

A Parkinson's disease 7 (PARK7) szerepének vizsgálata gyermekkori gyulladásoos bélbetegségekben

Doktori értekezés

Dr. Lippai Rita

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vannay Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Vojnisek Zsuzsanna, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Szokol Bálint, Ph.D., kutató vegyész

Bíráló bizottság elnöke: Dr. Kovács Gábor, D.Sc., egyetemi tanár

Bíráló bizottság tagjai: Dr. Bárczi Enikő, Ph.D., rezidens
Dr. Hajdinák Péter, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2022.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés – Irodalmi áttekintés	10
1.1. Gyulladásos bélbetegség	10
1.1.1. A gyulladásos bélbetegség epidemiológiája.....	11
1.1.2. A gyulladásos bélbetegség patogenezise	12
1.1.2.1. Genetikai faktorok szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában	13
1.1.2.2. Környezeti tényezők szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában	15
1.1.2.3. Immunológiai tényezők szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában.....	16
1.1.2.3.1. Tumor nekrozis faktor- α szerepe a gyulladásos bélbetegségben .	17
1.1.2.3.2. Transzformáló növekedési faktor- β szerepe a gyulladásos bélbetegségben	17
1.1.2.3.3. Interleukinok szerepe a gyulladásos bélbetegségben	18
1.1.2.4. A hypoxia és oxidatív stressz szerepe a gyulladásos bélbetegségben	19
1.1.3. A gyulladásos bélbetegség klinikai tünetei	19
1.1.3.1. A CD klinikai képe	20
1.1.3.2. Az UC klinikai képe	21
1.1.3.3. A gyulladásos bélbetegség szövődményei.....	22
1.1.4. A gyulladásos bélbetegség diagnózisa	22
1.1.5. A gyulladásos bélbetegség aktivitási indexe	23
1.1.6. A gyulladásos bélbetegség terápiája.....	24
1.2. A parkinson's disease 7 (PARK7) molekula	25
1.2.1. A parkinson's disease géncsalád	25
1.2.2. A PARK7.....	27
1.2.2.1. A PARK7 általános jellemzői.....	27
1.2.2.2. A PARK7 molekula funkciói.....	28

1.2.2.2.1. A PARK7, mint direkt scavanger, chaperon, antioxidáns és hypoxia elleni védelemben szerepet játszó molekula	28
1.2.2.2.2. A PARK7, mint antiapoptotikus molekula	30
1.2.2.2.3. A PARK7, mint deglikáz és glioxaláz	31
1.2.2.2.4. A PARK7, mint immunregulátor	31
1.2.2.3. A PARK7 molekula betegségekben betöltött szerepe	33
1.2.2.4. A PARK7-hez köthető terápiai lehetőségek.....	35
2. Célkitűzések	36
3. Betegk és módszerek.....	37
3.1. IBD-s beteganyag és kontroll csoportja.....	37
3.2. Coeliakiás beteganyag és kontroll csoportja.....	38
3.3. DSS-indukálta colitises egérmódel, Comp23 kezelés és etikai megfontolások .	39
3.4. A betegség aktivitási index (DAI) számítása.....	41
3.5. Immunfluoreszcens festés.....	42
3.6. Immuncytológiai festés.....	43
3.7. Hisztológia.....	43
3.8. HT-29 colon epithel sejtek és kezeléseik.....	44
3.9. HT-29 colon epithel sejtek PARK7 géncsendesítése RNS-interferencia segítségével és IL-17 kezelésével	44
3.10. RNS izolálás és valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR)	45
3.11. Fehérje izolálás és Western blot	47
3.12. Enzyme-linked immunosorbent assay / enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat (ELISA)	48
3.13. Áramlási cytometria / Flow cytometry (FACS)	49
3.14. Statisztikai analízis	50
4. Eredmények	51

4.1. A humán PARK7 mRNA expressziója és lokalizációja coeliakiában és IBD-ben	51
4.2. Az IL-17, H ₂ O ₂ , TNF- α , TGF- β , LPS és DPI hatása a HT-29 colon epithel sejtek PARK7 termelésére	54
4.3. IL-17, TNF- α és PARK7 mRNA expresszió, valamint PARK7 fehérje mennyiség vad típusú és IL-17 knock out egerek DSS-indukált colitises bélnyálkahártyájában .	56
4.4. A PARK7, TNF- α , IL-1 β , -6, -10 és TGF- β mRNA expressziója és/vagy fehérje mennyisége HT-29 colon epithel sejtekben IL-17-indukciót és PARK7 csendesítést követően.....	58
4.5. A PARK7-kötő Comp23 kezelés hatása DSS-indukálta colitises egerekben.....	60
5. Megbeszélés	62
6. Következtetések	70
7. Összefoglalás	71
8. Summary	72
9. Irodalomjegyzék	73
10. Ábrák- és táblázatok jegyzéke.....	95
10.1. Ábrák jegyzéke	95
10.2. Táblázatok jegyzéke.....	98
11. Saját publikációk jegyzéke	101
11.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti, nemzetközi publikációk.....	101
11.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent, eredeti, nemzetközi publikációk	101
11.3. Az értekezés témájában megjelent magyar nyelvű összefoglaló publikációk .	102
11.4. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent, magyar nyelvű összefoglaló publikációk.....	103
12. Köszönetnyilvánítás.....	104

Rövidítések jegyzéke

3-NP	3-nitropropionsav
Ab	Antibiotikum
AD	Autoszomális domináns
AGE(R)	Késői glikációs végtermék (receptor) (Advanced glycation endproducts (receptor))
Akt	Protein kináz B
AMPK	5-adenosine monophosphate-activated protein kináz
ANCA	Anti-neutrophil cytoplazmatikus antitest
APC	Antigén prezentáló sejt (Antigene presenting cells)
AR	Autoszomális recesszív
ASCA	Anti-saccharomyces cerevisiae antitest
Ask	Apoptózis szignál regulált kináz
ATLG16L1	Autophagy-related protein 16-1
BAD	Bcl-2-associated death promoter
Bax	BCL-2-asszociált X
BMI	Testtömeg index (Body mass index)
BSA	Bovine serum antigene
bp	Bázispár
CARD	Caspase recruitment domain
CD	Crohn-betegség (Crohn's disease)
CDDED	Crohn-betegség kizárásos étrendje (Crohn's disease exclusion diet)
Comp23	Compound-23 (3,4,5-trimethoxy-N-(4-(8-methylimidazo(1,2-a)pyridin-2-yl)phenyl)benzamid)
COPD	Krónikus obstruktív tüdőbetegség (Chronic obstructive pulmonary disease)
COX	Cyclooxygenáz
CRC	Colorectalis carcinoma
CRP	C-reaktív protein
Cys	Cystein
CXCL	Chemokin (C-X-C motif) ligand

DAI	Betegség aktivitási index (Disease activity index)
DC	Dendritikus sejt (Dendritic cell)
DIC	Differenciális interferencia kontraszt
DJBP	DJ-binding protein
DLG	Disc large homolog
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DPI	Diphenilén-jodonium chlorid
DSS	Dextrán nátrium szulfát (Dextrán sodium sulphat)
ECCO	Európai Crohn-Colitis Társaság (European Crohn's Colitis Organization)
EEN	Kizárólagos enterális táplálás (Exclusive enteral nutrition)
EFCAB6	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6
EGTA	Glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
EIF4G1	Eukaryóta transzláció iniciációs faktor 4 gamma 1
ELISA	Enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ESPGHAN	Európai Gyermekek Gasztroenterológiai, Hepatológiai és Nutríciós Társaság (European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition)
FACS	Áramlási cytometria (Flow cytometry)
FBS	Magzati borjú szérum (Fetal bovine serum)
FGFR	Fibroblast növekedési faktor receptor (Fibroblast growth factor receptor)
FODMAP	Fermentábilis oligo-, di-, mono- és poliszacharidok (Fermentable oligo-, di-, mono-saccharides and polyols)
FRET	Fluoreszcens rezonancia energia transzfer
FBXO7	F-box only protein 7
GAPDH	Glyceraldehid 3-foszfát dehydrogenáz
GFD	Gluténmentes diéta (Gluten-free diet)
GI	Gasztrointesztinális
h	Humán
H₂O₂	Hidrogén-peroxid

H₂SO₄	Kénsav
HE	Hematoxylin-eozin
HIF	Hypoxia indukált faktor
HLA	Humán leukocyta antigén
HSP	Hősokk protein
HUPIR	Magyar Gyermekek Gyulladásos Bélbetegség Regiszter (H ungarian P ediatric I nflammatory B owel D isease R egistry)
IBD	Gyulladásos bélbetegség (I nflammatory b owel d isease)
IBD-U	Nem klasszifikálható gyulladásos bélbetegség (I nflammatory b owel d isease- u nclassified)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL23R	Interleukin 23 -receptor
ip	Intraperitonealis
iNOS	Indukálható n itrogén m onoxid szintáz
IRGM	Immunity-related G Tase family M -protein
JNK	c-Jun N -terminalis kináz
Keap	Kelch-like E CH-associated protein
KO	Génkiütött (K nock o ut)
LPS	Lipopoliszacharid
LRRK	Leucine-rich repeat kináz
LT	Leukotrién
m	Mouse (egér)
MAPK(AP)	Mitogen aktivált protein kináz (a sszociált p rotein)
MEKK	Mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz
MKK	Mitogén-aktivált protein kináz kináz
MMP	Matrix metalloproteináz
mp	Másodperc
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Nikotinamid adenin dinucleotid p hosphate
NaF	Nátrium-fluorid
Na₃VO₄	Nátrium-ortovanadát

NBIA	Neurodegeneration with brain iron accumulation
NEC	Necrotizáló enterocolitis
NF-κB	Nuclear factor-κB
NOD	Nucleotid-binding oligomerization domain-containing protein
NO	Nitrogén monoxid
NQO	NAD(P)H quinone dehydrogenáz
Nrf	Nuclear factor erythroid 2- related factor
NSAID	Non-szteroid gyulladáscsökkentő (Non-steroidal anti-inflammatory drug)
p38 MAPK	p38 mitogén-aktivált protein kináz
p53	Celluláris tumor antigén p53
PAMP	Mintázatfelismerő receptorok (Pathogen-associated molecular pattern)
PARK	Parkinson's disease
PAS	Perjódsav–Schiff
PBS	Phosphate- buffered saline
PCDAI	Gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index (Pediatric Crohn's disease activity index)
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphoinositide 3-kináz
PINK	PTEN indukált putatív kináz
PKB	Protein kináz B
PLA2G6	Phospholipáz A2, group VI
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (Phenyl-methyl-sulfonic-fluorid)
PTEN	Phosphatase és tensin homolog
PUCAI	Gyermekkori colitis ulcerosa aktivitási index (Pediatric ulcerative colitis activity index)
PUFA	Többszörösen telítetlen zsírsav (Polyunsaturated fatty acid)
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
ROS	Reaktív oxigén gyökök (Reactive oxygene system)
RPLP0	Ribosomális protein lateral stalk subunit P0
RT-PCR	Valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (Reverse transcription polymerase chain reaction)
scrNS	Short scrambled ribonukleinsav

SDS	Nátrium dodecil-szulfát (Sodium-dodecli-sulphate)
SEM	Standard error of mean
SLC	Solute carrier family 22 member
siRNS	Short interfering ribonukleinsav
SOD	Szuperoxid dizmutáz
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SYNJ1	Synaptojanin-1
Ta	Anellációs hőmérséklet
TGF	Tumor növekedési faktor (Tumor growth factor)
Th	T-helper
TLR	Toll like receptor
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
TNF	Tumor nekrosis faktor
Treg	Regulatory T-sejtek
TRX	Thioredoxin
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága
UC	Colitis ulcerosa (Ulcerative colitis)
UCH	Ubiquitin C-terminalis hidroláz
UCP	Uncoupling protein
VEO-IBD	Igen korai kezdetű (Very early onset)-IBD
VPS	Vacuolar protein sorting-associated protein
WT	Vad típusú (Wild type)

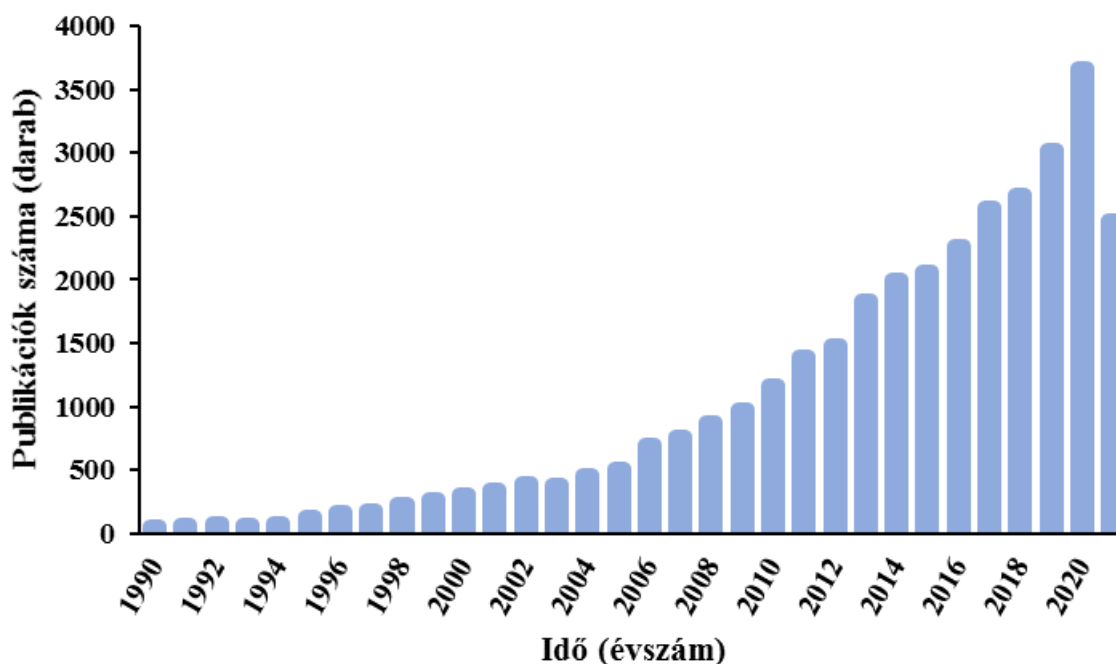
1. Bevezetés – Irodalmi áttekintés

1.1. Gyulladásos bélbetegség

A gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease-IBD) a gasztrointesztinális rendszer krónikus gyulladásával járó, remissziókkal és relapszusokkal jellemezhető megbetegedése. Az IBD multifaktoriális kórkép, kialakulásában genetikai, epigenetikai, immunológiai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak, azonban pontos patomechanizmusa máig sem tisztázott. Két fő megjelenési formája a Crohn-betegség (Crohn's disease-CD) és a colitis ulcerosa (ulcerative colitis-UC), melyek mellett megkülönböztetjük az indeterminált, atípusos, egyértelműen nem besorolható colitist (IBD-U–unclassified) is. A 6 éves kor előtt manifesztálódó, külön entitásként kezelhető, gyakran monogénes, autoszomális recesszív (AR) módon öröklődő kórkép az igen korai kezdetű (very early onset, VEO)-IBD nem képezi jelen dolgozat tárgyát, így ennek részletezésétől eltekintek.

Az IBD kiemelkedő jelentőségét évről-évre növekvő incidenciájának és prevalenciájának köszönheti, melyet jól tükröz a kórképpel foglalkozó irodalom rohamosan növekvő üteme is (ld.: 1. ábra). Több nyugati, fejlett országban a lakosság mintegy 0,5%-a szenved az éleminőséget markánsan rontó IBD-ben, így ez a betegség a rheumathoid arthritis után a második leggyakoribb krónikus gyulladással járó kórkép [1, 2].

Az utóbbi évek nagy esetszámú vizsgálatai alapján az IBD 15-30%-ban gyermekkorban kezdődik [1, 3], ami gyorsabb progresszióval, valamint kiterjedtebb és súlyosabb bélérintettséggel jár, ennek következtében növekedés elmaradáshoz, csontsűrűség csökkenéshez, valamint megkésett pubertáshoz vezethet. A hosszabb és súlyosabb betegségfolyás miatt a gyermekkori IBD számottevő közegészségügyi és anyagi problémát képvisel világszerte. Mindezek alapján kiemelt jelentőségű a gyermekkori IBD vizsgálata, a kialakulást elősegítő tényezők azonosítása, a patomechanizmus pontos megértése és a hatékony kezelés biztosítása.



1. ábra: A gyulladós bélbetegségekről (IBD) szóló publikációk számának évről-évre való növekedése az elmúlt 30 évben a PubMed adatbázis alapján [4].

1.1.1. A gyulladós bélbetegség epidemiológiája

Az IBD kiemelt jelentőségét a 20. század közepétől felnőttadattal t- és gyermekkorban egyaránt növekvő incidenciájának és prevalenciájának köszönheti. Egy kanadai vizsgálat alapján a gyermekkori IBD gyakorisága akár az évi 5-7%-os növekedési ütemet is elérheti [5]. 2010-ben az European Crohn's Colitis Organization (ECCO) adatai alapján a CD, illetve az UC incidenciája 3-6,5, valamint 4,1-10,8/100 000 fő [6]. Az IBD elsősorban a gazdaságilag fejlett országok betegsége volt, azonban az utóbbi évtizedekben elindult egy, a kiegyenlítődés irányába mutató tendencia is. Emellett a kelet-nyugati különbség mellett megfigyelhető, hogy a betegség gyakorisága északról dél felé haladva fokozatosan csökken [7].

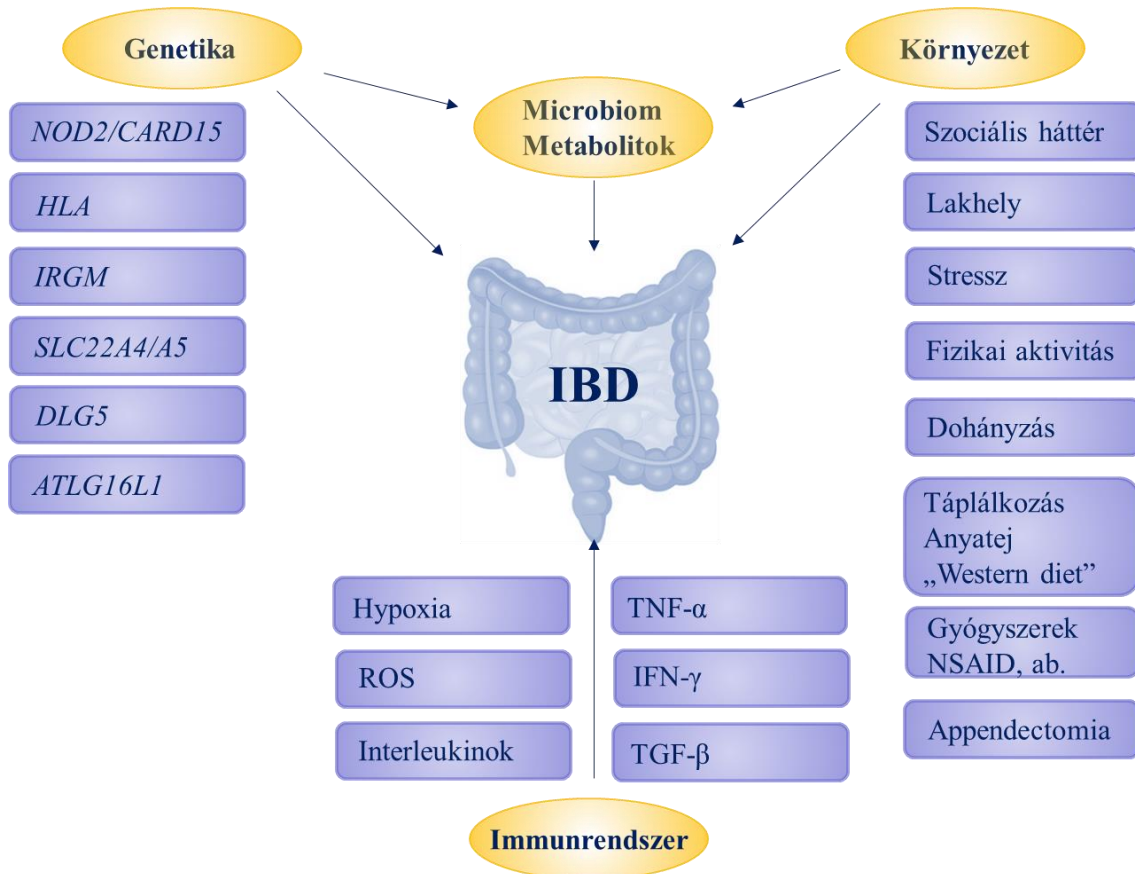
Magyarországon három nagyobb, az IBD gyakoriságot vizsgáló felmérést végeztek. Borsod-Abaúj-Zemplén megyében a harminc évet (1963-1992) felölelő, retrospektív felmérés alapján UC-ben 3,1-ről 3,6, CD-ben 0,43-ról 1,0/100 000 főre emelkedett a felnőtt lakosság körében a betegség incidenciája [8]. Az 1977-től 2001-ig

végzett prospektív Veszprém megyei tanulmány hasonló eredményeket mutatott. A vizsgált időszak alatt a CD és az UC incidenciája 0,41 főről 4,68, valamint 1,66-ről 11,01/100 000 főre nőtt [9].

A magyar gyermekkori IBD gyakoriságának vizsgálata a Magyar Gyermek Gyulladásos Bélbetegség Regiszternek (Hungarian Pediatric Inflammatory Bowel Disease Registry, HUPIR) köszönhető. A 2007. január 1-je óta működő prospektív regiszter az egész országra kiterjed, és a 27 magyarországi gasztroenterológiai központ közreműködésével minden frissen diagnosztizált, 18 év alatti IBD-s gyermek adatai rögzítésre kerülnek. Ezen adatok alapján 2007. január 1. és 2009. december 31. között a hazai gyermekkori IBD gyakorisága 420 beteg adatai alapján 7,8/100 000, ami nemzetközi adatokkal összevetve a középmezőnybe sorolja Magyarországot. A felmérésből kiderül, hogy hazánkban gyermekeknél a CD (4,9/100 000) kétszer gyakoribb az UC-nél (2,3/100 000) [10]. Az IBD-U gyakorisága gyermekkorban 10-30%-ra tehető, hét éves utánkövetés elteltével a gyermekek 1/3-a CD, 1/3-a UC diagnózist kap, ugyanakkor sajnos az esetek fennmaradó 1/3-a továbbra is tisztázatlan marad.

1.1.2. A gyulladásoos bélbetegség patogenezeise

A gyulladásoos bélbetegség egy multifaktoriális kórkép. Habár pontos patomechanizmusa nem teljesen tisztázott, ismert, hogy genetikai, epigenetikai, immunológiai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak kialakulásában. Genetikailag fogékony egyénekben környezeti tényezők hatására a bél immunrendszere kórosan aktiválódik, ami kontrollálatlan immunválasz és krónikus gyulladás kialakulásához vezet, előidézve a betegségre jellemző tünetek megjelenését. A patomechanizmus sematikus összefoglalása a 2. ábrán található.



2. ábra: Az IBD patomechanizmusának sematikus összefoglalása. A fontosabb genetikai, környezeti és immunológiai faktorok összegzése. (Saját ábra az irodalmi adatok alapján.)

Rövidítések: ab- antibiotikum, *ATLG16L1*- autophagia-related protein 16-1, *CARD*- caspase recruitment domain, *DLG*- disc large homolog, *HLA*- humán leukocytá antigén, IBD- gyulladáscélbetegség, IFN- interferon, *IRGM*- immunity-related GTPase family M protein, *NOD*- nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein, NSAID- nyszteroid gyulladáscsökkentő, ROS- reaktív oxigén gyök, *SLC*- solute carrier family 22 member, TGF- tumor növekedési faktor, TNF- tumor nekrozis faktor.

1.1.2.1. Genetikai faktorok szerepe a gyulladáscélbetegség kialakulásában

Az utóbbi évtizedekben genetika terén elért robbanásszerű fejlődés nagyban hozzájárult az IBD patomechanizmusáról nyert képünk pontosításához. Az IBD poligén betegség, kialakulásához azonban a környezeti tényezők nagyban hozzájárulnak.

Manifesztálódásának valószínűsége IBD-s betegek rokonainál 5-10-szer magasabb, mint az átlag népességben [11]. A genetikai predispozíció szerepére utal, hogy egyetétű ikrek esetében sokkal magasabb az együttes megjelenés valószínűsége (CD: 30-40%, UC: 6-14%), mint kétetétűeknél (CD: 7%, UC: 3%). A genetikai meghatározottság az előzőek alapján CD-ben erősebb, mint UC-ben [12].

A genetikai predispozíciót növelő gének közül kiemelendő a nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein-2/ caspase recruitment domain 15 (*NOD2/CARD15*) gén, melynek mutációi és bizonyos polimorfizmusai viszonylag alacsony allélfrekvencia mellett heterozigóta formában 1,5-4,3-szoros, homozigóta és compound heterozigóta formában viszont 17,6-44-szeresére növelik a CD kialakulásának esélyét [13]. Egy magyar vizsgálat alapján a betegség rizikója mutált allélhordozókban heterozigóta formában 1,7, homozigóta formában 25,2-szeres volt [14]. A humán leukocita antigén (*HLA*) asszociáció UC-ben erősebb [15], fehér bőrű kaukázusi populációban a DRB1*0103 allél hajlamosít UC-re [16].

A genetikai eltérések az immunrendszer direkt befolyásolásán túl hatással lehetnek a gasztrointesztinális mikrobiomra is. Az imént említett *NOD2* az intesztinális epithel sejtek felszínén expresszálódik, és hozzájárul a kommenziális baktériumok elleni immunválasz kialakulásához. Ezt bizonyítja, hogy a *NOD2* deficiens egerekben megváltozik a mikrobiom összetétele, hajlamosabbak colitis kialakulására. Humán vizsgálatok alapján a *NOD2* mutáció csökkent interleukin (IL)-10 expresszióval és megnövekedett mucosa-asszociált baktériumszámmal jár. A *NOD2* mutációt hordozó betegek mikrobiotáját csökkent *Faecalibacterium* és fokozott *Escherichia* fajok megjelenése jellemzi [17]. IBD-s betegekben csökkent diverzitású a mikrobiom [18], székletmintáikban 25%-al kevesebb faj található, mint a kontrollokban [19]. A mikrobiom patogenezisben betöltött szerepét a környezeti faktorok közül a kizárólagos enterális táplálás (exclusive enteral nutrition-EEN), a Crohn-betegség kizárásos étrendje (CDED), a pro- és prebiotikumok, valamint a széklettranszplantáció terápiás hatékonysága egyaránt alátámasztja [20-24].

1.1.2.2. Környezeti tényezők szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában

Az IBD kialakulásának szempontjából kiemelt jelentősége van a környezeti faktoroknak, melyek közül a teljesség igénye nélkül csupán a fontosabbakat említem.

Az IBD gyakoriságát befolyásoló faktorok közül kiemelendő a lakóhely. Számos vizsgálat kimutatta, hogy városban élők között magasabb a CD [25-27], illetve az IBD [28] gyakorisága, nem derült ki azonban, hogy melyik civilizációs ártalom áll a jelenség hátterében. Fontos, hogy a migráció elmosza az etnikai és rasszbeli különbségeket [29], ami felhívja a figyelmet a környezeti tényezők jelentőségére.

Egyes vizsgálatok összefüggésbe hozzák az IBD fokozott gyakoriságát a jobb szociális helyzettel, magasabb végzettséggel vagy jövedelemmel, bizonyos foglalkozásokkal (irodai munka, villamosmérnök, egészségügyi dolgozó, pék) [30]. Higiénia szempontjából protektívnek tartják a sok testvért, a nagy családot, a nem pasztörizált tej fogyasztását és az állatokkal való, kiemelten kora gyermekkori érintkezést [31-34]. Egy prospektív kohort vizsgálat kimutatta, hogy a komoly fizikai aktivitás 44%-al csökkenti a CD rizikóját [35]. Alvászavarok gyakoribbak IBD-ben, azonban vitatott, hogy oki- vagy okozati kapcsolatról beszélhetünk-e [36-38].

Különböző, az egészségügyi állapottal összefüggő rizikófaktorok is felmerültek az IBD kialakulása kapcsán. Az első életévben alkalmazott antibiotikum kezelés, vélhetően a mikrobiomra gyakorolt hatásán keresztül, emelkedett IBD gyakoriságot von maga után [39]. Kimutatták, hogy CD-ben a tartós anyatejes táplálás harmada, a tartós hasmenéssel járó infekciók gyakorisága pedig háromszorosa a kontroll csoporténak, UC-ben azonban csak az újszülöttkori hasmenés bizonyult rizikófaktornak [40]. Gent és mtsai. munkája alapján a korai infekciók hiánya és az otthoni higiénés viszonyok fejlettsége bizonyult rizikófaktornak CD-ben [41]. Az orális antikoncepciensek [42], valamint a non-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) [43, 44] tartós használata szintén összefüggésbe hozható az IBD fokozott kialakulásával. Érdekeség, hogy míg UC-ben az appendectomia protektív hatású [45, 46], CD-ben rizikófaktornak számít [47]. Dohányzás kapcsán is az appendectomiához hasonló kettősséggel találkozunk, míg az UC gyakoriságát 60%-al csökkenti az aktív dohányzás [48], addig CD-ben rizikófaktornak tekinthető [49].

Sokan az étkezési szokásokat is összefüggésbe hozzák az IBD kialakulásával. A fehérjedús "nyugati" típusú diéta fokozott kockázatot jelenthet [50]. A magas zsír,

többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA), omega-6 zsírsav és hús bevitel egyaránt fokozza az IBD kockázatát, míg a magas rost- és gyümölcs bevitel csökkenti a CD, a magas zöldség fogyasztás pedig az UC rizikóját [51]. A fermentálható oligo-, di-, mono- és poliszacharidok (FODMAP) szerepe még nem teljesen tisztázott IBD-ben, azonban redukált bevitelük hatására az irritábilis bélszindrómára emlékeztető tünetek gyakorisága csökken [20, 52]. Kimutatták, hogy a D-vitamin szupplementáció csökkenti a relapszusok gyakoriságát IBD-ben [53]. Habár az IBD és a diéta pontos kapcsolatának feltárása még számos vizsgálatot igényel, a táplálkozás jelentőségét egyértelműen jelzi az EEN szteroid kezeléssel egyenértékű terápiás hatékonysága.

A multifaktoriális betegségek, így IBD kialakulásában is szerepet tulajdonítanak a stressznek. Bár a szupportív pszichoterápiára vonatkozó adatok ellentmondásosak [54, 55], ismert, hogy a stressz fokozza a bélpermeabilitást, ami súlyosbíthatja a kórkép lefolyását.

1.1.2.3. Immunológiai tényezők szerepe a gyulladós bélbetegség kialakulásában

Az immunológiai faktorok szerepe vitathatatlan az IBD kialakulásában. A betegség előszobájában a genetikai predispozíció és a különböző környezeti faktorok hatására károsodik a bélnyálkahártya barrier. A sérült barrieren a mikrobiális termékek könnyedén bejutnak a bélfalba, ahol az immunsejtek aktivációját okozva intesztinális gyulladás alakul ki. A betegség elsősorban a bélrendszernek azon részein alakul ki, ahol a baktériumok száma magasabb. Kísérletes körülmények között csíramentes közegben tartott állatokban nem alakul ki IBD-szerű kórkép, ami a kommenziális flóra etiológiai szerepét támasztja alá [56]. Számos vizsgálat utal arra, hogy a veleszületett immunválasz zavara az inflammatorikus folyamatok elindításában, míg a szerzett immunitás a gyulladás fenntartásában játszhat kiemelt szerepet. A veleszületett immunrendszer antigén prezentáló sejtjei (APC) az IL-23 termelésén keresztül stimulálják az adaptív immunválasz részét képező T-helper (Th)-17 sejteket, melyek CD-ben és UC-ben egyaránt aktiválódnak [57]. A veleszületett immunrendszer mikroba-eliminációs defektusa, valamint a fokozott epitheliális permeabilitás egyaránt hozzájárul az adaptív immunitás kóros mértékben fokozódó működéséhez. IBD-ben a Th- és regulátoros T-

(Treg) sejtek, és ennek következtében a pro- és anti-inflammatorikus citokinek egészséges esetben finoman hangolt aránya felborul [58]. Mindezek háttérében a kóros mértékű Th-sejt aktiváció áll. CD-ben Th-1 dominancia jellemző, az APC-k zömmel macrophagok, a citokin profilban az IL-2, -12, -23, tumor nekrosis faktor (TNF)- α és interferon (IFN)- γ dominál. Ezzel szemben UC-ben, bár kevésbé egyértelműen, de inkább egy atípusos Th-2 dominanciáról beszélhetünk, a fő APC-k a B-sejtek, és zömmel az IL-4, -5, -10, -13 termelődés jellemző.

1.1.2.3.1. Tumor nekrosis faktor- α szerepe a gyulladásos bélbetegségben

A TNF- α egy, az IBD patomechanizmusában kulcsszerepet játszó pro-inflammatorikus citokin, melyet elsősorban az IBD-s betegek lamina propria mononuclearis sejtjei, így a macrophagok, fibroblastok, T-sejtek és adipocyták termelnek [59]. Ennek köszönhetően IBD-ben lokálisan és szisztémásan egyaránt emelkedett TNF- α mennyiség figyelhető meg. A TNF- α a nuclearis factor (NF- κ B) transzkripció faktor aktiválásán keresztül számos gyulladásos folyamatot indít el, mint a Paneth-sejtek necroptosisa, a macrophagok és effektor T-sejtek aktivációja, a fokozott angiogenesis, valamint a myofibroblastok fokozott matrix metalloproteináz (MMP) termelése [60]. A TNF- α neutralizáló antitestek (infliximab és adalimumab) használata súlyos betegség esetén az egyik leghatékonyabb terápiás eszközünk, mely *in vivo* igazolt T-sejt apoptosist kiváltó hatással is rendelkezik [61].

1.1.2.3.2. Transzformáló növekedési faktor- β szerepe a gyulladásos bélbetegségben

A transzformáló növekedési faktor (TGF)- β egy, a Treg-sejtek által termelt, kísérletes colitis modellekben protektív, anti-inflammatorikus, azonban profibrotikus hatású molekula [62]. A TGF- β csökkenti a Th-17 sejtek differenciációját, gátolja a Th-1 sejtek polarizációját és az NF- κ B jelátviteli útvonal gátlásán keresztül csökkenti a gyulladásos citokinek, például a mastocyták TNF- α termelését [63]. Azonban SMAD-dependens és -independens úton egyaránt profibrotikus gének (MMP1, -10, kollagén-1)

expresszióját indukálja, és elősegíti a fibroblastok aktivációját [64]. IBD-s betegek effektor T-sejtjei overexpresszálják a SMAD7-t, ami a TGF- β jelátviteli út gátlásán keresztül a TGF- β mediált szupresszióval szemben rezisztenssé teszi az effektor T-sejteket [65]. A két betegség eltérő Th-sejt profiljának köszönhetően különbség adódik a TGF- β expresszióban is. UC-ben a lamina propria mononuclearis- és T-sejtjeinek száma, valamint TGF- β termelése magasabb a CD-s és kontroll csoportokhoz képest [66].

1.1.2.3.3. Interleukinok szerepe a gyulladásos bélbetegségben

A környezeti tényezők hatására megváltozott a mikrobiom és a lumenális antigének mintázatfelismerő receptorokon (PAMP), például toll like receptoron (TLR) keresztüli felismerése aktiválja a dendritikus sejteket (DC), melyek fokozott IL-1 β , -6 és TNF- α expressziója elősegíti a naiv T-sejtek differenciációját [67, 68]. CD-ben Th-1 irányú differenciáció indul meg, melyek IFN- γ és IL-6 termelésükkel indukálják a macrophagokat. UC-ben a Th-2 dominancia jellemző, az IL-4, -5, -6, -10 és -13, valamint TNF- α termelés a B-lymphocytákra, a basophil és eosinophil sejtekre egyaránt hatással van [60]. A DC-k által termelt citokinek indukálják a Th-17-sejt irányú differenciációt is, ami emelkedett IL-17 és IFN- γ termelés révén károsítja az epithel réteget.

Az IL-17 az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül számos citokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6), kemokin [chemokin (C-X-C motif) ligand (CXCL)-1, -2], növekedési faktor (TGF- β), mátrix metalloproteináz (MMP3, MMP13) és antimikrobiális peptid (defensin, mucin) expresszióját fokozza [69], chemotaxis választ vált ki a neutrophil sejtekből, továbbá B-sejt aktiváción keresztül hozzájárul az autoimmun folyamatok elindításához [70]. Bár mind a protektív, mind a gyulladás irányába ható folyamatokat elindít, azonban a humán anti-IL-17A antitest, a Secukinumab egy 59 páciensen végzett, kettős-vak, placebo kontrollos vizsgálata alapján inaktívnek bizonyult IBD-ben [71]. Dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitises egérmodellben az *IL-17* knock out (KO) állatok epithel sérülése enyhébb, mint a vad típusú (WT) egereké, ami az IL-17 bélnyálkahártya károsító hatását támasztja alá [72].

1.1.2.4. A hypoxia és oxidatív stressz szerepe a gyulladásos bélbetegségben

A különböző gyulladásos citokinek neutrophil infiltrációt okoznak a lamina propriában, melyek egyrészt a fokozott O₂ felhasználás következtében kialakuló hypoxia miatt, másrészt a fokozott nikotinamid adenin dinucleotid phosphate (NADPH)-oxidáz aktivitás szuperoxid végterméke, vagyis a fokozott reaktív oxigéngyök (ROS) képződés révén hozzájárulnak a bélnyálkahártya sérüléséhez. A leukocyták és monocyták prosztaglandin (PG) és leukotrién (LT) metabolizmus révén további ROS termelést és szövetkárosodást okoznak [73], így fokozzák az oxidatív stressz IBD patomechanizmusában játszott központi szerepét. Mindemellett a hidrogén-peroxid (H₂O₂) - NADPH-oxidáz - NF-κB vagy mitogen aktivált protein kináz asszociált protein (MAPK-AP)-1 útvonalon keresztül fokozzák az intesztinális epithel sejtek proinflammatorikus citokin, mint a TNF-α, IL-6 vagy indukálható nitrogen-oxid szintáz (-iNOS) termelését [74] [75].

A gasztrointesztinális traktusban fiziológiás körülmények között is jelen vannak antioxidáns rendszerek, mint például a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz, a glutation, vagy a transzkripció faktoroként funkcionáló hypoxia indukált faktor (HIF), melynek aktivációja számos antioxidáns gén expresszióját fokozza [75-77]. AZ IBD-ben használt sulfasalazin és mesalazin csökkentik a bélrendszerben képződő ROS mennyiségét, a glukokortikoidok pedig redukálják a ROS termelésben résztvevő myeloperoxidáz és neutrophil elasztáz enzimek működését [75], így csökkentve a ROS-indukált bélkárosodást.

1.1.3. A gyulladásos bélbetegség klinikai tünetei

Az IBD mindkét megjelenési formája hullámzó lefolyású, remissziókkal és relapszusokkal tarkított kórkép. A klinikai kép függ a betegség lokalizációjától, a fennállás idejétől és az esetleges extraintesztinális manifesztációktól. A két betegség áttekintő összehasonlítása az 1. táblázatban található.

1. táblázat. A gyermekkori gyulladásos bélbetegség (IBD) két formájának összehasonlítása.

Rövidítések: ANCA- anti-neutrophil citoplazmatikus antitest, ASCA- anti-saccharomyces cerevisiae elleni antitest, CRC- colorectalis carcinoma, GI- gasztrointestinalis, IBD- gyulladásos bélbetegség, Th- T-helper sejt.

	Crohn-betegség	Colitis ulcerosa
Gyakoriság (Magyarország)	4,9/100 000 fő	2,3/100 000 fő
Th-dominancia	Th1	Th2
Jellemző antitest	ASCA	ANCA
Vezető tünetek	Hasi fájdalom, diarrhoea, súlyállás/fogyás	Haematochaezia tenezmussal
Extraintesztinális tünet	Gyakori	Ritka (sclerotizáló cholangitis)
Típusos szövődemény	Fissura, fistula, abscessus	Vérzés, toxicus megacolon, CRC
Lokalizáció	Teljes GI traktus	Colon
Rectum-érintettség	20%	100%
Kiterjedés	Szakaszos (proximalistól disztalis felé)	Folyamatos (disztalistól proximalis felé)
Réteg	Transmurális	Nyálkahártya
Röntgen	Fissura, utcakő-rajzolat	Pseudopolyposis, haustratio eltűnik > „kerékpártömlő”
Endoszkópia	Aphta, térkép szerű rajzolat („snail trail”), strictura, fissura, utcakő-rajzolat	Diffúz hyperaemia, kontakt vérzés, ulceratiók, pseudopolypok
Szövettan	Teljes bélfal Epithel sejtes granuloma, később fibrosis	Mucosa, submucosa Crypta abscessus, később mucosa atrophia, epithel dysplasia

1.1.3.1. A CD klinikai képe

A CD a gasztrointesztinális rendszer bármely részét érintheti, leggyakoribb az ileocecalis megjelenés, gyermekkorban azonban egyes források szerint az izolált colitis

gyakoribb (Magyarországon a HUPIR adatai alapján az izolált colitis gyakorisága 27,5%) [10]. Fontos, hogy gyermekkorban a betegek közel 30%-ának van felső gasztrointesztinális érintettsége is, ami megkönnyítheti a diagnózis felállítását [78, 79].

A CD tünetei aspecifikusak, a betegség leggyakrabban a klasszikus tünetek különböző kombinációival, abdominalis fájdalommal, diarrhoeával, étvágy csökkenéssel és fogyással jár. A betegek 70%-ának krónikus hasfájása van, mely a colon érintettségének megfelelően köldök körüli, jobb- vagy diffúz alhasi lehet [79]. A betegség bevezető tünete lehet a súlyvesztés (58%), a véres-nyákos széklet (22%-56%) és a láz is. Gyermekkorban a növekedési retardáció elkerülése érdekében kiemelt jelentőségű a tartós remisszió elérése, amennyiben ez sikerül, a növekedés felgyorsul („catch up growth”), ellenkező esetben azonban irreverzibilissé válhat a növekedésbeli elmaradottság. A betegség lefolyása során a gyakran csak operatív úton megoldható perianális fistulák (20%), bőrfüggelékek („skin tag”) és recidiváló perianális tályogok (8%) előfordulása is kiemelt jelentőségű [79-81].

A CD-s betegeket nagyobb arányban érintő, összességében 20-40%-ban előforduló extraintesztinális manifesztációk a betegek életminőségét nagymértékben befolyásolják. A leggyakoribb, aktivitással összefüggő tünetek az erythema nodosum, az episcleritis és a perifériás arthritis, míg a betegség aktivitásától független a sclerotizáló cholangitis, az uveitis és a pyoderma gangrenosum [10, 82, 83].

1.1.3.2. Az UC klinikai képe

UC-ben kezdeti panasz leggyakrabban a görcsös abdominalis fájdalommal (tenezmus) (62%) kísért hematochaezia (84%) és a diarrhoea (74%). A markánsabb tüneteknek köszönhetően az UC általában a CD-nél hamarabb kerül felismerésre. A gyorsabb diagnózisnak, rövidebb és a tápanyag felszívódás szempontjából kevésbé fontos bélérintettségnek köszönhetően UC-ben ritkább a súlyvesztés (31%) [79].

Felnőttkorban elsősorban a bal colonfél, a végbél disztális része és a rectum érintett [84], gyermekkorban azonban gyakori a pancolitis (Magyarországon a HUPIR adatai alapján a pancolitis gyakorisága 57%) [10], és érintett lehet akár a terminalis ileum is („backwash ileitis”), ami megnehezíti a diagnózis felállítását [79, 85].

Az extraintesztinalis manifesztációk közül a sclerotizáló cholangitis az esetek 70-80%-ban UC-hez társul.

1.1.3.3. A gyulladásos bélbetegség szövődményei

A CD lefolyása során a bélfal oedemája miatt strikturák, a krónikus gyulladás következtében fissurák-abscessusok alakulhatnak ki, továbbá fennáll a malignus transzformáció lehetősége is. A szövődmények miatt élete során a betegek több, mint 70%-a esik át műtéti beavatkozáson [86].

Az UC akut, fulmináns lefolyása esetén toxikus megacolon kialakulásával kell számolni, mely szeptikus lázmenettel, peritonitissel, perforációval járhat. UC-ben bizonyított a colorectalis carcinoma (CRC) kialakulásának fokozott rizikója, azonban az utóbbi években az új típusú terápiák és a gyakori „surveillance” endoszkópiák bevezetésének köszönhetően a CRC kialakulása csökkenő tendenciát mutat. A korábban említett veszprémi felmérés jól jelzi a korai kezdetű UC jelentőségét, adataik alapján a betegség 10 éves fennállását követően a CRC kockázata 0,6%, 20 év után 5,4%, 32 év után pedig már 12,6%. 5 év betegség fennállás után a betegek több, mint 20%-a szorul műtéti beavatkozásra [9, 84].

A hosszú betegség aktivitás eredményeként gyermekkorban mindkét kórkép esetében számolni kell növekedési zavarral, a felszívódási zavar következtében kialakuló esetleges hiánytünetekkel (pl. anaemia, csökkent csonttömeg) valamint akár pubertás tardával is.

1.1.4. A gyulladásos bélbetegség diagnózisa

A diagnózis felállítása a Portói kritériumok és az ESPGHAN irányelvei alapján történik [81, 87]. Fontos a részletes anamnézis és fizikális vizsgálat. Laboratóriumi eltérések közül főként CD-ben gyakori az emelkedett C-reaktív protein (CRP), a gyorsult süllyedés, az anaemia, thrombocytosis, illetve mérsékelt leukocytosis, valamint az emelkedett széklet calprotectin szint. Immunológai vizsgálattal CD-ben az anti-

saccharomyces cerevisiae elleni antitest (ASCA), UC-ben az anti-neutrophil citoplazmatikus antitest (ANCA) pozitívítás gyakoribb. A radiológiai képalkotásnak kiemelt jelentősége van az IBD diagnosztikájában, gyermekek esetében ehhez hasi ultrahang, valamint hasi- és kismedencei mágneses rezonancia vizsgálatot végzünk. A pontos diagnózis felállításához nélkülözhetetlen az felső- (oesophago-gastro-duodenoscopia) és alsó- (recto-ileo-colonoscopia) endoszkópos és szövettani vizsgálat egyaránt (ld. 2. táblázat).

A tünetek aspecifikus jellege miatt nagy hangsúlyt kell fektetni az elkülönítő kórismére is. CD esetén a funkcionális (irritábilis bélszindróma, gyulladásos (appendicitis acuta), infektív (*Yersinia enteritis*, béltuberculosis), endokrinológiai (hypothyreosis), immunológiai (vasculitisek, juvenilis arthritisek) és malignus (leukaemia, non-Hodgkin lymphoma) kórképek egyaránt felmerülnek. UC diagnózisakor leginkább az infektív (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter spp.*, invazív *E. coli*), valamint a jellemzően antibiotikum kezelést követően kialakuló *Clostridium difficile* által okozott pseudomembranosus colitises eredetet kell kizárni.

1.1.5. A gyulladásos bélbetegség aktivitási indexe

Mindkét betegség aktivitásának, súlyosságának számszerűsítése, valamint a terápia hatékonyságának könnyebb megítélése érdekében a klinikai gyakorlatban aktivitási indexet használnak.

CD-ben a Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) egy 0-100-ig terjedő skála, mely magában foglal néhány klinikai tünetet (fogyás, hematochaezia, diarrhoea), laboratóriumi értéket (albumin, haematokrit) és szövődményt (perirectalis elváltozás, extraintesztinális tünet). 10 alatti PCDAI esetében remisszióról, 30 fölött súlyos aktivitásról beszélhetünk. CD-ben fontos prognosztikai és terápiás jelentőséggel bír a lokalizáció és a viselkedés.

UC-ben a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)-t alkalmazzák, mely a PCDAI-val ellentétben kizárólag klinikai tüneteken (éjszakai véres hasmenés, véres székletek száma, mennyisége) alapul, és sokkal jobban korrelál a betegség tényleges

aktivitásával. A PUCAI esetében is 10 alatt remisszióról, 30 fölött súlyos aktivitásról beszélhetünk, 65 fölött akut fulmináns colitist különítünk el.

1.1.6. A gyulladáisos bélbetegség terápiája

Gyermekkori IBD-ben a terápia célja a növekedés és nemi érés alapfeltételét biztosító tartós remisszió elérése. Klinikai remisszióról 10 alatti PCDAI, illetve PUCAI esetében beszélhetünk.

Gyermekkori CD-ben az első választandó kezelés az EEN, mely során a páciens 6-8 héten keresztül csak folyékony tápszert fogyaszthat. A szteroid kezelés napi 1mg/ttkg dózisban adható 2-4 hétig, 2 hónapos leépítéssel. Fistula és tályog esetében a széles spektrumú antibiotikumok közül, szükség esetén kombinációban, ciprofloxacín és metronidazol adható [88]. A purin-analógok (azatioprin és 6-mercaptopurin) használatára az EEN vagy szteroid kezelés után fenntartó terápiaként kerül sor. Biológiai terápia három hónapos eredménytelen konzervatív terápiát követően; 30 fölötti PCDAI vagy fistula esetén adható. Sajnos a széles spektrumú farmakológiai terápiás lehetőségek ellenére 8 éves betegségfennállás esetén a gyermekek egyharmada, életük során pedig a CD-s betegek mintegy 70-90%-a szorul sebészeti beavatkozásra [89].

Enyhe és középsúlyos UC-ben per os vagy per rectum 5-amino-szalicilát terápia elégséges lehet. Súlyosabb esetben szteroid, azatioprin vagy cyclosporin adható [90], konzervatív terápiára rezisztens esetben pedig biológiai terápia kezdhető. Tíz éves betegségfennállás esetén gyermekkorban a colectomia kétszer gyakoribb (40%), mint felnőttkorban (20%).

1.2. A parkinson's disease 7 (PARK7) molekula

1.2.1. A parkinson's disease géncsalád

A parkinson's disease (*PARK*) géncsaládot a Parkinson-kóros betegeknek 5-15%-t érintő örökletes Parkinson-szindróma kutatása során fedezték fel. A betegség kialakulásával kapcsolatban eddig összesen 23 gén szerepe merült fel, melyek egy része autoszomalis domináns (AD) (pl. *LRRK2* és *VPS32*), más részük AR (pl. *PINK1* és *DJ-1*) öröklésmenetet mutat, néhány gén szerepe máig kétséges (*ARK5*, *PARK11*, *-13*, *-18*, *-21* és *-23*), másokét pedig csupán rizikófaktorként erősítették meg (*PARK3*, *-10*, *-12*, *-16* és *-22*). A *PARK* géncsalád örökletes Parkinson-szindrómában betöltött szerepét és jellemzőit az alábbi, 2. táblázat foglalja össze [91-93], mely nem tartalmazza a rizikófaktorként megjelölt géneket.

2. táblázat. A Parkinson's disease (PARK) géncsalád tagjai és szerepük az örökletes Parkinson-szindrómában.

Rövidítések: AD- autoszomális domináns, AR- autoszomális recesszív, *DJ-1*- PARK7, *EIF4G1*- Eukaryóta transláció iniciációs faktor 4 gamma 1, *FBXO7*- F-box only protein 7, *LRRK2*- Leucine-rich repeat kináz 2, *NBIA*- neurodegeneration with brain iron accumulation, *PARK*- Parkinson's disease, *PINK1*- phosphatase és tensin homolog (PTEN) induced putative kináz 1, *PLA2G6*-Phospholipáz A2, group VI, *SYNJ1*- Synaptojanin-1, *UCH-L1*- ubiquitin C-terminalis hidroláz L1, *VPS*- Vacuolar protein sorting-associated protein.

Gén	Kromoszóma	Érintett gén	Öröklődés	Klinikai jellemzők
<i>PARK1</i>	4q21	<i>α-synuclein</i>	AD	Demencia
<i>PARK2</i>	6q25,2-27	<i>Parkin (PRKN)</i>	AR	Korai kezdet L-dopa indukált dyskinesia Alsó végtagi dystonia
<i>PARK4</i>	4p15	<i>SNCA</i>	AD	Demencia, posturalis tremor
<i>PARK5</i>	4p14	<i>UCH-L1</i>	AD	Nem definiált
<i>PARK6</i>	1p36	<i>PINK1</i>	AR	Korai kezdet, tremor domináns
<i>PARK7</i>	1p36	<i>DJ-1</i>	AR	Korai kezdet, dystonia, Feltűnő pszichés jelenségek
<i>PARK8</i>	12p11.2-q13.1	<i>LRRK2</i>	AD	Nem definiált
<i>PARK9</i>	1q36	<i>ATP13A2</i>	AR	Kufor-Rakeb szindróma (NBIA), korai kezdet, járás- és neuropszichiátriai zavar
<i>PARK11</i>	2q36	<i>GIGYF2</i>	AD	Késői kezdet
<i>PARK13</i>	2p13	<i>HTRA2</i>	AD	Késői kezdet Klasszikus tünettan
<i>PARK14</i>	22q13	<i>PLA2G6</i>	AR	<i>PLA2G6</i> -asszociált neurodegeneráció (NBIA) Járási- és neuropszichiátriai zavar
<i>PARK15</i>	22q12	<i>FBXO7</i>	AR	Parkinsonian-pyramidal szindróma
<i>PARK17</i>	16q11	<i>VPS35</i>	AD	Késői kezdet, tremor domináns
<i>PARK18</i>	3q27	<i>EIF4G1</i>	AD	Késői kezdet, tremor domináns
<i>PARK19A,B</i>	1p31	<i>DNAJC6</i>	AR	Korai kezdet Mentalis retardáció
<i>PARK20</i>	21q22	<i>SYNJ1</i>	AR	Korai kezdet Dystonia, kognitív zavar
<i>PARK21</i>	3q22	<i>DNAJC13</i>	AD	Késői kezdet Tremor, rigiditás, bradykinesia
<i>PARK23</i>	15q22	<i>VPS13C</i>	AR	Korai kezdet Demencia, dysautonomia

Huszonöttnél több *PARK7* vagy más néven *DJ-1* mutációt azonosítottak korai kezdetű Parkinson-kórban, melyek közül néhány abnormálisan rövid DJ-1 proteint, néhány aminosav csere vagy hosszú szakaszt érintő deléción pedig rendellenes fehérjeszerkezetet eredményez. L166P mutációja destabilizálja a fehérjét és elősegíti lebomlását az ubiquitin-proteasoma rendszerben, így a degradáció fokozódása miatt csökken a sejt *PARK7* fehérje mennyisége [94]. A mutált génről átíródó fehérjék instabilak és nem funkcionálnak megfelelően, így AR öröklődő juvenilis Parkinson-kórt eredményeznek. A *PARK7* funkciójának kiesése miatt a mesencephalon substantia nigra pars compacta régiójának dopamintermelő idegsejtjei érzékenyebben reagálnak az oxidatív stresszre. A *PARK7* hiánya a hibásan feltekeredett vagy sérült fehérjék (α -synuclein) toxikus mértékű felszaporodásához és a dopaminerg neuronok fokozott apoptózisához vezet [95]. Ezek 70-75%-nak pusztulása után megjelennek a Parkinson-kórra jellegzetes klinikai tünetek, a hypo-/akinesia, a rigor és a nyugalmi tremor. A *PARK7* mutációja által kiváltott Parkinson-kór általában csak az agytörzset érinti, ennek köszönhetően a kognitív hanyatlás rizikója elenyésző [96].

1.2.2. A *PARK7*

1.2.2.1. A *PARK7* általános jellemzői

A *PARK7* vagy DJ-1 molekula evolúciósan erősen konzervált, az egész szervezetben jelen lévő, kisméretű, 20 kDa molekulatömegű fehérje. Génje az 1 kromoszóma rövid karján, a 36.23 pozícióban helyezkedik el (1p36.23), a 8,021,713-tól a 8,045,341 bázispárig. A gén 7 exonja kódolja a 189 aminosavból álló, fiziológiásan homodimert alkotó *PARK7* fehérjét, melynek másodlagos struktúrája 9 β -redőzött lemezt, 11 α -hélixet és 3 β -görbületet tartalmaz. A *PARK7* a C56 peptidáz proteincsalád tagja [97], a legtöbb humán szervben és szövetben megtalálható. Intracellularisan a sejtmagban lokalizálódik, ahonnan külső inger hatására a cytoplazmába és a mitokondriumokba transzlokálódik és antioxidánsként protektív funkciót tölt be [98].

1.2.2.2. A PARK7 molekula funkciói

Jelenlegi irodalmi adatok arra utalnak, hogy a PARK7 egy multifunkcionális cytoprotektív fehérje, melynek direkt scavenger, chaperon, antioxidáns, antiapoptotikus és immunreguláló hatása egyaránt ismert.

1.2.2.2.1. A PARK7, mint direkt scavenger, chaperon, antioxidáns és hypoxia elleni védelemben szerepet játszó molekula

A PARK7 legjobban alátámasztott, legtöbbet tanulmányozott funkciója az antioxidáns hatása. A PARK7 regulátorai kevésbé ismertek, de expressziója hypoxiás ingerre, valamint ROS jelenlétében fokozódik [99]. Bizonyított, hogy a PARK7 többféle mechanizmussal játszik szerepet a sejtek oxidatív károsodástól való védelmében:

Elsőként, mint direkt scavenger, oxidatív stressz hatására a 106-os pozícióban lévő cisztein (Cys-106) auto-oxidáción megy keresztül [100].

Másodszor, oxidatív környezetben redox-szenzitív chaperonként funkcionál [101]. Más chaperonokhoz hasonlóan elősegíti az újonnan képződő fehérjék megfelelő háromdimenziós alakjának kialakulását, hozzájárul a sérült fehérjék újrarahajtogatódásához, gátolja aggregációjukat, részt vesz a kiszelektált fehérjék proteozomához jutásában és ezáltal a felesleges molekulák lebomlásában. Mutációja ennek megfelelően a károsodott fehérjék felhalmozódásához, aggregációjához, majd végül apoptózishoz vezethet.

Harmadszor, ko-aktivátorként vagy ko-represszorként olyan transzkripciósfaktorok aktivitását regulálja, mint az oxidatív stressz kapcsán ismert nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (*Nrf2*) [102], vagy az oxidatív stressz elleni mitokondriális homeosztázist reguláló celluláris tumor antigén *p53* [103]. A PARK7 közvetlenül kapcsolódik a Kelch-like ECH-associated protein (Keap)-1 molekulához, ami az *Nrf2* gátlófehérjéje, így az *Nrf2* felszabadul a gátlás alól. Az *Nrf2* antioxidáns faktorok, például a thioredoxin (TRX) és a glutation útvonal egyik fő aktivátora [102]. A PARK7 mindemellett direkt peroxidáz aktivitással is rendelkezik [104], valamint fokozza a szabadgyökök mennyiségét redukáló superoxid dizmutáz (SOD)-3 expresszióját is [105].

Súlyos hypoxiában a tumorszupresszor p53 fokozott aktivitása HIF-1 α degradációhoz, valamint a p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) és Bcl-2-associated death promoter (BAD) proapoptotikus fehérjék aktivitásának növekedéséhez vezet. Ezen folyamatokat a PARK7 gátolja, így protektív szerepet játszik a hypoxia-indukált sejthalállal szemben [106].

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során kimutatta, hogy a a PARK7-hez kötődő protektív benzamid, 3,4,5-trimethoxy-N-[4-(8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)phenyl], Compound-23 (Comp23) kezelés csökkenti a H₂O₂-indukált ROS akkumulációt fokozva a FHs74Int sejtek viabilitását. A Comp23 kezelés növeli továbbá számos Nrf2 és p53 által regulált gén, így antioxidánsok (*NRF2*, *TRX1*, *GCLC*, *HMOX1*, *NQO1*), sejtciklus-szabályozók (*TP53*, *CDKN1A*, *PCNA*, *BCL2*, *BAX*) és sejtadhéziós molekulák (*ZO1*, *CDH1*, *VCL*, *ITGB5*) expresszióját a H₂O₂ kezelt sejteken [107].

Negyedszer, a PARK7 különböző szignáltranszdukciós utak, mint a phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ Protein kinase (PK-)B útvonal, az apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) szignalizáció [108] és a mitogen-activated protein kinases (MAPK) kaszkád [109] regulálásán keresztül védi a sejtet az oxidatív stressz által indukált sejthaláltól.

Végül, a PARK7 ismeretlen mechanizmussal aktiválja a glutation metabolizmust [110], regulálja a hő sokk fehérjék (heat shock proteins, HSP) és uncoupling proteinek (UCP-4 és -5) expresszióját [111], valamint indukálja a már említett SOD3 expresszióját [105], melyek szintén a ROS redukció irányába ható folyamatok.

A PARK7 antioxidáns szerepére utal az is, hogy a PARK7 hiányos neuroblastoma sejtek érzékenyebben reagálnak a H₂O₂ és a 6-hydroxidopamin indukálta sejthalálra [112, 113]. Leírták továbbá, hogy a PARK7 jelentős szerepet játszik a HIF-1 α stabilizálásában és aktiválásában azáltal, hogy a PI3K – Akt – mammalian target of rapamycin (mTOR) útvonalat aktiválja. U2OS humán osteosarcoma stroma és NIH3T3 egér embrió fibroblast sejtvonalak alkalmazásával Vasseur és mtsai. kimutatták, hogy a PARK7 az Akt pozitív modulátoraként fontos szerepet játszik az Akt/mTOR útvonal szabályozásában, ami fenntartja a HIF-1 stabilitását. A PARK7 mutációja azt eredményezi, hogy hypoxiában csökken a különböző HIF-1 által indukált gének expressziója [106].

A PARK7 hypoxiás körülmények között a sejtek energia homeosztázisában szerepet játszó 5-adenosine monophosphate-activated protein kináz (AMPK) aktiválásán keresztül, adaptív folyamatok indukciója révén befolyásolja a metabolizmust [106].

1.2.2.2.2. A PARK7, mint antiapoptotikus molekula

A PARK7 humán renális epithel sejteken gátolja az apoptotikus útvonalakat [114-116]. HEK293 embrionális vese tubularis epithel sejtekben a PARK7 a H₂O₂ és az UV-indukált apoptózis ellen hatott a mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 1 (MEKK1) – MAP kináz kináz 4 (MKK4) – c-Jun N-terminal kináz (JNK1) – ASK1 – p38 MAPK útvonal gátlásán keresztül [117, 118]. Primer egér astrocytákon kimutatták, hogy a PARK7 hiánya deprimálja a lipopoliszacharid (LPS)-aktivált TLR4 – ASK1 – MAPK kaskádöt, ami az iNOS aktiválásán keresztül fokozott NO-termelődéshez és végül sejthalálhoz vezethet [119].

A PARK7 antiapoptotikus hatása a p53 - BCL-2-asszociált X (Bax)-kaspáz útvonal gátlásán keresztül is érvényesül. PARK7-et overexpresszáló egér neuroblastoma sejtekben a H₂O₂ kezelés hatására csökkent a Bax proapoptotikus fehérje mennyisége p53 jelenlétében. A folyamatban a p53 kulcsszerepét igazolja, hogy hiányában a PARK7-tel kezelt sejtvonalban sem történt a Bax fehérje szintjében változás a kontroll csoporthoz képest. Bax fehérje hatására felszabaduló pro-apoptotikus kaspáz-3 és -9 enzimek aktív formája a H₂O₂ kezelt, PARK7-tel transzfektált sejtekben a kontroll csoporttal ellentétben nem volt kimutatható [120].

A PARK7 a PI3K útvonalat gátló phosphatase és tensin homolog (*PTEN*) tumorszupresszor gén negatív regulátoraként a sejttúlélés irányába hat. A PARK7 csökkent expressziója a protein kináz B (PKB) foszforilációjának csökkenéséhez, míg a *PARK7* overexpresszió a PKB-Akt hiperfoszforilációhoz és sejttúléléshez vezet. Primer mellrák mintákban a *PARK7* expresszió a PTEN immunreaktivitásával negatívan, a PKB-Akt hiperfoszforilációval pedig pozitívan korrelál [121].

1.2.2.2.3. A PARK7, mint deglikáz és glioxaláz

A PARK7 cytoprotektív hatásai között meg kell említeni, hogy deglikáz enzimként már a glikáció korai fázisában védi a fehérjéket és nukleinsavakat a glikáció ellen [122, 123], így nem alakulnak ki késői glikációs termékek (Advanced glycation endproducts, AGE) [124]. Tekintettel arra, hogy az AGE-k receptorukhoz (AGE-R) való kötődése inflammatorikus folyamatokat és endothel diszfunkciót vált ki, az AGE felhalmozódása a metabolikus terhelés markereként is értékelhető, mely képet ad a szervezetet ért hyperglykaemiáról, hyperlipidaemiáról, az oxidatív stresszről és gyulladásról [125].

A PARK7 glioxaláz enzimként a metabolikus folyamatok melléktermékeként intracellulárisan keletkező toxikus glioxál és metil-glioxál ártalmatlan glikol- és tejsavvá történő átalakulását katalizálja. A glioxalázok ily módon protektív hatásúak, védik a mitokondriumokat és a substantia nigra dopaminerg neuronjait a toxikus degradációtól [126].

1.2.2.2.4. A PARK7, mint immunregulátor

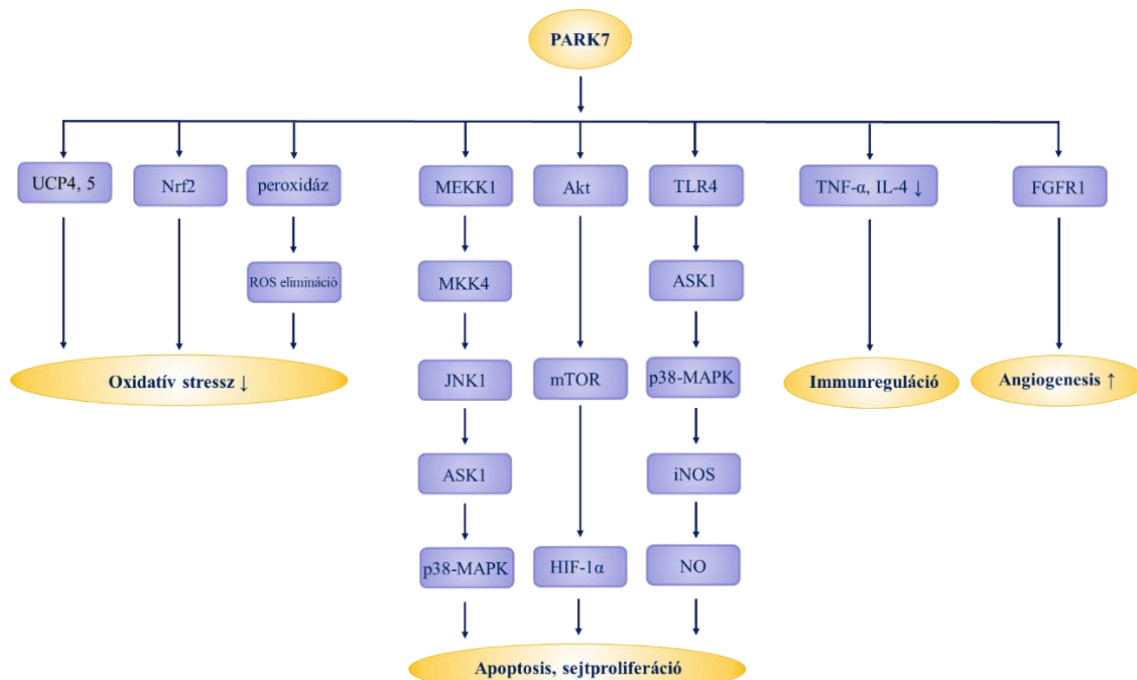
A PARK7 szerepet játszik a gyulladós folyamatok szabályozásában is. Hiányában csökken az LPS - TLR4 - ASK1 - p38/MAPK útvonal aktivitása, ami fokozott iNOS aktivitáson keresztül emelkedett proinflammatorikus NO-termelődéshez vezet. *PARK7* génkiütött sejtekben LPS hatására nő a proapoptotikus kaszpáz-3, valamint a proinflammatorikus IL-6 és a gyulladós folyamatokban résztvevő prosztaglandinok szintéziséért felelős ciklooxygenáz (COX)-2 expressziója is [119].

A *PARK7* génkiütött (knock out, KO) egerek csontvelejéből izolált hízósejtekben az antigén-indukálta proinflammatorikus TNF- α és IL-4 szintézis fokozott a WT kontroll sejtekhez viszonyítva, ami a PARK7 negatív szabályozó szerepére utal a TNF- α , valamint az IL-4 termelésében [127].

PARK7 KO egerek substantia nigrájában, valamint a *PARK7* géncsendesített microglia sejtekben az LPS által indukált IFN- γ termelés szignifikánsan magasabb [128].

A *PARK7* KO egerek szepszis indukált mortalitása szignifikánsan magasabb a WT állatokhoz képest. A *PARK7* C-terminusán keresztül kötődik a NADPH-oxidáz p47 (phox) alegységéhez, így elősegíti a macrophagok ROS termelését, ami kiemelt szerepet játszik a baktériumokkal szembeni aspecifikus védekezésben [129].

A *PARK7* főbb funkcióit a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A Parkinson's disease (PARK) 7 alapvető funkcióinak irodalmi adatokra alapozott összegzése. A *PARK7* által regulált biológiai folyamatok áttekintő összefoglalása. (Saját ábra.)

Rövidítések: Akt- protein kináz B, Ask- apoptózis szignál regulált kináz, FGFR- fibroblast growth factor receptor, HIF- hypoxia indukált faktor, IL- interleukin, iNOS- indukálható nitrogén monoxid szintáz, JNK- c-Jun N-terminal kinases, MEKK- mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz, MKK- mitogen-activated protein kinase kinase, mTOR- mammalian target of rapamycin, NO- nitrogén monoxid, *Nrf*- nuclear factor erythroid 2-related factor, p38 MAPK- p38 mitogén-aktivált protein kináz, PARK- Parkinson's disease, ROS- reaktív oxigén gyök, TLR- Toll like receptor, TNF- tumor nekrosis faktor, UCP- uncoupling protein.

1.2.2.3. A PARK7 molekula betegségekben betöltött szerepe

A PARK7-t bő 20 éve, 1997-ben onkogénként azonosították, mely malignus transzformációt indukálhat [130]. Jelenlétét kimutatták többek között pancreas-, tüdő-, oesophagus-, ovárium- és hepatikus tumorban is [131-136].

A PARK7 vonatkozásában legintenzívebben kutatott kórképek a központi idegrendszert érintik. A korábban többször említett Parkinson-kóron kívül a PARK7 szerepet játszhat az Alzheimer-kór kialakulásban is [137]. Az oxidatív folyamatokban való részvétele miatt a PARK7 fontos szerepet tölthet be iszkémiás strokeban, idegrendszeri gyulladásokban [138], túlprodukciója részt vehet az iszkémia-reperfúziós károsodás mérséklésében [139].

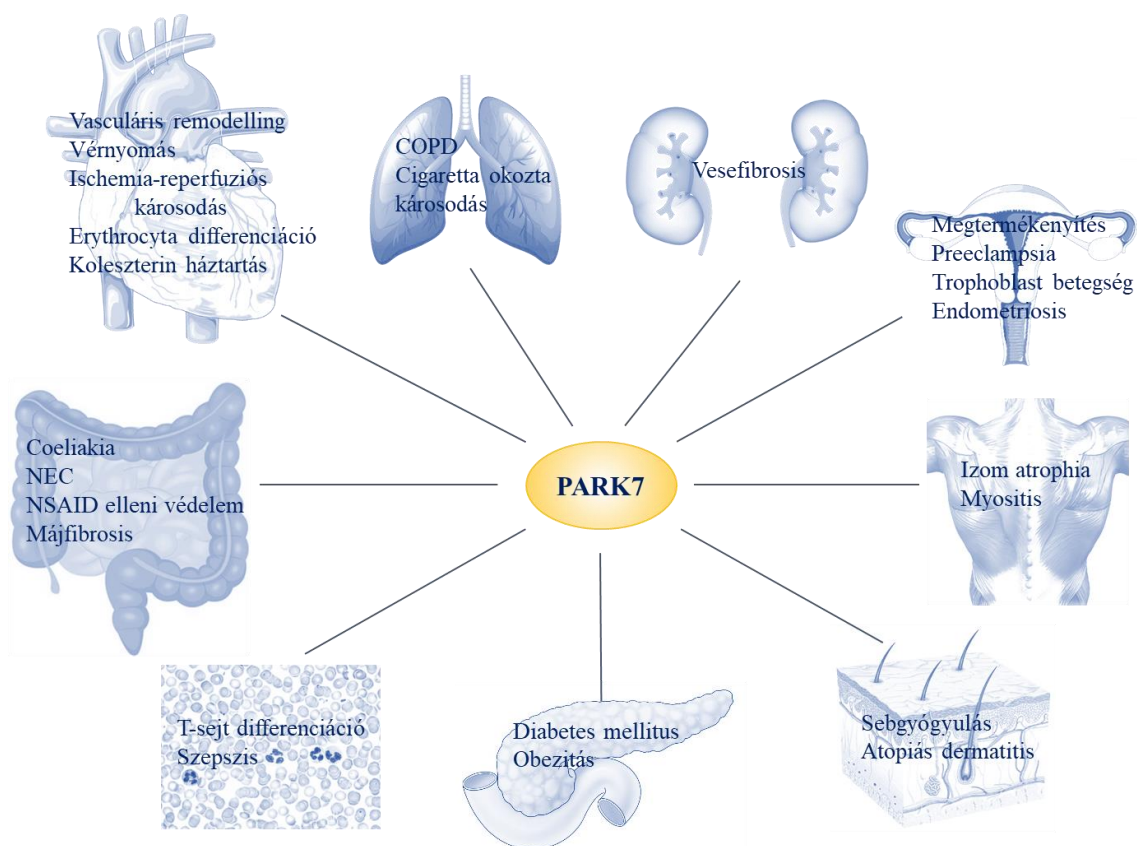
A legszélesebb körben vizsgált onkológiai és neurológiai kórképek mellett a PARK7 szerepe gyakorlatilag minden szervrendszerben, számos betegség patomechanizmusa kapcsán felmerült. A PARK7 szerepet játszhat a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) és a dohányzás okozta tüdőkárosodás patomechanizmusában [140, 141], az érrendszer szerkezeti-, a koleszterin háztartás-, a vérnyomás-, az erythrocyta-, valamint T-sejt differenciáció és a kardiális iszkémia-reperfúzió szabályozásában [142-148].

Szerepét kimutatták II-es típusú diabetes mellitusban (DM), obezitásban, vese- és májfibrózisban, szepszisben és infertilitásban (spermatogenesis) [129, 149-153]. Vizsgálták funkcióját humán normál motilitású és idiopáthiás aztenozoospermiában [154], valamint jelentőséget tulajdonítanak fokozott termelődésének preeclampsziás placentában, trophoblast betegségben és endometriosisban [155-157]. Felmerül, hogy részt vesz a sebgyógyulás, az atopiás dermatitis, myositis és izomatropia patomechanizmusában is [127, 158, 159].

A PARK7 részt vehet a nekrotizáló enterocolitis (NEC) patomechanizmusában és a NSAID ketoprofen által kiváltott intesztinális nyálkahártyasérülés elleni védelemben [160, 161]. A humán bélrendszer gyulladásos megbetegedéseivel kapcsolatban a PARK7-ről rendkívül kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Kutatócsoportunk korábbi, jelen dolgozat alapját is képező vizsgálatai mutatták ki először a PARK7 jelenlétét a humán vékonybélben. Eredményeink alapján a PARK7 expressziója coeliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában magasabb a kontroll csoporténál [162], és a PARK7

agonista Comp23 kezelés csökkenti az oxidatív stressz indukált nyálkahártya sérülést [107]. Az IBD-ben betöltött szerepét eddig két kutatócsoport vizsgálta. Di Narzo A. F. és mtsai. felnőtt IBD-s betegek plazma proteom vizsgálatára alapján a PARK7 alacsonyabb szintet mutatott CD-ben, mint UC-ben [163]; Zhang J. és mtsai. szintén felnőtt IBD-s betegek colon paraffinba ágyazott metszeteinek immunpozitivitását vizsgálták, eredményeik alapján mind CD-ben, mind UC-ben csökkent a PARK7 fehérje mennyisége a kontrollhoz viszonyítva [164]. A PARK7 mennyiségi változásait és szerepét gyermekkori, terápia naív IBD-ben azonban még nem vizsgálták.

A PARK7 kapcsán felmerülő betegségeket az 4. ábra foglalja össze.



4. ábra: A Parkinson's disease (PARK)7 molekula nem-daganatos és nem-neurológiai kórképekben. (Saját ábra.)

Rövidítések: COPD-krónikus obstruktív tüdőbetegség, NEC- necrotizáló enterocolitis, NSAID-non-szteroid gyulladáscsökkentő, PARK – Parkinson's disease.

1.2.2.4. A PARK7-hez köthető terápiás lehetőségek

A PARK7 fehérje 13 aminosav hosszúságú szakasza az ND-13, mintegy “antioxidáns PARK7 agonistaként” működő peptid. Az NSC-34 motoneuron-szerű sejtvonalon az ND-13 protektívnek bizonyult a neurotoxikus ágensekkel szemben [165]. Az ND-13 megvédte a sejteket 3-nitropropionsav (3-NP)-indukált oxidatív stressz ellen, a 3-NP-idukált multiplex szisztémás atrophia egérmodelljében az ND-13 átjutott a vér-agy gáton, csökkentette a nigrostriatalis degenerációt és növelte a rágcslók aktivitását [166]. *In vitro* az ND-13 csökkentette a ROS akkumulációt, aktiválta a protektív *Nrf2* rendszert és növelte a sejttúlélést. 6-hidroxidopamin-indukálta Parkinson-kór egérmodelljében *in vivo* szignifikáns mértékben javította a dopaminerg rendszer funkcióját, és mind a WT, mind a *PARK7 KO* egerek viselkedését javította, továbbá az 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine által indukált Parkinson-kór állatmodelljében is helyreállította a dopamin szintet [165]. Központi idegrendszeri iszkémiát követően WT egerekben az ND-13 kezelés jelentősen javította a motoros funkciókat, így az egyensúlyt és a koordinációt is, valamint csökkentette a mozgások asszimetriáját. A *PARK7 KO* egerek érzékenyebbek voltak az endothelin-1 indukálta iszkémiás sérülésre, ND-13 kezelés hatására ebben a modellben is nagymértékben javultak a motoros funkciók [167].

A PARK7-hez kötődő Comp23 a Parkinson-kór állatmodelljében megakadályozta az oxidatív stressz által kiváltott dopaminerg neuronális sejthalált és helyreállította a motoros diszfunkciót, valamint agyi iszkémia patkánymodelljében szignifikánsan csökkentette az agyi infarktus méretét. A Comp23 neuroprotektív hatásai elvesznek *PARK7 KO* sejtekben és egerekben egyaránt, ami arra utal, hogy a Comp23 az endogén PARK7-el kölcsönhatásba lépve fejti ki antioxidáns és neuroprotektív hatásait mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* [168, 169].

Mind az ND-13-al, mind pedig a Comp23-al végzett kísérletek arra utalnak, hogy a PARK7 potenciális terápiás célpont lehet multiplex szisztémás atrophia, strokeban és Parkinson-kórban egyaránt.

2. Célkitűzések

A fenti irodalmi adatok és korábbi vizsgálataink [162] [107] alapján jelen munkánk során célunk a PARK7 molekula terápia naív, gyermekkori gyulladásoos bélbetegség patomechanizmusában betöltött szerepének vizsgálata volt.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Expresszálódik-e a PARK7 a humán vékony- és vastagbélben, valamint az egér colonban?
2. Van-e különbség a kontroll, valamint coeliákias gyermekek vékonybelének *PARK7* expressziója között? Befolyásolja-e a GFD a *PARK7* expresszióját?
Van-e különbség a kontroll, valamint a terápia naív IBD-s gyermekek colon *PARK7* expressziója között?
3. Milyen hatással vannak az IBD patomechanizmusának ismert kulcsmolekulái a *PARK7* expressziójára?
4. Milyen hatással van a PARK7 az IBD patomechanizmusának ismert kulcsmolekuláinak expressziójára?
5. Lehet-e terápiás target molekula a PARK7 IBD-ben?

3. Betegek és módszerek

3.1. IBD-s beteganyag és kontroll csoportja

Az IBD-s betegeket a Portói kritériumok [170, 171] alapján diagnosztizáltuk, a betegség aktivitást a PCDAI és PUCAI segítségével számítottuk [172, 173]. 45 frissen diagnosztizált IBD-s gyermeket (összesen 19 fiú, 26 lány; medián életkor: 12,8 év, range: 1-18 év; CD n=27 (15 PCR-hez, 19 WB-hoz), UC n=18 (10 PCR-hez, 7 WB-hoz) és 19 kontroll gyermeket (7 fiú, 12 lány; medián életkor: 6,24 év, range: 1-16 év; 10 PCR-hez, 10 WB-hoz) vontunk be vizsgálatainkba (3. táblázat). A colon biopszia mintákat az IBD-s gyermekek makroszkóposan ép (CD ép) és kóros (CD gyulladt) nyálkahártyájából vettük. A kontroll gyermekeknek krónikus hasi fájdalom, diarrhoea vagy polyposis gyanúja miatt végeztünk endoszkópos vizsgálatot, az ő colon biopsziás mintáik ép makroszkópos és hisztológiai képet mutattak. A biopszia mintákat rögtön lefagyasztottuk és a további feldolgozásig -80°C-on tároltuk. A beavatkozás előtt minden vizsgálatba bevett gyermek szülei írásos beleegyezést adtak. A vizsgálatot jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB 58/2013), és a Helsinki Nyilatkozattal összhangban végeztük.

3. táblázat. A vizsgált kontroll és gyulladásoos bélbeteg (IBD) gyermekek klinikai karakterizálása. * $p < 0,05$ vs. Kontroll. **Aktivitási pontszám: Paediatric Crohn's Disease /Ulcerative Colitis Activity Index (PCDAI/PUCAI).

Rövidítések: BMI- testtömeg index; CD- Crohn-betegség, CRP- C-reactive protein, RT-PCR- valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció, UC- colitis ulcerosa, WB- Western blot.

	Kontroll	CD	UC
Esetszám (RT-PCR, WB)	19 (10, 10)	27 (15, 19)	18 (10, 7)
Életkor, medián (range), év	6,24 (1-16)	13,59 (2-18)*	11,61 (1-18)*
Nem (fiúk/lányok)	7/12	11/16	8/10
BMI z-score, medián (range)	-0,25 (-3,47-2,67)	-2,04 (-5,79-0,61)*	-0,39 (-2,84-1,36)
Aktivitási pontszám**, medián (range)	-	23,8 (5-50)*	38,06 (15-60)*
Vas (umol/l), medián (range)	15,76 (8-32)	4,73 (1-20)*	8,11 (1-22)*
Albumin (g/l), medián (range)	46,55 (37-68)	37,72 (26-46)*	40,94 (18-48)*
Trombocyt (Giga/L), medián (range)	369,21 (210-530)	499,38 (151-837)*	461,83 (158-656)
CRP (mg/l), medián (range)	0,96 (0-5)	31,23 (1-134,6)*	5,76 (0-31)*

3.2. Coeliakiás beteganyag és kontroll csoportja

A coeliakia diagnózisát az ESPGHAN diagnosztikai kritériumok alapján állítottuk fel [174]. Minden frissen diagnosztizált coeliakiás gyermeknek villosus boholyatrophiája és emelkedett anti-transzglutamináz antitest szintje volt.

19 frissen diagnosztizált coeliakiás gyermeket (összesen 6 fiú, 13 lány; medián életkor: 8 év, range: 2-15 év) vontunk be vizsgálatainkba. 16 gyermeknek csak a diagnózis felállításakor, 3 továbbinál pedig a GFD bevezetése előtt és után (medián: 1,5 év, range: 0,5-2,5 év) is történt endoscopos mintavétel. A coeliakia definitív terápiája a GFD bevezetése, amivel teljes klinikai és szövettani remissziót lehet elérni. Ebben a populációban nem indokolt az endoscopia és a mintavétel, tőlük valamilyen frissen megjelenő gasztrointesztinális tünetre való tekintettel vettünk biopsziát 0,5-1,5 év GFD után. Összesen 5 (2 fiú, 3 lány; átlag életkor: 10 év, range: 5-16 év) gyermek tartozott ebbe a csoportba. A kontroll gyermekeknek krónikus hasi fájdalom, diarrhoea vagy növekedési retardáció miatt végeztünk endoszkópos vizsgálatot, az ő duodenum biopsziás mintáik ép makroszkópos és hisztológiai képet mutattak. Összesen 10 kontroll gyermeket

(7 fiú, 3 lány; medián életkor: 5,25 év, range: 0,33-14 év) vontunk be a vizsgálatainkba (4. táblázat). A vizsgált gyermekek egyik csoportjában sem volt szignifikáns nemi, vagy életkorbeli eltérés. A biopsziás mintákat rögtön lefagyasztottuk, és további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. Minden gyermek szülei aláírták a hozzájáruló nyilatkozatot, és a vizsgálatot jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKÉB 124/2009), és a Helsinki Nyilatkozattal összhangban végeztük.

4. táblázat. A vizsgált kontroll, frissen diagnosztizált coeliakiás és gluténmentes diétát tartó (GFD) coeliakiás gyermekek klinikai karakterizálása.

	Frissen diagnosztizált		
	Kontroll	coeliákia	GFD
Esetszám	10	19	5
Életkor (év), medián (range)	5,25 (0,33-14)	8 (2-15)	10 (5-16)
Nem (fiúk/lányok)	7/3	6/13	2/3
Villosus atrophia: Nincs/subtotalis/totalis	10/0/0	0/19/0	5/0/0
GFD időtartama (év), medián (range)	0	0	1,5 (0,5-2,5)

3.3. DSS-indukálta colitises egérmodell, Comp23 kezelés és etikai megfontolások

A kísérleteket 7-8 hetes hím vad típusú (WT) C57Bl/6J (Charles River Laboratórium, Sulzfeld, Németország) és a Professor Yoichiro Iwakurától (Tokyo University of Science, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokió, Japán) kapott *IL-17* génkiütött (*IL17*^{-/-}) egereken végeztük. Az állatokat állandó hőmérsékletű (22 ± 1°C) szobákban standard körülmények között tartottuk, a 12 óránként ciklikusan váltakozó világos és sötét periódusok mellett folyamatosan elérhető rágcsálótápot és vizet biztosítottunk számukra.

Kísérleteink elvégzéséhez a WT és *IL17*^{-/-} egereket randomizált módon 4-4 csoportra osztottuk (WT0, WT3, WT5, WT7 és *IL17*^{-/-}0, *IL17*^{-/-}3, *IL17*^{-/-}5, *IL17*^{-/-}7) (n=6/csoport). A kontroll csoportok (WT0, *IL17*^{-/-}0) tiszta ivóvizet kaptak, a dextrán nátrium szulfát (DSS)-kezelt csoportok 2,5% (w/v) DSS (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA) -tartalmú vizet ihattak a kísérlet 3. (WT3, *IL17*^{-/-}3), 5. (WT5, *IL17*^{-/-}5)

vagy 7. (WT7, *IL17-/-*7) napon történő terminálásáig. A bélmintákat általános isoflurán inhaláció indukált anesztézia alatt gyűjtöttük (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, UK). A mintákat azonnal lefagyasztottuk és a további feldolgozásig -80°C-on tároltuk.

A PARK7 DSS-indukálta colitises egérmodellben betöltött szerepének vizsgálata érdekében 10 napig intraperitonealisan (ip) kezeltük a WT egereket 10mg/ttkg/nap dózissal, 80% dimetil-szulfoxid (DMSO) – 20% fiziológiás sóoldat keverékbe oldott PARK7-kötő compound agonistával, 3,4,5-trimethoxy-N-(4-(8-methylimidazo(1,2-a)pyridin-2-yl)phenyl)benzamiddal, Comp23-al (Enamine, Riga, Latvia), ami a 106-os cisztein oxidációjának gátlásán keresztül növeli a PARK7 aktivitását [169].

Ehhez a kísérlethez a WT egereket 4 csoportba randomizáltuk (Kontroll, Comp23, DSS, DSS+Comp23) (n=6/csoport). A kontroll csoportokat (Kontroll, Comp23) tiszta vízzel itattuk, és ip. oldószerrel (Kontroll) vagy Comp23-mal (Comp23) kezeltük. A DSS-indukált colitises csoportokat a fent említett módon kezeltük DSS-el és injektáltuk ip. oldószerrel (DSS) vagy Comp23-mal (DSS+Comp23). A 7 nap DSS-kezelést követően minden csoport tiszta ivóvizet kapott. A betegség aktivitást 10 napig rögzítettük. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz végzett modellt a 7. napon termináltuk, colon biopsziás mintákat gyűjtöttünk, melyeket fagyasztva további feldolgozásig -80°C-on tároltuk (5. táblázat).

Az összes állatkísérletet jóváhagyta a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (PEI/001/82-4/2013). Valamennyi módszert a vonatkozó előírásoknak és az ARRIVE irányelveknek megfelelően végeztük.

5. táblázat. A Comp23 hatás vizsgálatának kísérleti felállása vad típusú (WT) egerek dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitisben. A kísérlet során a WT egerek 10 napig tiszta vizet (Kontroll és Comp23 csoport) vagy 7 napig 2,5% DSS-es vizet kaptak, azt követően pedig 3 napig tiszta vizet ittak (DSS és DSS+Comp23 csoport). Az állatokat naponta intraperitonealisan Comp23-al (Comp23 és DSS+Comp23 csoport) vagy vehikulummal (Kontroll és DSS csoport) kezeltük. A testsúly változását és betegség aktivitási indexet (DAI) a teljes kísérlet alatt monitorizáltuk. A kísérletsort a 7. vagy 10. napon termináltuk. A lépsúlyt a 7. és 10. napon terminált kísérleti felállásban is megmértük. A molekuláris biológiai méréseket a 7. napon terminált kísérleti mintákból végeztük.

Napok		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Kezelések	DSS		■										
	Comp23	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑		
Mérések	Testsúly, DAI	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	
	Lép súly								◆			◆	
	Histológia, molekuláris biológia								◆				

3.4. A betegség aktivitási index (DAI) számítása

A DAI-t irodalmi példa alapján kalkuláltuk [175]. A colitis klinikai tüneteit, így a széket konzisztenciáját és vér tartalmát pontoztuk 0-3 skálán, valamint egy 0-2 skálán meghatároztuk az állatok általános állapotát 10 napon keresztül (6. táblázat). Az említett három kategória pontszámainak összegeként kaptuk meg a DAI értéket. A testsúly változását minden nap azonos időpontban, digitális mérleg segítségével monitorizáltuk.

6. táblázat. Az állatok betegség aktivitási indexének (DAI) számítása a széklet konzisztencia, a széklet vér és az általános állapot skála alapján.

Score	Széklet konzisztencia	Széklet vér	Általános állapot
0	Normál	Normál, nincs vér	Normál
1	Lazább	Kevés vér	Rossz
2	Enyhén formált	Perianalis vérzés	Haldoklik
3	Teljesen folyékony	Folyó vérzés	-

3.5. Immunfluoreszcens festés

A PARK7 szöveti elhelyezkedését immunfluoreszcens festési eljárással mutattuk ki. A fagyasztott duodenum és colon biopsziás mintákat Shandon cryomatrixba (ThermoElectron Co., Madison, WI, USA) ágyasztuk és 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Felhasználásig -80 °C-ra hűtöttük őket tárolás céljából. Ezt követően PARK7 specifikus antitesttel (nyúl polyclonalis IgG, 1:200 hígítás, szobahőmérséklet, 1 óra, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) inkubáltunk. A PBS-es mosások után Alexa Fluor 488-al vagy Alexa Fluor 568-al konjugált szekunder antitest (csirke anti-nyúl IgG, 1:200 és 1:1000 hígítás, szobahőmérséklet, 30 perc, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) inkubáció következett sötétben. A DNS kimutatására (magfestés) Hoechst 33342 festékkel (1:2000 hígítás, szobahőmérséklet, 10 perc, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) inkubáltunk sötétben. Újabb mosást követően a metszeteket Vectashield médiummal fixáltuk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) és fedőlemezzel fedtük. A specificitás ellenőrzésének és az autofluoreszcencia kiküszöbölésének céljából kizárólag szekunder ellenanyaggal is inkubáltunk kontrollnak használt metszeteket. A szövetek festődését Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Nikon, Minato, Tokió, Japán) vizsgáltuk.

3.6. Immuncytológiai festés

A sejteket kamrákba seedeltük, és 24 órán keresztül 37°C-on tenyésztettük. Eltávolítottuk a médiumot, PBS-es mosást követően permeabilizáltunk Cytotfix/Cytoperm oldattal (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 15 percen keresztül, majd ismételt mosást követően 5% BSA-PBS-el blokkoltuk a sejteket 1 órán át. Újabb PBS-es mosást követően PARK7 (nyúl polyclonalis IgG, 1:200 hígítás, AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság) vagy IL-17R (nyúl polyclonalis IgG, 1:200 hígítás, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) primer antitesttel inkubáltunk 1 órán keresztül. WashPerm solution-el végzett ismételt mosást követően Alexa Fluor 488-al vagy Alexa Fluor 568-al konjugált szekunder antitest (csirke anti-nyúl IgG, 1:200 hígítás, szobahőmérséklet, 30 perc, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) inkubáció következett sötétben. A DNS kimutatására (magfestés) Hoechst 33342 festékkel (1:2000 hígítás, szobahőmérséklet, 10 perc, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) inkubáltunk sötétben. Újabb mosást követően a sejteket Vectashield médiummal fixáltuk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) és fedőlemezzel fedtük. A specificitás ellenőrzésének és az autofluoreszcencia kiküszöbölésének céljából kizárólag szekunder ellenanyaggal is inkubáltunk kontrollnak használt sejteket. A sejtek festődését Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Nikon, Minato, Tokió, Japán) vizsgáltuk.

3.7. Hisztológia

A paraformaldehid (4%, pH 7,4) fixált colon biopsziás minták paraffinos metszeteit hematoxylin-eozinnal (HE-festés) vagy perjódsvav-Schiff (PAS-festés) módszerrel festettük. A képek Olympus IX81 mikroszkóppal készültek (Olympus Corporation, Tokió, Japán). A colitis szövettani jeleit, mint a sejtgazdag subepithelialis regeneratív gócot (granulációs szövetet) (1), a mucosalis neutrophil infiltrációt (2), az epithel réteg alatti oedémát (3), az eróziót (4) és a hámsejtek vakuolizációját (5) egy 0-tól 6-ig terjedő skálán „vakon” dolgozó patológus határozta meg. A fent említett öt kategória számértékeinek összege adta a végső hisztológiai score értéket.

3.8. HT-29 colon epithel sejtek és kezeléseik

A HT-29 colon epithel sejtvonalat (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; European Collection of Cell Cultures) módosított McCoy's 5A médiumban (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett. A médiumot L-glutaminnal, 10% hő-inaktivált magzati borjú szérummal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) szupplementáltuk.

A sejteket seedeltük 6 well-platere körülbelül 80% konzisztenciát adó 5×10^5 sejt/well denzitással 0% FBS mellett, majd 24 óra múlva kezeltük (n=6/csoport) 100 ng/ml rekombináns humán IL-17-tel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 20 µM H₂O₂-al (Reanal, Budapest, Magyarország), 10 ng/ml TNF-α-val (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1 nM TGF-β-val (Life Technologies, Carlsbad, USA), vagy 100 ng/ml *Escherichia coli* eredetű LPS-el (Sigma-Aldrich). A kezelések időtartama 24 óra volt 37°C-on. A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük (TGF-β esetén 4 mM HCl, IL-17, H₂O₂, TNF-α és LPS esetén pedig steril PBS).

Annak vizsgálata érdekében, hogy az IL-17 a NADPH-oxidázon keresztül hat-e a PARK7 expresszióra, 30 percig előkezeltük a sejteket a DMSO-ban oldott NAD(P)H-oxidáz gátló diphenilén-jodonium chloriddal (DPI; 5 µM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Az előkezelést követően a sejteket a fent leírt módon kezeltük IL-17-tel (100 ng/ml, 24h).

3.9. HT-29 colon epithel sejtek *PARK7* géncsendesítése RNS-interferencia segítségével és IL-17 kezelésével

Exponenciálisan növekvő sejteket tenyésztettünk 6 well-plateken (5×10^5 sejt/well, n=6/csoport) 24 óráig 37°C-on, majd médiumot cseréltük 0%-os FBS tartalmú, Opti-MEM I reduced-serum médiummal (92,5 µl/ml, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), ami *PARK7* specifikus small interfering (si) RNS-t (30 nM, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és Lipofectamin RNAiMax Transfection Reagent (2,5 µl/ml, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tartalmazott. A *PARK7*

siRNS kódoló szekvenciája GGUUUUGGAAGUAAAGUUAtt. Negatív kontrollként a sejteket egy nem-kódoló, short scrambled (sc)RNS-sel (30 nM, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kezeltük, ami a célszerkezet egyik génjével sem komplementer. A sejteket ebben a transzfektáló reagensben 24 óráig inkubáltuk. Az egyik kísérleti felállás során a transzfekció után a sejteket 100ng/ml IL-17-tel, a kontroll csoportot oldószerrel (4 mM HCl) kezeltük 24 órán keresztül.

3.10. RNS izolálás és valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A biopsziák és a HT-29 colon epithel sejtek teljes RNS tartalmát a gyártó előírása alapján a Geneaid Total RNA Mini Kittel (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei, Taiwan) izoláltuk. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét a DeNovix DS-11 spectrophotometerrel (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) mértük. 1µg RNS-t reverz transzkripció (RT) során komplementer DNS-sé (cDNS) konvertáltunk 20µl reakció végtérfogatban, 200U SuperScript IIITM reverz transzkriptáz, 40U RNaseOUTTM inhibitor és 0,5µg oligo dT₁₂₋₁₈ primer jelenlétében Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével.

Az mRNA expressziókat fluoreszcens rezonancia energia transzfer (FRET) alapú valós idejű (real time) PCR-rel határoztuk meg a LightCycler480 rendszerrel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A 20µl végtérfogatú reakcióelegy 10pmol/µl specifikus sense- és antisense PCR primert (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10µl LightCycler 480 SYBR Green I Master enzim mixet (Roche Diagnostics) és 1µl cDNS mintát tartalmazott. A kezdeti 5 perces 95°C-on végzett denaturáció után a cDNS templátokat 60 cikluson keresztül amplifikáltuk. A denaturáció – anelláció – extenzió ciklus primerenként eltérő, a specifikus primer szekvenciákat, valamint a termékhozzsokot és anellációs hőmérsékleteket a 7. táblázat tartalmazza. Minden mérés egyetlen fluoreszcens detekciós pontot tartalmazott az extenziós fázis végén. A PCR-termékek várható hosszát gélelektroforézissel (2% agaróz gél, Bioline, London, Egyesült Királyság) monitorizáltuk. Az eredményeket a Light-Cycler 480 software 1.5.0.39 verziója (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével elemeztük, és

glyceraldehyd 3-foszfát dehydrogenáz (*GAPDH*)-ra, ribosomális protein lateral stalk subunit P0 (*RPLP0*)-ra, vagy *Rn18S*-re, mint háztartási génekre, $\Delta\Delta\text{Ct}$ módszert alkalmazva normalizáltuk.

7. táblázat. A real time (RT)-polimeráz láncreakcióban (PCR) alkalmazott primer párok nukleotid szekvenciája, a keletkező termékek hossza és az anellációs hőmérsékletek.

Rövidítések: bp-bázispár, *GAPDH*- glyceraldehyd 3-phosphát dehydrogenáz, h- humán, *IL*- interleukin, m- mouse (egér), *PARK*- Parkinson's disease, *RPLP0*- ribosomális protein lateral stalk subunit P0, Ta- anellációs hőmérséklet, *TGF*- tumor növekedési faktor, *TNF*- tumor nekrozis faktor.

Gén	Primer párok	Termékhossz	T _a
<i>hPARK7</i>	Forward: 5'-AGT ACA GTG TAG CCG TGA-3' Reverse: 5'-TAA TCT GGG CGC ACA GAA TT-3'	116 bp	60°C
<i>hTNF-α</i>	Forward: 5'- GAG GCG CTC CCC AAG AAG ACA-3' Reverse: 5'- TGG GCC AGA GGG CTG ATT AGA-3'	182 bp	60°C
<i>hTGF-β1</i>	Forward: 5'-GCG TGC GG CAG CTG TAC ATT GAC T-3' Reverse: 5'-CGA GGC GCC CGG GTT ATG C-3'	174 bp	60°C
<i>hIL-1β</i>	Forward: 5'-CAC GCT CCG GGA CTC ACA G -3' Reverse: 5'-GCC CAA GGC CAC AGG TAT TTT -3'	160 bp	56°C
<i>hIL-6</i>	Forward: 5'- AAA GAT GGC TGA AAA AGA TGG AT -3' Reverse: 5'- CTC TGG CTT GTT CCT CAC TAC TCT -3'	146 bp	60°C
<i>hIL-10</i>	Forward: 5'-ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC-3' Reverse: 5'-AGA AAT CGA TGA CAG CGC CGT AGC-3'	107 bp	60°C
<i>hGAPDH</i>	Forward: 5'-CAC CAC CAT GGA GAA GGC TG-3' Reverse: 5'-GTG ATG GCATGG ACT GTG-3'	240 bp	60°C
<i>hRPLP0</i>	Forward: 5'- GAG GCT GCC AAC CGG AAC AAT GAC -3' Reverse: 5'- TCC TGC AGG CGG CCA ATA GTG TCT -3'	206 bp	60°C
<i>mPARK7</i>	Forward: 5'-TTT ATC TGA GTC GCC TAT GGT G-3' Reverse: 5'-TTT GGA TGC AAG GTC ACA AC-3'	132 bp	60°C
<i>mTNF-α</i>	Forward: 5'-GGG CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA-3' Reverse: 5'- GAG AGG GAG GCC ATT TGG GAA CTT-3'	83 bp	56°C
<i>mTGF-β1</i>	Forward: 5'-GTG CGG CAG CTG TAC ATT GAC TTT-3' Reverse: 5'-GGC TTG CGA CCC ACG TAG TAG AC-3'	239 bp	59°C
<i>mIL-1β</i>	Forward: 5'-GCC ACC TTT TGA CAG TGA TGA GAA-3'	136 bp	55°C

Reverse: 5'-GAT GTG CTG CTG CGA GAT TTG A-3'

<i>mIL-6</i>	Forward: 5'-AAC CAC GGC CTT CCC TAC TTC A-3' Reverse: 5'-TGC CAT TGC ACA ACT CTT TTC TCA-3'	155 bp	55°C
<i>mIL-10</i>	Forward: 5'-CAA AGG ACC AGC TGG ACA ACA TAC-3' Reverse: 5'-GCC TGG GGC ATC ACT TCT ACC-3'	124 bp	54°C
<i>mIL-17</i>	Forward: 5'-AGG ACT TCC TCC AGA ATG T-3' Reverse: 5'-CCG CAA TGA AGA CCC TGA-3'	136 bp	60°C
<i>mRn18s</i>	Forward: 5'-AGC GGT CGG CGT CCC CCA ACT TCT-3' Reverse: 5'-GCG CGT GCA GCC CCG GAC ATC TA-3'	107 bp	60°C
<i>mGAPDH</i>	Forward: 5'- ATC TGA CGT GCC GCC TGG AGA AAC -3' Reverse: 5'- CCC GGC ATC GAA GGT GGA AGA GT -3'	164 bp	60°C

3.11. Fehérje izolálás és Western blot

A vizsgált humán és egér colon biopsziás, valamint sejtes mintákat 50mM HEPES, 150mM NaCl, 1% Triton-X-100, 5mM EDTA, 5mM glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), 20mM nátrium-pirofoszfát, 20mM nátrium-fluorid (NaF), 0,2mg/ml fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 10µg/ml leupeptin és 10µg/ml aprotinin (pH 7,4) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tartalmú lízis pufferben homogenizáltuk (FastPrep FP120 homogenizátor, Qbiogene Inc, Cedex, Franciaország). A homogenizált mintákat centrifugáltuk (10000g, 5 perc, 4°C).

A felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States) segítségével határoztuk meg. A fehérje mintákat denaturáltuk (95°C, 5 perc), majd 20µg/minta mennyiségeket 4-20%-os grádiensű nátrium-dodecil-szulfát (SDS) tartalmú poliakrilamid gélben elektroforetizáltuk 120 V feszültség mellett (~40mA) 60 percig (Penguin™ Dual-Gel Water Cooled Systems, Owl, NH, USA). Markerként ismert molekulásúlyú fehérjék keverékét használtuk (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). Ezt követően az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blottoltuk át a szeparált fehérjéket.

Az aspecifikus kötőhelyek és kölcsönhatások gátlásához 1 órán át 5% zsírszegény tejpport tartalmazó 1x-es PBS pufferben, óvatos rázás mellett inkubáltuk a

blotmembránokat, majd primer jelölést végeztünk PARK7 specifikus antitesttel (nyúl polyclonalis IgG, 1:300 hígítás, szobahőmérséklet, teljes éjszaka, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság). Az ismételt mosást követően peroxidáz-konjugált szekunder antitesttel (kecske anti-nyúl IgG, 1:2000 hígítás, szobahőmérséklet, 30 perc, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) inkubáltuk a membránokat. Az újabb mosási lépésekkel eltávolítottuk a feleslegben jelen lévő, nem bekötődött másodlagos ellenanyagokat. Kontrollként a β -actin carboxy (C-11)-terminálisához (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) vagy GAPDH-hoz (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) kötődő nyúl polyclonalis IgG antitestet használtunk 1:2000 hígításban, végül ezekre vagy teljes loadolt fehérje mennyiségre normalizáltunk ^[176].

Az immunreaktív sávokat a kemilumineszcens Western-blot-detektálási protokoll (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) segítségével detektáltuk, az így kapott képeket VersaDoc 5000MP rendszerrel (Bio-Rad) vizualizáltuk, majd a Quantity One v4.6.9 (Bio-Rad) és az ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) szoftverek alkalmazásával analizáltuk. Végül az eredményeket relatív optikai denzitásként fejeztük ki.

3.12. Enzyme-linked immunosorbent assay / enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat (ELISA)

A PARK7 specifikus géncsendesítést követően IL-17-ei (100ng/ml, 24 óra) kezelt HT-29 sejtek lizátumából mért TNF- α ELISA-analízisét a Human TNF-alpha DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével végeztük a gyártó előírásának megfelelően. A welleket 100 μ l capture antitesttel (4ug/ml) coatoltuk és egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Minden wellt mosó pufferrel mostunk (a gyártó protokollja alapján 0,05% Tween20 PBS-ben oldva), majd a non-specifikus kötőhelyek gátlása érdekében blokkoltuk a welleket 1% BSA-s PBS-t tartalmazó reagens diluenssel. Ezt követően, a fehérje hígítási sornak megfelelő, 100ul mennyiségű mintával inkubáltunk 3 órán keresztül. Először a biotin-konjugált antitestet (50ng/ml), majd az avidin-konjugált HRP-t adtuk hozzá a wellekhez, amit 20 percig inkubáltunk. A lépések között mosási lépéseket végeztünk. Ezt követően 3,3',5,5'-tetramethylbenzidint (TMB,

Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) pipettáztunk minden wellhez, és 20 percig sötétben inkubáltunk. Az enzim-szubsztrát reakciót kénsav (H₂SO₄) oldat hozzáadásával állítottuk le, és a színreakciót spektrofotométerrel mértük 450nm-es és korrekcióként 570nm-es hullámhosszon Hidex Chameleon Microplate Reader (Triathler, Plate Chameleon, 300SL Lablogic Systems, Inc., Brandon, FL, USA) és MikroWin 2000 software segítségével. A TNF- α koncentrációt a standard kalibrációs görbe alapján számítottuk ki.

3.13. Áramlási cytometria / Flow cytometry (FACS)

Az IL-17 (100ng/ml, 24 óra), H₂O₂ (20 μ M, 24 óra), TNF- α (10ng/ml, 24 óra) vagy TGF- β (1nM, 24 óra) kezelt HT-29 sejteket lecentrifugáltuk (2000g, szobahőmérséklet, 5 perc), PBS-el mostuk, majd 10 percig inkubáltuk FACS Permeabilizing Solution 2-ben (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). A permeabilizált sejteket PBS-el mostuk, és PARK7 specifikus primer (nyúl anti-humán polyclonalis IgG, 1:25 hígítás, szobahőmérséklet, 30 perc, AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság) antitesttel inkubáltuk. A sejteket ezután is mostuk FACS Permeabilizing Solution 2-vel, majd Alexa Fluor 488 szekunder antitesttel (csirke anti-nyúl IgG, 1:50 hígítás, szobahőmérséklet, 30 perc, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubáltuk sötétben. A negatív kontrollt csak szekunder antitesttel jelöltük. Ezután ismét FACS Permeabilizing Solution 2-vel mostuk, centrifugáltunk (800g, szobahőmérséklet, 7 perc), majd PBS-ben reszuszpendáltuk a sejteket. Az analízist a BD FACSAriaTM cytometerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. Az élő sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoltuk be. 10,000 sejtet számoltunk le minden kezelési csoportból, az eredményeket pedig a BD FACSDiva Software (Becton Dickson Co., San Jose, CA, USA) segítségével elemeztük.

3.14. Statisztikai analízis

Az adatokat a GraphPad Prism 5.0. software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével analizáltuk. Az adatsorok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével határoztuk meg. Normál eloszlás esetén a csoportok közötti különbséget két csoport esetén 2-mintás párosítatlan t-teszttel, kettőnél több csoport esetén one-way ANOVA teszt segítségével határoztuk meg. Amennyiben a normál eloszlás feltétele nem teljesült, két csoport esetén Mann-Whitney-, több csoport esetén Kruskal-Wallis tesztet használtunk. A WT és KO genotípusú egerek adatainak többszörös összehasonlítását two-way ANOVA és multiple-t-teszt segítségével végeztük. Szignifikáns eltérést a $p < 0,05$ valószínűség esetén # szimbólummal jelöltük. A szemléltető grafikonokon átlag+standard error of mean (SEM) látható az egyedi mérések feltüntetése mellett.

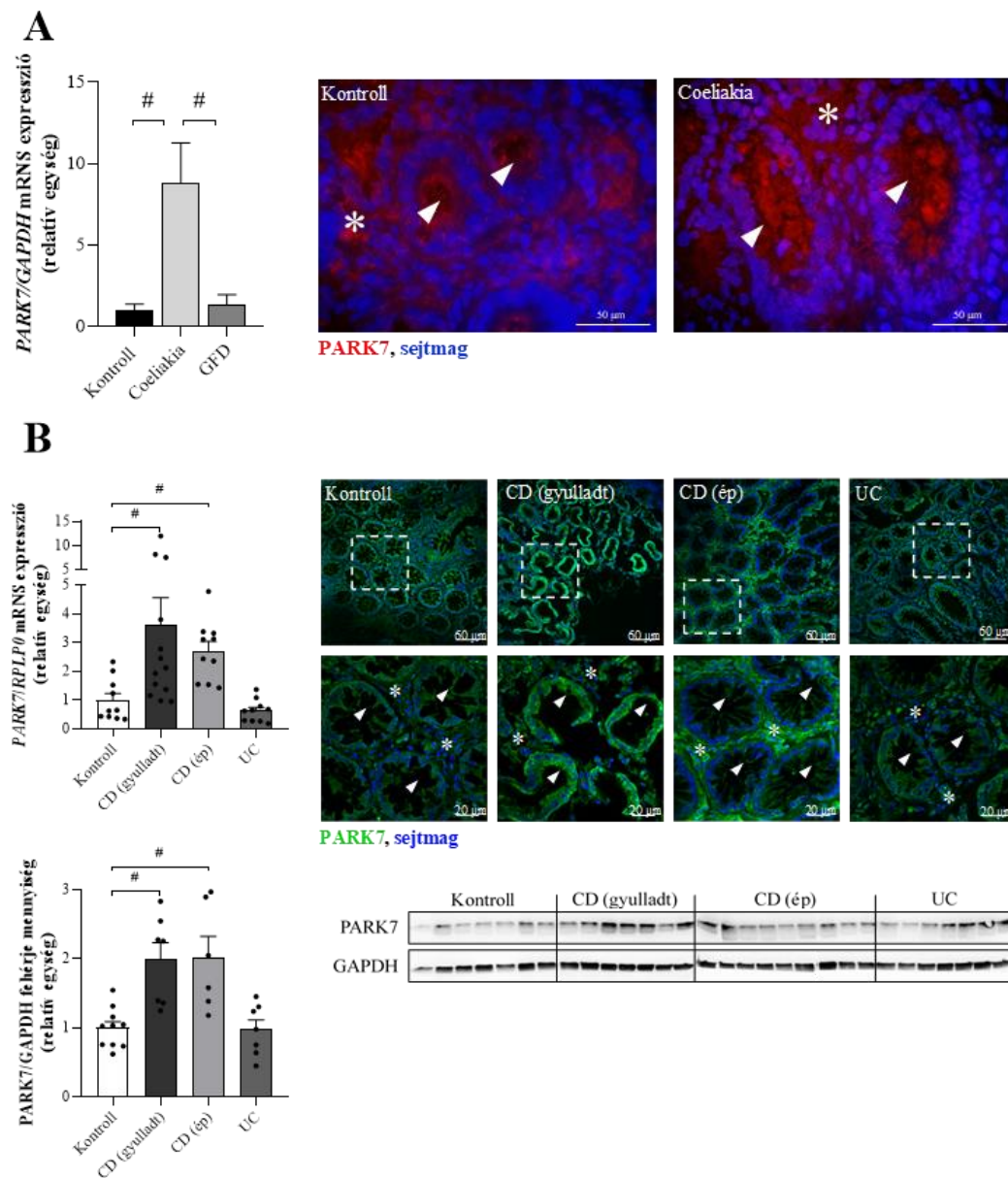
4. Eredmények

4.1. A humán *PARK7* mRNS expressziója és lokalizációja coeliakiában és IBD-ben

A humán duodenum és colon biopsziás minták *PARK7* mRNS expressziójának meghatározásához valós idejű RT-PCR, a fehérje mennyiségi méréséhez western blot, a lokalizáció vizualizálásához pedig immunfluorescens festési eljárást használtunk.

Kezeletlen coeliakiások duodenum mucosájának *PARK7* mRNS expressziója szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoport mintáiban ($p < 0,05$). Ugyanakkor a coeliakiás betegek mucosa *PARK7* expressziója gluténmentes diéta hatására a kontrollokéhoz hasonló értékre normalizálódik ($p = \text{NS}$). Fehérje szinten intenzív *PARK7* immunpozitivitás látható a coeliakiás gyermekek duodenum epithelialis és lamina propria sejtjeiben (5/A. ábra) [[107](#), [162](#)].

A *PARK7* mRNS expressziója és fehérje mennyisége a kontroll csoporthoz viszonyítva az ép és a gyulladt CD-s nyálkahártyában is szignifikánsan magasabbnak bizonyult ($p < 0,05$), az UC-s gyermekek colon mucosájában azonban nem emelkedett a kontroll csoporthoz képest ($p = \text{NS}$). Erős *PARK7* immunpozitivitás látható a CD-s gyermekek colon epithelialis és lamina propria sejtjeiben (5/B. ábra).



5. ábra. A Parkinson's disease 7 (*PARK7*) mRNS expressziója, fehérje mennyisége és lokalizációja coeliakiás, gluténmentes diétát tartó (GFD) és kontroll gyermekek duodenális mucosájában (A), valamint Crohn-beteg (CD) gyermekek ép és gyulladt, colitis ulcerosás (UC) és kontroll gyermekek colon nyálkahártyájában (B). Az mRNS expressziót valós idejű RT-PCR (n=10-13), a fehérje mennyiséget Western blot (n=6-10) segítségével mértük, a lokalizáció vizualizálásához immunhisztológiai festést (PARK7 - piros (A) / zöld (B)) használtunk. A relatív mennyiségeket belső kontrollként a *GAPDH* (A) vagy *RPLP0* (B) mRNS és *GAPDH* fehérje (B) mennyiségéhez viszonyítottuk. Az adatokat a hozzájuk tartozó kontrollhoz normalizáltuk. A képek a Nikon C2 konfokális

lézer scanning mikroszkóppal készültek. Nagyítás: 20 μ m, 50 μ m vagy 60 μ m. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festékkel vizualizáltuk. A statisztikai analízishez ordinary one-way ANOVA (Holm-Sidak multiplex összehasonlítás) és Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. # $p < 0,05$ a csatolt csoportok összehasonlítása. A nyilak a kripta epithel sejtjeit, a * szimbólumok a lamina propriát jelzik.

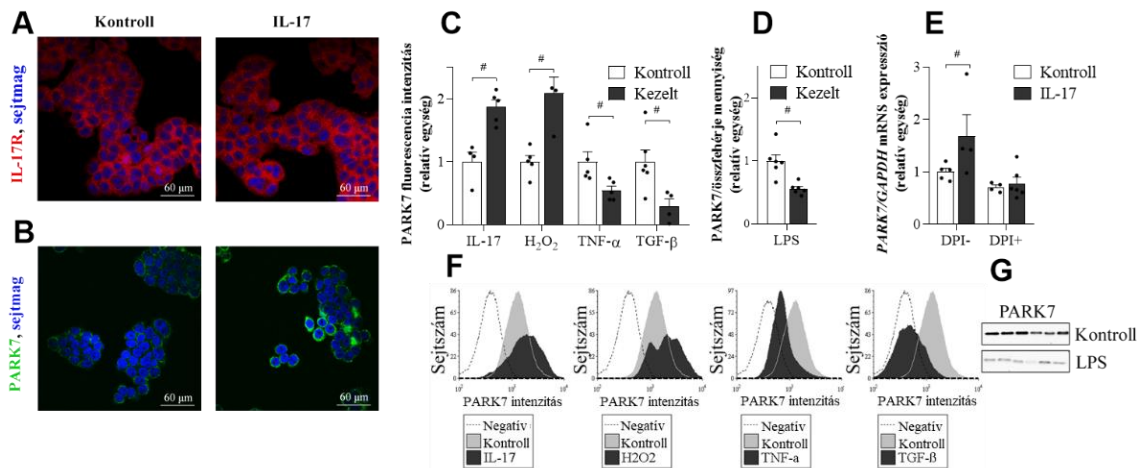
4.2. Az IL-17, H₂O₂, TNF- α , TGF- β , LPS és DPI hatása a HT-29 colon epithel sejtek PARK7 termelésére

A HT-29 colon epithel sejt vonal IL-17, H₂O₂, TNF- α és TGF- β kezelését követően a PARK7 mennyiségét áramlási cytometriával határoztuk meg, az LPS kezelést követően Western blotot használtunk. Az IL-17R és PARK7 immunpozitivitás kimutatásához immuncytológiai festést használtunk.

A HT-29 colon epithel sejtek IL-17R immunpozitivitást mutattak (6/A. ábra). Az IL-17 és H₂O₂ kezelés szignifikáns mértékben növelte, míg a TNF- α , TGF- β és LPS kezelés nagymértékben csökkentette a PARK7 fehérje mennyiségét ($p < 0,05$) (6/B-D, F-G. ábra).

A NAD(P)H-oxidáz inhibitor DPI (5 μ M, 30 perc) előkezelt, majd IL-17 (100ng/ml, 24 óra) indukálta HT-29 sejtek *PARK7* mRNS expressziójának méréséhez valós idejű RT-PCR technikát használtunk.

Az IL-17 kezelés által indukált *PARK7* mRNS expresszió emelkedést kivédte a DPI előkezelés ($p < 0,05$) (6/E. ábra).



6. ábra. Az interleukin (IL)-17 (100ng/ml, 24h) (A, B, C, E, F), hidrogén peroxid (H₂O₂, 20uM, 24h) (C, F), tumor nekrozis faktor (TNF)-α (10ng/ml, 24h) (C, F), tumor növekedési faktor (TGF)-β (1nM, 24h) (C, F), lipopoliszacharid (LPS) (100ng/ml, 24h) (D, G) és a NADPH-oxidáz inhibitor diphenilén-jodonium chlorid (DPI) (5uM, 30 perc) előkezelés (E) hatása a HT-29 colon epithelialis sejtek Parkinson's disease (PARK)7 termelésére (n=4-6). A mérést áramlási cytometriával (C, F), Western blottal (D, G) és valós idejű RT-PCR-el (E) végeztük, a lokalizáció vizualizálásához immunocytológiai festést (A: IL-17R-piros, B: PARK7-zöld) használtunk. A relatív mennyiségeket belső kontrollként a *GAPDH* mRNS (E) illetve az összfehérje (D, G) mennyiségéhez viszonyítottuk. Az adatokat a hozzájuk tartozó vehikulum kezelt kontrollhoz normalizáltuk. A képek a Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal készültek. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festékkel vizualizáltuk. Nagyítás: 60μm. A statisztikai analízishez Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. #p<0,05 a csatolt csoportok összehasonlítása.

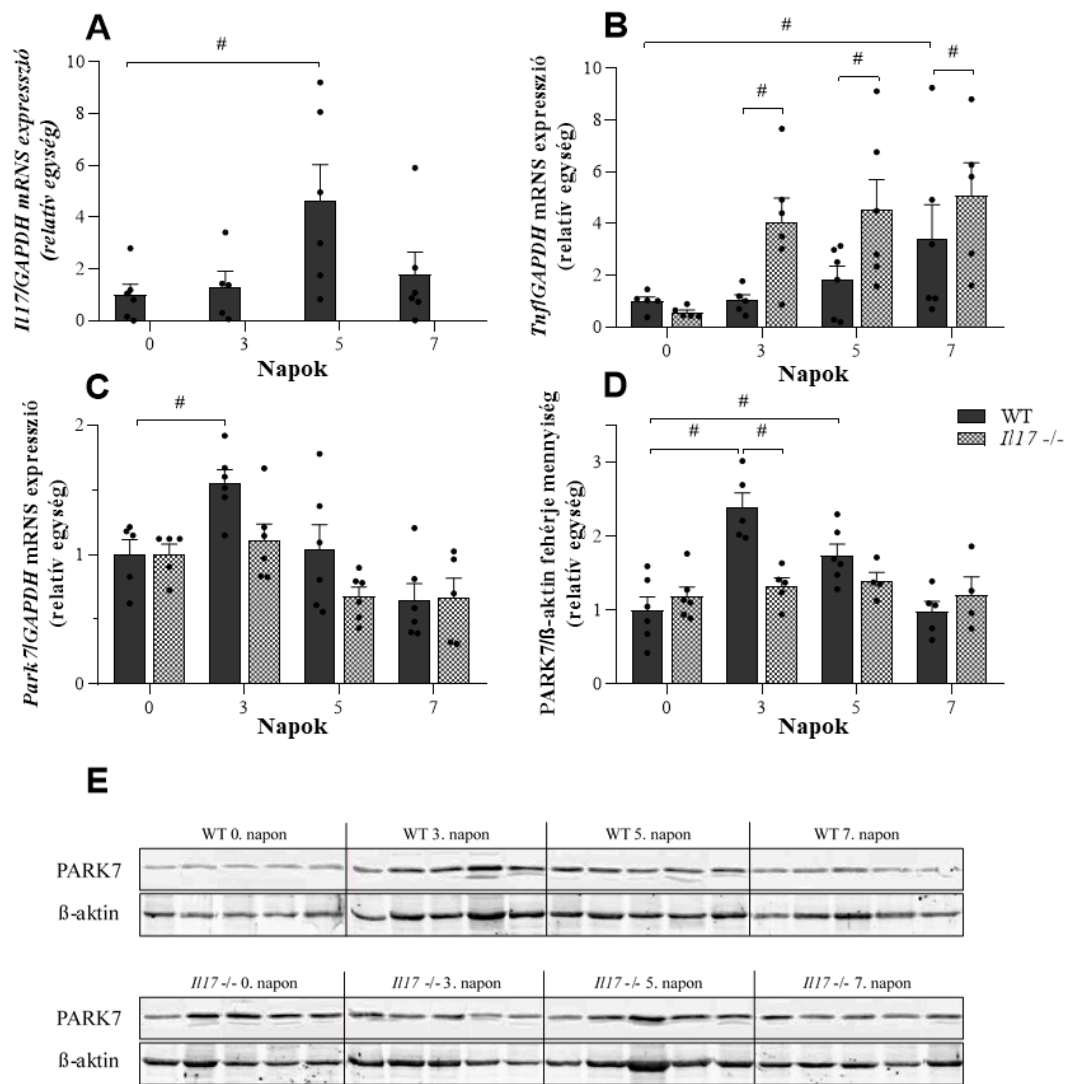
4.3. *IL-17*, *TNF- α* és *PARK7* mRNS expresszió, valamint *PARK7* fehérje mennyiség vad típusú és *IL-17* knock out egerek DSS-indukált colitises bélnyálkahártyájában

Az *IL-17*, *TNF- α* és *PARK7* mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR módszerrel, a *PARK7* fehérje mennyiségét pedig Western blot technikával határoztuk meg a WT és *IL17*^{-/-}, DSS-indukálta colitises egerekben.

Az *IL-17* mRNS expresszió szignifikánsan magasabb a vad típusú egerek colon mucosájában a DSS-kezelés ötödik (WT5) ($p < 0,05$) napján a kontroll csoporthoz (WT0) képest (7/A. ábra).

A WT állatokban a *TNF- α* mRNS expresszió a hetedik napon (WT7) szignifikánsan magasabb ($p < 0,05$), mint a kontroll csoportban (WT0). Az *IL17*^{-/-} egerekben a *TNF- α* mRNS expresszió a harmadik, ötödik és hetedik napon is magasabb volt (*IL17*^{-/-}3, *IL17*^{-/-}5, *IL17*^{-/-}7) ($p < 0,05$) a kontrollhoz viszonyítva (*IL17*^{-/-}0) (7/B. ábra).

A *PARK7* mRNS expresszió (7/C. ábra) szignifikánsan emelkedett a WT állatokban a DSS-kezelés harmadik napján (WT3), a fehérje mennyisége (7/D-E. ábra) pedig a harmadik és ötödik napon (WT3 és WT5) a kontroll csoporthoz (WT0) képest ($p < 0,05$). Az *IL17*^{-/-} egerekben azonban nem detektáltunk sem a *PARK7* mRNS, sem a fehérje mennyiségében változást ($p = \text{NS}$) (7/C-E. ábra).



7. ábra. Az interleukin (*IL*)-17 (A), tumor nekrozis faktor (*TNF*)- α (B) és Parkinson's disease (*PARK*)7 (C, D, E) mRNA expressziója (A, B, C) és fehérje mennyisége (D, E) a vad típusú (WT) (A-E) és *IL*-17 knock out (*IL17*^{-/-}) (B-E) egerek colon mucosájából a dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitis harmadik (WT3, *IL17*^{-/-}3), ötödik (WT5, *IL17*^{-/-}5) és hetedik (WT7, *IL17*^{-/-}7) napján, valamint a kontroll csoportban (WT0, *IL17*^{-/-}0). Az mRNA expressziókat valós idejű RT-PCR (A-C), a PARK7 fehérje mennyiséget (D-E) Western blot mérésrel detektáltuk (n=5-6). A relatív mennyiségeket a GAPDH mRNA (A-C) és a β -aktin fehérje (D-E) szinthez, mint belső kontrollhoz hasonlítottuk, az eredményeket WT0 csoportra normalizáltuk. A statisztikai analízist two-way ANOVA teszt segítségével végeztük. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. #p<0,05 a csatolt csoportok összehasonlítása.

4.4. A *PARK7*, *TNF- α* , *IL-1 β* , *-6*, *-10* és *TGF- β* mRNS expressziója és/vagy fehérje mennyisége HT-29 colon epithel sejtekben IL-17-indukciót és *PARK7* csendesítést követően

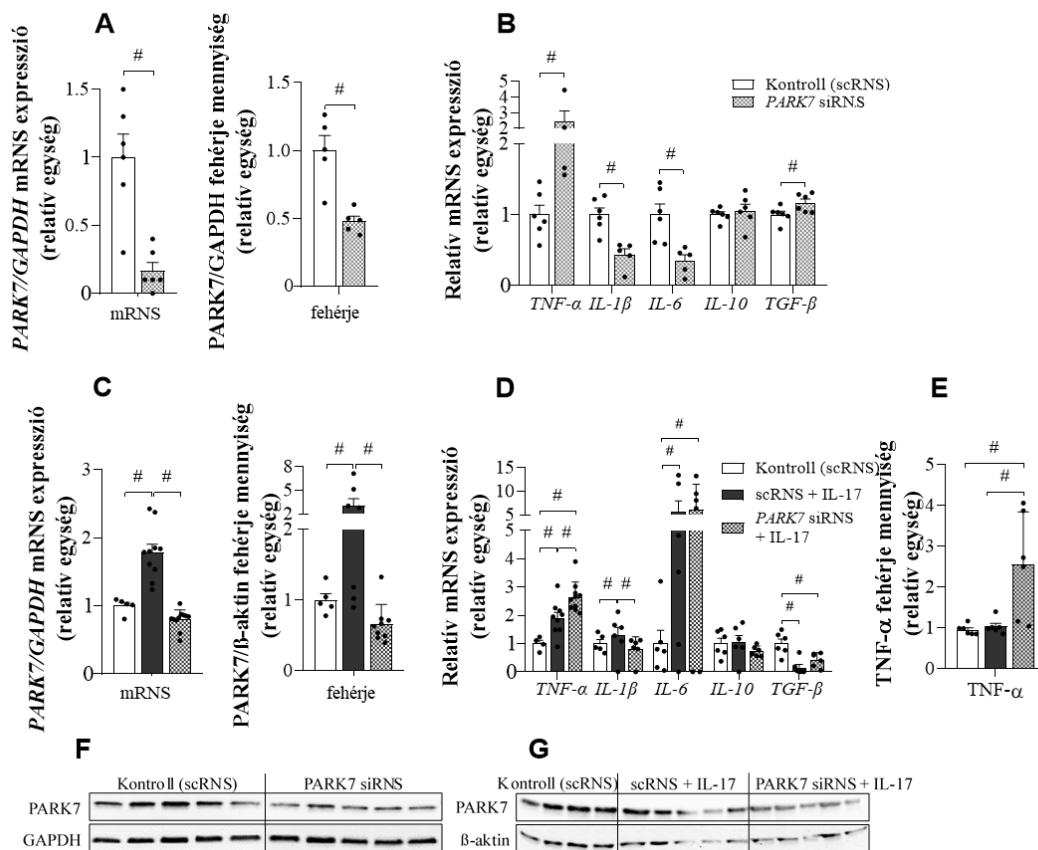
A *PARK7*, *TNF- α* , *IL-1 β* , *-6*, *-10* és *TGF- β* mRNS expressziót valós idejű RT-PCR, a *PARK7* fehérje mennyiségét Western blot, a *TNF- α* fehérje mennyiségét pedig ELISA módszer segítségével mértük a *PARK7* géncsenedesített és az egyik kísérleti felállásban emellett IL-17 (100ng/ml, 24 óra) kezelt sejtekben.

A *PARK7* géncsenedesítés mind IL-17 kezelés mellett, mind anélkül szignifikáns ($p < 0,05$) mértékben csökkentette a *PARK7* mRNS expressziót és fehérje mennyiséget (8/A, C, F, G. ábra). Az IL-17 szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a *PARK7* mRNS expressziót és fehérje mennyiséget (8/C, G. ábra).

A *PARK7* géncsenedesítés önmagában szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a *TNF- α* és *TGF- β* , valamint csökkentette az *IL-1 β* és *IL-6* mRNS expresszióját a kontroll sejtekhez [kontroll (scRNS)] képest (8/B. ábra).

Az IL-17 kezelés növelte a *TNF- α* , *IL-1 β* , és *IL-6* mRNS expresszióját; azonban csökkentette a HT-29 colon epithel sejtek *TGF- β* mRNS expresszióját a kontroll csoporthoz képest (8/D. ábra). A *PARK7* géncsenedesítés tovább növelte a *TNF- α* mRNS expressziót és fehérje mennyiséget az IL-17 kezelt HT-29 sejtekben a kontroll és IL-17 kezelt csoportokhoz képest (8/D-E. ábra).

Sem az IL-17 kezelésnek, sem a *PARK7* géncsenedesítésnek nem volt hatása a colon epithel sejtek *IL-10* mRNS expressziójára ($p = \text{NS}$) (8/B, D. ábra).



8. ábra. A Parkinson's disease (*PARK*)7 (A, C, F, G), tumor nekrozis faktor (*TNF*)- α (B, D, E), interleukin (*IL*)-1 β (B, D), *IL*-6 (B, D), *IL*-10 (B, D) és tumor növekedési faktor (*TGF*)- β (B, D) mRNA expressziója (A, B, C, D) és fehérje mennyisége (A, C, E, F, G) *IL*-17 (100ng/ml, 24h) indukció nélkül (A, B, F) és indukcióval (C, D, E, G) HT-29 sejtekben *PARK*7 specifikus kis interferáló (si)RNS, vagy kontroll scrambled (sc)RNS kezelést követően. Az mRNA expressziókat valós idejű RT-PCR (A, B, C, D), a *PARK*7 fehérje mennyiséget Western blot (A, C, F, G), a *TNF*- α fehérje mennyiséget pedig ELISA (E) módszerrel mértük (n=4-6). A relatív mennyiségeket a *GAPDH* mRNA (A, B, C, D) és *GAPDH* (A, F) vagy β -aktin fehérje (C, G) szinthez, mint belső kontrollhoz hasonlítottuk, az eredményeket a vehikulum kezelt csoportra normalizáltuk. A statisztikai analízist Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis teszt segítségével végeztük. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. #p<0,05 a csatolt csoportok összehasonlítása.

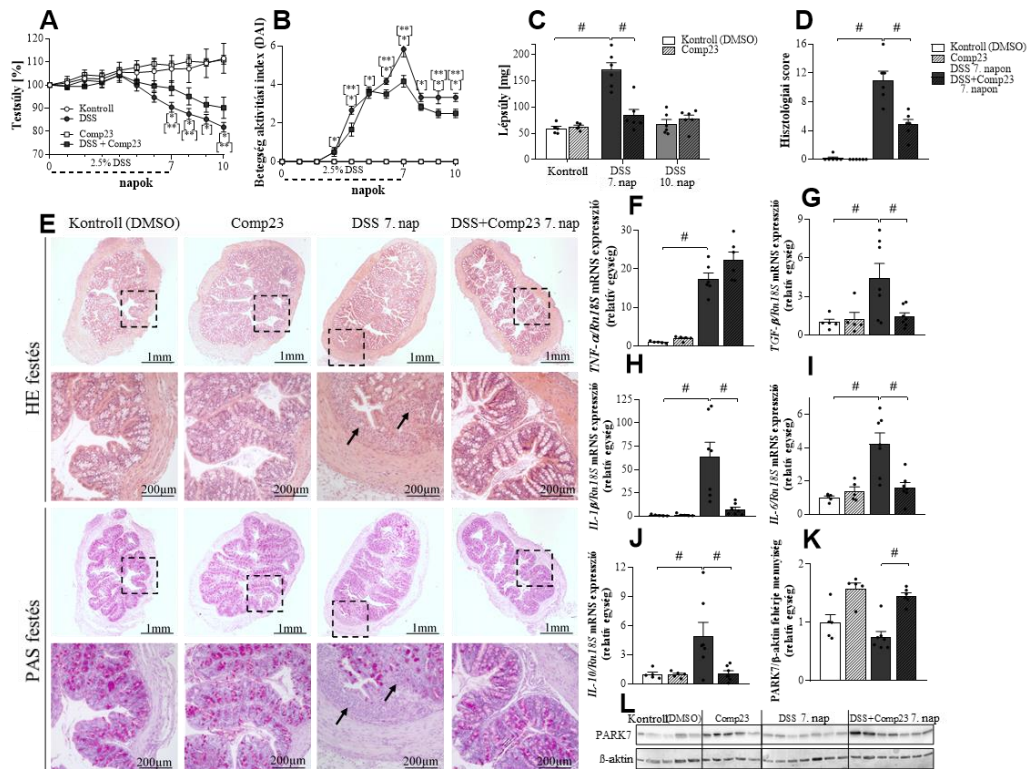
4.5. A PARK7-kötő Comp23 kezelés hatása DSS-indukálta colitises egerekben

A betegség aktivitási indexet (DAI) a fent részletezett pontrendszer (5.3 fejezet, 5. táblázat) alapján számítottuk a széklet konzisztencia, a széklet vér és az egerek általános állapota alapján. A testsúly csökkenését minden nap azonos időpontban detektáltuk. A lépsúlyt a kezelés hetedik és tizedik napján mértük. A molekuláris biológiai, így a *TNF- α* , *IL-1 β* , *-6*, *-10* és *TGF- β* mRNS expressziót valós idejű RT-PCR, a PARK7 fehérje mennyiség mérését Western blot segítségével-, valamint hisztológiai vizsgálatokat, -HE és PAS festést-, a hetedik napon készítettük.

Az intraperitonealis PARK7-kötő Comp23 kezelés szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) redukálta a DSS-indukált testsúly csökkenést (9/A. ábra), a lép megnagyobbodását (9/C. ábra), valamint javította a DSS-colitis aktivitási indexét (9/B. ábra) a vehikulummal kezelt egerekhez képest. A klinikai képnek megfelelően a Comp23 kezelés csökkentette a DSS-colitises egerek colon szövettani elváltozásait is (9/D-E. ábra). Hatására csökkent a subepithelialis immunsejtek infiltrációja és a nyálkahártya károsodás, ami hozzájárult a DSS-kezelt egerek kripta és mikrovillus morfológiájának megtartásához (9/E. ábra).

A Comp23 kezelés növelte ($p < 0,05$) a PARK7 fehérje mennyiségét a DSS-kezelt egerek (DSS+Comp23) vastagbelében a Kontroll, a Comp23 és a DSS csoporthoz képest (9/K-L. ábra).

A Comp23 kezelés csökkentette ($p < 0,05$) a DSS-indukált *IL-1 β* , *-6*, *-10* és *TGF- β* mRNS expressziót a DSS-indukált colitises egerek colonjában (9/G-J. ábra), a *TNF- α* mRNS expressziót azonban nem befolyásolta ($p = \text{NS}$) (9/F. ábra).



9. ábra. Betegség aktivitási index (DAI) (B), a testsúly (A), a légsúly (C), a hisztológia (D-E), a tumor nekrosis faktor (*TNF*)- α (F), tumor növekedési faktor (*TGF*)- β (G), interleukin (*IL*)-1 β (H), *IL*-6 (I) és *IL*-10 (J) mRNS expressziója, valamint a Parkinson's disease (PARK)7 fehérje mennyisége (K-L) a kontroll, dextranszulfát (DSS), Comp23 és DSS+Comp23 kezelt vad típusú egerekben (n=5-7). A DAI-t (B) és testsúlycsökkenést (A) a 10. napon, a légsúlyt (C) a 7. és 10. napon, a HE és PAS festést és hisztológiai értékelést (D, E), valamint a molekuláris biológiai méréseket (F, G, H, I, J, K, L) a 7. napon terminált kísérletről végeztük. A fekete nyilak a gyulladásosejt infiltrációt, valamint a sérült kriptákat és mikrovillusokat jelzik. Scale bar: 1mm vagy 200 μ m. A *TNF*- α , *TGF*- β , *IL*-1, *IL*-6 és *IL*-10 mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel (F, G, H, I, J), a PARK7 fehérje szintjét Western blot (K-L) módszerrel határoztuk meg. A relatív mRNS expressziókat belső kontrollként *Rn18S* mRNS-hez (F, G, H, I, J), a relatív PARK7 fehérje mennyiséget β -aktinhez (K-L) viszonyítva adtuk meg, az eredményeket a kontroll csoportra normalizáltuk. A statisztikai analízist two-way ANOVA teszt segítségével végeztük. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. * $p < 0,05$ Kontroll vs. DSS az adott napon, ** $p < 0,05$ DSS vs DSS + Comp23 adott napon, # $p < 0,05$ a csatolt csoportok összehasonlítása.

5. Megbeszélés

Az IBD a gasztrointesztinális rendszer krónikus gyulladásával járó, remissziókkal és relapszusokkal jellemezhető kórképe, melynek két fő megjelenési formája a CD és az UC. A multifaktoriális betegség kialakulásában genetikai, immunológiai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak, azonban pontos patomechanizmusa máig sem tisztázott, így a definitív, kóroki terápia sem teljesen megoldott. Az IBD patomechanizmusában betöltött központi szerepe, és ennek köszönhetően terápiás jelentősége miatt kiemelendő a pro-inflammatorikus TNF- α , valamint a ROS és a hypoxia szerepe. A nyugati, fejlett országokban a lakosság mintegy 0,5%-a szenved IBD-ben [2]. Sajnos a kórkép egyre gyakrabban kezdődik gyermekkorban [177], hazánkban a HUPIR adatai alapján a gyermekkori gyakorisága 7,8/100 000 gyermek [10], ami a súlyosabb kórlefolyás és hosszabb betegségfennállás miatt hatványozott közegészségügyi terhet jelent. Mindezek alapján kiemelt jelentőségű a gyermekkori IBD vizsgálata, a kialakulást elősegítő tényezők azonosítása, a pontos patomechanizmusának megértése.

A PARK7 egy evolúciósan erősen konzervált, a legtöbb szövetben és szervben jelen lévő, kisméretű fehérje. Az irodalmi adatok alapján a PARK7 egy multifunkcionális, cytoprotektív molekula, melynek antioxidáns, direkt scavenger, chaperon, antiapoptotikus és immunreguláló funkciója egyaránt ismert. Számos kórkép kapcsán felmerült a PARK7 szerepe, így elsősorban daganatos betegségekben, mint például a tüdő-, oesophagus-, pancreas-, ovárium- és hepatikus tumorokban [131-136], valamint a központi idegrendszeri kórképekben, mint a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór, a stroke és az idegrendszeri gyulladások [137-139]. Mindezek mellett leírták szerepét COPD-ben, vérnyomás-, kardiális iszkémia-reperfúzió szabályozásában, II. típusú diabetes mellitusban, obezitásban, vese- és májfibrózisban, valamint szepsisben is [129, 141-143, 146, 148-150, 152, 153].

A bélrendszer gyulladással megbetegedései kapcsán azonban rendkívül kevés adat áll rendelkezésünkre. Kutatócsoportunk elsőként vetette fel a PARK7 bélrendszeri gyulladással való pathomechanikai szerepének lehetőségét. Humán biopsziás mintákon végzett, a PARK7 mennyiségi változásait és lokalizációját leíró vizsgálatainkat mind a vékony-, mind a vastagbél biopsziás mintákon elvégeztük.

A vékonybél eredetű mintákat vizsgálva azt találtuk, hogy a coeliákiás gyermekek duodenum biopsziás mintáiban a *PARK7* expressziója magasabb, mint a kontroll csoportban. Ugyanakkor a GFD-t tartó, remisszióban lévő gyermekek *PARK7* expressziója lecsökken, megegyezik a kontroll csoportéval (5/A. ábra) [162]. Egy későbbi tanulmányunkban leírtuk a *PARK7* jelenlétét a humán duodenum epithel sejtek és lamina propria sejtjeinek citoplazmájában (5/A. ábra). A *PARK7* szerepét vizsgálva kimutattuk, hogy a *PARK7*-kötő Comp23 kezelés csökkenti a H₂O₂-indukált intracelluláris ROS akkumulációt, valamint növeli az antioxidánsok (*NRF2*, *TRX1*, *GCLC*, *HMOX1*, *NQO1*) expresszióját és a sejt viabilitást humán vékonybél epithelialis (FHs74Int) sejtvonalon. A Comp23 előkezelés jelentősen csökkentette a vékonybél permeabilitását az *ex vivo* bélzsák preparátumokon, vagyis hatására összességében csökkent az oxidatív stressz által indukált nyálkahártya sérülés [107].

A *PARK7* mennyiségének változásait és lokalizációját tovább vizsgálva vastagbél mintákon azt találtuk, hogy a *PARK7* mRNA expressziója és fehérje mennyisége egyaránt magasabb a terápia naív CD-s gyermekek colon biopsziás mintáiban, mint a kontroll csoportban (5/B. ábra). Ezzel párhuzamosan a CD-s gyermekek mintáiban a *PARK7* intenzív immunfluoreszcens festődést mutatott a betegség által érintett colon nyálkahártya epithel sejtjeinek és a lamina propria sejtjeinek citoplazmájában (5/B. ábra). Érdekes módon a kezelésben nem részesült, frissen diagnosztizált UC-s gyermekek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában sem a *PARK7* mRNA expressziója, sem pedig fehérje mennyisége nem mutatott különbséget a kontroll csoporthoz viszonyítva (5/B. ábra). Ennek megfelelően jelen eredményeink szignifikáns különbséget mutatnak a CD-s és UC-s gyermekek colon nyálkahártyában mért *PARK7* mennyiségek között.

A coeliakiában és IBD-ben leírt eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a gasztrointesztinális traktusban, így a vékony- és vastagbélben egyaránt expresszálódó molekula, a *PARK7* mennyisége gyulladás következtében az alapbetegségtől függetlenül nemcsak megnő, de mennyiségét a betegség aktivitása is befolyásolja.

Humán IBD kapcsán korábban mindössze két tanulmány született a *PARK7* kapcsán. Di Narzo A. F. és mtsai. [163] felnőtt IBD-s betegek plazma, Zhang J. és mtsai. [164] pedig felnőtt IBD-s betegek intesztinális *PARK7* mennyiségi változását tanulmányozták. Bár Di Narzo A. F. és mtsai. megfigyelései szerint az UC-s betegek plazmájában magasabb a *PARK7* mennyiség, mint a CD-sekében [163], eredményeik

nem vethetőek össze a jelen vizsgálatunk eredményeivel, mert Di Narzo A. F. és mtsai. terápia alatt álló felnőtt IBD-s betegek plazma proteom vizsgálatát végezték, vagyis más beteganyagon, más mintából, más metodikával dolgoztak. Ők maguk is megállapították, hogy a plazmában mért változások kevésbé korrelálnak a bélnyálkahártyában talált változásokkal.

Zhang J. és mtsai. tanulmányukban az IBD-s betegek intesztinális mintáiban a kontrollhoz képest csökkent PARK7 mennyiséget mértek, azonban nem kvantitatív metodikát használtak, hanem paraffinba ágyazott colon metszetek PARK7 immunpozitivitását vizsgálták [164]. Tanulmányukba a bevont betegek vonatkozó klinikai adatok nem elérhetőek. Nem világos a betegek neme, kora, pontos diagnózisa (CD vagy UC), illetve terápiája sem.

Összességében tehát, tekintve a különböző betegcsoportokat, mintákat és metodikákat, ezek a vizsgálatok nehezen, vagy egyáltalán nem vethetőek össze eredményeinkkel.

Vizsgálatainkban a terápia naív CD-s és UC-s gyermekek mucosájában megfigyelt különbségre az IBD két formájának eltérő típusú gyulladása szolgálhat magyarázatul. Míg a CD transmuralis gyulladással, valamint Th1- és Th17-aktivációval jár, addig UC-ben a mucosalis gyulladás kialakulásában a Th2- és NK-sejtek dominálnak [178-181]. A CD-s és UC-s mintákban mért PARK7 mennyiségi különbség alapján felmerül a lehetőség, hogy a PARK7 mennyiségének biomarkerként való meghatározása segíthet az IBD két formájának differenciálásában, azonban ennek alátámasztására nagy elemszámú, prospektív vizsgálatra lenne szükség. Különösen figyelmet érdemel ez a megfigyelés, hiszen jelenleg az IBD pontos diagnózisa éveket is igénybe vehet [182, 183].

A *PARK7* expresszió regulálásának hátterében álló mechanizmusok pontos megértése érdekében megvizsgáltuk az IBD-ben ismert és széles körben vizsgált gyulladósos mediátorok, az IL-17, a TNF- α , a TGF- β , a bakteriális LPS, valamint az oxidatív stresszt modellező H₂O₂ hatását a *PARK7* szintézisére HT-29 colon epithel sejteken (6. ábra). Ezen kísérletsorban minden vizsgált faktor hatással volt a *PARK7* szabályozására. *In vitro* kísérletünk alapján míg az IL-17 és H₂O₂ kezelés indukálta, addig a TNF- α , a TGF- β és az LPS kezelés csökkentette a *PARK7* expresszióját.

Ismereteink szerint ez az első olyan vizsgálat, amely kimutatta az IL-17 PARK7 szintézisében betöltött reguláló szerepét. A Th17-sejtek által szecernált IL-17 központi szerepet tölt be az IBD patomechanizmusában. Korábbi kutatások kimutatták, hogy az IBD-s betegek gyulladt bélnyálkahártyájában és szérumában fokozott az *IL-17* expresszió [184-186]. Emellett a mucosalis *IL-17* expresszió korrelál a betegség aktivitási index-el, valamint a betegek endoscopos és hisztológiai score-jával is [187]. Mindezek alapján tovább vizsgáltuk az IL-17 *PARK7* expresszióra gyakorolt hatását *in vivo* modell segítségével. Hasonlóan a CD-s gyermekek colon biopsziás mintáiban észlelt emelkedett *PARK7* szinthez, emelkedett *PARK7* mRNS és fehérje expressziót találtunk a DSS-indukált C57/BL/6J WT egerek colon mintáiban is (7. ábra). Ugyanakkor, az *IL17*^{-/-} egerek colon *PARK7* szintje nem változott DSS kezelés hatására, jelezve *in vivo* is az IL-17 *PARK7* regulációban betöltött centrális szerepét. Irodalmi adatok alapján a mucosalis *PARK7* mennyiségi változásához hasonlóan a Th17-sejtek, valamint az expresszált IL-17 mennyisége is emelkedett a CD-s betegek nyálkahártyájában az UC-sekhez képest, ami az IL-17 potenciálisan *PARK7* reguláló hatására utal *in vivo* [184, 185].

Az IBD patomechanizmusában kiemelt jelentősége van az immunsejtek által termelt ROS-nak [73], valamint ismert, hogy NADPH- és xantin-oxidáz aktiváláson keresztül az IL-17 is indukál ROS termelődést [188, 189]. Ismert továbbá, hogy a ROS a *PARK7* szintézis induktora [99, 138, 190]. Ezen irodalmi adatokkal összhangban a NADPH-oxidáz inhibitor DPI kezelés gátolta az IL-17 indukált *PARK7* szintézist HT-29 sejteken (6/D. ábra), alátámasztva a ROS *PARK7* szabályozásában betöltött szerepét colon sejtvonalon is.

HT-29 colon epithel sejteken a TGF- β a *PARK7* szintézis negatív regulátora (6. ábra). Korábban Del Zotto B. és munkatársai kimutatták, hogy UC-sek lamina propria mononuklearis sejtjeiben magasabb a TGF- β expressziója, mint a kontroll, illetve a CD-s csoportokban [66]. Ezek alapján elképzelhető, hogy UC-s betegekben a fokozott colon mucosalis TGF- β termelődés is hozzájárulhat az általunk észlelt csökkent *PARK7* mennyiséghez.

A környezeti faktorok, mint például az infekciók, szintén megváltoztatják az intesztinális mucosa barrier funkcióját, elősegítve ezzel az IBD kialakulását [73, 191, 192]. A bakteriális LPS-t a veleszületett immunrendszer TLR4-en keresztül felismeri, ami

proinflammatorikus molekulák, pl. TNF- α fokozott szekréciójához vezet [193]. Vizsgálataink során mind az LPS, mind pedig a TNF- α kezelés csökkentette a PARK7 szintézisét HT-29 sejtvonalon (6. ábra). Adatainkkal összhangban Khasnavis S. és mtsai. kimutatták, hogy az LPS kezelés gátolja a *PARK7* expressziót primer humán neuronokban és astrocytáknakban [194].

Fenti eredményeink összességében azt demonstrálják, hogy a *PARK7* szintézisét számos, az IBD patomechanizmusában kulcsszerepet játszó faktor szabályozza.

Összességében elmondható, hogy a fent részletezett különbségek a CD-ben és UC-ben jelentkező intesztinális gyulladásban legalább részben megmagyarázzák az észlelt mucosális *PARK7* mennyiségi különbséget.

A következő kísérletsorozatban a *PARK7* biológiai funkcióját vizsgáltuk a nyálkahártya-gyulladásban. Elsőként a *PARK7* IBD-ben szerepet játszó citokinek expressziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk HT-29 colon epithel sejtvonalon *in vitro*. Kísérleteink alapján a *PARK7* géncsendesítése jelentősen megváltoztatta számos gyulladásban szerepet játszó citokin expresszióját (8. ábra).

A *PARK7* csendesített sejtek *TNF- α* expressziója magasabb volt, mint a kontroll csoporté (8/B. ábra). Érdekes módon a *TNF- α* mennyisége még magasabb volt az IL-17 kezelt és *PARK7* csendesített sejtekben a kontroll és IL-17 kezelt csoporthoz képest (8/D-E. ábra). Ezzel összhangban, a WT csoporttal ellentétben az *IL17*^{-/-} DSS-kezelt egerek colonjában, -ahol a *PARK7* expresszió (7/C-E. ábra) változatlan volt-, emelkedett a *TNF- α* mennyisége *in vivo* (7/B. ábra). A két eredmény azt sugallja, hogy a *PARK7* mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* kiemelt jelentőségű a TNF- α regulálásában. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a *PARK7* gyulladásos faktorok szabályozásában betöltött szerepéről, azonban eredményeinkhez hasonlóan Kim D.K. és mtsai. leírták, hogy az antigén-indukált TNF- α szintézis magasabb a *PARK7*^{-/-} egerekből izolált hízósejtekben, mint a WT csoportban [127].

Összhangban Gao és mtsai. vizsgálataival, melyben a *PARK7* elnyomja a TGF- β /Smad útvonalat és részben helyreállítja a patkányok pulmonális artériás hypertóniáját [195], kísérletünkben a *PARK7* géncsendesített HT-29 sejtek *TGF- β* expressziója fokozott volt a kontroll csoporthoz képest (8/B. ábra).

PARK7 jelenlétében egyéb gyulladásos citokinek, így az *IL-1 β* és *IL-6* expressziója csökkent (8/B. ábra). Tovább vizsgálva a *PARK7* hatását, megmértük az *IL-*

IL-1 β és *IL-6* mennyiségét *IL-17* kezelt HT-29 sejteken is, ahol a korábbiakhoz hasonló eredményt kaptunk. A *PARK7* csendesítése csökkentette az *IL-1 β* expressziót, de nem volt hatással az *IL-6* mRNS szintre az *IL-17* kezelt colon sejtvonalon (8/D. ábra). A jelenség háttérében részben az *IL-17* csupán kismértékű, *IL-1 β* -t befolyásoló hatása állhat, mellyel szemben az *IL-6* szintjére szignifikáns, -majd ötszörös indukáló hatást gyakorolt-, ami elnyomhatta a *PARK7* géncsökkentés ennél jóval kisebb léptékű hatását. Mindemellett meg kell említeni, hogy eredményeinkkel ellentétben Chien C.H. és mtsai. emelkedett *IL-1 β* szintet találtak a *PARK7*^{-/-} egerek substantia nigra sejtjeiben [128].

Ezen eredményeink összességében azt jelzik, hogy a *PARK7* hatással van számos IBD-asszociált citokin regulációjára.

A fentiek alapján könnyen elfogadható, hogy a *PARK7* valószínűleg fontos szerepet tölt be az IBD patomechanizmusában. Ezért a következő kísérletben megvizsgáltuk a nemrégiben kifejlesztett *PARK7*-kötő Comp23 biológiai hatását az IBD DSS-indukált egérmodelljében [169]. Korábban a Comp23 *PARK7* specifikus hatását bizonyították, protektív hatása *PARK7*^{-/-} sejtekben, illetve egerekben nem érvényesült. A Comp23 megakadályozza a *PARK7* 106-os pozícióban lévő cisztein oxidációját, megőrizve ezáltal a molekula aktivitását [196]. Vizsgálataink során a Comp23 kezelés csökkentette a vad típusú egerek DSS-indukálta vastagbélgyulladás kapcsán a colitis aktivitási indexét, illetve az egerek súlycsökkenését (9/A-B. ábra). Eredményeink összhangban vannak Zhang és mtsai. vizsgálatával, akik súlyosabb klinikai tüneteket észleltek *Park7*^{-/-} DSS-indukált colitises egereken, mint a WT kontrollokon [164]. A klinikai tünetekkel összhangban a Comp23 kezelés csökkentette a lépmeagnagyobbodás mértékét, elősegítette a kripták és mikrovillusok normál megjelenésének megőrzését, és csökkentette a colon subepithelialis rétegébe infiltrálódó immunsejtek számát a DSS-kezelt egerekben (9/C-E. ábra).

A klinikai javulás háttérében álló folyamatok feltérképezése céljából molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk, melyek alapján a Comp23 kezelés hatására szignifikánsan magasabb *PARK7* mennyiséget detektáltunk a DSS-kezelt egerek colonjában (9/K, L. ábra). Annak tükrében ez talán nem annyira meglepő eredmény, hogy Takahashi-Niki K és mtsai. munkája alapján a Comp23 gátolhatja a *PARK7* oxidáció által kiváltott chaperon-mediált degradációját [197].

Eredményeink alapján a Comp23 kezelés csökkentette az *IL-1 β* , *IL-6* és *TGF- β* expressziót a DSS-indukált colitises egerek vastagbelében (9/G-I. ábra). Ezek a citokinek meghatározóak a CD-ben [198] látható epithel gyulladásért felelős Th1- [199], Th17- és Treg-sejtek [200] érésében.

Érdekes, hogy ezzel ellentétben a Comp23 kezelés csökkentette az anti-inflammatorikus *IL-10* expresszióját (9/J. ábra). Az alapján, hogy a PARK7 géncsendesítésünk nem változtatta meg az *IL-10* expresszióját *in vitro* (8/B. ábra), feltételezzük, hogy a csökkent *IL-10* mennyiség inkább a Comp23-kezelés hatására csökkenő colon gyulladás indirekt következménye lehet a DSS-indukált colitises egerekben.

Végezetül meg kell említeni, hogy a Comp23-al kezelt DSS-indukált colitises egereken kapott eredményeink nincsenek teljesen összhangban az *in vitro* kísérleteinkkel. Lehetséges, hogy az *IL-1* és *IL-6* expresszióban észlelt különbségek egyszerűen az *in vitro* és *in vivo* modell komplexitásának különbségéből erednek, azonban lényegi különbség az is, hogy míg az *in vitro* kísérletünk során a géncsendesítéssel csökkentettük, addig az *in vivo* modellben a Comp23 kezeléssel növeltük a PARK7 mennyiségét, sőt a Comp23 kezelés a PARK7 oxidációjának kivédésén keresztül véhetően a PARK7 aktivitását is növelte.

Vizsgálatunk rámutatott, hogy a PARK7 expresszálódik a humán colonban, valamint, hogy kifejeződésében különbség van a kontroll, a terápia naív CD-s és UC-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában. Ez az eltérés felveti a lehetőségét, hogy a jövőben a PARK7 esetleg biomarker funkciót tölthet be a két kórkép differenciálásában, azonban ennek megerősítésére a jövőben nagyobb elemszámú, prospektív vizsgálatra van szükség. Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy az IBD patomechanizmusában kulcsfontosságú faktorok, mint a TNF- α , TGF- β , IL-17, H₂O₂ és az LPS hatással vannak a colon epithel sejtek PARK7 szintézisére *in vitro*. Ez a megfigyelés felveti a lehetőségét, hogy a PARK7 központi szerepet tölthet be az IBD kialakulásában, illetve lokális különbségeik magyarázatot adhatnak a CD-s és UC-s gyermekek nyálkahártya PARK7 mennyisége között megfigyelt különbségre. Munkacsoportunk igazolta, hogy a PARK7 hatással van számos IBD-ben szerepet játszó faktor, mint az *IL-1*, *IL-6*, *IL-10*, TNF- α és TGF- β expressziójára *in vitro*. Bizonyítottuk továbbá, hogy a PARK7-kötő Comp23 *in vivo* protektív hatású a DSS-indukálta klinikai tünetek és mucosalis gyulladás

kifejeződésével szemben. Ezek a megfigyelések alátámasztják a PARK7 ismerten jótékony szerepét, illetve az IBD-ben betöltött potenciálisan centrális funkcióját.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a PARK7 potenciálisan központi szerepet tölthet be az IBD patomechanizmusában, ezért a jövőben, további vizsgálatokat követően felmerül differenciáldiagnosztikai biomarker, valamint terápiás target funkciója is.

6. Következtetések

PhD munkám célja az antioxidáns, protektív hatású Parkinson's disease (PARK)7 molekula gyulladásoos bélbetegségek (IBD) patomechanizmusában betöltött szerepének vizsgálata volt humán biopsziás minták feldolgozása, valamint *in vivo* DSS-indukálta colitises egérmodell és *in vitro* funkcionális kísérletek segítségével.

Eredményeink alapján elmondható:

1. A *PARK7* expresszálódik a humán colonban.
2. Terápia naív Crohn-beteg gyermekek colon nyálkahártyájában emelkedett a *PARK7* mennyisége a kontroll és a colitis ulcerosás csoportéhoz képest.
3. Terápia naív colitis ulcerosás gyermekek colon nyálkahártyájában nem emelkedett meg a *PARK7* mennyisége a kontroll csoportéhoz képest.
4. Az IBD patomechanizmusában kiemelt jelentőségű IL-17, TNF- α , TGF- β , LPS és H₂O₂ hatással van a HT-29 colon epithel sejtek *PARK7* expressziójára.
5. A *PARK7* expressziójánk csendesítése befolyásolja a HT-29 colon epithel sejtek gyulladásoos citokin termelését.
6. A *PARK7*-en keresztül ható Comp23 protektív *in vivo* a DSS-indukált colitises egerek klinikai tüneteinek és mucosalis gyulladásának kialakulásával szemben.
7. A *PARK7* aktivitásának fokozása befolyásolja a colon gyulladásoos citokin termelését *in vivo*.

7. Összefoglalás

Jelen dolgozat alapjául szolgáló munka során a Parkinson's disease (PARK)7 gyermekkori gyulladásos bélbetegségekben (IBD) betöltött szerepét vizsgáltuk. Az IBD a gasztrointesztinális traktus krónikus, egyre nagyobb ütemben növekvő incidenciával jellemezhető, nem teljes mértékben tisztázott patomechanizmusú megbetegedése, melynek két típusa a Crohn-betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC). A PARK7 egy multifunkcionális, cytoprotektív fehérje, melynek direkt scavanger, chaperon, antioxidáns, antiapoptotikus és immunreguláló hatása egyaránt ismert, IBD-ben betöltött szerepe azonban még nem teljesen tisztázott.

Kutatásunk során kimutattuk, hogy terápia naív CD-s gyermekek colon nyálkahártyájában a *PARK7* mRNS expressziója és fehérje mennyisége egyaránt szignifikánsan magasabb, mint a kontroll és UC-s gyermekek mintáiban, ami felveti a PARK7 potenciális biomarker szerepét az IBD-ben.

In vitro eredményeink alapján az IBD patomechanizmusában kulcsszerepet játszó molekulák, mint az interleukin (IL)-17, a tumor nekrozis faktor (TNF)- α , a tumor növekedési faktor (TGF)- β , a lipopoliszaharid (LPS) és a hidrogén peroxid (H₂O₂) befolyásolják a PARK7 szintézisét.

Kimutattuk továbbá, hogy a PARK7 szerepet játszik az IBD-ben fontos molekulák, mint például az *IL-1*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* és *TGF- β* mennyiségének szabályozásában.

In vivo a PARK7-en keresztül ható Compound-23 (Comp23) protektív hatással volt a dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitises egerek klinikai tüneteire és mucosalis gyulladására.

Összességében eredményeink alapján felmerül a PARK7 központi szerepe az IBD patomechanizmusában. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a nyálkahártya PARK7 mennyiségének meghatározása a jövőben biomarker funkciót tölthet be az IBD diagnózisának felállításánál. Ezenfelül eredményeink alapján a jövőben a PARK7 új terápiás célpont lehet az IBD kezelésében.

8. Summary

In this thesis, we examined the role of Parkinson's disease (PARK)7 in childhood inflammatory bowel diseases (IBD). IBD is a chronic disorder of the gastrointestinal tract with increasing incidence and not fully understood pathomechanism. It has two types including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). PARK7 is a multifunctional, cytoprotective protein with known direct scavenger, chaperone, antioxidant, antiapoptotic and immunoregulatory effects, however its exact role in the pathomechanism of IBD is not fully elucidated.

We have shown that the mRNA expression and protein level of *PARK7* are significantly higher in the colonic mucosa of therapy naive children with CD than in control or children with UC, suggesting the potential role of *PARK7* as a biomarker in the differential diagnosis of IBD.

Our *in vitro* results confirm that the key molecules of the pathomechanism of IBD including interleukin (IL)-17, tumor necrosis factor (TNF)- α , tumor growth factor (TGF)- β , lipopolysaccharide (LPS) and hydrogen peroxide (H₂O₂) have regulatory role on the synthesis of *PARK7*.

We have also shown that *PARK7* plays a role in the regulation of the central molecules of the pathomechanism of IBD, including *IL-1*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* and *TGF- β* .

In vivo Compound-23 (Comp23) acting through *PARK7* were protective on the clinical signs and mucosal inflammation of dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis in mice.

Our study suggests that *PARK7* may have a central role in the pathomechanism of IBD. Our results suggest that determination of the amount of mucosal *PARK7* may be a useful tool in the accurate differential diagnosis of IBD. Moreover our experiments suggest that *PARK7* may be a new therapeutic target in the treatment of IBD in the future.

9. Irodalomjegyzék

1. Perrin JM, Kuhlthau K, Chughtai A, Romm D, Kirschner BS, Ferry GD, Cohen SA, Gold BD, Heyman MB, Baldassano RN, Winter HS. (2008) Measuring quality of life in pediatric patients with inflammatory bowel disease: psychometric and clinical characteristics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 46: 164-171
2. Loftus EV, Jr. (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126: 1504-1517
3. Kim SC, Ferry GD. (2004) Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology*, 126: 1550-1560
4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=ibd&filter=years.1990-2021&timeline=expanded>. Vol. 2021.07.06.
5. Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, Rabeneck L, Mack DR, Brill H, Howard J, Guan J, To T. (2009) Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*, 58: 1490-1497
6. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, Shonova O, Vind I, Avnstrom S, Thorsgaard N, Andersen V, Krabbe S, Dahlerup JF, Salupere R, Nielsen KR, Olsen J, Manninen P, Collin P, Tsianos EV, Katsanos KH, Ladefoged K, Lakatos L, Bjornsson E, Ragnarsson G, Bailey Y, Odes S, Schwartz D, Martinato M, Lupinacci G, Milla M, De Padova A, D'Inca R, Beltrami M, Kupcinskas L, Kiudelis G, Turcan S, Tighineanu O, Miha I, Magro F, Barros LF, Goldis A, Lazar D, Belousova E, Nikulina I, Hernandez V, Martinez-Ares D, Almer S, Zhulina Y, Halfvarson J, Arebi N, Sebastian S, Lakatos PL, Langholz E, Munkholm P, EpiCom g. (2014) East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*, 63: 588-597
7. Tsianos EV, Masalas CN, Merkouropoulos M, Dalekos GN, Logan RF. (1994) Incidence of inflammatory bowel disease in north west Greece: rarity of Crohn's disease in an area where ulcerative colitis is common. *Gut*, 35: 369-372

8. Nagy György ÚL, Juhász László, Minik Károly. (1994.) A gyulladásoos bélbetegségek epidemiológiája Borsod-Abaúj-Zemplén megyében 1963-1992. LAM, p. 424-430
9. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL. (2004) Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol*, 10: 404-409
10. Muller KE, Lakatos PL, Arato A, Kovacs JB, Varkonyi A, Szucs D, Szakos E, Solyom E, Kovacs M, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Csoszanszki N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Cseh A, Szabo D, Voros P, Veres G, Hungarian IBDRG. (2013) Incidence, Paris classification, and follow-up in a nationwide incident cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57: 576-582
11. Orchard TR, Satsangi J, Van Heel D, Jewell DP. (2000) Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scand J Immunol*, 51: 10-17
12. Satsangi J, Morecroft J, Shah NB, Nimmo E. (2003) Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17: 3-18
13. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. (2002) Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 123: 86-91
14. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P, Hungarian IBDSG. (2005) Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol*, 11: 1489-1495
15. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. (1999) HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*, 45: 395-401
16. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. (2006) Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and

- microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J Gastroenterol*, 12: 1829-1841
17. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. (2020) The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*, 145: 16-27
 18. Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL. (2010) The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, 45: 266-276
 19. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59-65
 20. Ahmed I, Roy BC, Khan SA, Septer S, Umar S. (2016) Microbiome, metabolome and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, 4: 20
 21. Gong D, Gong X, Wang L, Yu X, Dong Q. (2016) Involvement of Reduced Microbial Diversity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Res Pract*, 2016: 6951091
 22. Reinisch W. (2017) Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis*, 35: 123-126
 23. Fuentes S, de Vos WM. (2016) How to Manipulate the Microbiota: Fecal Microbiota Transplantation. *Adv Exp Med Biol*, 902: 143-153
 24. Levine A, Wine E, Assa A, Sigall Boneh R, Shaoul R, Kori M, Cohen S, Peleg S, Shamaly H, On A, Millman P, Abramas L, Ziv-Baran T, Grant S, Abitbol G, Dunn KA, Bielawski JP, Van Limbergen J. (2019) Crohn's Disease Exclusion Diet Plus Partial Enteral Nutrition Induces Sustained Remission in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, 157: 440-450 e448
 25. Humphreys WG, Parks TG. (1975) Crohn's disease in Northern Ireland--a retrospective survey of 159 cases. *Ir J Med Sci*, 144: 437-446

26. Monk M, Mendeloff AI, Siegel CI, Lilienfeld A. (1969) An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis among adults in Baltimore. II. Social and demographic factors. *Gastroenterology*, 56: 847-857
27. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, Fedorak R, Israel D, Blanchard JF. (2006) The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol*, 101: 1559-1568
28. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*, 100: 350-358
29. Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. (1992) Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut*, 33: 687-693
30. Danese S, Sans M, Fiocchi C. (2004) Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev*, 3: 394-400
31. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. (2006) A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*, 101: 993-1002
32. Timm S, Svanes C, Janson C, Sigsgaard T, Johannessen A, Gislason T, Jogi R, Omenaas E, Forsberg B, Toren K, Holm M, Braback L, Schlunssen V. (2014) Place of upbringing in early childhood as related to inflammatory bowel diseases in adulthood: a population-based cohort study in Northern Europe. *Eur J Epidemiol*, 29: 429-437
33. Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S, Chronische Autoimmunerkrankungen und Kontakt zu Tieren Study G. (2007) Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics*, 120: 354-361
34. Van Kruiningen HJ, Joossens M, Vermeire S, Joossens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, Cortot A, Colombel JF, Rutgeerts P, Vlietinck R. (2005) Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis*, 11: 360-365

35. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, Liao X, Higuchi LM, Fuchs CS, Spiegelman D, Richter JM, Korzenik JR, Chan AT. (2013) Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ*, 347: f6633
36. Ananthakrishnan AN, Long MD, Martin CF, Sandler RS, Kappelman MD. (2013) Sleep disturbance and risk of active disease in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11: 965-971
37. Ananthakrishnan AN. (2015) Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12: 205-217
38. Kinnucan JA, Rubin DT, Ali T. (2013) Sleep and inflammatory bowel disease: exploring the relationship between sleep disturbances and inflammation. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 9: 718-727
39. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. (2010) Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 105: 2687-2692
40. Koletzko S, Sherman P, Corey M, Griffiths A, Smith C. (1989) Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *BMJ*, 298: 1617-1618
41. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. (1994) Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*, 343: 766-767
42. Logan RF, Kay CR. (1989) Oral contraception, smoking and inflammatory bowel disease--findings in the Royal College of General Practitioners Oral Contraception Study. *Int J Epidemiol*, 18: 105-107
43. Rampton DS, Sladen GE. (1981) Relapse of ulcerative proctocolitis during treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Postgrad Med J*, 57: 297-299
44. Schwartz AG, Targan SR, Saxon A, Weinstein WM. (1982) Sulfasalazine-induced exacerbation of ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 306: 409-412
45. Gilat T, Dotan I. (1997) Ulcerative colitis and appendectomy. What is the nature of the (negative) association? *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 29: 212-213

46. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. (2002) Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*, 8: 277-286
47. Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M. (2007) The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut*, 56: 1387-1392
48. Tobin MV, Logan RF, Langman MJ, McConnell RB, Gilmore IT. (1987) Cigarette smoking and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 93: 316-321
49. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP. (2001) Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*, 120: 1093-1099
50. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, Israel D, Mack D, Ghadirian P, Deslandres C, Chotard V, Budai B, Law L, Levy E, Seidman EG. (2007) Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*, 102: 2016-2025
51. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. (2011) Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*, 106: 563-573
52. Gibson PR. (2017) Use of the low-FODMAP diet in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 32 Suppl 1: 40-42
53. Jorgensen SP, Agnholt J, Glerup H, Lyhne S, Villadsen GE, Hvas CL, Bartels LE, Kelsen J, Christensen LA, Dahlerup JF. (2010) Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*, 32: 377-383
54. Timmer A, Preiss JC, Motschall E, Rucker G, Jantschek G, Moser G. (2011) Psychological interventions for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006913
55. Wahed M, Corser M, Goodhand JR, Rampton DS. (2010) Does psychological counseling alter the natural history of inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*, 16: 664-669

56. Peloquin JM, Nguyen DD. (2013) The microbiota and inflammatory bowel disease: insights from animal models. *Anaerobe*, 24: 102-106
57. Fransen K, van Sommeren S, Westra HJ, Veenstra M, Lamberts LE, Modderman R, Dijkstra G, Fu J, Wijmenga C, Franke L, Weersma RK, van Diemen CC. (2014) Correlation of genetic risk and messenger RNA expression in a Th17/IL23 pathway analysis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 20: 777-782
58. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. (2016) Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22: 2195-2205
59. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, Hildner K, Hoffman A, Kiesslich R, Rink AD, Rau TT, Rose-John S, Kessler H, Schmidt J, Neurath MF. (2011) Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14(+) macrophages. *Gastroenterology*, 141: 2026-2038
60. Neurath MF. (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14: 329-342
61. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. (2016) Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 10: 989-997
62. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. (1996) A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med*, 183: 2669-2674
63. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. (2014) The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25: 45-55
64. Derynck R, Zhang YE. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425: 577-584
65. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, Becker C, Macdonald TT, Pallone F, Neurath MF, Monteleone G. (2009) Smad7 controls resistance of

- colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*, 136: 1308-1316, e1301-1303
66. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Boirivant M. (2003) TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*, 134: 120-126
 67. Khalili H, Chan SSM, Lochhead P, Ananthakrishnan AN, Hart AR, Chan AT. (2018) The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15: 525-535
 68. Mao L, Kitani A, Strober W, Fuss IJ. (2018) The Role of NLRP3 and IL-1beta in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 9: 2566
 69. Onishi RM, Gaffen SL. (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129: 311-321
 70. Zhu S, Qian Y. (2012) IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, 122: 487-511
 71. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, Wehkamp J, Feagan BG, Yao MD, Karczewski M, Karczewski J, Pezous N, Bek S, Bruin G, Mellgard B, Berger C, Londei M, Bertolino AP, Tougas G, Travis SP, Secukinumab in Crohn's Disease Study G. (2012) Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 61: 1693-1700
 72. Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O. (2008) Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 12-16
 73. Tian T, Wang Z, Zhang J. (2017) Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 4535194
 74. Espinosa-Diez C, Miguel V, Vallejo S, Sanchez FJ, Sandoval E, Blanco E, Cannata P, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF, Lamas S. (2018) Role of glutathione biosynthesis in endothelial dysfunction and fibrosis. *Redox Biol*, 14: 88-99

75. Piechota-Polanczyk A, Fichna J. (2014) Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387: 605-620
76. Hirota SA, Beck PL, MacDonald JA. (2009) Targeting hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling in therapeutics: implications for the treatment of inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 3: 1-16
77. Fagundes RR, Taylor CT. (2017) Determinants of hypoxia-inducible factor activity in the intestinal mucosa. *J Appl Physiol* (1985), 123: 1328-1334
78. Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, Kovacs JB, Varkonyi A, Solyom E, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Tomsits E, Csozszanszky N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Szucs D, Cseh A, Molnar K, Szabo D, Veres G, Hungarian IBDRG. (2012) Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohns Colitis*, 6: 86-94
79. Sawczenko A, Sandhu BK. (2003) Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child*, 88: 995-1000
80. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. (2002) The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*, 122: 875-880
81. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Martin de Carpi J, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC, European Society of Pediatric Gastroenterology H, Nutrition. (2014) ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 58: 795-806
82. Andrisani G, Guidi L, Papa A, Armuzzi A. (2012) Anti-TNF alpha therapy in the management of extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16: 890-901
83. Ott C, Scholmerich J. (2013) Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 585-595

84. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Lakatos PL. (2011) Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis*, 17: 2558-2565
85. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO, Van Assche G. (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*, 6: 965-990
86. Maggiori L, Panis Y. (2013) Surgical management of IBD--from an open to a laparoscopic approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 297-306
87. Oliva S, Thomson M, de Ridder L, Martin-de-Carpi J, Van Biervliet S, Braegger C, Dias JA, Kolacek S, Miele E, Buderus S, Bronsky J, Winter H, Navas-Lopez VM, Assa A, Chong SKF, Afzal NA, Smets F, Shaoul R, Hussey S, Turner D, Cucchiara S. (2018) Endoscopy in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper on Behalf of the Porto IBD Group of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 67: 414-430
88. Nitzan O, Elias M, Peretz A, Saliba W. (2016) Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22: 1078-1087
89. Hwang JM, Varma MG. (2008) Surgery for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 14: 2678-2690
90. Reinisch W, Dejaco C, Knoflach P, Petritsch W, Vogelsang H, Tilg H. (2004) [Immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: consensus by the Austrian working group on IBD]. *Z Gastroenterol*, 42: 1033-1045; discussion 1046-1037
91. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat*, 31: 763-780
92. Benjamin BT. (2008) Új eredmények a neurodegeneratív kórképek genetikája és kezelése területén p. p8, Semmelweis University, PhD értekezés

93. Kouli A, Torsney KM, Kuan W-L. (2018) Parkinson's disease: etiology, neuropathology, and pathogenesis. Exon Publications, 3-26
94. Miller DW, Ahmad R, Hague S, Baptista MJ, Canet-Aviles R, McLendon C, Carter DM, Zhu PP, Stadler J, Chandran J, Klinefelter GR, Blackstone C, Cookson MR. (2003) L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem*, 278: 36588-36595
95. 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: 1036-1048
96. Puschmann A. (2013) Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord*, 19: 407-415
97. <http://en.wikipedia.org/wiki/PARK7>. Vol. 2021.07.06.
98. Junn E, Jang WH, Zhao X, Jeong BS, Mouradian MM. (2009) Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J Neurosci Res*, 87: 123-129
99. Yanagida T, Tsushima J, Kitamura Y, Yanagisawa D, Takata K, Shibaie T, Yamamoto A, Taniguchi T, Yasui H, Taira T, Morikawa S, Inubushi T, Tooyama I, Ariga H. (2009) Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2: 36-42
100. 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: 722-728
101. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. (2004) DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol*, 2: e362
102. 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: 15091-15096

103. Shinbo Y, Taira T, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2005) DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *Int J Oncol*, 26: 641-648
104. 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: 14807-14812
105. Nishinaga H, Takahashi-Niki K, Taira T, Andreadis A, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2005) Expression profiles of genes in DJ-1-knockdown and L 166 P DJ-1 mutant cells. *Neurosci Lett*, 390: 54-59
106. 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: 1111-1116
107. Veres-Szekely A, Bernath M, Pap D, Rokonay R, Szebeni B, Takacs IM, Lippai R, Cseh A, Szabo AJ, Vannay A. (2020) PARK7 Diminishes Oxidative Stress-Induced Mucosal Damage in Celiac Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2020: 4787202
108. Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H, Mouradian MM. (2005) Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 9691-9696
109. Gao H, Yang W, Qi Z, Lu L, Duan C, Zhao C, Yang H. (2012) DJ-1 protects dopaminergic neurons against rotenone-induced apoptosis by enhancing ERK-dependent mitophagy. *J Mol Biol*, 423: 232-248
110. Zhou W, Freed CR. (2005) DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. *J Biol Chem*, 280: 43150-43158
111. Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ. (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468: 696-700
112. 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: 256-259
113. 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: 213-218
 114. Eltoweissy M, Muller GA, Bibi A, Nguye PV, Dihazi GH, Muller CA, Dihazi H. (2011) Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. *Mol Biosyst*, 7: 1277-1288
 115. Zhu XL, Wang ZF, Lei WB, Zhuang HW, Jiang HY, Wen WP. (2010) DJ-1: a novel independent prognostic marker for survival in glottic squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 101: 1320-1325
 116. Hod Y. (2004) Differential control of apoptosis by DJ-1 in prostate benign and cancer cells. *J Cell Biochem*, 92: 1221-1233
 117. 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: 229-237
 118. 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
 119. Waak J, Weber SS, Waldenmaier A, Gorner 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: 2478-2489
 120. Fan J, Ren H, Jia N, Fei E, Zhou T, Jiang P, Wu M, Wang G. (2008) DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity. *J Biol Chem*, 283: 4022-4030
 121. 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: 263-273

122. 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: 208-211
123. 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: 1885-1897
124. Richarme G, Dairou J. (2017) Parkinsonism-associated protein DJ-1 is a bona fide deglycase. *Biochem Biophys Res Commun*, 483: 387-391
125. Lima M, Baynes J. (2013) *Glycation*, Encyclopedia of Biological Chemistry
126. Toyoda Y, Erkut C, Pan-Montojo F, Boland S, Stewart MP, Muller DJ, Wurst W, Hyman AA, Kurzchalia TV. (2014) Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biol Open*, 3: 777-784
127. Kim DK, Kim HS, Kim AR, Kim JH, Kim B, Noh G, Kim HS, Beaven MA, Kim YM, Choi WS. (2013) DJ-1 regulates mast cell activation and IgE-mediated allergic responses. *J Allergy Clin Immunol*, 131: 1653-1662
128. Chien CH, Lee MJ, Liou HC, Liou HH, Fu WM. (2016) Microglia-Derived Cytokines/Chemokines Are Involved in the Enhancement of LPS-Induced Loss of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in DJ-1 Knockout Mice. *PLoS One*, 11: e0151569
129. Liu W, Wu H, Chen L, Wen Y, Kong X, Gao WQ. (2015) Park7 interacts with p47(phox) to direct NADPH oxidase-dependent ROS production and protect against sepsis. *Cell Res*, 25: 691-706
130. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. (1997) DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun*, 231: 509-513
131. He XY, Liu BY, Yao WY, Zhao XJ, Zheng Z, Li JF, Yu BQ, Yuan YZ. (2011) Serum DJ-1 as a diagnostic marker and prognostic factor for pancreatic cancer. *J Dig Dis*, 12: 131-137

132. Liu S, Yang Z, Wei H, Shen W, Liu J, Yin Q, Li X, Yi J. (2010) Increased DJ-1 and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 57: 1247-1256
133. Merikallio H, Paakko P, Kinnula VL, Harju T, Soini Y. (2012) Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) and DJ1 are prognostic factors in lung cancer. *Hum Pathol*, 43: 577-584
134. 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
135. Yuen HF, Chan YP, Law S, Srivastava G, El-Tanani M, Mak TW, Chan KW. (2008) DJ-1 could predict worse prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 3593-3602
136. Davidson B, Hadar R, Schlossberg A, Sternlicht T, Slipicevic A, Skrede M, Risberg B, Florenes VA, Kopolovic J, Reich R. (2008) Expression and clinical role of DJ-1, a negative regulator of PTEN, in ovarian carcinoma. *Hum Pathol*, 39: 87-95
137. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS, Li L. (2006) Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem*, 281: 10816-10824
138. Kahle PJ, Waak J, Gasser T. (2009) DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med*, 47: 1354-1361
139. 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: 643-651
140. Duan X, Kelsen SG, Merali S. (2008) Proteomic analysis of oxidative stress-responsive proteins in human pneumocytes: insight into the regulation of DJ-1 expression. *J Proteome Res*, 7: 4955-4961
141. 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: 592-604
142. Dongworth RK, Mukherjee UA, Hall AR, Astin R, Ong SB, Yao Z, Dyson A, Szabadkai G, Davidson SM, Yellon DM, Hausenloy DJ. (2014) DJ-1 protects against cell death following acute cardiac ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis*, 5: e1082
 143. Won KJ, Jung SH, Jung SH, Lee KP, Lee HM, Lee DY, Park ES, Kim J, Kim B. (2014) DJ-1/park7 modulates vasorelaxation and blood pressure via epigenetic modification of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*, 101: 473-481
 144. Won KJ, Jung SH, Lee CK, Na HR, Lee KP, Lee DY, Park ES, Choi WS, Shim SB, Kim B. (2013) DJ-1/park7 protects against neointimal formation via the inhibition of vascular smooth muscle cell growth. *Cardiovasc Res*, 97: 553-561
 145. Xu X, Martin F, Friedman JS. (2010) The familial Parkinson's disease gene DJ-1 (PARK7) is expressed in red cells and plays a role in protection against oxidative damage. *Blood Cells Mol Dis*, 45: 227-232
 146. Billia F, Hauck L, Grothe D, Konecny F, Rao V, Kim RH, Mak TW. (2013) Parkinson-susceptibility gene DJ-1/PARK7 protects the murine heart from oxidative damage in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 6085-6090
 147. Klawitter J, Klawitter J, Agardi E, Corby K, Leibfritz D, Lowes BD, Christians U, Seres T. (2013) Association of DJ-1/PTEN/AKT- and ASK1/p38-mediated cell signalling with ischaemic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 97: 66-76
 148. Yamaguchi S, Yamane T, Takahashi-Niki K, Kato I, Niki T, Goldberg MS, Shen J, Ishimoto K, Doi T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2012) Transcriptional activation of low-density lipoprotein receptor gene by DJ-1 and effect of DJ-1 on cholesterol homeostasis. *PLoS One*, 7: e38144
 149. Inberg A, Linial M. (2010) Protection of pancreatic beta-cells from various stress conditions is mediated by DJ-1. *J Biol Chem*, 285: 25686-25698
 150. Shi SY, Lu SY, Sivasubramaniyam T, Revelo XS, Cai EP, Luk CT, Schroer SA, Patel P, Kim RH, Bombardier E, Quadrilatero J, Tupling AR, Mak TW, Winer DA, Woo M. (2015) DJ-1 links muscle ROS production with metabolic reprogramming and systemic energy homeostasis in mice. *Nat Commun*, 6: 7415

151. Yoshida K, Sato Y, Yoshiike M, Nozawa S, Ariga H, Iwamoto T. (2003) Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. *Mol Reprod Dev*, 66: 391-397
152. Lee KJ, Terada K, Oyadomari S, Inomata Y, Mori M, Gotoh T. (2004) Induction of molecular chaperones in carbon tetrachloride-treated rat liver: implications in protection against liver damage. *Cell Stress Chaperones*, 9: 58-68
153. Yao Y, Wei H, Liu L, Liu L, Bai S, Li C, Luo Y, Zeng R, Han M, Ge S, Xu G. (2011) Upregulated DJ-1 promotes renal tubular EMT by suppressing cytoplasmic PTEN expression and Akt activation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 31: 469
154. Shen S, Wang J, Liang J, He D. (2013) Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol*, 31: 1395-1401
155. Kwon HS, Hwang HS, Sohn IS, Park SH. (2013) Expression of DJ-1 proteins in placentas from women with severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 168: 40-44
156. Zhang HJ, Siu MK, Jiang LL, Mak VC, Ngan HY, Cheung AN. (2010) Overexpression of the Parkinson disease protein DJ-1 and its regulator PTEN in gestational trophoblastic disease. *Int J Gynecol Pathol*, 29: 468-475
157. Rai P, Shivaji S. (2011) The role of DJ-1 in the pathogenesis of endometriosis. *PLoS One*, 6: e18074
158. El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, Kempenaar J, van der Schors R, Poncet M. (2004) Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. *Lab Invest*, 84: 102-112
159. Terracciano C, Nogalska A, Engel WK, Wojcik S, Askanas V. (2008) In inclusion-body myositis muscle fibers Parkinson-associated DJ-1 is increased and oxidized. *Free Radic Biol Med*, 45: 773-779
160. Jiang P, Siggers JL, Ngai HH, Sit WH, Sangild PT, Wan JM. (2008) The small intestine proteome is changed in preterm pigs developing necrotizing enterocolitis in response to formula feeding. *J Nutr*, 138: 1895-1901

161. 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: 1045-1057
162. Voros P, Sziksz E, Himer L, Onody A, Pap D, Frivolt K, Szebeni B, Lippai R, Gyorffy H, Fekete A, Brandt F, Molnar K, Veres G, Arato A, Tulassay T, Vannay A. (2013) Expression of PARK7 is increased in celiac disease. *Virchows Arch*, 463: 401-408
163. Di Narzo AF, Brodmerkel C, Telesco SE, Argmann C, Peters LA, Li K, Kidd B, Dudley J, Cho J, Schadt EE, Kasarskis A, Dobrin R, Hao K. (2019) High-Throughput Identification of the Plasma Proteomic Signature of Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 13: 462-471
164. Zhang J, Xu M, Zhou W, Li D, Zhang H, Chen Y, Ning L, Zhang Y, Li S, Yu M, Chen Y, Zeng H, Cen L, Zhou T, Zhou X, Lu C, Yu C, Li Y, Sun J, Kong X, Shen Z. (2020) Deficiency in the anti-apoptotic protein DJ-1 promotes intestinal epithelial cell apoptosis and aggravates inflammatory bowel disease via p53. *J Biol Chem*, 295: 4237-4251
165. Lev N, Barhum Y, Ben-Zur T, Aharony I, Trifonov L, Regev N, Melamed E, Gruzman A, Offen D. (2015) A DJ-1 Based Peptide Attenuates Dopaminergic Degeneration in Mice Models of Parkinson's Disease via Enhancing Nrf2. *PLoS One*, 10: e0127549
166. Glat MJ, Ben-Zur T, Barhum Y, Offen D. (2016) Neuroprotective Effect of a DJ-1 Based Peptide in a Toxin Induced Mouse Model of Multiple System Atrophy. *PLoS One*, 11: e0148170
167. Molcho L, Ben-Zur T, Barhum Y, Offen D. (2018) DJ-1 based peptide, ND-13, promote functional recovery in mouse model of focal ischemic injury. *PLoS One*, 13: e0192954
168. Inden M, Yanagisawa D, Hijioka M, Ariga H, Kitamura Y. (2017) Therapeutic Activities of DJ-1 and Its Binding Compounds Against Neurodegenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 1037: 187-202
169. Kitamura Y, Watanabe S, Taguchi M, Takagi K, Kawata T, Takahashi-Niki K, Yasui H, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2011) Neuroprotective effect of a

- new DJ-1-binding compound against neurodegeneration in Parkinson's disease and stroke model rats. *Mol Neurodegener*, 6: 48
170. Ibd Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology H, Nutrition. (2005) Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41: 1-7
 171. de Bie CI, Buderus S, Sandhu BK, de Ridder L, Paerregaard A, Veres G, Dias JA, Escher JC, ESPGHAN EPIWGo. (2012) Diagnostic workup of paediatric patients with inflammatory bowel disease in Europe: results of a 5-year audit of the EUROKIDS registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 54: 374-380
 172. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle J. (1991) Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 12: 439-447
 173. Dotson JL, Crandall WV, Zhang P, Forrest CB, Bailey LC, Colletti RB, Kappelman MD. (2015) Feasibility and validity of the pediatric ulcerative colitis activity index in routine clinical practice. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 60: 200
 174. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Troncone R, Auricchio R, Castillejo G, Christensen R, Dolinsek J, Gillett P, Hrobjartsson A, Koltai T, Maki M, Nielsen SM, Popp A, Stordal K, Werkstetter K, Wessels M. (2020) European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 70: 141-156
 175. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. (2012) Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*,
 176. Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401: 318-320
 177. Hammer T, Nielsen KR, Munkholm P, Burisch J, Lyng E. (2016) The Faroese IBD Study: Incidence of Inflammatory Bowel Diseases Across 54 Years of Population-based Data. *J Crohns Colitis*, 10: 934-942

178. Leung JM, Davenport M, Wolff MJ, Wiens KE, Abidi WM, Poles MA, Cho I, Ullman T, Mayer L, Loke P. (2014) IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol*, 7: 124-133
179. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jurgens M, Schmechel S, Konrad A, Goke B, Ochsenkuhn T, Muller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. (2008) Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 14: 437-445
180. Kaistha A, Levine J. (2014) Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 44: 328-334
181. Poggi A, Benelli R, Vene R, Costa D, Ferrari N, Tosetti F, Zocchi MR. (2019) Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. *Front Immunol*, 10: 961
182. Geboes K. (2001) Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis--how important is it to differentiate? *Acta Gastroenterol Belg*, 64: 197-200
183. Guindi M, Riddell RH. (2004) Indeterminate colitis. *J Clin Pathol*, 57: 1233-1244
184. Holtta V, Klemetti P, Sipponen T, Westerholm-Ormio M, Kociubinski G, Salo H, Rasanen L, Kolho KL, Farkkila M, Savilahti E, Vaarala O. (2008) IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 14: 1175-1184
185. Ruiz de Morales JMG, Puig L, Dauden E, Canete JD, Pablos JL, Martin AO, Juanatey CG, Adan A, Montalban X, Borrueal N, Orti G, Holgado-Martin E, Garcia-Vidal C, Vizcaya-Morales C, Martin-Vazquez V, Gonzalez-Gay MA. (2020) Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev*, 19: 102429
186. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52: 65-70

187. Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R, Zhang H. (2014) Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*, 63: 943-950
188. Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, Lee Y, Kim HH. (2009) IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ*, 16: 1332-1343
189. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR. (2010) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*, 24: 1023-1034
190. Oh SE, Mouradian MM. (2018) Cytoprotective mechanisms of DJ-1 against oxidative stress through modulating ERK1/2 and ASK1 signal transduction. *Redox Biol*, 14: 211-217
191. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. (2013) Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am J Pathol*, 182: 375-387
192. Matricon J, Barnich N, Ardid D. (2010) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*, 1: 299-309
193. Wang H, Gu J, Hou X, Chen J, Yang N, Liu Y, Wang G, Du M, Qiu H, Luo Y, Jiang Z, Feng L. (2017) Anti-inflammatory effect of miltirone on inflammatory bowel disease via TLR4/NF-kappaB/IQGAP2 signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 85: 531-540
194. Khasnavis S, Pahan K. (2012) Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7: 424-435
195. Gao W, Shao R, Zhang X, Liu D, Liu Y, Fa X. (2017) Up-regulation of caveolin-1 by DJ-1 attenuates rat pulmonary arterial hypertension by inhibiting TGFbeta/Smad signaling pathway. *Exp Cell Res*, 361: 192-198
196. Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2001) DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *J Biol Chem*, 276: 37556-37563

197. Takahashi-Niki K, Inafune A, Michitani N, Hatakeyama Y, Suzuki K, Sasaki M, Kitamura Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. (2015) DJ-1-dependent protective activity of DJ-1-binding compound no. 23 against neuronal cell death in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Sci*, 127: 305-310
198. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27: 485-517
199. de Souza HS, Fiocchi C. (2016) Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13: 13-27
200. Ihara S, Hirata Y, Koike K. (2017) TGF-beta in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J Gastroenterol*, 52: 777-787

10. Ábrák- és táblázatok jegyzéke

10.1. Ábrák jegyzéke

1. ábra: **A gyulladásoos bélbetegségekről (IBD) szoló publikációk számának évről-évre való növekedése az elmúlt 30 évben a PubMed adatbázis alapján [4].**

2. ábra: **Az IBD patomechanizmusának sematikus összefoglalása.** A fontosabb genetikai, környezeti és immunológiai faktorok összegzése. (Saját ábra az irodalmi adatok alapján.)

Rövidítések: ab- antibiotikum, *ATLG16L1*- autophagia-related protein 16-1, *CARD*- caspase recruitment domain, *DLG*- disc large homolog, *HLA*- humán leukocytá antigén, IBD- gyulladásoos bélbetegség, IFN- interferon, *IRGM*- immunity-related GTPase family M protein, *NOD*- nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein, NSAID- nonszteroid gyulladásooscsökkentő, ROS- reaktív oxigén gyök, *SLC*- solute carrier family 22 member, TGF- tumor növekedési faktor, TNF- tumor nekrozis faktor.

3. ábra: **A Parkinson's disease (PARK) 7 alapvető funkcióinak irodalmi adatokra alapozott összegzése.** A PARK7 által regulált biológiai folyamatok áttekintő összefoglalása. (Saját ábra.)

Rövidítések: Akt- protein kináz B, Ask- apoptózis szignál regulált kináz, FGFR- fibroblast growth factor receptor, HIF- hypoxia indukált faktor, IL- interleukin, iNOS- indukálható nitrogén monoxid szintáz, JNK- c-Jun N-terminal kinases, MEKK- mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz, MKK- mitogen-activated protein kinase kinase, mTOR- mammalian target of rapamycin, NO- nitrogén monoxid, *Nrf*- nuclear factor erythroid 2-related factor, p38 MAPK- p38 mitogén-aktivált protein kináz, PARK- Parkinson's disease, ROS- reaktív oxigén gyök, TLR- Toll like receptor, TNF- tumor nekrozis faktor, UCP- uncoupling protein.

4. ábra: **A Parkinson's disease (PARK)7 molekula nem-daganatos és nem-neurológiai kórképekben.** (Saját ábra.)

Rövidítések: COPD-krónikus obstruktív tüdőbetegség, NEC- necrotizáló enterocolitis, NSAID-non-szteroid gyulladáscsökkentő, PARK – Parkinson's disease.

5. ábra. A Parkinson's disease 7 (*PARK7*) mRNS expressziója, fehérje mennyisége és lokalizációja coeliakiás, gluténmentes diétát tartó (GFD) és kontroll gyermekek duodenális mucosájában (A), valamint Crohn-beteg (CD) gyermekek ép és gyulladt, colitis ulcerosás (UC) és kontroll gyermekek colon nyálkahártyájában (B).

Az mRNS expressziót valós idejű RT-PCR (n=10-13), a fehérje mennyiséget Western blot (n=6-10) segítségével mértük, a lokalizáció vizualizálásához immunhisztológiai festést (*PARK7* - piros (A) / zöld (B)) használtunk. A relatív mennyiségeket belső kontrollként a *GAPDH* (A) vagy *RPLP0* (B) mRNS és *GAPDH* fehérje (B) mennyiségéhez viszonyítottuk. Az adatokat a hozzájuk tartozó kontrollhoz normalizáltuk. A képek a Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal készültek. Nagyítás: 20µm, 50µm vagy 60µm. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festékkel vizualizáltuk. A statisztikai analízishez ordinary one-way ANOVA (Holm-Sidak multiplex összehasonlítás) és Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. #p<0,05 a csatolt csoportok összehasonlítása. A nyilak a kripta epithel sejteit, a * szimbólumok a lamina propriát jelzik.

6. ábra. Az interleukin (IL)-17 (100ng/ml, 24h) (A, B, C, E, F), hidrogén peroxid (H₂O₂, 20uM, 24h) (C, F), tumor nekrosis faktor (TNF)-α (10ng/ml, 24h) (C, F), tumor növekedési faktor (TGF)-β (1nM, 24h) (C, F), lipopoliszacharid (LPS) (100ng/ml, 24h) (D, G) és a NADPH-oxidáz inhibitor diphenilén-jodionium chlorid (DPI) (5uM, 30 perc) előkezelés (E) hatása a HT-29 colon epithelialis sejtek Parkinson's disease (PARK)7 termelésére (n=4-6).

A mérést áramlási cytometriával (C, F), Western blottal (D, G) és valós idejű RT-PCR-el (E) végeztük, a lokalizáció vizualizálásához immuncytológiai festést (A: IL-17R-piros, B: *PARK7*-zöld) használtunk. A relatív mennyiségeket belső kontrollként a *GAPDH* mRNS (E) illetve az összfehérje (D, G) mennyiségéhez viszonyítottuk. Az adatokat a hozzájuk tartozó vehikulum kezelt kontrollhoz

normalizáltuk. A képek a Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal készültek. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festékkel vizualizáltuk. Nagyítás: 60 μ m. A statisztikai analízishez Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. #p<0,05 a csatolt csoportok összehasonlítása.

7. ábra. Az interleukin (*IL*)-17 (A), tumor nekrozis faktor (*TNF*)- α (B) és Parkinson's disease (*PARK*)7 (C, D, E) mRNS expressziója (A, B, C) és fehérje mennyisége (D, E) a vad típusú (WT) (A-E) és *IL17* knock out (*IL17*-/-) (B-E) egerek colon mucosájából a dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitis harmadik (WT3, *IL17*-/-3), ötödik (WT5, *IL17*-/-5) és hetedik (WT7, *IL17*-/-7) napján, valamint a kontroll csoportban (WT0, *IL17*-/-0).

Az mRNS expressziókat valós idejű RT-PCR (A-C), a *PARK7* fehérje mennyiséget (D-E) Western blot mérésrel detektáltuk (n=5-6). A relatív mennyiségeket a *GAPDH* mRNS (A-C) és a β -aktin fehérje (D-E) szinthez, mint belső kontrollhoz hasonlítottuk, az eredményeket WT0 csoportra normalizáltuk. A statisztikai analízist two-way ANOVA teszt segítségével végeztük. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. #p<0,05 a csatolt csoportok összehasonlítása.

8. ábra. A Parkinson's disease (*PARK*)7 (A, C, F, G), tumor nekrozis faktor (*TNF*)- α (B, D, E), interleukin (*IL*)-1 β (B, D), *IL-6* (B, D), *IL-10* (B, D) és tumor növekedési faktor (*TGF*)- β (B, D) mRNS expressziója (A, B, C, D) és fehérje mennyisége (A, C, E, F, G) *IL-17* (100ng/ml, 24h) indukció nélkül (A, B, F) és indukcióval (C, D, E, G) HT-29 sejtekben *PARK7* specifikus kis interferáló (si)RNS, vagy kontroll scrambled (sc)RNS kezelést követően.

Az mRNS expressziókat valós idejű RT-PCR (A, B, C, D), a *PARK7* fehérje mennyiséget Western blot (A, C, F, G), a *TNF*- α fehérje mennyiséget pedig ELISA (E) módszerrel mértük (n=4-6). A relatív mennyiségeket a *GAPDH* mRNS (A, B, C, D) és *GAPDH* (A, F) vagy β -aktin fehérje (C, G) szinthez, mint belső kontrollhoz hasonlítottuk, az eredményeket a vehikulum kezelt csoportra normalizáltuk. A statisztikai analízist Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis teszt

segítségével végeztük. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. # $p < 0,05$ a csatolt csoportok összehasonlítása.

9. ábra. **Betegség aktivitási index (DAI) (B), a testsúly (A), a lépsúly (C), a hisztológia (D-E), a tumor nekrosis faktor (TNF)- α (F), tumor növekedési faktor (TGF)- β (G), interleukin (IL)-1 β (H), IL-6 (I) és IL-10 (J) mRNS expressziója, valamint a Parkinson's disease (PARK)7 fehérje mennyisége (K-L) a kontroll, dextrán nátrium szulfát (DSS), Comp23 és DSS+Comp23 kezelt vad típusú egerekben (n=5-7).**

A DAI-t (B) és testsúlycsökkenést (A) a 10. napon, a lépsúlyt (C) a 7. és 10. napon, a HE és PAS festést és hisztológiai értékelést (D, E), valamint a molekuláris biológiai méréseket (F, G, H, I, J, K, L) a 7. napon terminált kísérletből végeztük. A fekete nyilak a gyulladással sejt infiltrációt, valamint a sérült kriptákat és mikrovillusokat jelzik. Scale bar: 1mm vagy 200 μ m. A TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6 és IL-10 mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel (F, G, H, I, J), a PARK7 fehérje szintjét Western blot (K-L) módszerrel határoztuk meg. A relatív mRNS expressziókat belső kontrollként *Rn18S* mRNS-hez (F, G, H, I, J), a relatív PARK7 fehérje mennyiséget β -aktinhez (K-L) viszonyítva adtuk meg, az eredményeket a kontroll csoportra normalizáltuk. A statisztikai analízist two-way ANOVA teszt segítségével végeztük. Az eredmények ábrázolása: átlag+SEM. A pontok az egyedi mintákat ábrázolják. * $p < 0,05$ Kontroll vs. DSS az adott napon, ** $p < 0,05$ DSS vs DSS + Comp23 adott napon, # $p < 0,05$ a csatolt csoportok összehasonlítása.

10.2. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. **A gyermekkori gyulladással bélbetegség (IBD) két formájának összehasonlítása.**

Rövidítések: ANCA- anti-neutrophil citoplazmatikus antitest, ASCA- anti-saccharomyces cerevisiae elleni antitest, CRC- colorectalis carcinoma, GI- gasztrointestinalis, IBD- gyulladással bélbetegség, Th- T-helper sejt.

2. táblázat. A Parkinson's disease (PARK) géncsalád tagjai és szerepük az örökletes Parkinson-szindrómában.

Rövidítések: AD- autoszomális domináns, AR- autoszomális recesszív, *DJ-1*- PARK7, *EIF4G1*- Eukaryóta transzláció iniciációs faktor 4 gamma 1, *FBXO7*- F-box only protein 7, *LRRK2*- Leucine-rich repeat kináz 2, *NBIA*- neurodegeneration with brain iron accumulation, *PARK*- Parkinson's disease, *PINK1*- phosphatase és tensin homolog (PTEN) induced putative kináz 1, *PLA2G6*-Phospholipáz A2, group VI, *SYNJ1*- Synaptojanin-1, *UCH-L1*- ubiquitin C-terminalis hidroláz L1, *VPS*- Vacuolar protein sorting-associated protein.

3. táblázat. A vizsgált kontroll és gyulladássos bélbeteg (IBD) gyermekek klinikai karakterizálása.

* $p < 0,05$ vs. Kontroll. **Aktivitási pontszám: Paediatric Crohn's Disease /Ulcerative Colitis Activity Index (PCDAI/PUCAI).

Rövidítések: BMI- testtömeg index; CD- Crohn-betegség, CRP- C-reactive protein, RT-PCR- valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció, UC- colitis ulcerosa, WB- Western blot.

4. táblázat. A vizsgált kontroll, frissen diagnosztizált coeliakias és gluténmentes diétát tartó (GFD) coeliakias gyermekek klinikai karakterizálása.

5. táblázat. A Comp23 hatás vizsgálatának kísérleti felállása vad típusú (WT) egerek dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitisben.

A kísérlet során a WT egerek 10 napig tiszta vizet (Kontroll és Comp23 csoport) vagy 7 napig 2,5% DSS-es vizet kaptak, azt követően pedig 3 napig tiszta vizet ittak (DSS és DSS+Comp23 csoport). Az állatokat naponta intraperitonealisan Comp23-al (Comp23 és DSS+Comp23 csoport) vagy vehikulummal (Kontroll és DSS csoport) kezeltük. A testsúly változását és betegség aktivitási indexet (DAI) a teljes kísérlet alatt monitorizáltuk. A kísérletsort a 7. vagy 10. napon termináltuk. A lépsúlyt a 7. és 10. napon terminált kísérleti felállásban is megmértük. A molekuláris biológiai méréseket a 7. napon terminált kísérleti mintákból végeztük.

6. táblázat. **Az állatok betegség aktivitási indexének (DAI) számítása a széklet konzisztencia, a széklet vér és az általános állapot skála alapján.**

7. táblázat. **A real time (RT)-polimeráz láncreakcióban (PCR) alkalmazott primer párok nukleotid szekvenciája, a keletkező termékek hossza és az anellációs hőmérsékletek.**

Rövidítések: bp-bázispár, *GAPDH*- glyceraldehid 3-phosphát dehydrogenáz, h-humán, *IL*- interleukin, m- mouse (egér), *PARK*- Parkinson's disease, *RPLP0*-ribosomális protein lateral stalk subunit P0, Ta- anellációs hőmérséklet, *TGF*- tumor növekedési faktor, *TNF*- tumor nekrosis faktor.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti, nemzetközi publikációk

1. Vörös P, Sziksz E, Himer L, Ónody A, Pap D, Frivolt K, Szebeni B, **Lippai R**, Gyórfy H, Fekete A, Brandt F, Molnár K, Veres G, Arató A, Tulassay T, Ádám Vannay. (2013) Expression of PARK7 is increased in celiac disease. *Virchows Arch.* 2013 Sep;463(3):401-8. IF=2,560
2. Apor Veres-Székely, Mária Bernáth, Domonkos Pap, Réka Rokonay, Beáta Szebeni, István M. Takács, **Rita Lippai**, Áron Cseh, Attila J. Szabó, and Ádám Vannay. (2020) PARK7 Diminishes Oxidative Stress-Induced Mucosal Damage in Celiac Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Sep 5;2020:4787202. IF=6,543
3. **Rita Lippai**, Apor Veres-Székely, Erna Sziksz, Yoichiro Iwakura, Domonkos Pap, Réka Rokonay, Beáta Szebeni, Gábor Lotz, Nóra J Béres, Áron Cseh, Attila J Szabó, Ádám Vannay. (2021) Immunomodulatory role of Parkinson's disease 7 in inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2021 Jul 16;11(1):14582. IF= 4.379

11.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent, eredeti, nemzetközi publikációk

1. Sziksz E, Molnar K, **Lippai R**, Pap D, Onody A, Veres-Szekely A, Voros P, Szabo D, Gyorffy H, Veres G, Tulassay T, Vannay A, Arato A. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and thymic stromal lymphopietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Arch.* 2014 Oct;465(4):385-93. IF= 2,651
2. Domonkos Pap, Erna Sziksz, Zoltán Kiss, Réka Rokonay, Apor Veres-Székely, **Rita Lippai**, István Márton Takács, Éva Kis, Andrea Fekete, György Reusz, Attila J Szabó, Adam Vannay. (2017) Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Ureteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling. *Kidney Blood Press Res.* 2017;42(1):16-32. IF=3,000

3. Apor Veres-Székely, Domonkos Pap, Erna Sziksz, Eszter Jávorszky, Réka Rokony, **Rita Lippai**, Kálmán Tory, Andrea Fekete, Tivadar Tulassay, Attila J Szabó, Ádám Vannay. (2017) Selective measurement of α smooth muscle actin: why β -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. BMC Mol Biol. 2017 Apr 27;18(1):12. IF= 2,795
4. Judit Béres N, Kiss Z, Müller KE, Cseh Á, Veres-Székely A, **Lippai R**, Benkő R, Bartha Á, Heininger S, Vannay Á, Sziksz E, Veres G, Horváth EM. (2018) Role of microRNA-223 in the regulation of poly(ADP-ribose) polymerase in pediatric patients with Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 2018 Sep;53(9):1066-1073. IF=2,152
5. Rokony R, Veres-Székely A, Szebeni B, Pap D, **Lippai R**, Béres NJ, Veres G, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Role of IL-24 in the mucosal remodeling of children with coeliac disease. J Transl Med. 2020 Jan 23;18(1):36. IF= 5,531
6. Pap D, Veres-Székely A, Szebeni B, Rokony R, Ónody A, **Lippai R**, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F, Fekete A, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Characterization of IL-19, -20, and -24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. J Transl Med. 2020 Apr 19;18(1):172. IF= 5,531

11.3. Az értekezés témájában megjelent magyar nyelvű összefoglaló publikációk

1. Lippai Rita, Sziksz Erna, Rokony Réka, Pap Domonkos, Veres-Székely Apor, Fekete Andrea, Szabó Attila, Vannay Ádám. Célzott géncsendesítés siRNS interferenciával. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 66:(6) pp. 350-351. (2015)
2. Sziksz Erna, Lippai Rita, Matyikánics Cintia, Pap Domonkos, Fekete Andrea, Szabó J Attila, Vannay Ádám. A Parkinson's disease 7 molekula jelentősége és funkciója. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 67:(1) pp. 18-20. (2016)

11.4. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent, magyar nyelvű összefoglaló publikációk

1. **Lippai Rita**, Veres-Székely Apor, Sziksz Erna, Szebeni Beáta, Ónody Anna, Pap Domonkos, Veres Gábor, Arató András, Tulassay Tivadar, Vannay Ádám. A hősokk fehérjék szerepe coeliakiában. *ORVOSKÉPZÉS* 88:(2) pp. 286-291. (2013)
2. Rokonay Réka, Sziksz Erna, **Lippai Rita**, Pap Domonkos, Veres-Székely Apor, Reusz György, Szabó Attila, Vannay Ádám. A vesefibrózisban szerepet játszó szignalizációs útvonalak. *HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA* 18:(3-4) pp. 72-75. (2014)
3. Makovický Peter, Makovický Pavol, **Lippai Rita**, Sziksz Erna, Samasca Gabriel. A harántcsíkolt izomrostok fejlődése és növekedése. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA* 137: pp. 559-567. (2015)
4. Takács István Márton, Rokonay Réka, **Lippai Rita**, Sziksz Erna, Szabó J Attila, Vannay Ádám. Rekombináns fehérjék előállítására szolgáló expressziós rendszerek. *GYERMEKGYÓGYÁSZAT* 67:(4) pp. 198-199. (2016)

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Vannay Ádámnak, a Kutató Laboratórium vezetőjének, hogy kutatói gondolkodásmódjával példaként állt előttem és mindig a következő kérdés megválaszolására sarkallt. Hálás vagyok Neki a rengeteg hasznos szakmai segítségért és a világ más kérdéseit is gyakran érintő szemléletformálásért.

Köszönöm Dr. Szabó J. Attila és Dr. Tulassay Tivadar Professzor Uraknak, hogy a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekklinika Kutató Laboratóriumában lehetőséget biztosítottak számomra a kutatómunka elvégzéséhez.

Köszönöm kutatócsoportunk valamennyi tagjának, Dr. Rokony Rékának, Dr. Ónódy Annának, Takács István Mártonnak, Dr. Szebeni Beátának, de főként Dr. Veres-Székely Apornak, Dr. Pap Domonkosnak és Bernáth Máriának, hogy baráti légkörben, fáradtságot nem ismerve segítettek a kísérletek elvégzésében, az eredmények kiértékelésében, valamint a publikálásban.

Köszönöm Dr. Sziksz Ernának, hogy munkámat, fejlődésemet mindvégig szakmailag és barátilag egyaránt támogatta és segítette.

Köszönöm a Kutató Laboratórium valamennyi munkatársának, hogy baráti légkört teremtettek és biztatásukkal nagymértékben hozzájárultak e dolgozat megszületéséhez.

Köszönöm Dr. Arató András Professzor Úrnak, hogy már TDK-s koromban a kutatói munka irányába terelgetett, és tanácsaival minden szükséges alkalommal segítséget nyújtott.

Köszönöm Dr. Veres Gábornak[†], Dr. Dezsőfi-Gottl Antalnak, Dr. Cseh Áronnak, Dr. Béres Nóra Juditnak, Dr. Müller Katalin Eszternek és Kis Zoltánnak, valamint a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekklinika Gasztroenterológiai és hepatológiai osztály és ambulancia valamennyi munkatársának a humán minták gyűjtésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Családom, legfőképpen Szüleim és Férjem szeretetét, rendkívüli támogatását, türelmét és biztatását, mely nélkül e munka sem jöhetett volna létre.