

# Az interleukin-24 szerepe a cöliákia patomechanizmusában

Doktori tézisek

**Rokonay Réka**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Menyhart Otília, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Szántai-Kis Csaba, Ph.D., vezető kutató

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Szabó András, D.Sc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szokol Bálint, Ph.D., kutató vegyész  
Dr. Tomsits Erika, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2022

## 1. Bevezetés

A cöliákia, más néven gluténszenzitív enteropátia, vagy lisztérzékenység, egy első sorban a vékonybelet érintő autoimmun megbetegedés, amelyet a táplálékkal a béllumenbe kerülő glutén vált ki az arra genetikailag fogékony egyéneknél. A cöliákia az enteropátia mellett számos, ugyancsak a glutén immunogén hatásához köthető extraintesztinális tünettől járhat, valamint a vérben specifikus autoantitestek jelennek meg, ezért szisztémás, egész szervezetet érintő kórképnek is tekinthető. A cöliákia gyakorisága magas, a népesség mintegy 1%-át érinti világszerte, és előfordulása folyamatosan növekvő tendenciát mutat. Jelenleg egyetlen igazán hatékony terápiája az élethosszig tartó szigorú glutén mentes diéta (gluten-free diet, GFD), amely az esetek nagyrésztében a bálnyalakahártyát károsító kórfolyamat leállítását és a tünetek teljes remisszióját eredményezi. Azonban a rendkívül nagy teher, amit a GFD betartása ró a betegekre, valamint a terápiára nem reagáló, úgynevezett refrakter esetek egyre növekvő száma új terápiás megoldások keresését teszi indokolttá. Ennek érdekében a cöliákia patomechanizmusának minél pontosabb megismerése szükséges.

A tápcsatorna funkciójából következően a bélhám a lumen felől folyamatos mechanikai, biológiai és kémiai ingereknek van kitéve, ezért a bél epitél sejtjeinek károsodása és regenerációja állandóan jelen lévő, rendkívül precízen szabályozott, egymással párhuzamosan zajló folyamat. Az epitél réteg megújulásához nélkülözhetetlen az epitélium alapjaként szolgáló bazális membrán, amelynek komponenseit, kollagéneket, fibronektint, laminint és egyéb extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéket a miofibroblasztok termelik. Cöliakiában a glutén közvetlen citotoxicitása, valamint a lamina propria bejutva az általa indukált kóros immunreakció és a krónikussá váló gyulladás

következtében az epitélium pusztulása fokozódik, és ezt a fokozott mértékű sejthalált a regeneráció nem tudja követni, az egészséges állapotra jellemző kényes egyensúly felbomlik. Így a bélnyálkahártyában kóros szöveti átrendeződés következik be, ami mikroszkóposan boholyatrófiában és kripta hiperpláziában nyilvánul meg.

Az interleukin (IL)-20 citokin alcsaládba öt citokin, az IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 és az IL-26 tartozik. Ezek közül is külön csoportot alkot az IL-19, IL-20 és IL-24, melyek közös, heterodimer receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Irodalmi ismereteink alapján a citokin alcsalád tagjait számos sejttípus termelheti, forrásai lehetnek immunsejtek, illetve szöveti sejtek, így keratinociták, epitel és endotél sejtek, valamint fibroblasztok. Elsődlegesen a szervezet védekezési rendszerében, immunfolyamatok regulációjában és a szövet homeosztázisának fenntartásában való közreműködésük ismert. Az elmúlt években krónikus gyulladással és szöveti átrendeződéssel járó betegségek patomechanizmusában játszott szerepüket több tanulmány is felvetette. Kutatócsoportunk kimutatta az IL-24 fokozott expresszióját gyulladással járó bélbetegségben, valamint krónikus vesebetegségben szenvedő betegek szövetmintáin, más kutatócsoportok pedig a citokin alcsalád tagjainak pszoriázisban és reumatoid artritiszben való emelkedett mennyiségét írták le.

## 2. Célkitűzés

Munkánk során a cöliákia patomechanizmusának pontosabb megértésére törekedtünk, különös tekintettel a gyulladt nyálkahártyában lejátszódó szöveti átrendeződés folyamataira. Vizsgálataink fókuszpontjában az IL-20 citokin alcsalád molekulái álltak.

Célkitűzéseink a következők voltak:

- A szöveti átrendeződésre jellemző markerek vizsgálata vékonybél nyálkahártyában.
- Az IL-19, IL-20, IL-24 citokinek és receptoruk génexpressziójának, illetve a fehérjetermékek mennyiségének vizsgálata egészséges, illetve cöliákiás gyerekek bélmintáiban.
- Annak megállapítása, hogy mely sejttípusok felelősek az IL-19, IL-20, IL-24 citokinek termeléséért a bélben.
- A cöliákia patomechanizmusában igazoltan szerepet játszó gyulladáshoz kapcsolódó citokinek hatásának vizsgálata az IL-19, IL-20, IL-24, valamint az IL-20RA, IL-20RB, és IL-22RA receptor alegységek expressziójára.
- Az IL-24 szerepének megismerése a bél szöveti átrendeződésének folyamatában, a nyálkahártya epitél sejtjeire és a duodenális miofibroblasztokra kifejtett hatásának vizsgálata által.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Duodénum biopsziák

Az *IL19*, *IL20*, *IL24*, *IL20RB* mRNS, valamint az IL-24, IL-20RB,  $\alpha$ -simaizom aktin ( $\alpha$ -SMA) és fibronectin (FN) fehérje mennyiségét 16 frissen diagnosztizált cöliákiás, és 14 kontroll gyermek duodenumából származó biopsziás mintában vizsgáltuk. Minden cöliákiás gyermeknél igazolható volt a boholyatrófia, valamint az emelkedett szöveti transzglutamináz szint. A kontroll csoportba tartozó gyermekeknél krónikus hasmenés, krónikus hasfájás, vagy növekedési elmaradás diagnosztikai algoritmus miatt került sor felső endoszkópiás mintavételre, azonban esetükben a duodenális nyálkahártya szövettanilag épnek bizonyult.

#### 3.2. Sejtkultúrák és kezelések

*In vitro* vizsgálatainkat FHs74Int duodenális epitél sejtvonalon, kontroll gyermekek duodénum nyálkahártyájából származó primer miofibroblaszt (pdMF) sejttenyészetben, valamint kontroll és cöliákiás gyermekek perifériás vérből izolált mononukleáris sejteken (PBMC) végeztük.

A sejtek *IL19*, *IL20*, *IL24*, *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS- és IL-24 fehérje expresszióját kezeletlen állapotban, valamint IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , vagy IL-17 kezelést követően vizsgáltuk.

Az IL-24 szöveti átrendeződésben betöltött szerepét H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés által oxidatív károsodásnak kitett FHs74Int sejteken, valamint PDGF-B-vel vagy TGF- $\beta$ -val aktivált pdMF-eken vizsgáltuk. A 24 órás, 0,1 ng/ml rekombináns IL-24 kezelést követően a sejtek életképességét, morfológiáját, kollagéntermelését, illetve az mRNS expresszióban bekövetkező változásokat mértük.

### **3.3. Immunfluoreszcens festés**

Az IL-24, IL-20RB,  $\alpha$ -SMA, illetve az aktin fehérjék szövetmintákon, illetve FHs74Int és primer miofibroblaszt sejteken való jelenlétének, illetve lokalizációjának meghatározása érdekében immunfluoreszcens festéseket végeztünk el. A sejtmagokat Hoechst 33342 festék segítségével tettük láthatóvá. A képeket Nikon C2 konfokális, vagy Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóp rendszerrel készítettük.

A primer miofibroblasztok  $\alpha$ -SMA stresszrostjának orientációját grafikus módszerrel, ImageJ szoftver segítségével számszerűsítettük.

### **3.4. mRNS expresszió meghatározása**

A kísérleteink során a szövetmintákban, illetve sejtekben végbemenő génexpressziós változásokat RNS izolálást, majd komplementer DNS szintézist követően valós idejű (RT) PCR-rel vizsgáltuk. A különböző célgének expresszióját az *RPLP0* referenciagénre vonatkoztatva, majd a kontroll csoportok átlagértékre normalizálva határoztuk meg.

### **3.5. Fehérjék mennyiségi meghatározása**

A bélszövetminták IL-24,  $\alpha$ -SMA és FN mennyiségét Western blot módszerrel, az FHs74Int sejtek, pdMF-ek, és PBMC-k IL-24 termelését ELISA-val vizsgáltuk. A fehérjék relatív mennyiségét Western blot módszer esetében a GAPDH belső kontroll hányadosaként, a kontroll szövetben kapott átlagértékre normalizálva határoztuk meg. ELISA mérés esetén a fehérjemennyiség meghatározása kalibrációs egyenes segítségével történt.

### **3.6. Életképességi vizsgálatok**

A sejtek életképességét a különböző kezeléseket követően MTT sejtviabilitás teszt, LDH citotoxicitás teszt, illetve Annexin V apoptózis teszt segítségével vizsgáltuk.

### **3.7. Sirius Red teszt**

A pdMF-ek által termelt kollagén mennyiségének meghatározása Sirius Red teszttel történt.

### **3.8. Statisztika**

Az adatok normál eloszlását Kolmogorow-Smirnov teszt segítségével vizsgáltuk, teljesülése esetén két csoport esetén egymintás t-próbát, több csoport esetén varianciaanalízist (ANOVA) használtunk. Amennyiben az adatok nem normál-eloszlást mutattak, Mann-Whitney U-tesztet, vagy Kruskal-Wallis tesztet végeztünk. A többváltozós, assay jellegű vizsgálatainkból származó adatsorok összehasonlítását többszörös t-próba, illetve két-szemponos ANOVA segítségével végeztük el. Többcsoportos analízis esetén a páronkénti összehasonlításhoz Dunnett-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. A betegek biopsziáiban mért relatív génexpresszió és legfőbb klinikai paramétereik közti összefüggéseket Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk.

## 4. Eredmények

### 4.1. Az *IL-19*, *IL-20*, *IL-24*, *IL-20RB*, $\alpha$ -SMA és FN mennyiségének vizsgálata duodenum nyálkahártyában

A cöliákiás gyermekek mintáiban fokozott *IL24* mRNA expressziót detektáltunk a kontroll mintákhoz képest, az *IL19* mRNA mennyiségében azonban nem találtunk különbséget a vizsgált csoportok között, az *IL20* mRNA jelenlétét pedig egyik csoportban sem tudtuk kimutatni. A bélszövetben mért *IL24* mRNA expresszió mértéke nem mutatott korrelációt a betegek klinikai paramétereivel. A beteg populáció szövetmintáit a kontrollokéval összehasonlítva a betegekben magasabb *IL-24*, FN és  $\alpha$ -SMA fehérjemennyiséget, illetve főként a kripták építél sejtjeiben fokozott *IL-24* és *IL-20RB* immunpozitivitást detektáltunk.

### 4.2. Az *IL-19*, *IL-20*, *IL-24* mennyiségének vizsgálata PBMC-kben

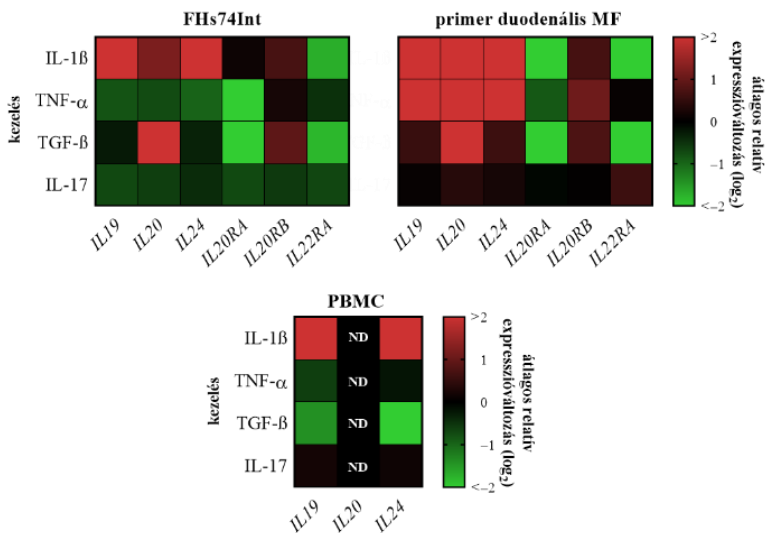
A cöliákiás gyermekek véréből izolált PBMC-k fokozott *IL24* és *IL19* mRNA expresszióját mértük a kontroll gyermekek PBMC-ihez képest. Az *IL20* mRNA jelenlétét egyik csoportban sem tudtuk kimutatni.

### 4.3. Az *IL-1 $\beta$* , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ és *IL-17* kezelések hatása az *IL19*, *IL20*, *IL24*, valamint az *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* expressziójára

Az FHs74Int, pdMF és PBMC sejtek génexpressziós eredményeit az 1. ábra mutatja be. A kezelések közül kiemelkedik az *IL-1 $\beta$*  hatása, amely mindhárom sejt típuson nagymértékben fokozta az *IL19*, *IL20*, *IL24* expresszióját. Ez alól kivételt csak a PBMC sejtek *IL20* mRNA expressziója jelentett, ami nem csak az *IL-1 $\beta$* , hanem bármely más kezelés ellenére is detektálhatatlan maradt. A TNF- $\alpha$  kezelés hatása sejt típus függőnek bizonyult. Míg pdMF-eken fokozta a vizsgált citokinek expresszióját, addig az FHs74Int sejteken csökkentette azt, a



PBMC-ken pedig nem volt hatása. Az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  IL-24 termelést fokozó hatását méréseink fehérje szinten is igazolták. A receptoralegységek esetében a kezelések többsége fokozta az *IL20RB* expresszióját, az *IL20RA* és *IL22RB* esetében viszont az expresszió csökkenése figyelhető meg.



1. ábra. Összefoglaló ábra az IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  és IL-17 kezelések hatásáról az FHs74Int, pdMF és PBMC sejtek *IL19*, *IL20*, *IL24*, valamint *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS expressziójára.

#### 4.4. Az IL-24 hatása a vékonybél epitél sejtekre

Kísérleteink során az FHs74Int sejteken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő oxidatív stressz indukciót követően vizsgáltuk az IL-24 epitél sejtekre kifejtett hatását. Az MTT, LDH, valamint Annexin V apoptózis mérések eredményei szerint a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nagyfokú sejtelhalást eredményezett, amelyet az IL-24 kezelés mérsékelte. Génexpressziós méréseink alapján az IL-24

csökkentette az epitél sejtek oxidatív stressz által indukált *IL1A*, *IL6*, valamint *TNF* mRNS expresszióját.

#### **4.5. IL-24 hatása a miofibroblasztokra**

A pdMF-ok esetében kísérleteink során az IL-24 sejtproliferációra, a sejtek morfológiájára és stresszrost hálózatára, valamint ECM termelésére kifejtett hatását vizsgáltuk.

Az MTT és LDH tesztek eredményei alapján az IL-24 mérsékelte a pdMF-ok endogén, illetve PDGF-B kezelés által kiváltott proliferációját. Ezzel összhangban állva az IL-24 csökkentette a PDGF-B kezelés által indukált *PCNA* és *KI67* proliferációs markerek mRNS expresszióját.

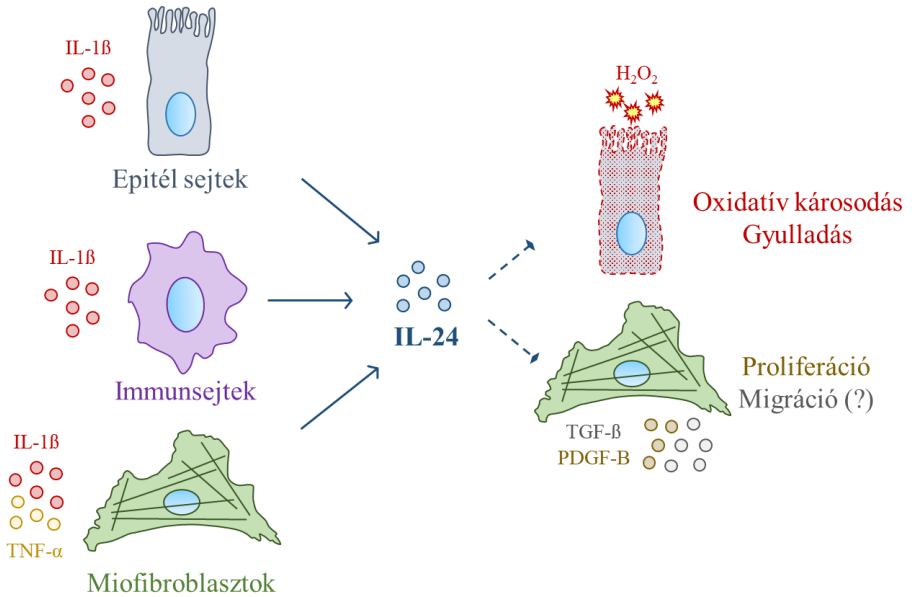
Az IL-24 sejtalakra és a sejtek stresszrost hálózatára kifejtett hatását immunfluoreszcens festést követően mikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. A kezeletlen pdMF-ok hosszúkás, elnyúlt sejtalakkal, párhuzamos  $\alpha$ -SMA stresszrosthálózattal rendelkeztek. IL-24 kezelés hatására azonban a sejtek lepedőszerű alakot vettek fel, a stresszrostok párhuzamos rendezettsége megszűnt, körszerűen rendeződött át. Génexpressziós vizsgálataink alapján IL-24 kezelés hatására fokozódott a miofibroblasztokban a sejtváz struktúrelemeinek ( $\alpha$ -SMA,  $\beta$ -aktin, vimentin), illetve a sejtadhézió szabályzásában résztvevő faktoroknak (Snail és Slug) mRNS expressziója.

A SiriusRed teszt és génexpressziós méréseink eredménye szerint az IL-24 nem befolyásolta a pdMF-ok endogén, illetve a TGF- $\beta$  kezelés által kiváltott kötőszövet termelését.

## 5. Következtetések

Munkánk során a cöliákia patomechanizmusának pontosabb megismerése érdekében az IL-20 citokin alcsalád tagjainak a betegségben betöltött szerepét vizsgáltuk. Megfogalmazott kérdéseinkre humán szövetmintákon végzett vizsgálatok, és *in vitro* kísérletek segítségével kerestük a választ. Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- A vékonybél biopsziák vizsgálata során a cöliákiás mintákban tapasztalt emelkedett  $\alpha$ -SMA és FN mennyiség a nyálkahártya szöveti struktúrájának aktív átrendeződésére utal.
- Az IL-24 mennyisége magasabb cöliákiás bélszövetben, valamint a betegekből izolált PBMC-kben a kontroll mintákban mért értékekhez képest.
- *In vitro* kísérleteink alapján az epitél sejtek, a miofibroblasztok, valamint az immunsejtek egyaránt felelősek lehetnek az IL-19, IL-20 és IL-24 expressziójáért a bélben.
- *In vitro* igazoltuk, hogy az IL-19, IL-20 és IL-24, valamint receptoraik expresszióját erőteljesen befolyásolják a bél gyulladásos folyamataiban szerepet játszó citokinek, amelyek közül különösen az IL-1 $\beta$  hatása jelentős.
- Az IL-24 *in vitro* csökkenti a vékonybél epitél sejtek esetében az oxidatív stressz által kiváltott sejthalálozás mértékét, valamint mérsékli az oxidatív stressz indukálta gyulladásos citokinek termelését.
- *In vitro* körülmények között az IL-24 csökkenti a miofibroblasztok endogén, illetve PDGF-indukált proliferációját.
- Az IL-24 *in vitro* körülmények között a miofibroblasztok aktin stresszrost hálózatának átrendeződését, a sejtek morfológiai változását okozza.



**2. ábra. Az IL-24 cöliákia során megfigyelhető bélhám szöveti átrendeződésben betöltött szerepének általunk feltételezett mechanizmusa.** Eredményeink alapján a gyulladt vékonybél-szövetben IL-1 $\beta$ , illetve TNF- $\alpha$  hatására fokozódik a bélhám epitél sejtek, a miofibroblasztok, illetve az immunsejtek IL-24 termelése. Az IL-24 hozzájárul az epitél sejtek oxidatív károsodással szembeni védekezéséhez, valamint gátolja a miofibroblasztok proliferációját, és csökkenti migrációs képességre utaló sejtvázszerkezetet eredményez.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

- **Rokonay 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. *Journal of translational medicine*, 18: 1-13 (*IF*: 5,531)
- Veres-Székely A, Bernáth M, Pap D, **Rokonay R**, Szebeni B, Takács IM, Lippai R, Cseh Á, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) PARK7 Diminishes Oxidative Stress-Induced Mucosal Damage in Celiac Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (*IF*: 6,543)

### 6.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent közlemények

- Szűcs D, Béres NJ, **Rokonay R**, Boros K, Borka K, Kiss Z, Arató A, Szabó AJ, Vannay Á, Sziksz E. (2016) Increased duodenal expression of miR-146a and-155 in pediatric Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, 22: 6027 (*IF*: 3,365)
- Pap D, Sziksz E, Kiss Z, **Rokonay R**, Veres-Székely A, Lippai R, Takács IM, Kis É, Fekete A, Reusz G. (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 and Blood Pressure Research*, 42: 16-32 (*IF*: 3,000)
- Veres-Székely A, Pap D, Sziksz E, Jávorszky E, **Rokonay R**, Lippai R, Tory K, Fekete A, Tulassay T, Szabó AJ. (2017) Selective measurement of  $\alpha$  smooth muscle actin: why  $\beta$ -actin can

- not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. BMC molecular biology, 18: 1-15 (*IF: 2,795*)
- Pap D, Veres-Székely A, Szebeni B, **Rokonay R**, Ónody A, Lippai R, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F. (2020) Characterization of IL-19, -20, and-24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. Journal of translational medicine, 18: 1-15 (*IF: 5,531*)
  - Ónody A, Veres-Székely A, Pap D, **Rokonay R**, Szebeni B, Sziksz E, Oswald F, Veres G, Cseh Á, Szabó AJ. (2021) Interleukin-24 regulates mucosal remodeling in inflammatory bowel diseases. Journal of translational medicine, 19: 1-16 (*IF: 5,531*)
  - Lippai R, Veres-Székely A, Sziksz E, Iwakura Y, Pap D, **Rokonay R**, Szebeni B, Lotz G, Béres NJ, Cseh Á. (2021) Immunomodulatory role of Parkinson's disease 7 in inflammatory bowel disease. Scientific Reports, 11: 1-14 (*IF: 4,379*)
  - **Rokonay R**, Sziksz E, Lippai R, Pap D, Veres-Székely A, Reusz G, Szabó A, Vannay Á. (2014) A vesefibrózisban szerepet játszó szignalizációs útvonalak. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 18: 72-75
  - Pap D, Sziksz E, **Rokonay R**, Ács OD, Szabó A. (2014) D-vitamin szerepe a vesefibrosis patomechanizmusában. GYERMEKGYÓGYÁSZAT, 65: 137-139
  - Lippai R, Sziksz E, **Rokonay R**, Pap D, Veres-Székely A, Fekete A, Szabó A, Vannay Á. (2015) Célzott géncsendesítés siRNS interferenciával. GYERMEKGYÓGYÁSZAT, 66: 350-351
  - Takács IM, **Rokonay R**, Lippai R, Sziksz E, Szabó A, Vannay Á. (2016) Rekombináns fehérjék előállítására szolgáló expressziós rendszerek. GYERMEKGYÓGYÁSZAT, 67: 198-199

- Takács IM, **Rokonay R**, Pap D, Lippai R, Sziksz E, Fekete A, Szabó A, Vannay Á. (2016) Klinikumban és kutatásban alkalmazott antitestek előállítása. GYERMEKGYÓGYÁSZAT, 67: 345-346