunregulátor fontos szerepet játszik a kommenzális flórával szembeni tolerancia kialakulásában és a normál barrier homeosztázis fenntartásában (168).

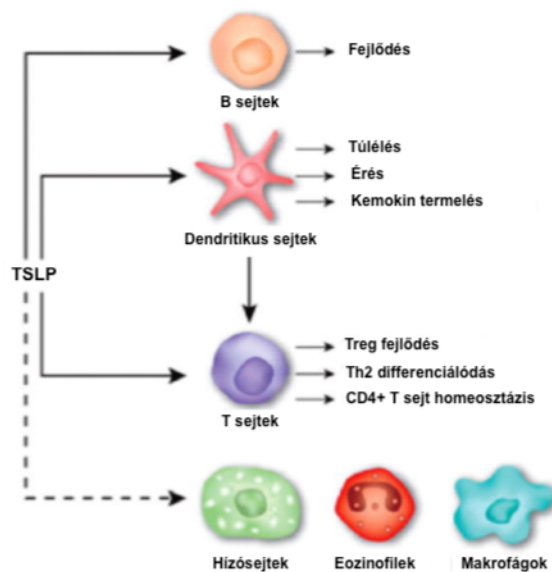
Több tanulmány során leírták, hogy ha a szervezet egyensúlya megborul, a TSLP expressziójában is változás mutatható ki. Számos káros exogén és endogén stimulus, így mikrobiális infekciók, fizikális sérülés okozta trauma és gazda eredetű gyulladással citokinek egyaránt indukálhatják a TSLP fokozott kifejeződését. A patogén-stimulált TSLP-expresszióra az egyik első bizonyítékot Allakhverdi és mtsai. írták le, akik kimutatták, hogy a gram⁺ baktériumok egyik komponense, a peptidoglikán fokozza a TSLP mennyiségét humán légúti epitél sejtekben (171). Atópiás betegségekben, mint asztmában, allergiás rinitiszben és atópiás dermatitiszben szintén a TSLP fokozott expresszióját írták le a gyulladt szövetekben (172,173,177). Az asztma akut exacerbációjáért leginkább felelős vírus, a rinovírus infekciónak kitett légúti epitél sejtekben a TSLP expressziója ugrásszerűen megnőtt. Kimutatták, hogy ez a hatás a TLR3-on keresztüli stimuláció eredménye, mely tovább fokozódott IL-4 jelenlétében és melyet a terápiás hatású glükokortikoid adása gátolt (175).

A TSLP-t reguláló faktorok felderítése során humán bronchiális légúti epitél sejteket gyulladásszerű mediátorokkal kezelve igazolták, hogy a TNF- α és az IL-1 β kezelés NF κ B-dependens módon a TSLP gyors termelődését idézi elő. A TLR-agonistákkal (TLR2, 8, 9 ligandokkal) történő kezelés ugyancsak fokozta a TSLP expresszióját (176). A Th2 eredetű gyulladásszerű citokinek, mint az IL-4 vagy IL-13 adása csakúgy, mint a TLR3-ligand kezelés szintén a TSLP szintjének szignifikáns emelkedését idézte elő humán légúti epitél sejtekben. Ezek a faktorok ugyancsak NF κ B és IFN regulátor faktor-3 dependens módon indukálták a TSLP szintézisét (175). A tüdősejteken tapasztaltakhoz hasonlóan a TNF- α vagy a TLR3- illetve TLR4-ligand (poly (I:C) és LPS) kezelés fokozta a reumatoid artritiszes és oszteoartritiszes betegekből származó szinoviális fibroblasztok TSLP termelését. Az NF κ B inhibitor IMD-0354, a Dexametazon és IFN- γ adása egyaránt gátolta ezt a TSLP-növekedést (177).

Az IFN- γ -án kívül a TSLP-t negatívan reguláló faktor lehet a TGF- β és az IL-17 is, ugyanis TLR3-liganddal stimulált humán keratinocitáknak adva csökkentették azok TSLP expresszióját (178). Ugyanakkor a proinflammatorikus (TNF- α vagy IL-1 α) vagy Th2 típusú citokinekkal (IL-4, IL-13) kezelt humán bőr explantátumok esetében sem a TGF- β , sem az IFN- γ nem fejtette ki TSLP gátló hatását (179).

Míg normál körülmények között a TSLP részt vehet a barrier homeosztázis fenntartásában és a saját komponensekkel szembeni tolerancia megőrzésében, kóros állapotokban kifejezetten proinflammatorikus karakterű is lehet. Erre bizonyíték, hogy a TSLP-t neutralizáló antitest adása csökkentette a teljes gyulladás mértékét a kollagén II-indukálta artritisz TNF- α dependens egérmódeljében (180). Hasonlóképpen a TSLP-neutralizáló antitest kezelés csökkentette az eozinofil granulociták számát, az IL-4 és IL-13 produkcióját az atópiás dermatitiszre jellemző allergiás bőrgyulladást modellező ovalbuminnal szenzitizált egerek bőrén. A TSLPR-/- génkiütött egerekben pedig az ismételt ovalbumin kezelést követően sem sikerült allergiás bőrgyulladást kiváltani (181).

Ahogy fent említettük, számos immunsejt kifejez TSLPR-t. Ezeken keresztül hatva a TSLP elősegíti a dendritikus sejtek túlélését, érését, befolyásolja kemokin termelésüket, hat a hízósejtekre, eozinofilekre és makrofágokra indukálva azok citokin expresszióját. Hatással van a B-sejtek keletkezésére, részt vesz a CD4⁺ T-sejtek homeosztázisában, stimulálja a naiv T-sejtek érését és leginkább regulátor T (Treg), illetve Th2 irányú differenciációját, valamint gyulladásos citokinek termelődését (21. ábra) (164).



21. ábra: A TSLP immunsejtekre gyakorolt főbb hatásai. Részletes magyarázat a szövegben. Rövidítések: Treg: regulátor T-sejt, Th: segítő T-sejt (164).

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során a PARK7, a PPAR γ és a TSLP gyermekkori cöliákiában betöltött szerepét vizsgáltam. Célkitűzéseim témakörök szerinti bontásban a következők voltak:

1. PARK7 cöliákiában betöltött szerepének vizsgálata.

A PARK7 citoprotektív, antioxidáns, antiapoptotikus és immunregulátor hatását több szervben és betegségben is leírták, azonban gyulladással járó bélbetegségekben, így cöliákiában eddig még nem tanulmányozták, ezért célul tűztük ki a PARK7 vizsgálatát gyermekkori lisztérzékenységben.

Célkitűzéseim a következők:

1. Kimutatható-e a PARK7 jelenléte a duodénumban mRNS- és fehérje szinten?
Miként változik a PARK7 expressziója cöliákiában?
2. Hol lokalizálódik a PARK7 a cöliákiás és az egészséges gyermekek duodenális mukózájában?
3. Miként befolyásolja a gluténmentes diéta a PARK7-mRNS expresszióját és fehérje mennyiségét?

2. A PPAR γ és a TSLP cöliákiában betöltött szerepének vizsgálata.

Az antiinflammatorikus hatású PPAR γ jótékony hatását számos betegség kapcsán tanulmányozták. Leírták, hogy számos molekula expressziójának modulátora lehet, így a barrierintegritás homeosztázisát szabályozó és egyúttal gyulladással modulátorként is ismert TSLP-fehérje mennyiségét is befolyásolhatja. Egyes tanulmányok felnőttkori cöliákiában a PPAR γ -szint változását igazolták, azonban expresszióját gyermekkori cöliákiában eddig még nem vizsgálták. A TSLP expressziója vizsgálataink

megkezdésekor teljesen ismeretlen volt, ezért célul tűztük ki a PPAR γ , a TSLP és TSLPR tanulmányozását gyermekkori cöliákiában.

Célkitűzéseim a következők:

1. Miként expresszálódik a PPAR γ , a TSLP és a TSLPR az újonnan diagnosztizált, terápianaiiv cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában mRNS, illetve fehérje szinten?
2. Mely sejtek expresszálják a PPAR γ -t, a TSLP-t a cöliákiás és az egészséges gyermekek duodenális mukózájában?
3. Hogyan hat a gluténmentes étrend a PPAR γ , a TSLP és a TSLPR expressziójára?

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegcsoportok

Vizsgálatainkhoz duodenális biopsziamintákat gyűjtöttünk 19 újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermektől (CD csoport: 6 fiú, 13 lány, átlagéletkor: 8 év, tartomány: 2-15 év), 6 kezelt, azaz GFD-t tartó cöliákiás gyermektől (GFD csoport: 3 fiú, 3 lány, átlagéletkor: 10 év, tartomány: 5-16 év) és 10 kontroll gyermektől (Kontroll csoport: 7 fiú, 3 lány, átlag életkor: 5,25 év, tartomány: 0,33-14 év). Nem vagy életkor tekintetében egyik csoport összetétele sem különbözött a többiétől ($p=NS$).

A biopszia mintákat a duodenális bulbus és a duodenum disztális szakaszából vettük a rutinszerű felső endoszkópia során. Diagnosztikai célból a hisztológiai vizsgálatokhoz 2-2 biopsziát azonnal 4%-os pufferolt formalinban fixáltunk. Kutatási célokra további 4 biopsziás mintát vettünk, melyek egy részét rögtön lefagyasztottuk és -80°C -on tároltuk a további molekuláris biológiai mérésekhez (valós idejű, reverz transzkripció polimeráz láncreakció, röviden RT-PCR, Western blot, immunfluoreszcens festés), míg a másik részét 4%-os pufferolt formalinba helyeztük a további immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB 124/2009) hagyta jóvá.

A cöliákia diagnózisa során az ESPGHAN által meghatározott kritériumrendszert vettük alapul. Az újonnan diagnosztizált cöliákiás betegek mindegyikénél magas tTG elleni antitest szintet és szubtotális villus atrófiát (Marsh IIIB) mutattunk ki. Továbbá az IEL-ek száma szignifikánsan nőtt a cöliákiás gyermekek duodenumában, melynek mértékét az IEL/100 epitél sejt aránnyal adtuk meg. Ennek átlagértéke cöliákiás gyermekeknél 65,9 (tartomány: 40-85) volt, míg a GFD-t tartó gyermekek esetében 13 (tartomány: 6-25), a kontroll személyeknél pedig 12 (tartomány: 2-20). A GFD-t tartó gyermekeknél a biopsziavételre átlagosan 1,5 évvel (tartomány: 0,5-2,5) a glutén étrendből való kizárását követően került sor. Mivel a glutén kivonásával akár teljes klinikai és szövettani remissziót lehet elérni, az ESPGHAN ajánlása szerint alapvetően a kezelést követően nem indokolt a biopsziavétel, tőlük valamilyen újonnan megjelenő gastrointesztinalis tünet kivizsgálása céljából vettünk mintát. Ez magyarázza a GFD csoport alacsony elemszámát. A PPAR γ , TSLP-vel kapcsolatos méréseinket 6 GFD-t

folytató cöliákias gyermek mintájából végeztük el, azonban a PARK7 mérések a fent felsorolt limitáció miatt, 5 személy adataiból származnak (2 fiú, 3 lány; átlag életkor: 10 év, tartomány: 5-16 év). A kontroll csoportba olyan gyermekeket válogattunk, akik krónikus hasi fájdalom, hányás vagy növekedési retardáció miatt kerültek klinikánkra. A felső gasztrointesztinális endoszkópia esetükben is a diagnosztikai eljárás része volt és a duodenális biopszia mintáik normál hisztológiai képet mutattak. A vizsgálatba bevont betegcsoportokat és klinikai paramétereiket az 1. táblázatban összegezzük.

1. táblázat: A vizsgálatba bevont betegcsoportok és klinikai jellemzőik. Rövidítések: CD: újonnan diagnosztizált, kezeletlen cöliákias betegcsoport; GFD: gluténmentes diétát tartó cöliákias betegcsoport; IEL: intraepiteliális-limfocita *p <0,01 vs. GFD és Kontroll.

	Kontroll	CD	GFD
Betegek száma	10	19	5 ill. 6
Átlagéletkor (tartomány)	5,25 (0,33-14) év	8 (2-15) év	10 (5-16) év
Fiúk/lányok	7/3	6/13	2 ill. 3/3
Villus atrófia			
Nincs	10	0	5
Szubtotális	0	19	0
Totális	0	0	0
Átlagos IEL sűrűség /100 epitél sejt (tartomány)	12 (2-20)	65,9 (40-85)*	13 (6-25)
GFD átlagos időtartama (tartomány)	-	-	1,5 (0,5-2,5) év

3.2. Valós idejű PCR

3.2.1. RNS izolálás

A -80°C-on tárolt duodenális biopszia mintákból a Qiagen protokollja alapján az RNeasyMini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével RNS-t izoláltunk. A kinyert

RNS mennyiségét és minőségét fotometrálassal határoztuk meg. Ezt követően az RNS mintákból azonnal elvégeztük a komplementer (c)DNS minták szintézisét.

3.2.2. cDNS szintézis

A reverz transzkripció során 1 µg RNS-t konvertáltunk cDNS-sé 20 µl reakcióvégtérfogóban, 200 egység (U) SuperScript III reverz transzkriptáz, 40 U RNaseOUT inhibitor és 0,5 µg oligo-(dT)12-18 primer jelenlétében (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reakcióelegyet 25°C-on 5 percig, majd 50°C-on 60 percig és végül 70°C-on 15 percig inkubáltuk, ezután 4°C-ra hűtöttük és további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.2.3. Specifikus primerek tervezése

A humán PARK7, PPAR γ , TSLP és a belső kontrollként alkalmazott glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) specifikus mRNS szekvenciákat a Nemzeti Biotechnikai Információs Központ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki. A legoptimálisabb primer párok (forward és reverz primerek) megtervezéséhez a LightCycler Probe Design szoftvert (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtuk. A méréseink során alkalmazott specifikus primerek szekvenciáit és az általuk felszorzott termékek hosszát a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) mérések során alkalmazott specifikus primer párok nukleotid szekvenciája. Rövidítések: bp-bázispár, PARK7: Parkinson-kór protein-7, PPAR γ : peroxiszóma proliferáció aktivált receptor- γ , TSLP: tímusz sztrómális limfopoietin, GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz.

Gén	Primer párok	Termékhossz
PARK7	forward: 5' AGT ACA GTG TAG CCG TGA 3'	116 bp

	reverz: 5' AAT TCT GTG CGC CCA GAT TA 3'	
PPAR γ	forward: 5'-GCG AGG GCG ATC TTG ACA GGA A-3' reverz: 5'-GAT GCG GAT GGC CAC CTC TTTG-3'	147 bp
TSLP	forward: 5'-AGG CTG CCT TAG CTA TCT GGT G-3' reverz: 5'-TTG AAG CGA CGC CAC AAT C-3'	148 bp
GAPDH	forward: 5'-CAC CAC CAT GGA GAA GGC TG-3' reverz: 5'-GTG ATG GCA TGG ACT GTG-3'	240 bp

3.2.4. PCR reakciók

A PARK7, PPAR γ , TSLP messenger (m)RNS expresszióját SYBR Green I Master elegy alkalmazásával Light Cycler 480 berendezés (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével határoztuk meg. A 20 μ l végtérfogatú reakcióelegy 10 pmol/ μ l sense- és antisense PCR primert (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 μ l LightCycler 480 SYBR Green I Master enzim mixet (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) és a fentiek szerint előaállított 1 μ l cDNS mintát tartalmazott.

A PCR reakciókat az alábbiak szerint végeztük el: 95 °C-on történő 5 perces denaturációt követően a görbék feltörését és platózását figyelve maximum 60 cikluson keresztül szaporítottuk fel a cDNS-t. A PARK7 mérés kapcsán a ciklus a következők szerint történt: 95°C-on 10 másodperc denaturáció, 60°C-on 20 másodperc anelláció (komplement szekvenciához való bekötődés) és 72°C-on 5 másodperc extenzió (Taq polimeráz általi DNS szintézis). A PPAR γ mérés során alkalmazott PCR ciklus kondíciói: 95°C-on 10 másodperc, 56°C-on 10 másodperc és 72°C-on 10 másodperc. A TSLP esetében: 95°C-on 10 másodperc, 53°C-on 10 másodperc és 72°C-on 10 másodperc. A GAPDH esetében a cDNS templátokat az alábbiak szerint amplifikáltuk fel: 95°C-on 4 másodperc, 55°C-on 8 másodperc, 72°C-on 22 másodperc.

A PCR termékek specificitásának ellenőrzésére olvadáspont analízist végeztünk a következő paraméterek szerint: 95°C 10 másodperc, majd 20°C/másodperc sebességű hűtés után 15 másodperc inkubálás 40°C-on, ezt követően 20°C/mp sebességű fűtéssel 85°C-ra melegítettük fel a mintákat. A olvadáspont analízis igazolta a keletkezett termékek specifikusságát, melyet ezt követően gélelektroforézissel is ellenőriztünk. Az

eredményeket LightCycler 480 1.5.0.39 verziójú szoftverrel elemeztük (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A PARK7-, PPAR γ - és TSLP-mRNS expresszióját ugyanazon minta GAPDH, mint belső kontroll mRNS expressziójára vonatkoztatva adtuk meg.

3.3. Fehérje izolálás, western blot

3.3.1. Mintaelőkészítés

A -80 °C-on tárolt duodénum biopszia minták egy részét 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1% Triton-X100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1 mM glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav, 5 mM nátrium-fluorid, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, és 10 mM nátrium-ortovanadát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmú lízis pufferben homogenizáltuk FastPrep FP120 homogenizátor (Qbiogene, Cedex, Franciaország) segítségével. A homogenizált mintát 4 °C-on 10000g-n 5 percig centrifugáltuk, majd meghatároztuk a felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.3.2. Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az ismert koncentrációjú fehérje mintákhoz 30% glicerol, 20% merkaptóetanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl (pH=6,8) tartalmú puffert adtunk, majd 95 °C-on 5 percig denaturáltunk. A fehérjék futtatásához 10%-os SDS tartalmú poliakrilamid gélt használtunk, koncentráló gélként 4%-os SDS-poliakrilamidot alkalmaztunk. A PARK7 mérések esetén mintánként 25 μ g fehérjét, a PPAR γ és TSLP meghatározáshoz pedig 20-20 μ g proteint vittünk fel a gél zsebeibe, az elektroforézist hűtött rendszerben (Penguin Dual-Gel Water Cooled Systems, Owl, NH, USA) végeztünk 120 V feszültség mellett (~40mA) 90 percig. Markerként BenchMark protein létra (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ismert molekulásúlyú fehérjék keverékét alkalmaztuk.

3.3.3. Fehérje blottolás

A szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) blottoltuk. A blottolást hűtött rendszerben (MiniTankElectroblotter, Owl, NH, USA) végeztük 90 percen keresztül, 70V-on, 220 mA-el, 25 mM Tris, 170 mM glicin és 20% metanol tartalmú transzfer pufferben. A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékekkel ellenőriztük.

3.3.4. Immunoblotting

Az immunoblottinghoz szükséges PARK7, PPAR γ , TSLP, TSLPR és a belső kontrollként alkalmazott β -aktin specifikus primer ellenanyagok és a szekunder antitestek megfelelő koncentrációit előzetesen dotblot technikával határoztuk meg. Az ellenanyagokat és az alkalmazott koncentrációikat a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. Western blot során alkalmazott specifikus primer és szekunder antitestek és hígításaik. Rövidítések: PARK7: Parkinson-kór protein-7, PPAR γ : peroxiszóma proliferáció aktivált receptor- γ , TSLP: tímusz sztrómális limfopoinetin, TSLPR: tímusz sztrómális limfopoinetin receptor, IgG: Immunglobulin G, HRPO: torma peroxidáz.

Fehérje	Primer Antitest	Hígítás	Szekunder antitest	Hígítás
PARK7	Nyúl anti-humán poliklonális PARK7 IgG (Abcam)	1:250	Kecske anti-nyúl IgG-HRPO (Sigma-Aldrich)	1:2000
PPARγ	Nyúl anti-humán poliklonális PPAR γ IgG (Novus Biologicals)	1:200	Kecske anti-nyúl IgG-HRPO (Sigma-Aldrich)	1:2000
TSLP	Nyúl anti-humán poliklonális TSLP IgG (Novus Biologicals)	1:200	Kecske anti-nyúl IgG-HRPO (Sigma-Aldrich)	1:2000
TSLPR	Kecske anti-humán poliklonális TSLPR IgG (R&D Systems)	1:100	Szamar anti-kecske IgG HRPO (Sigma-Aldrich)	1:2000
β-aktin	Kecske anti-humán poliklonális β -aktin IgG (Sigma-Aldrich)	1:200	Egér anti-kecske IgG-HRPO (Santa Cruz Biotechnology)	1:2000

Az aspecifikus kötőhelyek blokkolására és ezáltal a nem kívánt fehérje kölcsönhatások megakadályozása végett a blotmembránokat óvatos ráztatás mellett 5% zsírmentes tejpor és 10% PBS puffer tartalmú blokkoló oldatban inkubáltuk. Ezt követően a membránokat az elsődleges, specifikus ellenanyagokkal inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül 1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween20 detergens és 10% PBS puffer tartalmú mosó oldatban hígítva. Mosást követően 30 percig, szobahőmérsékleten torma peroxidáz (HRPO) konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk a membránokat. Újabb mosási lépésekkel eltávolítottuk a feleslegben jelen lévő, nem bekötődött másodlagos ellenanyagokat.

3.3.5. Immunoreaktív helyek detektálása, Western blotok kiértékelése

Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját ECLplus reagenssel detektáltuk VersaDoc 3000 típusú kamera (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével. Eredményeinket a Quantity One software 4.6.9. verziójával (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) denzitometráltuk és értékeltük.

3.4. Immunfluoreszcens festés

Endoszkópiát követően a duodenális biopsziák egy részét azonnal 4%-os paraformaldehid oldatba helyeztük és a mintákat 4 °C-on 2 órán keresztül fixáltuk. Ezt követően került sor a minták szövettani metszésre történő előkészítésére. A folyamat során a mintákat lizin-foszfát puffert, 20% paraformaldehydet és nátrium-perjodátot tartalmazó oldatba helyeztük szintén 4 °C-on 24 órára. 2,3 M szukróz oldatban történő inkubálás után a biopszia mintákból 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk és további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A PARK7 szöveti lokalizációjának kimutatása céljából a metszeteket a következő módon jelöltük: nyúlban termeltetett poliklonális anti-humán PARK7 specifikus IgG (Abcam, CA, USA) antitest szobahőmérsékleten 1 órán át inkubálva, 1:300 hígításban, majd PBS-sel történő mosást követően szobahőmérsékleten 30 percig Alexa Fluor 568 festékkel konjugált, csirkében termeltetett anti-nyúl IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ellenanyaggal inkubálva, 1:100 hígításban. A

sejtmagok kimutatására a DNS-hez kötődő Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) festéket használtuk 1:1000 hígításban, szobahőmérsékleten 10 percig inkubálva a mintákat. Újabb mosást követően a metszeteket Vectashield médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) vontuk be, majd fedőlemezzel fedtük és rögzítettük. A specificitás ellenőrzésének és az autofluoreszcencia kiküszöbölésének céljából megfelelő kontrollokat is alkalmaztunk, melyek esetében csak Alexa Fluor 568 festékekkel konjugált, csirkében termeltetett anti-nyúl IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ellenanyaggal inkubáltuk a metszeteket. A festett metszeteket Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennert mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) vizsgáltuk.

3.5. Immunhisztokémia

Biopsziavételt követően az azonnal 4%-os puffereelt formalinban fixált mintákat 24 óra inkubálást követően dehidráltuk, majd paraffinba ágyasztuk és 3-5 μm vastagságú metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiát deparaffinizációt és antigén feltárást követően Ventana BanchMark XT immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) automata alkalmazásával végeztük el a gyártó utasítási szerint. A reakciókhoz a western blotnál már ismertetett antitesteket használtuk: nyúlban termeltetett anti-humán poliklonális PPAR γ IgG (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) 1:100 hígításban és nyúl anti-humán poliklonális TSLP IgG (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), valamint nyúlban termeltetett anti-humán monoklonális CD3 IgG (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). A kettős festések miatt a PPAR γ illetve TSLP esetén Ultra ViewUniversal diamino-benzidin detekciós kitért (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), míg a CD3 kimutatásához Ultra ViewUniversal alkalikus foszfatáz red (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) festéket alkalmaztunk. Minden esetben negatív kontrollokat is használtunk az immunhisztokémia specifikusságának igazolására.

3.6. Statisztikai analízis

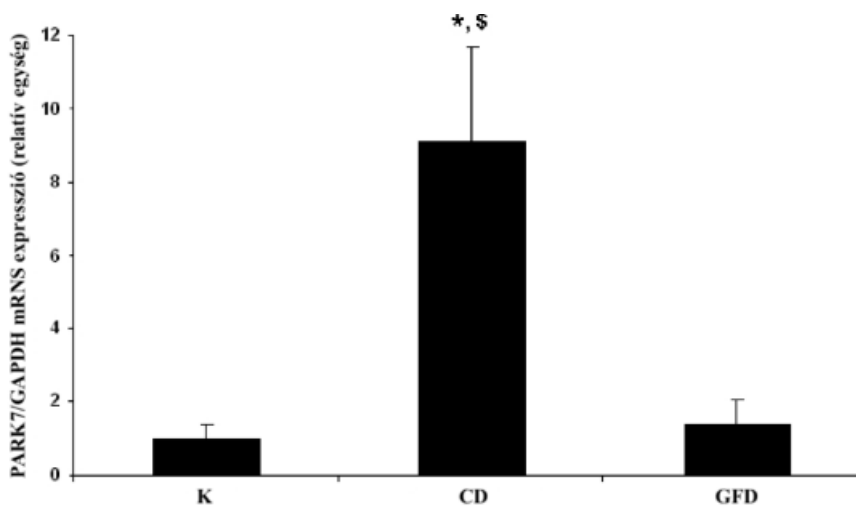
Az adatokat GraphPad Prism 5.0. verziójú szoftverrel (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) elemeztük. A normál eloszlás tesztelését Shapiro-Wilk's-féle teszttel végeztük, majd ezt követően a nem-paraméteres módszerek közé tartozó Mann-Whitney U tesztet alkalmaztuk a csoportok közötti eltérések meghatározására. A $P \leq 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az értékeket átlag \pm standard hibaformában adtuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. PARK7 vizsgálatával kapcsolatos eredmények

4.1.1. A PARK7-mRNS expressziója a duodenális mukózában

A PARK7-mRNS expresszióját valós idejű PCR módszerrel határoztuk meg az újonnan diagnosztizált, kezeletlen cöliákiás (CD csoport), a GFD-t tartó cöliákiás (GFD csoport), valamint a kontroll (K csoport), nem lisztérzékeny gyermekek duodenumából származó biopsziás mintákban. A PARK7-mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett a kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában a kontroll csoportéhoz képest ($p=0,007$ CD vs. K). A kezelés, azaz GFD hatására a PARK7-mRNS expressziója szignifikánsan csökkent a kezeletlen betegekéhez képest ($p=0,023$ CD vs. GFD). A kezelt gyermekek duodenumában a kontroll csoportéhoz hasonló PARK7-mRNS expressziót mértünk ($p=NS$ GFD vs. K) (22. ábra).

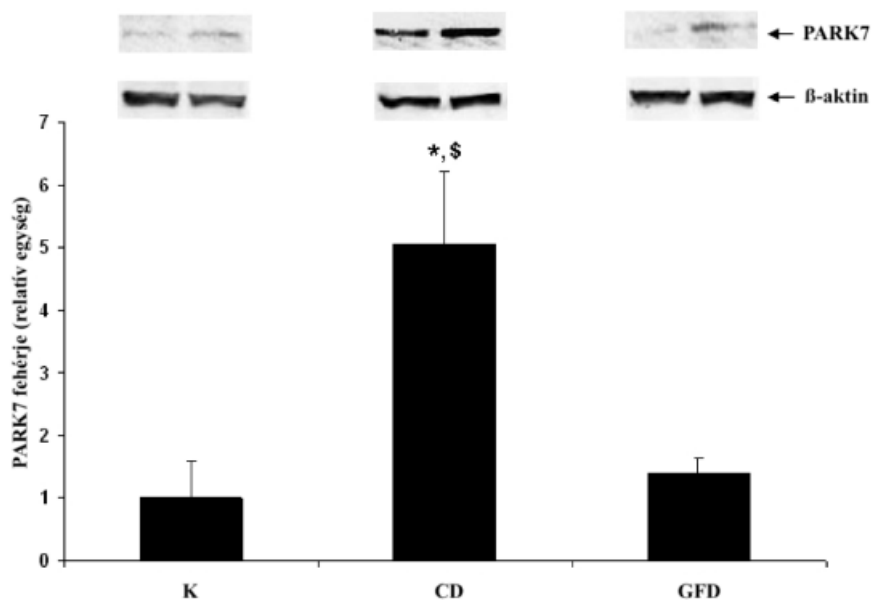


22. ábra: A Parkinson-kór protein 7 (PARK7) mRNS expressziója a kontroll (K), a kezeletlen, újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD) és a gluténmentes diétát tartó (GFD) gyermekek duodenális mukózájában. A PARK7-mRNS expresszióját valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) módszerrel határoztuk meg és a glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) háztartási gén mRNS

expressziójának értékeire vonatkoztatva átlag±standard hiba formában adtuk meg. *p=0,023 vs. GFD; §p=0,007 vs. K.

4.1.2. A PARK7 relatív fehérje mennyisége a duodenális mukózában

A PARK7 relatív fehérje mennyiségét western blot technikával határoztuk meg a gyermekek duodenális nyálkahártyájából származó biopsziás mintákból. A mérés során egyetlen 20 kDa közeli sávot detektáltunk a membránokon, mely megfelelt a PARK7 molekulatömegének. A PARK7-fehérje szintje szignifikánsan magasabb volt az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában a kontrollokéhoz képest (p=0,003 CD vs. K). A kezelt, GFD-t tartó gyermekek duodenum nyálkahártyájában a PARK7-protein mennyisége szignifikánsan csökkent (p=0,025 CD vs. GFD), a kontroll csoportéhoz közeli értéket mutatott (p=NS GFD vs. K) (23. ábra).

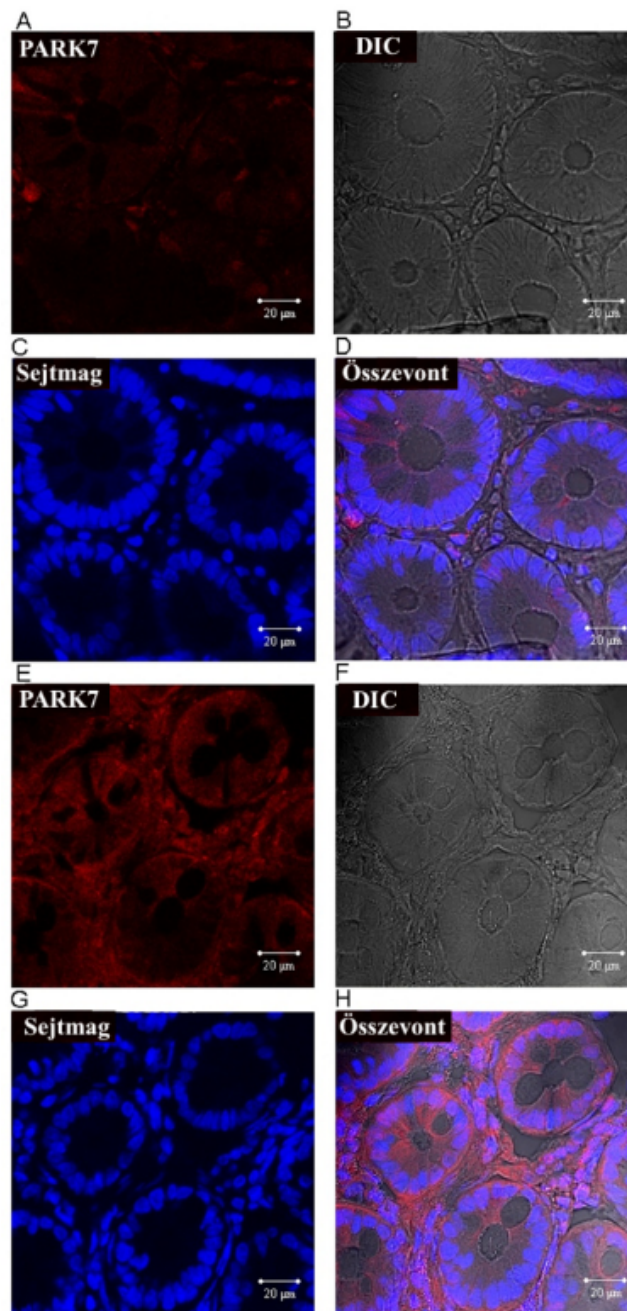


23. ábra: A Parkinson-kór protein 7 (PARK7) relatív fehérje mennyisége a kontroll (K), a gluténmentes diétát tartó (GFD) és a kezeletlen cöliákiás (CD) gyermekek duodenális mukózájában. A PARK7 relatív fehérje mennyiségét western blot technika segítségével határoztuk meg és a β-aktin protein értékeire vonatkoztatva adtuk meg. A

PARK7-molekulára specifikus antitest alkalmazásával egyetlen 20 kDa körüli sávot detektáltunk, mely megfelel a PARK7 molekulatömegének. A fehérje mennyiséggel arányos denzitás értékeket átlag±standard hiba formában adtuk meg *p = 0,025 vs. GFD; §p = 0,003 vs. K.

4.1.3.A PARK7 lokalizációja a duodenális mukózában

A PARK7 szöveti lokalizációját immunfluoreszcens festéssel határoztuk meg a gyermekek duodenális nyálkahártyájából származó biopszia mintákon. Erőteljes PARK7-immunpozitivitást tapasztaltunk a kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenális kripta enterocitáiban és a lamina propriában. A PARK7 jelenlétét a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt kimutattuk. A kontroll gyermekek duodenális mukózájában azonban csak gyenge PARK7-immunreaktivitást figyeltünk meg (24. ábra). Bár az immunfluoreszcens festés alapvetően nem mennyiségi meghatározásra szolgál, ez a mikroszkópikus vizsgálat is alátámasztja az előzőekben ismertetett eredményeinket, melyek szerint a PARK7 expressziója jelentősen fokozódik cöliákiában.



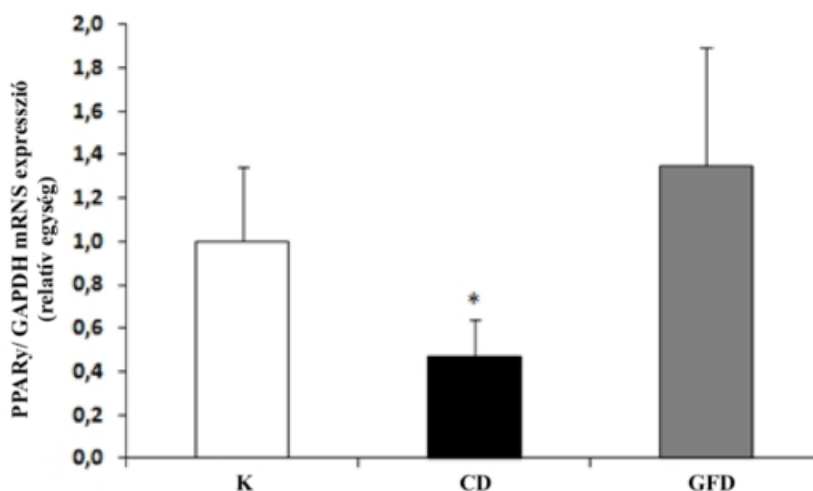
24. ábra. A Parkinson-kór protein 7 (PARK7) szöveti lokalizációját bemutató, kontroll (A-D) és kezetlen cöliákiás (E-H) gyermekek duodenális mukózájából származó szövettani metszetekről készült reprezentatív képek. Immunfluoreszcens festést készítettünk anti-PARK7 primer és Alexa Fluor 568 konjugált szekunder antitesttel (piros). A sejtmagok kékkel (Hoechst 33342) festődnek. A kontrollcsoport duodenális mukózájában gyenge PARK7-immunreaktivitás figyelhető meg (A–D). Ezzel szemben a kezetlen cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában erős

PARK7-immunreaktivitás látható a kripta enterocitákban és lamina propriában (E-H). PARK7 jelen van a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt. A felvételek konfokális pásztázó lézermikroszkóppal készültek (Zeiss Axiovert LSM510, 63x /1.40 apokromatikus differenciális interferencia kontraszt (DIC).

4.2. PPAR γ vizsgálatával kapcsolatos eredmények

4.2.1. A PPAR γ -mRNS expressziója a duodenum nyálkahártyában

A PPAR γ -mRNS expresszióját a duodenális mukózában valós idejű PCR módszerrel határoztuk meg. Az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában mért PPAR γ -mRNS expresszió átlag értéke csökkenő tendenciát mutatott a kontroll csoporthoz képest. A GFD-t tartó lisztérzékeny gyermekek duodenális mukózájában a PPAR γ -mRNS expressziója szignifikánsan nőtt az újonnan diagnosztizált cöliákiás esetekhez képest ($p < 0,05$ CD vs. GFD). A kontrollok és a GFD csoport értékei között nem volt szignifikáns különbség ($p = \text{NS}$) (25. ábra).

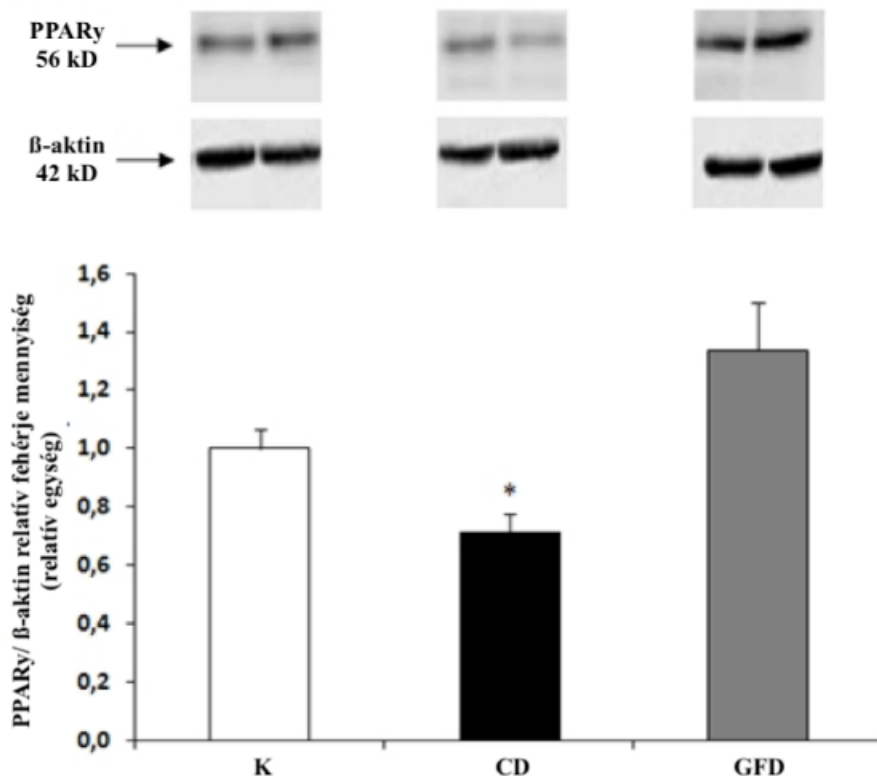


25. ábra. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) mRNS expressziója kontroll (K), újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD) és kezelt, gluténmentes diétát tartó (GFD) gyermekek duodenális mukózájában. A PPAR γ -mRNS expresszióját a valós idejű PCR mérések eredményeinek számítógépes

analízisével határoztuk meg és a glicerin-aldehyd-3-foszfát dehidrogenáz háztartási gén mRNS expressziójának arányában. Az eredményeket átlag \pm standard hiba formában adtuk meg. * $p < 0,05$ vs. GFD.

4.2.2. A PPAR γ relatív fehérje mennyisége a duodénum nyálkahártyában

A PPAR γ -fehérje mennyiségét a duodénum nyálkahártyában Western-blot analízissel határoztuk meg. A membránokon egyetlen 56 kDa körüli specifikus jelet detektáltunk, mely megfelel a PPAR γ molekulatömegének. A cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában a PPAR γ -fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,05$). A GFD-t tartó gyermekek duodénum nyálkahártyájában mért PPAR γ -protein mennyisége szignifikánsan magasabb volt a frissen diagnosztizált cöliákiás esetekhez képest ($p < 0,05$). A kontrollok és GFD csoport értékei között nem volt szignifikáns különbség ($p = \text{NS}$) (26. ábra)

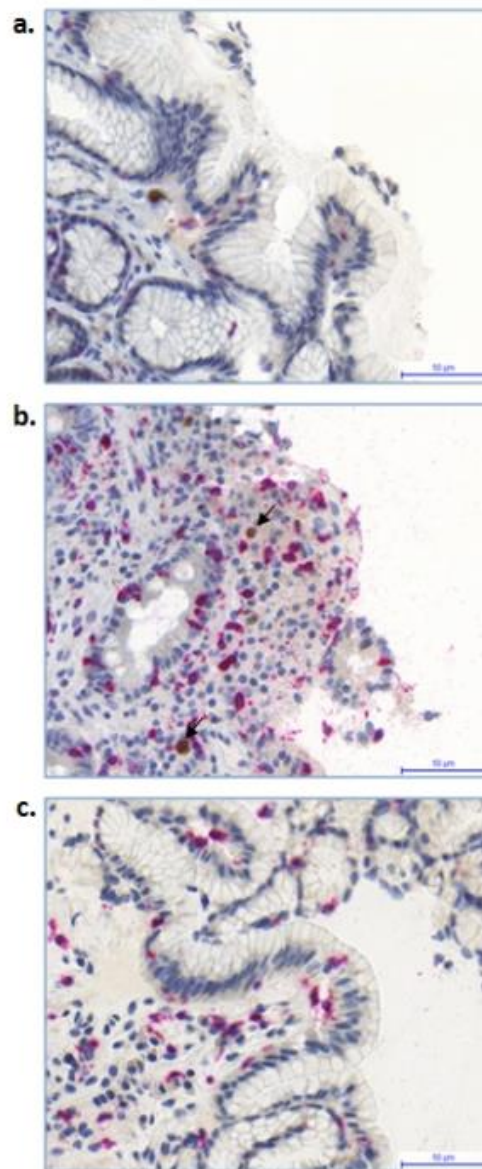


26. ábra. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) fehérje mennyisége kontroll (K), újonnan diagnosztizált coeliakiás (CD) és gluténmentes

diétát tartó (GFD) gyermekek duodenális mukózájában.A PPAR γ -fehérje szinteket a duodénumból származó biopszia mintákból Western-blot analízissel határoztuk meg, és a belső kontrollként alkalmazott β -aktin protein értékeire vonatkoztatva adtuk meg. A Western blot analízissel 56 kDa körül észlelt specifikus jel megfelel a PPAR γ -nak. Eredményeinket átlag \pm standard hiba formában adtuk meg. * $p < 0,05$ vs. K és GFD.

4.2.3. A PPAR γ lokalizációja a duodenum nyálkahártyában

A PPAR γ szöveti lokalizációját immunhisztokémiával határoztuk meg az újonnan diagnosztizált cöliákiás, a GFD-t tartó és a kontroll gyermekek duodenális mukózájából származó biopszia mintákon. A PPAR γ és a T-sejt markerként alkalmazott CD3 kettős immunfestéssel PPAR γ + T-limfocitákat mutattunk ki az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenális nyálkahártyájában. A T-sejteken kívül nem CD3-pozitív immunsejtek, valamint enterociták is pozitív PPAR γ festődést mutattak elsősorban a kontroll és a GFD-t tartó gyermekek duodenális mukózájában (27.ábra).

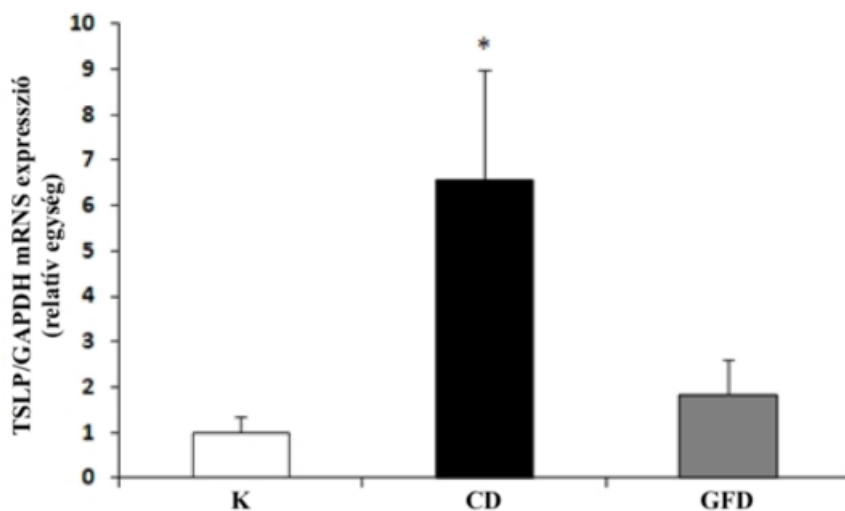


27. ábra. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- γ (PPAR γ , barna) és a T-sejt specifikus CD3 (vörös) lokalizációja kontroll (a), újonnan diagnosztizált cöliákiás (b) és gluténmentes diétát tartó gyermekek duodenum nyálkahártyájában (c). Immunhisztokémiai eljárással PPAR γ és CD3 kettős immunfestéssel PPAR γ -pozitív T-limfociták jelenlétét mutattuk ki az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában (fekete nyilak). Elsősorban a kontroll és gluténmentes diétát tartó gyermekek mintáiban számos nem CD3-pozitív immunsejt és enterocita is PPAR γ -pozitív festődést mutat. 200x-os nagyítás.

4.3. TSLP vizsgálatával kapcsolatos eredmények

4.3.1. A TSLP-mRNS expressziója a duodenális mukózában

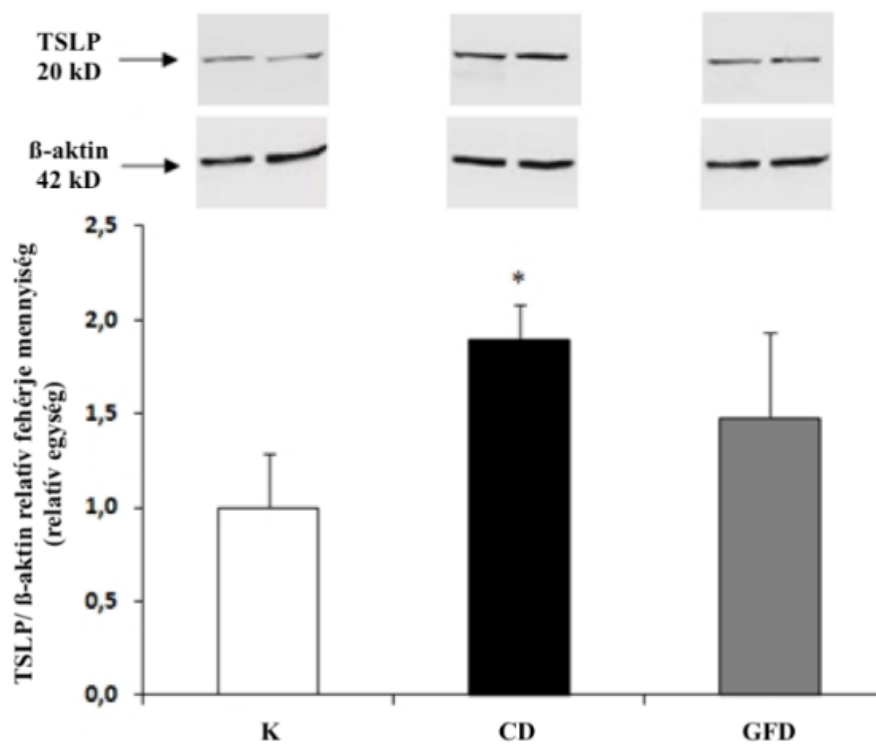
A TSLP-mRNS expresszióját valós idejű PCR technikával határoztuk meg. A TSLP-mRNS expressziója szignifikánsan magasabb volt az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest ($p < 0,05$). GFD hatására a TSLP-mRNS expresszió átlag értéke csökkenő tendenciát mutatott a duodenális nyálkahártyában a frissen diagnosztizált cöliákiás esetekhez képest. A GFD-t tartó és a kontroll gyermekek duodenális TSLP-mRNS expressziója között nem mutattunk ki szignifikáns különbséget ($p = \text{NS}$) (28. ábra).



28. ábra. A tímusz sztrómális limfopietin (TSLP) mRNS expressziója kontroll (K), újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD) és a gluténmentes diétát tartó (GFD) gyermekek duodenális mukózájában. A TSLP-mRNS expresszióját a valós idejű PCR mérések eredményeinek számítógépes analízisével határoztuk meg és a glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz háztartási gén mRNS expressziójának arányában átlag±standard hiba formában adtuk meg. * $p < 0,05$ vs. K.

4.3.2. A TSLP relatív fehérje mennyisége a duodenális mukózában

A TSLP-fehérje mennyiségét a duodenális biopsziákból Western-blot technikával határoztuk meg. Az analízis egy specifikus, 20 kDa körüli jelet eredményezett, mely megfelel a TSLP molekulatömegének. Az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában a TSLP-fehérje szintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,05$ CD vs. K). GFD hatására a TSLP relatív fehérje mennyiség átlag értéke csökkenő tendenciát mutatott a duodenális mukózában a frissen diagnosztizált cöliákiás gyermekeknél mért értékekhez képest. A GFD-t tartó gyermekek és a kontrollok duodenális TSLP-fehérje szintjei között nem találtunk szignifikáns eltérést ($p = \text{NS}$) (29. ábra).

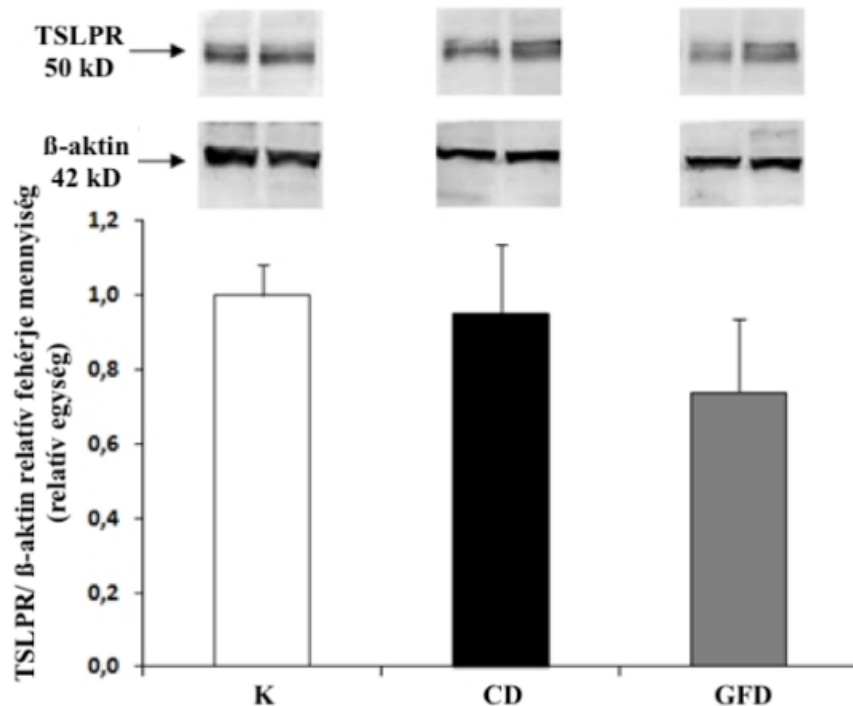


29. ábra. A tímusz sztrómális limfopoiétin (TSLP) relatív fehérje mennyisége kontroll (K), újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD) és gluténmentes diétát tartó lisztérzékeny (GFD) gyermekek duodenális mukózájában. A Western-blot analízis eredményeként egyetlen 20 kDa körüli specifikus jelet detektáltunk a duodenális mukózából származó mintákon, mely megfelel a TSLP-molekulának. Eredményeinket a

β -aktin háztartási protein mért értékeire vonatkoztatva, átlag \pm standard hiba formában adtuk meg. * $p < 0,05$ vs. K.

4.3.3. A TSLPR-fehérje mennyisége a duodénum nyálkahártyában

A duodenális mukózában fellelhető TSLPR-fehérje szintjének meghatározására Western blot analízist alkalmaztunk. A közel 50 kDa-nál kimutatott jel megfelel a TSLPR molekulatömegének. A mukózális TSLPR-fehérje mennyiség tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést az újonnan diagnosztizált cöliákiás, a GFD-t tartó lisztérzékeny és a kontroll csoportba tartozó gyermekek értékei között ($p = \text{NS}$) (30. ábra).

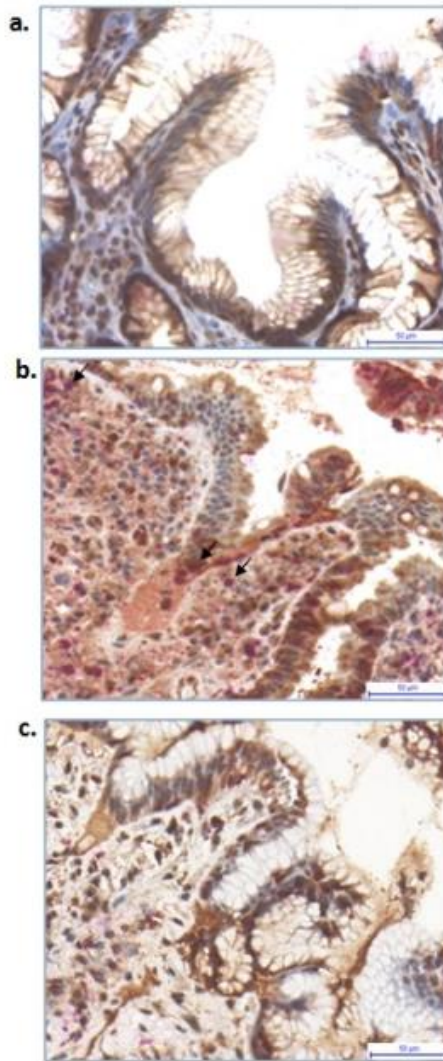


30. ábra. A tímusz sztrómális limfopoietin receptor (TSLPR) fehérje szintje kontroll (K), újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD) és gluténmentes diétát tartó lisztérzékeny (GFD) gyermekek duodenális mukózájában. A TSLPR-fehérje mennyiségét a duodénum biopszia mintákból Western-blot analízissel határoztuk meg, és a belső kontrollként alkalmazott β -aktin protein értékeire vonatkoztatva adtuk meg. A Western-blot analízis egy határozott 50 kDa körüli jelet eredményezett, mely megfelel a TSLPR

molekulatömegének. Eredményeinket a β -aktin háztartási protein értékeire vonatkoztatva adtuk meg (p=NS).

4.3.4. A TSLP lokalizációja a duodénum nyálkahártyájában

A TSLP-fehérje lokalizációját a duodénum nyálkahártyában immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk. A frissen diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodénum nyálkahártyájában a TSLP és a T-sejt markerként alkalmazott CD3 kettős festéssel TSLP-pozitív T-limfocitákat mutattunk ki (31/b ábra, fekete nyilak). A CD3-pozitív sejteken kívül citoplazmatikus TSLP pozitivitást tapasztaltunk más intraepiteliális ill. sztrómális gyulladással járó sejtekben, valamint enterocitákban is (31. ábra).



31. ábra. A tímusz sztrómális limfopoietin (TSLP, barna) és a T-sejt marker CD3 (vörös) lokalizációja kontroll (a), újonnan diagnosztizált cöliákiás (b) és gluténmentes diétát tartó gyermekek duodénum nyálkahártyájában (c). A TSLP duodenális lokalizációjának meghatározására immunhisztokémiát alkalmaztunk. Az újonnan diagnosztizált cöliákiás betegek duodénum nyálkahártyájában TSLP-pozitív T-limfocitákat (fekete nyíl) mutattunk ki, ugyanakkor citoplazmatikus TSLP pozitivitást figyeltünk meg más intraepiteliális és kötőszöveti gyulladásozó sejtekben, valamint enterocitákban is. 200x-os nagyítás.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. PARK7 vizsgálatával kapcsolatos eredmények megbeszélése

A PARK7 cöliákiában betöltött szerepének vizsgálata során elsőként mutattuk ki, hogy a lisztérzékeny gyermekek duodenális mukózájában a PARK7-mRNS expressziója fokozódik és ezzel párhuzamosan fehérje mennyisége nő a kontroll és a GFD csoportokban mért értékekhez képest. Ez a megfigyelés, valamint a PARK7 szöveti lokalizációja, mely szerint a gyulladt duodenális mukóza szinte valamennyi sejtjében jelen van, arra utal, hogy a PARK7 lényeges szerepet játszhat a cöliákia patomechanizmusában. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy a PARK7 központi szerepet tölt be számos karcinóma és neurodegeneratív betegségben, ugyanakkor jelentősége a különböző gyomor-bélrendszeri betegségekben, így cöliákiában is kutatásunk kezdetekor még teljesen ismeretlen volt (88,182,183,184).

A PARK7 talán leginkább ismert biológiai hatása az oxidatív, hipoxiás stresszválaszhoz kapcsolódó funkciója. A PARK7 peroxiredoxin-szerű peroxidásként direkt módon semlegesíti a ROS-okat, így például a H₂O₂-t, és ezáltal védi a sejteket az oxidatív stressz ellen (103,106). Ennél azonban sokkal jelentősebb antioxidáns hatást eredményez, hogy a PARK7 a sejtek redox állapotát érzékelő szignál molekulaként számos olyan fehérjéhez kötődhet, amelyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be az oxidatív stressz indukálta sejthalál folyamatában (ASK1, Daxx, paraoxonase-2, PRAK, Trx) (102,107,108).

A PARK7 citoprotektív hatását az oxidatív stressz által kiváltott sejtválasz fő szabályozójának, az Nrf2 transzkripciós faktor stabilitásának és aktivitásának befolyásolása révén is kifejti. Az Nrf2 több, mint 200 antioxidáns (Trx és a GSH számos tagja) és II-es fázisú detoxifikáló enzim, valamint számos stresszválasz fehérje átírását moduláló molekula expresszióját szabályozza. A PARK7-dependens Nrf2-választ több modellben is igazolták (115, 116).

Vasseur és munkatársai leírták, hogy a PARK7 az Akt pozitív szabályozójaként kritikus szerepet játszik az Akt/mTOR szignalizációs útvonal aktivációjában, amely a HIF-1 stabilitásának fenntartásához vezet U2OS humán osteoszarkóma és NIH3T3 egér embrionális fibroblaszt sejtvonalakban (121). A PI3K/Akt/mTor útvonal modulálásán túl,

a p53 aktiváció gátlásával, valamint direkt módon a VHL-hez kapcsolódva a PARK7 gátolja a HIF-VHL-kölcsönhatást, így megakadályozza a HIF1- α proteaszómális degradációját (121,107). A HIF-1-re gyakorolt hatása révén a PARK7 számos olyan gén expresszióját indítja be, melyek a sejtek hipoxiás körülményekhez való alkalmazkodásához elengedhetetlenek. A PARK7-HIF-1 kapcsolatra további bizonyíték, hogy PARK7 hiányában a különböző HIF-1 által regulált gének transzkripciója csökken a hipoxia során (121). Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy a HIF-1 α és az általa szabályozott gének (trefoil factor 1, ecto-5-nukleotidáz (CD73) és multidrog rezisztencia gén-1) szintje a cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában emelkedett a kontroll csoporthoz és a GFD-t tartó gyermekekhez képest (185). Mivel ezek a gének felelősek lehetnek az intesztinális barrier integritásának és funkciójának megőrzéséért (185,186), a HIF-1 α pedig igazoltan protektív hatású a hipoxia és gyulladásos folyamatok által okozott epitélium károsodással szemben, eredményeink arra utaltak, hogy a HIF-1 és az általa szabályozott gének szerepet játszhatnak a cöliákia patomechanizmusában.

A fent ismertetett antioxidáns és citoprotektív hatásain túl a PARK7 szerepet játszhat a veleszületett immunrendszer TLR-függő szabályozásában is. A transzmembrán receptorok családjába tartozó TLR-ek APC-k aktiválásán, vagy T-sejt kostimuláción keresztül döntő szerepet játszanak a veleszületett és adaptív immunitás kialakulásában. Ismert, hogy a PARK7 szelektíven képes befolyásolni a TLR4 indukálta immunválaszt. Korábban kutatócsoportunk a TLR4 fokozott expresszióját mutatta ki a cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában (42). Az aktivált TLR4 adapter molekulájához, a Myd88-hoz kapcsolódva az IRAK/TRAF6/MKK/JNK útvonalon keresztül proinflammatorikus gének transzkripciójához vezet. Ezen kívül a TLR4 a p38 MAPK-n keresztül valamint egy Myd88 független úton is képes aktiválni az Nf- κ B transzkripció faktor (130,131). Az Nf- κ B pedig számos citokin (pl. IL-1 β , IL-6, TNF- α) és adhéziós molekula génjének transzkripcióját serkenti (187,188). A TLR4 ugyancsak a p38 MAPK és az Nf- κ B útvonalak aktiválásával részt vesz az iNOS transzkripciójának szabályozásában is. Kimutatták, hogy PARK7 hiányában nem gátlódik az LPS által aktivált TLR4-ASK1-p38 MAPK kaskád, ami az iNOS fokozott aktiválásához, és ennek következtében túlzott NO termeléshez vezet. A PARK7 kiesése tehát TLR4-aktiváció által kiváltott iNOS dependens sejtapoptózist idézett elő, mely bizonyítja, hogy a PARK7

az iNOS és NO képződés csökkentése révén protektív és gyulladáscsökkentő hatású (132, 133).

Vizsgálatainkból kiderült, hogy a PARK7 a duodenális mukóza azonos sejteiben lokalizálódik mint a TLR4 vagy az iNOS. Westerholm–Ormio és mtsai. eredményeivel összhangban kimutattuk, hogy a TLR4 jelen van a duodenum nyálkahártya epiteljében, az IEL-ekben és a lamina propria mononukleális sejteiben is (189). Murrey és mtsai. vizsgálata szerint az iNOS mennyisége kezeletlen cöliákiás betegekben nőtt és konstitutívan expresszáldott humán duodenális enterocitákban, szintje a kezelés után pedig részlegesen csökkent (55). Beckett és mtsai. úgy találták, hogy a lamina propria iNOS+ sejteinek száma kezeletlen cöliákiában szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest (190). Ezen adatok arra utalnak, hogy a cöliákia kapcsán is összefüggés lehet a PARK7, TLR4 és iNOS között, potenciálisan így is befolyásolva a betegség patomechanizmusát. Cöliákiás betegeknél a TLR4 jelátviteli út a gasztrointesztinális hámsejtek, szöveti makrofágok és dendritikus sejtek aktiválódását eredményezi, ami különböző citokinek expressziójának fokozódásához vezet. Kaneko és mtsai. megfigyelték, hogy az LPS-stimulált TLR4 mutáns, azaz TLR4-et nem expresszálo C3H/HeJ egerek intesztinális epitel sejtelei összehasonlítva a vad típusú állatokéval nem termelnek IL-15-t (191). Az IL-15 egy epiteliális sejt eredetű citokin, ami a cöliákiában megfigyelhető megnövekedett IEL számért felelős (192). Tang és mtsai. megállapították, hogy az IL-15 az epitel sejtek citolízisét indukálja a citotoxikus T-limfociták lektin-szerű receptorain keresztül, ami magyarázatot nyújthat arra, hogy miként okoznak gasztrointesztinális károsodást és felszívódási zavart annak ellenére, hogy nem ismerik fel a glutént (193). A cöliákiás betegek fokozott TLR4 jelátvitelle indukálja az IL-1, IL-6 és TNF- α expresszióját a duodenum nyálkahártyájában, befolyásolva ezzel a gyulladás folyamatát, valamint az epiteliális tight junction szerkezetét és funkcióját (194,195).

A fentebb említett TLR4-aktiváció által kiváltott iNOS dependens sejtapoptózist gátló hatása mellett HEK-293 vese proximális tubuláris epitel sejteken végzett kísérletek során igazolták, hogy a PARK7 a MEKK1-MKK4-JNK1-ASK1-p38 MAPK jelátviteli út szuppresszállása révén is képes védeni a sejteket a H₂O₂ vagy UV-indukálta apoptózissal szemben (110,196).

Összefoglalásként elmondható, hogy a PARK7 fokozott expressziója a duodenum nyálkahártyájában szerepet játszhat a cöliákia patomechanizmusában. A PARK7

antioxidáns rendszerekre gyakorolt hatásai, a HIF-1 reguláló és TLR4 szignalizációját moduláló hatásai révén részt vehet az oxidatív stressz okozta károsodás mérséklésében, az immunfolyamatok szabályozásában, az intesztinális sejtek apoptózisának gátlásában és ezáltal az epithelialis barrierintegritás fenntartásában, a bél immunhomeosztázisának megőrzésében. A PARK7 gasztrointesztinális traktusban betöltött szerepének pontosítása érdekében azonban további vizsgálatokra van szükség, kiterjesztve más gyomor-és bélrendszert érintő kórképekre is, mint a gyulladásos bélbetegség vagy a nekrotizáló enterokolitisz.

5.2. PPAR γ és TSLP vizsgálatával kapcsolatos eredmények megbeszélése

A cöliákia fő jellemzője a vékonybél nyálkahártyájának krónikus gyulladása, mely boholy atrófiához és az ennek következményeként kialakuló felszívódási zavarhoz vezet (39). Habár a betegség számos sejtbiológiai aspektusa és molekuláris folyamata ismert, tudomásunk szerint mi vizsgáltuk elsőként a PPAR γ és a TSLP gyulladásos modulátorok szerepét a gyermekkori cöliákiában.

A PPAR γ egy, a II. típusú nukleáris receptor családnhoz tartozó ligand-dependens transzkripciós faktor, melyet eredetileg a lipid metabolizmus és az inzulin érzékenység modulátoraként azonosítottak zsírszövetben (139). A proinflammatorikus gének expressziójának negatív regulátoraként a PPAR γ protektív hatását immunmediált kórképekben is igazolták (197, 198).

Luciani és mtsai. kimutatták, hogy a gliadin peptidek által indukált oxidatív stressz elősegíti a PPAR γ tTG-mediált keresztlinkálását, ubiquitinizációját és proteasomális degradációját felnőtt cöliákias betegek duodenális mukózájában és bélhám sejtjeiben (66). Soares és mtsai. szignifikánsan magasabb PPAR γ -expressziót mutattak ki a GFD-n tartott egerekben a magas zsír- és gluténtartalmú étrenden tartott állatokhoz képest (199).

Összhangban Luciani és mtsai. felnőtt cöliákias betegek esetében tett megfigyeléseivel, vizsgálatunk során alacsonyabb PPAR γ -mRNS expressziót és fehérje szintet igazoltunk az újonnan diagnosztizált lisztérzékeny gyermekek duodenális nyálkahártyájában a kontrollokéhoz képest. GFD hatására a PPAR γ expressziója

normalizálódott. Eredményeink összhangban vannak De Re és mtsai. kutatásaival is, akik felnőtt cöliákias betegekben glutén megvonás hatására ugyancsak a PPAR γ szintjének és jelátvitelének rendeződését tapasztalták (67). Összességében ezen eredmények a glutén bevitel és a PPAR γ -expresszió közötti erős összefüggésre utalnak. A PPAR γ -t expresszáló sejttípusokat vizsgálva kimutattuk, hogy a PPAR γ a T-sejtek markereként ismert CD3 molekulával kolokalizációt mutat a frissen diagnosztizált lisztérzékeny gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Ugyanakkor, egyéb, CD3-ra nézve nem pozitív immunsejtek és a bélhámsejtek is mutattak PPAR γ -pozitivitást, elsősorban a kontroll és a GFD-t tartó gyermekek mukózájában.

Ismert, hogy a cöliákia patomechanizmusában számos központi szerepet betöltő proinflammatorikus citokin, mint a pl. a TNF- α vagy az intraepiteliális-limfocita infiltráció fő promotere az IL-15, és egyes adhéziós molekulák génexpressziója a nukleáris faktor (NF)- κ B szabályozása alatt áll (64,69,200,201). A PPAR γ immunválaszt moduláló hatását az NF- κ B aktivitásának antagonizálása révén fejtheti ki, csökkent aktivitása hozzájárulhat az NF- κ B aktiválásához, ezáltal a szövetkárosító hatások felerősödéséhez. Ismét, hogy a gliadin NF- κ B-vel járó mechanizmuson keresztül növeli az iNOS-gén expresszióját is. (64). Eredményeinkkel szintén összhangban van Benedetti és munkacsoportja 2 éve megjelent tanulmánya, melyben cöliákias sejtkultúrákban egyrészt csökkent PPAR γ -expressziót mutattak ki a kontroll csoportokhoz képest, másrészt egy erős PPAR γ -aktivátorral, mesalazinnal kezelt cöliákias mintákban az NF- κ B és NOS2 szintek csökkenését észlelték, amely csökkenés még a GFD-tartó betegekből származó mintáknál is szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott (202).

Továbbá, a PPAR γ -agonistaként ismert roziglitazon kezelés szignifikáns módon csökkentette az immunmoduláns hatású TSLP szintjét az atópiás dermatitisz rágszáló modelljében (203). Ezen irodalmi adatokkal összhangban, vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PPAR γ és a TSLP expressziója ellentétes irányú változást mutat a gyermekek duodenális mukózájában. Azaz a PPAR γ szintjének csökkenésével egyidejűleg szignifikánsan magasabb TSLP-mRNS expressziót és fehérje szintet mértünk a cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában, mely eltérések a GFD-t tartó gyermekek bélrendszerében normalizálódtak. TSLP-re specifikus antitesttel és anti-CD3 ellenanyaggal történő kettős jelölést alkalmazva immunhisztokémia eljárással TSLP-pozitív limfocitákat találtunk az újonnan diagnosztizált cöliákias gyermekek duodenum

nyálkahártyájában. A TSLP-pozitív sejtek egy jelentős része azonban CD3-negatív volt, mely arra utal, hogy a lamina propriában más immunsejtek és a duodenális enterociták egyaránt expresszálják a TSLP-t. Ezen eredményeink összhangban állnak az irodalmi adatokkal, melyek leírják, hogy a TSLP-t számos sejtípus, így az epitél sejtek, dendritikus sejtek, hízósejtek, bazofil granulociták, simaizom sejtek, fibroblasztok is kifejezhetik (204).

Más modellekben leírták, hogy a szintetikus PPAR γ -ligand adása csökkentette számos, a TSLP által is indukált proinflammatorikus citokin és kemokin szintjét, melyek a cöliákia patomechanizmusában jól ismert szerepet játszanak, így a TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , eotaxin, CD80 és CD86 expresszióját is (159,203,205-208). Mivel a TSLP jelentős szerepet tölt be az epitélium és a környező immunsejtek közötti kommunikáció szabályozásában (209) az általunk tapasztalt magasabb TSLP-szint a duodenális mukózában és a TSLP fokozott jelenléte számos immun, valamint epitél sejtben felveti a TSLP gluténszenzitív enteropátiában betöltött lehetséges immunszabályozó szerepét is.

Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a mai napig, kutatásunk lezáródása után több évvel is csak korlátozott számú tanulmány vizsgálta a TSLP és a cöliákia kapcsolatát, egyelőre ellentmondásos eredményekkel. 2019-ben Aksoy és munkatársai felnőtt cöliákiás betegek szérumában – saját eredményeinkkel összhangban- magasabb szérum TSLP-szintet igazolt a kontroll csoporthoz képest, míg szintén kutatási eredményeink közzétételét követően, 2016-ban Biancheri és mtsai. csökkent TSLP-szinteket mértek a kezeletlen és refraktórikus stádiumban lévő szintén felnőtt cöliákiás betegek duodenális nyálkahártyájában (210, 211). Saját eredményeinkkel megegyező módon ugyanakkor TSLPR tekintetében felnőtt betegekben sem találtak szintbeli eltérést a cöliákiás, GFD-t tartó és kontroll csoportok között, tehát a TSLPR valamennyi esetben jelen volt és közel azonos mértékben fejeződött ki a duodénumban. Az eltérő eredmények háttérében állhat, hogy az általunk vizsgált újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek átlagos életkora 8 év volt (tartomány: 2-15 év), ezzel szemben a felnőtt vizsgálatok kapcsán a betegek átlagos életkora 35,7 év (tartomány: 19-66). Ezen a kézenfekvőnek tűnő magyarázaton kívül megemlíteném, hogy időközben megjelent egy összefoglaló közlemény, mely rávilágít a TSLP kapcsán több modellben és betegségben felmerült ellentmondás esetleges feloldására (212). Harada és mtsai. ugyanis azonosították a TSLP kétféle izoformáját. Kezdetben úgy vélték, hogy a két izoforma alternatív splicing révén

keletkezik, azonban később két különböző 5' nemtranszlált régiót azonosítottak, mely a TSLP-re vonatkozóan két különböző nyitott leolvasási keretet eredményez a humán genomban. A rövid izoforma a hosszú variáns C-terminusával homológ, lényegileg a hosszú izoforma utolsó 63 aminosavjából álló szekvencia alkotja (212). A hosszú izoforma promóter régiójában viszont azonosítottak kötőhelyet az AP-1 transzkripció faktor számára is, mely fontos szerepet tölt be a sejt differenciáció, proliferáció, a programozott sejthalál és a szöveti regeneráció folyamatában is (213). Az egyik legjobban vizsgált szerv TSLP-expresszió tekintetében a tüdő. Kimutatták, hogy asztmások tüdejében a TSLP mennyisége nő és szintjét a glükokortikoid kezelés csökkenti. Kiderült, hogy a hosszabb TSLP-variáns keletkezik normál humán bronchiális epitél sejtekben, amikor a TLR3-ligandként ismert poly(I:C)-vel kezelik azokat. Ugyanakkor az asztmatikus légutakban az AP-1 fokozott expressziója figyelhető meg, mely az allergiás gyulladással asszociált és melynek aktivitását a glükokortikoid képes blokkolni. Ez a hosszú TSLP-variáns-AP1 összefüggés magyarázat lehet arra, hogy a glükokortikoid miként csökkentheti a TSLP expresszióját a tüdőben (213). Kimutatták, hogy a korábbiakban leírt konstitutívan expresszálódó TSLP valójában a rövid variánsnak felel meg és ez a rövid izoforma felelős a homeosztatis funkciókért (212). A gyulladással járó körülmények esetén tapasztalt TSLP-szaporulatot viszont leginkább a hosszabb izoforma jelenléte okozza, ahogyan arra a fentiekben már utaltunk (214).

Fontos kiemelni, hogy az általunk alkalmazott vizsgálataink elvégzésekor a két különféle izoforma létezése még nem volt ismert, és természetesen a két izoforma elkülönítésének még a módszere sem volt adott. Ugyanakkor az általunk használt TSLP-antitest (NovusBiological, NB110-55234) kötődési helye a TSLP 40-90-es aminosavak közti helye (hTSLP: 159 aminosav, rTSLP 97-159 aminosav), így méréseink csak a hosszú formát mutatták ki. A Western-blot során 20 kDa-nál tapasztalt sáv ennek megfelel, mivel a hosszú TSLP-molekula tömege 20 kDa, a rövid TSLP-molekula tömege 6 kDa. Mivel cöliákiában az epitélréteg nagymértékben károsodik, logikus lehet, hogy az epitél sejtek által konstitutívan kifejezett rövid TSLP-variáns mennyisége csökken az epitélsejtek eltűnésének következményeként. Mi azonban a lamina propria immunsejtjeiben is jelentős TSLP-pozitivitást tapasztaltunk a beteg gyermekek duodenális mukózájából származó mintákon. Ismert az is, hogy a cöliákia patomechanizmusában is kiemelt szerepet játszó TNF- α aktivációja a hosszú TSLP-

variáns mennyiségének megemelkedéséhez vezet primer humán fibroblasztokban (215). Mivel a gyulladás a hosszabb TSLP-variáns megjelenését indukálhatja, a cöliákiára jellemző Th1 és Th17 dominancia létrejöttében is közrejátszhat a TSLP fokozott expressziója a lisztérzékeny gyermekek duodenumában. Ennek tisztázásához azonban további vizsgálatokra van szükség. A jövőben érdemes lenne meghatározni a rövid és hosszú TSLP-izoformák arányát az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenumában, korreláltatva a kapott eredményeket a TSLP által szabályozott citokinek expressziós változásaival. Optimális esetben mindezt természetesen bővített esetszámmal végezve.

Összegzésképpen, az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenális nyálkahártyájában tapasztalt csökkent PPAR γ -szint és az ezzel egyidejű TSLP-expresszió fokozódás, valamint a GFD-t követő normalizálódás arra utal, hogy ezek a molekulák aktívan szerepet játszanak a cöliákia patomechanizmusában. Mivel a PPAR γ fokozott termelése gyulladásgátló hatású lehet, az újonnan diagnosztizált cöliákiás betegek duodenális nyálkahártyájában tapasztalt csökkent PPAR γ jelenlét alapján feltehetően a PPAR γ nem tudja kifejteni protektív hatását hozzájárulva a krónikus gyulladás kialakulásához, illetve fennmaradásához. A GFD-t követően észlelt PPAR γ -szint normalizálódás és az ezzel egyidejű TSLP-expresszió csökkenés alátámasztja a hipotézist, miszerint a glutén bevitel befolyásolhatja a PPAR γ /TSLP/TNF- α , INF- γ tengelyt. Feltételezésünk szerint a citoprotektív hatású PPAR γ aktivációját fokozó agonisták és az immunmoduláns TSLP-t célzó eljárások terápiás potenciállal rendelkezhetnek a gluténszenzitív enteropátiák kezelésében, figyelembe véve ugyanakkor hogy a TSLP cöliákiában betöltött szerepével kapcsolatos információink jelenleg még ellentmondásosak és mivel a fehérje rövid izoformája fontos homeosztatis funkciókkal rendelkezik, a megfelelő terápiás stratégiák megtervezésekor, így esetleges hosszú TSLP semlegesítésére használt monoklonális antitestek ideális esetben nem léphetnek kölcsönhatásba vagy akadályozhatják a rövid TSLP homeosztatis hatásait.

Hipotézisünk megerősítésére és eredményeink cöliákiára vonatkozó specificitásának megállapításához azonban további vizsgálatokra van szükség.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezés alapjául szolgáló munkám célja a cöliákia patomechanizmusának pontosabb megértése, olyan potenciális protektív molekulák, immunmodulátorok vizsgálata, melyek szerepe gyermekkori lisztérzékenységben eddig teljesen ismeretlen volt.

Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

1. Kimutattuk, hogy a citoprotektív, antioxidáns, antiapoptotikus és immunregulátor hatású PARK7-mRNS expressziója fokozódik és fehérje mennyisége nő a cöliákiás gyermekek duodenum mukózájában a kontroll gyermekeknél tapasztaltakhoz képest.
2. A kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában erős PARK7-immunreaktivitást tapasztaltunk a kripta enterocitákban és a lamina propriában, míg a kontroll csoport duodenális mukózájában gyenge PARK7-festődést figyeltünk meg. A PARK7 jelenléte a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt kimutatható volt.
3. GFD hatására a PARK7-mRNS expressziója és fehérje mennyisége egyaránt csökkent a kezeletlen betegekéhez képest.
4. Kimutattuk, hogy az antiinflammatorikus és intesztinális barrier protektív hatású PPAR γ szintje jelentős mértékben lecsökkent a cöliákiás gyermekek duodenum mukózájában a kontroll gyermekek normál PPAR γ expressziójához képest. Eredményeink összhangban vannak egy másik kutatócsoport által leírtakkal, akik felnőtt cöliákiás betegek duodenumában ugyancsak csökkent PPAR γ -expressziót tapasztaltak.
5. Irodalmi adatok szerint a PPAR γ a gyulladáscsökkentő modulátorként is ismert TSLP expresszióját is szabályozhatja. Kísérleteink eredményeképpen a csökkent PPAR γ -szintekkel párhuzamosan a TSLP hosszú izoformájának fokozott expresszióját tapasztaltuk az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenum mukózájában, mely szintek a GFD hatására normalizálódtak.
6. Lokalizációjukat tekintve a PPAR γ -t és a TSLP-t egyaránt kimutattuk CD3-pozitív immunsejtekben, enterocitákban és más intraepiteliális, illetve sztrómális gyulladáscsökkentő sejtekben.
7. A TSLPR-fehérje mennyiségének tekintetében gyermekek esetében nem tapasztaltunk eltérést a cöliákiás, kontroll és GFD csoportok között. Későbbi

vizsgálatok során egy másik kutatócsoport eredményeinkkel egyezően ugyancsak változatlan TSLPR-expressziót tapasztalt felnőtt cöliákiás betegek esetében is.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Értekezésem alapjául szolgáló kutatásaim célja a citoprotektív, illetve immunmoduláns hatású molekulák, a PARK7, a PPAR γ és a TSLP gyermekkori cöliákiában betöltött szerepének vizsgálata volt. Kimutattuk, hogy a cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában a PARK7-mRNS expressziója és fehérje mennyisége is megemelkedik, szintjük a GFD hatására normalizálódik. A kripta enterocitákban és a lamina propria immunsejtekben egyaránt kimutattuk jelenlétét. A PARK7 peroxidázként védi a sejteket az oxidatív stresszel szemben, szignál molekulaként protektív hatású molekulák expresszióját, stabilitását szabályozza. Hat a számos antioxidáns átírását moduláló Nrf2 transzkripciós faktorra, gátolja a HIF-1 α degradációját. Korábbi megfigyelésünk szerint cöliákiában a HIF-1 α és az általa regulált, intesztinális barrier integritásának megőrzésében kulcsfontosságú gének expressziója nőtt. A PARK7 gátolja továbbá a TLR4/ASK1/p38MAPK kaszkádot, ami az iNOS és a NO szint csökkenéséhez vezet, így antiapoptotikus, az IL-1, IL-6 és TNF- α expressziójának mérséklése révén gyulladáscsökkentő hatású. Kimutattuk, hogy az ugyancsak antiinflammatorikus és intesztinális barrier protektív hatású PPAR γ -mRNS expressziója és fehérje mennyisége jelentősen csökken, míg ezzel egyidejűleg az általa is szabályozott immunmoduláns hatású TSLP expressziója fokozódik a cöliákiás gyermekek duodenális nyálkahártyájában, szintjük GFD hatására normalizálódik. A PPAR γ és a TSLP jelenlétét CD3-pozitív immunsejtekben, enterocitákban és más intraepiteliális, illetve sztrómális gyulladásosejtekben is kimutattuk. A PPAR γ immunválaszt moduláló hatását az NF- κ B aktivitásának antagonizálása révén fejtheti ki, ezáltal gátolja számos proinflammatorikus citokin, így a TNF- α , az IL-15, valamint az IFN- γ expresszióját. A TSLP-expresszió részben a PPAR γ szabályozása alatt áll, ugyanis a PPAR γ -agonista rosiglitazon hatására a TSLP-expresszió csökken. A PPAR γ csökkent aktivitása hozzájárulhat a cöliákiára jellemző magas TNF- α szinthez, mely szintén a TSLP upregulációjának kedvez. A TSLP fokozott expressziója a cöliákiára jellemző Th1 és Th17 dominancia létrejöttében is közrejátszhat. Feltételezésünk szerint a citoprotektív hatású PARK7 stabilitását fenntartó, a PPAR γ aktivációját fokozó agonisták és az immunmoduláns TSLP-t célzó eljárások terápiás potenciállal rendelkezhetnek a gluténszenzitív enteropátiák kezelésében. Hipotézisünk megerősítésére azonban további vizsgálatokra van szükség.

8. SUMMARY

The aim of my research was to investigate the role of cytoprotective and immunomodulatory molecules, PARK7, PPAR γ and TSLP, in childhood celiac disease. We have shown that PARK7 mRNA expression and protein levels are increased in the duodenal mucosa of celiac children, and their levels are normalized by GFD. It was detected in both crypt enterocytes and lamina propria immune cells. As a peroxidase, PARK7 protects cells against oxidative stress, and as a signal molecule, it regulates the expression and stability of molecules with protective effects. It acts on the Nrf2 transcription factor, which modulates the transcription of many antioxidants, and inhibits the degradation of HIF-1 α . Previous observations of our research group found that expression of HIF-1 α and numerous genes regulated by it, crucial for the maintenance of the integrity of the intestinal barrier are increased in celiac disease. PARK7 also inhibits the TLR4/ASK1/p38MAPK cascade, leading to a decrease in iNOS and NO levels, thus having an antiapoptotic and antiinflammatory effect by reducing the expression of IL-1, IL-6 and TNF- α . We have shown that the mRNA expression and protein amount of PPAR γ , which also has an antiinflammatory and intestinal barrier protective effect, is reduced, while the expression of the immunomodulatory TSLP is increased in the duodenal mucosa of celiac children. The presence of PPAR γ and TSLP was detected in CD3⁺ immune cells but also enterocytes, and other intraepithelial and stromal inflammatory cells. PPAR γ may modulate the immune response by antagonizing the activity of the transcription factor NF- κ B, thereby inhibiting the expression of several proinflammatory cytokines, like TNF- α , IFN- γ or IL-15. TSLP expression is partially regulated by PPAR γ , as it is documented that the PPAR γ -agonist rosiglitazone reduced the expression of the immunomodulatory TSLP. Decreased PPAR γ activity may contribute to the high TNF- α levels characteristic of celiac disease, which also favors upregulation of TSLP, which may contribute to the Th1 and Th17 dominance characteristic of celiac disease. We hypothesize that agonists that maintain the stability of cytoprotective PARK7, enhance PPAR γ activation, and immunomodulatory methods targeting TSLP may have therapeutic potential in the treatment of gluten-sensitive enteropathies. However, further studies are needed to confirm our hypothesis.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. (2010) The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*, 42(8):587-95.
2. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. (2003) Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*, 163(3):286-92.
3. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. (2012) Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*, 18(42):6036-59.
4. Lionetti E, Gatti S, Pulvirenti A, Catassi C. (2015) Celiac disease from a global perspective. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 29(3):365-79.
5. Freeman HJ. (2010) Risk factors in familial forms of celiac disease. *World J Gastroenterol*, 16(15):1828-31.
6. Korponay-Szabó IR, Kovács JB, Czinner A, Gorácz G, Vámos A, Szabó T. (1999) High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 28(1):26-30.
7. Guandalini S, Assiri A. (2014) Celiac disease: a review. *JAMA Pediatr*, 168(3):272-8.
8. Rodrigo L. (2006) Celiac disease. *World J Gastroenterol*, 12(41):6585-93.
9. Rodrigo-Sáez L, Fuentes-Álvarez D, Pérez-Martínez I, Alvarez-Mieres N, Niño-García P, de-Francisco-García R, Riestra-Menéndez S, Bousoño-García C, Alonso-Arias R, López-Vázquez A. (2011) Differences between pediatric and adult celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig*, 103(5):238-44.
10. Hopper AD, Hadjivassiliou M, Butt S, Sanders DS. (2007) Adult coeliac disease. *BMJ*, 335(7619):558-62.
11. Kagnoff MF. (2007) Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*, 117(1):41-9.

12. Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, Kooy YM, de Haan W, Drijfhout JW, Van Veelen PA, Koning F. (2003) Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*, 125(4):1105-13.
13. Meresse B, Ripoché J, Heyman M, Cerf-Bensussan N. (2009) Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol*, 2(1):8-23.
14. Temme S, Kämper N, Koch N. (2013) Assembly of matched alpha/beta subunits to HLA class II peptide receptors. *Methods Mol Biol*, 960:433-445.
15. Wolters VM, Wijmenga C. (2008) Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol*, 103(1):190-5.
16. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. (2005) Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 19(3):373-87.
17. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P, Wijmenga C. (2007) A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet*, 39(7):827-9.
18. Adamovic S, Amundsen SS, Lie BA, Gudjónsdóttir AH, Ascher H, Ek J, van Heel DA, Nilsson S, Sollid LM, Torinsson Naluai A. (2008) Association study of IL2/IL21 and FcγRIIa: significant association with the IL2/IL21 region in Scandinavian coeliac disease families. *Genes Immun*, 9(4):364-7.
19. Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. (2008) Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut*, 57(7):887-92.
20. Koskinen LL, Einarsdóttir E, Korponay-Szabo IR, Kurppa K, Kaukinen K, Sistonen P, Pocsai Z, Széles G, Adány R, Mäki M, Kere J, Saavalainen P. (2009) Fine mapping of the CELIAC2 locus on chromosome 5q31-q33 in the Finnish and Hungarian populations. *Tissue Antigens*, 74(5):408-16.
21. Wolters VM, Verbeek WH, Zhernakova A, Onland-Moret C, Schreurs MW, Monsuur AJ, Verduijn W, Wijmenga C, Mulder CJ. (2007) The MYO9B gene is a strong risk factor for developing refractory celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5(12):1399-405.

22. Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, Franke L, van't Slot R, van Belzen MJ, Lavrijsen IC, Diosdado B, Daly MJ, Mulder CJ, Mearin ML, Meijer JW, Meijer GA, van Oort E, Wapenaar MC, Koeleman BP, Wijmenga C. (2005) Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet*, 37(12):1341-4.
23. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shear-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. (2008) Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*, 135(1):194-204.
24. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. (2006) Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol*, 125(4):502-11.
25. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2008) Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*, 57(6):747-54.
26. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G, Bouhnik Y, Lamarque D, Chaussade S, Malamut G, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Monteiro RC, Heyman M. (2008) Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med*, 205(1):143-54.
27. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjöström H, Sollid LM. (1998) Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*, 4(6):713-7.
28. Qiao SW, Bergseng E, Molberg Ø, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM. (2004) Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol*, 173(3):1757-62.
29. Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, Naiyer AJ, Lee AR, Ciaccio E, Minaya MT, Green PH, Bhagat G. (2010) Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Hum Immunol*, 71(1):50-7.
30. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. (1998) Gluten induces an intestinal cytokine response strongly

dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 115(3):551-63.

31. Olausson RW, Johansen FE, Lundin KE, Jahnsen J, Brandtzaeg P, Farstad IN. (2002) Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol*, 56(6):652-64.

32. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. (2011) Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 29:493-525.

33. Przemioslo RT, Lundin KE, Sollid LM, Nelufer J, Ciclitira PJ. (1995) Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon gamma antibody. *Gut*, 36(6):874-9.

34. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, Muzi P, D'Alò S, Ventura T, Pistoia MA, Cifone MG, Corazza GR. (2001) Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *Am J Clin Pathol*, 115(4):494-503.

35. Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, Ullrich R. (1999) Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut*, 44(1):17-25.

36. Barone MV, Caputo I, Ribecco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, Troncone R, Auricchio S, Esposito C. (2007) Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology*, 132(4):1245-53.

37. Caja S, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. (2011) Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cell Mol Immunol*, 8(2):103-9.

38. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Rossi M, Maglio M, Sblattero D, Not T, Porta R, Auricchio S, Marzari R, Troncone R. (2002) Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut*, 51(2):177-81.

39. Di Sabatino A, Corazza GR. (2009) Coeliac disease. *Lancet*, 373(9673):1480-93.

40. Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, De Vincenzi M, Pavone V, Auricchio S. (1996) In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol*, 31(3):247-53.

41. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, Londei M. (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*, 362(9377):30-7.
42. Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vársárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A. (2007) Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45(2):187-93.
43. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quaratino S, Londei M. (2000) Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 119(4):996-1006.
44. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, Allez M, Cellier C, Hermine O, Cerf-Bensussan N. (2007) Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*, 132(3):994-1008.
45. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. (2006) Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*, 55(4):469-77.
46. Heyman M, Menard S. (2009) Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann NY Acad Sci*, 1165:274-8.
47. Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, Büning J, Lerch MM, Ciclitira PC, Weber P, Naim HY. (2010) Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut*, 59(3):300-10.
48. Stojiljković V, Todorović A, Radlović N, Pejić S, Mladenović M, Kasapović J, Pajović SB. (2007) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. *Ann Clin Biochem*, 44(Pt 6):537-43.
49. Odetti P, Valentini S, Aragno I, Garibaldi S, Pronzato MA, Rolandi E, Barreca T. (1998) Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free Radic Res*, 29(1):17-24.
50. Stojiljković V, Todorović A, Pejić S, Kasapović J, Sačić ZS, Radlović N, Pajović SB. (2009) Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. *Clin Biochem*, 42(13-14):1431-7.

51. Rivabene R, Mancini E, De Vincenzi M. (1999) In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease. *Biochim Biophys Acta*, 1453(1):152-60.
52. Elli L, Dolfini E, Bardella MT. (2003) Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicol Lett*, 146(1):1-8.
53. Giovannini C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, De Vincenzi M. (2000) Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology*, 145(1):63-71.
54. Daniels I, Cavill D, Murray IA, Long RG. (2005) Elevated expression of iNOS mRNA and protein in coeliac disease. *Clin Chim Acta*, 356(1-2):134-42.
55. Murray IA, Daniels I, Coupland K, Smith JA, Long RG. (2002) Increased activity and expression of iNOS in human duodenal enterocytes from patients with celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(2):G319-26.
56. Murray IA, Bullimore DW, Long RG. (2003) Fasting plasma nitric oxide products in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(10):1091-5.
57. Ertekin V, Selimoğlu MA, Türkan Y, Akçay F. (2005) Serum nitric oxide levels in children with celiac disease. *J Clin Gastroenterol*, 39(9):782-5.
58. Högberg L, Webb C, Fälth-Magnusson K, Forslund T, Magnusson KE, Danielsson L, Ivarsson A, Sandström O, Sundqvist T. (2011) Children with screening-detected coeliac disease show increased levels of nitric oxide products in urine. *Acta Paediatr*, 100(7):1023-7.
59. Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, Suissa A, Aviram M. (2005) Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med*, 39(3):336-44.
60. Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. (2007) Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med*, 43(5):730-9.
61. Iltanen S, Rantala I, Laippala P, Holm K, Partanen J, Maki M. (1999) Expression of HSP-65 in jejunal epithelial cells in patients clinically suspected of coeliac disease. *Autoimmunity*, 31(2):125-32.

62. Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prókai A, Gál K, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. (2010) Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51(5):573-8.
63. Allegretti YL, Bondar C, Guzman L, Cueto Rua E, Chopita N, Fuertes M, Zwirner NW, Chirido FG. (2013) Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease. *PLoS One*, 8(9):e73658.
64. Maiuri MC, de Stefano D, Mele G, Iovine B, Bevilacqua MA, Greco L, Auricchio S, Carnuccio R. (2003) Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF- κ B. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, 368:63–71.
65. deStefano D, Maiuri MC, Iovine B, Ialenti A, Bevilacqua MA, Carnuccio R. (2006) The role of NF- κ B, IRF-1, and STAT-1 α transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN- γ in RAW 264.7 macrophages. *J. Mol. Med*, 84:65–74.
66. Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quarantino S. (2010) Lysosomal accumulation of gliadin p31e43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR γ downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*, 59:311–319.
67. de Re V, Simula MP, Notarpietro A, Canzonieri V, Cannizzaro R, Toffoli G. (2010) Do gliadin and tissue transglutaminase mediate PPAR downregulation in intestinal cells of patients with coeliac disease? *Gut*, 59:1730–1731.
68. Simula MP, Cannizzaro R, Canzonieri V, Pavan A, Maiero S, Toffoli G, deRe V. (2010) PPAR signaling pathway and cancer-related proteins are involved in celiac disease-associated tissue damage. *Mol. Med*, 16:199–209.
69. Maiuri MC, de Stefano D, Mele G, Fecarotta S, Greco L, Troncone R, Carnuccio R. (2003) Nuclear factor kappa B is activated in small intestinal mucosa of celiac patients. *J. Mol. Med*, 81:373–379.
70. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. (2012) Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. *Nutrients*, 4(4):243-57.
71. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. (2006) Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*, 101(10):2333-40.

72. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A. (2006) In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med*, 3(9):e358.
73. Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. (2007) Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*, 56:1669-74.
74. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, Sundqvist T, Norin E. (2010) Screening-detected and symptomatic untreated celiac children show similar gut microflora-associated characteristics. *Scand J Gastroenterol*, 45(9):1059-62.
75. Cammarota G, Cuoco L, Cianci R, Pandolfi F, Gasbarrini G. (2000) Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet*, 356(9240):1494-5.
76. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. (2002) Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr*, 75(5):914-21.
77. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. (2012) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 54(1):136-60.
78. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Troncone R, Auricchio R, Castillejo G, Christensen R, Dolinsek J, Mäki M, European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition guidelines for diagnosing coeliac disease 2019. (http://www.espghan.org/fileadmin/user_upload/IBD/ESPGHAN_Celiac_Guidelines_2019.pdf)
79. Rubio-Tapia, Alberto; Hill, Ivor D; Kelly, Ciarán P; Calderwood, Audrey H; Murray, Joseph A. (2013) ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease *Am J Gastroenterol*, 108:5 656–676.

80. Sziksz E, Pap D, Veres G, Fekete A, Tulassay T, Vannay Á. (2014) Involvement of heat shock proteins in gluten-sensitive enteropathy. *World J Gastroenterol*, 20(21):6495-503.
81. van den Broeck HC, van Herpen TW, Schuit C, Salentijn EM, Dekking L, Bosch D, Hamer RJ, Smulders MJ, Gilissen LJ, van der Meer IM. (2009) Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biol*, 9:41.
82. Francavilla R, Cristofori F, Stella M, Borrelli G, Naspì G, Castellaneta S. (2014) Treatment of celiac disease: from gluten-free diet to novel therapies. *Minerva Pediatr*, 66(5):501-16.
83. Vanga RR, Kelly CP. (2014) Novel therapeutic approaches for celiac disease. *Discov Med*, 17(95):285-93.
84. Leffler DA, Kelly CP, Green PH, Fedorak RN, DiMarino A, Perrow W, Rasmussen H, Wang C, Bercik P, Bachir NM, Murray JA. (2015) Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 148(7):1311-9
85. Crespo Pérez L, Castillejo de Villasante G, Cano Ruiz A, León F. (2012) Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. *Eur J Intern Med*, 23(1):9-14.
86. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (1997) DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun*, 231(2):509-13.
87. van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P. (2001) Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet*, 69(3):629-34.
88. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604):256-9.
89. Deng H, Wang P, Jankovic J. (2018) The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev*, 42:72-85.

90. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321):2045-7.
91. Miklya I, Pencz N, Hafenscher F, Göttl P. (2014) The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacol Hung*, 16(2):77-84.
92. Miklya I, Göttl P, Hafenscher F, Pencz N. (2014) The role of parkin in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacol Hung*, 16(2):67-76.
93. Hatano T, Kubo S, Sato S, Hattori N. (2009) Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 111(5):1075-93.
94. Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SM. (2013) Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:683920.
95. Saito Y. (2014) Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *J Clin Biochem Nutr*, 54(3):138-44.
96. Wilson MA, Collins JL, Hod Y, Ringe D, Petsko GA. (2003) A resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16):9256-61.
97. Maita C, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2013) Monomer DJ-1 and its N-terminal sequence are necessary for mitochondrial localization of DJ-1 mutants. *PLoS One*, 8(1):e54087.
98. Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, Hanash SM. (2001) Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 7(11):3328-35.
99. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*, 5(2):213-8.
100. Yu HH, Xu Q, Chen HP, Wang S, Huang XS, Huang QR, He M. (2013) Stable overexpression of DJ-1 protects H9c2 cells against oxidative stress under a hypoxia condition. *Cell Biochem Funct*, 31(8):643-51.

101. Kim YC, Kitaura H, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2009) Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *Int J Oncol*, 35(6):1331-41.
102. Waak J, Weber SS, Görner K, Schall C, Ichijo H, Stehle T, Kahle PJ. (2009) Oxidizable residues mediating protein stability and cytoprotective interaction of DJ-1 with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*, 284(21):14245-57.
103. Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H, Niki E. (2004) Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(3):722-8.
104. Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL. (2006) The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J Mol Biol*, 356(4):1036-48.
105. Wilson MA. (2011) The role of cysteine oxidation in DJ-1 function and dysfunction. *Antioxid Redox Signal*, 15(1):111-22.
106. Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, Blanchard-Fillion B, Greco TM, Thomas B, Ko HS, Sasaki M, Ischiropoulos H, Przedborski S, Dawson TM, Dawson VL. (2007) DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37):14807-12.
107. Parsanejad M, Zhang Y, Qu D, Irrcher I, Rousseaux MW, Aleyasin H, Kamkar F, Callaghan S, Slack RS, Mak TW, Lee S, Figeys D, Park DS. (2014) Regulation of the VHL/HIF-1 pathway by DJ-1. *J Neurosci*, 34(23):8043-50.
108. Fu C, Wu C, Liu T, Ago T, Zhai P, Sadoshima J, Li H. (2009) Elucidation of thioredoxin target protein networks in mouse. *Mol Cell Proteomics*, 8(7):1674-87.
109. Im JY, Lee KW, Junn E, Mouradian MM. (2010) DJ-1 protects against oxidative damage by regulating the thioredoxin/ASK1 complex. *Neurosci Res*, 67(3):203-8.
110. Mo JS, Jung J, Yoon JH, Hong JA, Kim MY, Ann EJ, Seo MS, Choi YH, Park HS. (2010) DJ-1 modulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway through physical interaction with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Cell Biochem*, 110(1):229-37.
111. Raninga PV, Di Trapani G, Tonissen KF. (2017) The Multifaceted Roles of DJ-1 as an Antioxidant. *Adv Exp Med Biol*, 1037:67-87.

112. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JP. (2006) DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(41):15091-6.
113. Cuevas S, Yang Y, Konkalmatt P, Asico LD, Feranil J, Jones J, Villar VA, Armando I, Jose PA. (2015) Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the oxidative stress-dependent hypertension associated with the depletion of DJ-1. *Hypertension*, 65(6):1251-7.
114. Raninga PV, Trapani GD, Tonissen KF. (2014) Cross Talk between Two Antioxidant Systems, Thioredoxin and DJ-1: Consequences for Cancer. *Oncoscience*, 1(1):95-110.
115. Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, Chen L, Zhuang X, Hogg J, Pare P, Tudor RM, Biswal S. (2008) Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(6):592-604.
116. Cheng YT, Ho CY, Jhang JJ, Lu CC, Yen GC. (2014) DJ-1 plays an important role in caffeic acid-mediated protection of the gastrointestinal mucosa against ketoprofen-induced oxidative damage. *J Nutr Biochem*, 25(10):1045-57.
117. Im JY, Lee KW, Woo JM, Junn E, Mouradian MM. (2012) DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. *Hum Mol Genet*, 21(13):3013-24.
118. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, Klausner RD, Pause A. (1999) Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12436-41.
119. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, 275(33):25130-8.
120. Foti R, Zucchelli S, Biagioli M, Roncaglia P, Vilotti S, Calligaris R, Krmac H, Girardini JE, Del Sal G, Gustincich S. (2010) Parkinson disease-associated DJ-1 is required for the expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor receptor RET in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 285(24):18565-74.

121. Vasseur S, Afzal S, Tardivel-Lacombe J, Park DS, Iovanna JL, Mak TW. (2009) DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(4):1111-6.
122. Aleyasin H, Rousseaux MW, Marcogliese PC, Hewitt SJ, Irrcher I, Joselin AP, Parsanejad M, Kim RH, Rizzu P, Callaghan SM, Slack RS, Mak TW, Park DS. (2010) DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7):3186-91.
123. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW. (2005) DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, 7(3):263-73.
124. Oh SE, Mouradian MM. (2017) Regulation of Signal Transduction by DJ-1. *Adv Exp Med Biol*, 1037:97-131.
125. Keyser RJ, van der Merwe L, Venter M, Kinnear C, Warnich L, Carr J, Bardien S. (2009) Identification of a novel functional deletion variant in the 5'-UTR of the DJ-1 gene. *BMC Med Genet*, 10:105.
126. Gu L, Cui T, Fan C, Zhao H, Zhao C, Lu L, Yang H. (2009) Involvement of ERK1/2 signaling pathway in DJ-1-induced neuroprotection against oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 383(4):469-74.
127. Kim KS, Kim JS, Park JY, Suh YH, Jou I, Joe EH, Park SM. (2013) DJ-1 associates with lipid rafts by palmitoylation and regulates lipid rafts-dependent endocytosis in astrocytes. *Hum Mol Genet*, 1;22(23):4805-17.
128. Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2(8):675-80.
129. Muzio M, Mantovani A. (2001) The Toll receptor family. *Allergy*, 56(2):103-8.
130. Uematsu S, Akira S. (2007) Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem*, 282(21):15319-23.
131. Armant MA, Fenton MJ. (2002) Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol*, 3(8):REVIEWS3011.
132. Lahti A, Sareila O, Kankaanranta H, Moilanen E. (2006) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase enhances c-Jun N-terminal kinase activity: implication in inducible nitric oxide synthase expression. *BMC Pharmacol*, 2006, 6:5.

133. Aktan F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, 75(6):639-53.
134. Waak J, Weber SS, Waldenmaier A, Görner K, Alunni-Fabbroni M, Schell H, Vogt-Weisenhorn D, Pham TT, Reumers V, Baekelandt V, Wurst W, Kahle PJ. (2009) Regulation of astrocyte inflammatory responses by the Parkinson's disease-associated gene DJ-1. *FASEB J*, 23(8):2478-89.
135. Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, Xia K, Jiang W, Ronai Z, Zhuang X, Zhang Z. (2009) Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*, 119(3):650-60.
136. Björkblom B, Adilbayeva A, Maple-Grødem J, Piston D, Ökvist M, Xu XM, Brede C, Larsen JP, Møller SG. (2013) Parkinson disease protein DJ-1 binds metals and protects against metal-induced cytotoxicity. *J Biol Chem*, 288(31):22809-20.
137. Richarme G, Mihoub M, Dairou J, Bui LC, Leger T, Lamouri A. (2015) Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues. *J Biol Chem*, 290(3):1885-97.
138. Richarme G, Liu C, Mihoub M, Abdallah J, Leger T, Joly N, Liebart JC, Jurkunas UV, Nadal M, Bouloc P, Dairou J, Lamouri A. (2017) Guanine glycation repair by DJ-1/Park7 and its bacterial homologs. *Science*, 357(6347):208-211.
139. Grygiel-Górniak B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*, 13:17.
140. Issemann I, Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294):645-50.
141. Berger J, Moller DE. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53:409-35.
142. Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, Reddy JK. (2010) Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res*, 2010. pii: 250126.
143. Boitier E, Gautier JC, Roberts R. (2003) Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol*, 2(1):3.
144. Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, Rossbacher JC, Moore IK, Regittnig W, Munoz DS, Kim JH, Shulman GI. (2007) n-3

Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes*, 56(4):1034–1041.

145. Delerive P, Furman C, Teissier E, Fruchart J, Duriez P, Staels B. (2000) Oxidized phospholipids activate PPAR alpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett*, 471(1):34–38.

146. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Whali W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9):4318–4323.

147. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, 4: 61–70.

148. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68: 879–87.

149. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 7355–9.

150. Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. (2003) Peroxisome-proliferator activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113(2):159–170.

151. Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN. (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, 64(9):3162–3170.

152. Sheu SH, Kaya T, Waxman DJ, Vajda S. Exploring the binding site structure of the PPAR gamma ligand-binding domain by computational solvent mapping. (2005) *Biochemistry (Mosc)*, 44(4):1193–1209.

153. Lehrke M, Lazar MA. (2005) The many faces of PPARgamma. *Cell*, 123(6):993–999.

154. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. (2004)

Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol*, 483(1):79-93.

155. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391:79–82.

156. Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:2203–2208.

157. Chen K, Li D, Zhang X, Hermonat PL, Mehta JL. (2004) Anoxia-reoxygenation stimulates collagen type-I and MMP-1 expression in cardiac fibroblasts: modulation by the PPAR-gamma ligand pioglitazone. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44:682–687.

158. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. (1998) *Nature*, 391:82–86.

159. Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS. (2006) THR0921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 8(1):R7.

160. Christmann R, Mathes A, Affandi AJ, Padilla C, Nazari B, Bujor AM, Stifano G, Lafyatis R. (2013) Thymic stromal lymphopoietin is up-regulated in the skin of patients with systemic sclerosis and induces profibrotic genes and intracellular signaling that overlap with those induced by interleukin-13 and transforming growth factor β . *Arthritis Rheum*, 65(5):1335-46.

161. Friend SL, Hosier S, Nelson A, Foxworthe D, Williams DE, Farr A. (1994) A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol*, 22(3):321-8.

162. Quentmeier H, Drexler HG, Fleckenstein D, Zaborski M, Armstrong A, Sims JE, Lyman SD. (2001) Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*, 15(8):1286-92.

163. Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Farr AG, Ziegler SF, Morrissey PJ, Paxton R, Sims JE. (2000) Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med*, 192(5):659-70.

164. He R, Geha RS. (2010) Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci*, 1183:13-24.
165. Verstraete K, Peelman F, Braun H, Lopez J, Van Rompaey D, Dansercoer A, Vandenberghe I, Pauwels K, Tavernier J, Lambrecht BN, Hammad H, De Winter H, Beyaert R, Lippens G, Savvides SN. (2017) Structure and antagonism of the receptor complex mediated by human TSLP in allergy and asthma. *Nat Commun*, 8:14937.
166. Isaksen DE, Baumann H, Trobridge PA, Farr AG, Levin SD, Ziegler SF. (1999) Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol*, 163(11):5971-7.
167. Kashyap M, Rochman Y, Spolski R, Samsel L, Leonard WJ. (2011) Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol*, 187(3):1207-11.
168. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. (2005) Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*, 6(5):507-14.
169. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204(8):1757-64.
170. Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. (2008) Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor- β . *Immunology*, 123(2):197-208.
171. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, Paquette N, Ziegler SF, Sarfati M, Delespesse G. (2007) Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med*, 204(2):253-8.
172. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 3(7):673-80.

173. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, Robinson D, Zhang G, Zhao J, Lee TH, Corrigan C. (2005) Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*, 174(12):8183-90.
174. Miyata M, Hatsushika K, Ando T, Shimokawa N, Ohnuma Y, Katoh R, Suto H, Ogawa H, Masuyama K, Nakao A. (2008) Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis. *Eur J Immunol*, 38(6):1487-92.
175. Kato A, Favoreto S Jr, Avila PC, Schleimer RP. (2007) TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol*, 179(2):1080-7.
176. Lee HC, Ziegler SF. (2007) Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3):914-9.
177. Ozawa T, Koyama K, Ando T, Ohnuma Y, Hatsushika K, Ohba T, Sugiyama H, Hamada Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A. (2007) Thymic stromal lymphopoietin secretion of synovial fibroblasts is positively and negatively regulated by Toll-like receptors/nuclear factor-kappaB pathway and interferon-gamma/dexamethasone. *Mod Rheumatol*, 17(6):459-63.
178. Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Vu AT, Ogawa T, Gunawan H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. (2009) Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol*, 123(1):179-86.
179. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, Marloie-Provost MA, Volpe E, Sastre X, Soumelis V. (2007) Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol*, 178(6):3373-7.
180. Koyama K, Ozawa T, Hatsushika K, Ando T, Takano S, Wako M, Suenaga F, Ohnuma Y, Ohba T, Katoh R, Sugiyama H, Hamada Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A. (2007) A possible role for TSLP in inflammatory arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 357(1):99-104.

181. He R, Oyoshi MK, Garibyan L, Kumar L, Ziegler SF, Geha RS. (2008) TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33):11875-80.
182. Liu S, Yang Z, Wei H, Shen W, Liu J, Yin Q, Li X, Yi J. Increased DJ-1 and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma. (2010) *Hepatogastroenterology*, 57(102-103):1247-56.
183. Merikallio H, Pääkkö P, Kinnula VL, Harju T, Soini Y. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) and DJ1 are prognostic factors in lung cancer. (2012) *Hum Pathol*, 43(4):577-84.
184. Tian M, Cui YZ, Song GH, Zong MJ, Zhou XY, Chen Y, Han JX. (2008) Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer*, 8:241.
185. Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Veres G, Molnár K, Szakál DN, Onódy A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. (2010) Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*, 68(2):118-22.
186. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. (2004) Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest*, 114:1098–1106.
187. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. (2017) 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, 168(1-2):37-57.
188. <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>
189. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Tiittanen M, Savilahti E. (2010) Infiltration of Foxp3- and Toll-like receptor-4-positive cells in the intestines of children with food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50:367–376.
190. Beckett CG, Dell’Olio D, Ellis HJ, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ. (1998) The detection and localization of inducible nitric oxide synthase production in the small intestine of patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 10:641–647.
191. Kaneko M, Mizunuma T, Takimoto H, Kumazawa Y. (2004) Development of TCR alpha beta CD8 alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4. *Biol Pharm Bull*, 27:883–889.

192. Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B. (2003) Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*, 125:730–745.
193. Tang F, Chen Z, Ciszewski C, Setty M, Solus J, Tretiakova M, Ebert E, Han J, Lin A, Guandalini S, Groh V, Spies T, Green P, Jabri B. (2009) Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J Exp Med*, 206:707–719.
194. Fornari MC, Pedreira S, Niveloni S, González D, Diez RA, Vázquez H, Mazure R, Sugai E, Smecuol E, Boerr L, Mauriño E, Bai JC. (1998) Pre- and post-treatment serum levels of cytokines IL-1beta, IL-6, and IL-1 receptor antagonist in celiac disease. Are they related to the associated osteopenia? *Am J Gastroenterol*, 93:413–418.
195. Kolodziej LE, Lodolce JP, Chang JE, Schneider JR, Grimm WA, Bartulis SJ, Zhu X, Messer JS, Murphy SF, Reddy N, Turner JR, Boone DL. (2011) TNFAIP3 maintains intestinal barrier function and supports epithelial cell tight junctions. *PLoS One*, 6:e26352.
196. Mo JS, Kim MY, Ann EJ, Hong JA, Park HS. (2008) DJ-1 modulates UV-induced oxidative stress signaling through the suppression of MEKK1 and cell death. *Cell Death Differ*, 15:1030–1041.
197. Heneka MT, Reyes-Irisarri E, Hull M, Kummer MP. (2011) Impact and therapeutic potential of PPARs in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol*, 9:643–650.
198. Sharabi Y, Oron-Herman M, Kamari Y, Avni I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E, Shamiss A. (2007) Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens*, 20:206–210.
199. Soares FL, de Oliveira MR, Teixeira LG, Menezes Z, Pereira SS, Alves AC, Batista NV, de Faria AM, Cara DC, Ferreira AV, Alvarez-Leite JJ. (2013) Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. *J Nutr Biochem*, 24:1105–1111.
200. Barroso E, Eyre E, Palomer X, Vazquez-Carrera M. (2011) The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) agonist GW501516 prevents TNF-alpha-induced NF-kappaB activation in human HaCaT cells by reducing p65 acetylation through AMPK and SIRT1. *Biochem Pharmacol*, 81:534–543.
201. Bertin B, Dubuquoy L, Colombel JF, Desreumaux P (2013) PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr Drug Targets*, 14:1501–1507.

202. Mesalazine treatment in organotypic culture of celiac patients: Comparative study with gluten free diet. (2018) Benedetti E, Viscido A, Castelli V, Maggiani C, d'Angelo M, Di Giacomo E, Antonosante A, Picarelli A, Frieri G.J. *Cell Physiol*. 233(6):4383-4390.
203. Jung K, Tanaka A, Fujita H, Matsuda A, Oida K, Karasawa K, Okamoto N, Ohmori K, Jee Y, Shin T, Matsuda H. (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated suppression of dendritic cell function prevents the onset of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J Allergy Clin Immunol*, 127(420–429):e421–e426.
204. Takai T. (2012) TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol*, 61:3–17.
205. Christmann RB, Mathes A, Affandi AJ, Padilla C, Nazari B, Bujor AM, Stifano G, Lafyatis R. (2013) Thymic stromal lymphopoietin is up-regulated in the skin of patients with systemic sclerosis and induces profibrotic genes and intracellular signaling that overlap with those induced by interleukin-13 and transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*, 65:1335–1346.
206. Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, Cerna M, Pecharova B, Dvorak M, Fruhauf P, Tlaskalova-Hogenova H, Smith PD, Tuckova L. (2007) Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol* 27:201–209.
207. Kim SY, Jeong EJ, Steinert PM. (2002) IFN-gamma induces transglutaminase 2 expression in rat small intestinal cells. *J Interf Cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res*, 22:677–682.
208. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A, Lerner A. (1999) Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol*, 49:441–446.
209. Liu YJ. (2009) TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol* 101:1–25.
210. Thymic stromal lymphopoietin levels are increased in patients with celiac disease. (2019) Kahramanoğlu Aksoy E, Akpınar MY, Pirinççi Sapmaz F, Doğan Ö, Uzman M, Nazlıgül Y. *Bosn J Basic Med Sci*. 19(3):282-287.
211. Biancheri P, Di Sabatino A, Rescigno M, Giuffrida P, Fornasa G, Tsilingiri K, Pender SL, Papadia C, Wood E, Pasini A, Ubezio C, Vanoli A, Forbes A, MacDonald TT, Corazza GR. (2016) Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease. *Gut*, 65(10):1670-80.

212. Tsilingiri K, Fornasa G, Rescigno M. (2017) Thymic Stromal Lymphopoietin: To Cut a Long Story Short. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 3(2):174-182.
213. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. (2009) Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40(3):368-74.
214. Xie Y, Takai T, Chen X, Okumura K, Ogawa H. (2012) Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 66(3):233-7.
215. Datta A, Alexander R, Sulikowski MG, Nicholson AG, Maher TM, Scotton CJ, Chambers RC. (2013) Evidence for a functional thymic stromal lymphopoietin signaling axis in fibrotic lung disease. *J Immunol*, 191(9):4867-79.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Vörös P, Sziksz E, Himer L, Ónody A, Pap D, Frivolt K, Szebeni B, Lippai R, Gyórfly H, Fekete A, Brandt F, Molnár K, Veres G, Arató A, Tulassay T, Ádám Vannay. Expression of PARK7 is increased in celiac disease. (2013) *Virchows Archiv*, 463:(3) pp. 401-408. IF:2,560

Sziksz E, Molnár K, Lippai R, Pap D, Ónody A, Veres-Szekely A, **Vörös P**, Szabó D, Gyórfly H, Veres G, Tulassay T, Vannay A, Arató A. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Archiv*, 465:(4) pp. 385-393. IF:2,651

Vörös Péter, Sziksz Erna, Lippai Rita, Pap Domonkos, Ónody Anna, Veres-Székely Apor, Veres Gábor, Vannay Ádám, Arató András. (2018) A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (PPAR γ) és a tímusz sztrómális limfopoietin (TSLP) vizsgálata gyermekkori cöliákiában. *Gyermekgyógyászat*, 69: 5 pp. 363-363.

Sziksz E, **Vörös P**, Veres G, Fekete A, Vannay Á. (2013) Coeliac disease: from triggering factors to treatment. *International Journal of Celiac Disease*, 1:(1) pp. 9-13.

Sziksz Erna, Molnár Kriszta, Lippai Rita, Pap Domonkos, Ónody Anna, Veres-Székely Apor, Szebeni Beáta, **Vörös Péter**, Gyórfly Hajnalka, Veres Gábor, Tulassay Tivadar, Vannay Ádám, Arató András. (2014) Involvement of thymic stromal lymphopoietin and peroxisome proliferator-activated receptor in coeliac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 58: suppl. 1 pp. 187-187.

Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Schaefer B, Bartosova M, Macher-Goeppinger S, Sallay P, **Vörös P**, Ranchin B, Vondrak K, Ariceta G, Zaloszyc A, Bayazit AK, Querfeld U, Cerkauskiene R, Testa S, Taylan C, VandeWalle J, Yap Y, Krmar RT, Büscher R, Mühlhig AK, Drozd D, Caliskan S, Lasitschka F, Fathallah-Shaykh S, Verrina E, Klaus G, Arbeiter K, Bhayadia R, Melk A, Romero P, Warady BA, Schaefer F, Ujszaszi A, Schmitt CP. (2018) Neutral pH and low-glucose degradation product dialysis fluids induce major early alterations of the peritoneal membrane in children on peritoneal dialysis. *Kidney international*, 94(2):419-429. IF: 8,306

Müller KE , Lakatos PL , Kovacs JB , Arató A , Varkonyi A , Nemes E , Tarnok A , Toth G , Papp M , Solyom E , Horvath A , Guthy I , Kovacs M , **Hungarian IBD Registry Group (HUPIR)*** , Veres G. (2016) Baseline characteristics and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 62:(1) pp. 50-55. IF: 2,799

Boros K, Vojnisek Z, Szabados K, **Vörös P**, Lestár B, Lásztity N, Veres G. (2014) Coeliakia és familiáris adenomatous polyposis (FAP) társulása. *Gyermekgyógyászat*, 65:(5) pp. 305-306.

Müller Katalin Eszter, Veres Gábor, HUPIR csoport, Kollaborációs közreműködő: Arató András, Csoszánzski Noémi Tomsits Erika, Cseh Áron, Dezsőfi Antal, Vörös Péter, Micskey Éva, Tóth Gergely, Szakos Erzsébet, Tárnok András, Szűcs Dániel, Vass Noémi. (2014) Gyermekkori gyulladásoos bélbetegségek jellegzetességei a HUPIR tükrében (2007-2011) *Gyermekgyógyászati továbbképző szemle*, 19: 1 pp. 38-41.

Müller KE, Lakatos PL, Arató A, Kovács JB, Várkonyi A, Szűcs D, Szakos E, Solyom E, Kovács M, Polgár M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Tóth G, Horváth A, Tárnok A, Csoszánzski N, Balogh M, Vass N, Bódi P, Dezsőfi A, Gárdos L, Micskey E, Papp M, Cseh Á, Szabó D, **Vörös P**, Hungarian IBD Registry Group (HUPIR), Veres G. Incidence; Paris Classification and follow-up in a nationwide; incident cohort of pediatric

patients with inflammatory bowel disease. (2013) Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 57:(5) pp. 576-582. IF: 2,873

Antal Z, Kovács T, **Vörös P**, Verebély T. Gastric Transposition after Duodeno-duodenostomy in Infants with Combined Esophageal and Duodenal Atresia-Report of Three Cases. (2012) European Journal of Pediatric Surgery, 22:(6) pp. 470-472. IF: 0,839

Várkonyi I, **Vörös P**, Székely E. Ultrahanggal diagnosztizált omentalis infarctus. Magyar Radiológia2009:83:(3) pp. 198-202.

Verebély T, Kálmán A, Kiss I, **Vörös P**, Antal Zs. Új eljárások a gyermeksebészetben. Gyermekgyógyászat 2009:60:(1) pp. 91-97.

Összesített impakt faktor: 20,028

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt Prof. Dr. Tulassay Tivadar és Prof. Dr. Szabó Attilának, akik biztosították számomra a kutatómunka elvégzéséhez szükséges szellemi műhelyt, és lehetőséget adtak, hogy a kutató munkámat klinikai feladataim mellett is elvégezhessem. Hálával tartozom témavezetőmnek Dr. Vannay Ádámnak, aki türelemmel, megértéssel és derűvel segítette, bátorította kutatói munkámat, valamint Prof. Dr. Arató Andrásnak és †Prof. Dr. Veres Gábornak, akik támogattak és megteremtették a munkámhoz szükséges tárgyi feltételeket. Külön köszönettel és hálával tartozom Sziksz Ernának, aki nemcsak a vizsgálataim, hanem a kéziratom összeállítása során is mellettem állt, felbecsülhetetlen segítséget nyújtott, lelkesített, motivált és vigasztalt. Köszönettel tartozom Dr. Cseh Áronnak, Himer Leonóranak, Molnár Krisztának, Lippai Ritának, Ónody Annának, Pap Domonkosnak, Veres-Székely Apornak és Bernáth Máriának, akik mind fontos szerepet vállaltak abban, hogy ez a munka megszülethessen. Köszönöm Cseh Évának lektori segítségét. Köszönöm továbbá gyermeksebész kollégáim, barátaim Prof. Dr. Verebély Tibor, Dr. Kálmán Attila, Dr. Kiss Imre, Dr. Antal Zsuzsa és Dr. Tallós Zsuzsa segítségét, valamint az I.sz. Gyermekklinika valamennyi munkatársának, hogy segítő, baráti körülmények között végezhettem doktori munkámat.

Végezetül köszönöm szüleimnek és feleségemnek támogatásukat, biztatásukat és végtelen türelmüket.