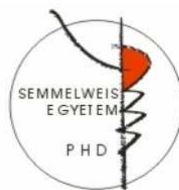


A hősoikkfehérje 72 szerepe gyulladásoos kórképekben

Doktori értekezés

Dr. Gál Krisztina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Müller Veronika egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Dérfalvi Beáta egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Antus Balázs osztályvezető főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szabó András egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Dr. Novák Zoltán egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Szilasi Mária egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Constantin Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2012

BEVEZTÉS

A **hősokkfehérjék** minden élő sejt működésében alapvető szerepet játszanak. Ezek olyan speciális fehérjék, amelyek az evolúció hosszú évezeirei alatt is megőrizték szerkezetüket. Hagyományosan molekulatömegük alapján osztjuk őket családokba. A proteinek egyik legismertebb képviselője a 70 kDa molekulásúlyú hősokkfehérje (HSP70), mely a 6-os kromoszóma p21.3 lókusán kódolt. Indukálható formája a HSP72, mely az emlős sejtek legjelentősebb, stresszre termelődő védő molekulája.

Az intracelluláris proteinek az alapvető sejt folyamatokban és azok szabályozásában vesznek részt, ATP hasítása révén fejtik ki biokémiai hatásukat. Több feladatot látnak el, nagyjából intracellulárisan, kisebb részben extracellulárisan fejtik ki hatásukat.

A HSP70 család fehérjéinek intracellulárisan antiapoptotikus hatásuk van - több szinten akadályozzák a sejthalál folyamatát: gátolják a cytochróm-C kiáramlását a mitokondriumokból, illetve a kaszpáz-3 aktiválódását. Másrészt „dajkafehérjék” lévén, segítik a sérült, denaturált fehérjék helyreállítását, illetve amennyiben a károsodás visszafordíthatatlan, a proteinek degradálását. Mint extracelluláris, illetve sejt felszíni molekulák szerepet játszanak az immunválasz szabályozásában, részt vesznek a jelátviteli folyamatokban. Egyre több az adat arra vonatkozóan, hogy fontos szerepük lehet a tumor ellenes immunválaszban.

A **cigaretta** napjaink talán legveszélyesebb és legtöbb halálos áldozatot követelő legális élvezeti szere. A dohányzás leggyakrabban szív- és tüdőbetegségekhez vezet, kóroki szerepe vitathatatlan a krónikus

obstruktív tüdőbetegség (COPD), valamint a tüdőrák kialakulásában. Egyre több adat szól amellett, hogy összefüggés van a COPD – főleg az emphysemás forma - és a tüdőrák között, melynek legfőbb oka a közös rizikófaktor, a dohányzás.

Jelenleg évente ötmillió - egy Finnországnyi - ember hal meg valamilyen dohányzás okozta megbetegedésben. Magyarország a világ vezető dohányfogyasztói között van, hazánkban évente mintegy 28000 ember halálát okozza a dohányzás.

A szteroidok a tüdőbetegségek kezelésében gyakran alkalmazott készítmények ám a pontos, a tüdő epitéliumára ható gyulladáscsökkentő mechanizmusuk nem ismert. Légúti obstrukcióval járó kórképek esetén tény, hogy amíg a legtöbb asztmás beteg jól reagál a szteroid kezelésre, dohányzó asztmások és a COPD-s betegek többsége szteroid kezelésre általában nem adnak megfelelő terápiás választ. Míg a légúti gyulladás szteroidokra nem reagál megfelelően, addig COPD-ben a hosszú távú szteroid inhaláció protektív hatását igazolták tüdőrák kialakulását illetően.

Intenzív kutatások folynak jelenleg is, amelyek a szteroidok pontos, molekuláris szintű hatását vizsgálják. A szteroid hatás leginkább a glukokortikoid receptor (GR) által közvetített. A glukokortikoid receptor működéséhez kell a HSP apparátus (a HSP90/HSP72-heterokomplex), amely megnyitja az inaktivált receptor ligand kötő hasadékát, előkészítve így a receptort a szteroid molekula fogadására. Ezt követően történhet meg a dimerizáció, és a komplexum intracellulárisan a DNS molekula megfelelő helyére kötődik, így irányítva a gének átíródását.

COPD-s betegekben a **tüdőrák** előfordulási gyakorisága is megnő, egyes irodalmi adatok szerint 4.5-szeresére. A két kórállapot kialakulásában igazoltan a dohányzás a fő közös patogenetikai faktor. A két betegség patomechanizmusában azonban jelentős eltérések igazolhatók, hisz míg a tüdőrák kontrollálatlan sejtszaporodás eredményeként alakul ki, a COPD-ben a gyulladás-mediálta légúti destrukció és sejthalál a jellemző. Mégis kell, hogy legyen összefüggés a két betegség között, hisz a tüdőrákosok szignifikáns hányada COPD-ben is szenved, a COPD pedig a tüdőrák fontos kockázati tényezője. Ueda és munkatársai felvetették, hogy a COPD-re jellemző krónikus gyulladás következtében létrejövő emfizéma, vagy a betegségre szintén jellemző légúti obstrukció az, amivel a tüdőrák rizikója korrelál COPD-s betegekben. Eredményeik alapján az emfizéma (már a legenyhébb is) emeli a tüdőrák kialakulásának kockázatát. Houghton és munkatársai két hipotézist dolgoztak ki ennek az első látásra összeférhetetlen ellentétnek a feloldására. A dohányfüst hatására létrejövő krónikus gyulladás következtében sérülnek a tüdőalveolusok, megbomlik a proteáz-antiproteáz egyensúly. Emellett a gyulladás következtében a tüdőben levő neutrofil granulociták és makrofágok növekedési és egyéb faktorokat is termelnek, ami a rosszindulatú daganatok sejtjeire is jellemző. A gyulladás lehetséges oki szerepét bizonyítja az is, hogy azokban a COPD-sekben, akik inhalatív szteroid kezelésben részesülnek, kisebb a tüdőrák kialakulásának kockázata.

A másik lehetséges mechanizmus a szervezet válasza az őt ért sérülés helyreállítására. Ebben az esetben a krónikus gyulladás miatt létrejövő fokozott sejtpusztulást a tüdő bronchoalveoláris őssejtjei igyekeznek

helyreállítani. Ezek az őssejtek normál körülmények között felelősek a tüdő integritásának helyreállításában, a károsodott sejtek pótlásában. A fokozott sejtpusztulás miatt szükséges a fokozott helyreállítás is, ami kontrollálatlan sejt szaporodást eredményezhet, melynek következménye lehet a tüdőrák.

A **kissejtes tüdőrák** (SCLC) az összes tüdőrák mintegy 15-20 %-át teszi ki, és évente világszerte körülbelül 200 000 ember haláláért felelős. Kemo- és radioszenzitivitása ellenére a túlélés mérsékelt, amely a gyors metasztázisképződésnek, illetve a betegség gyakori ismételt megjelenésének köszönhető. Az átlagos túlélés a kezelés mellett is csak mindössze 9-20 hónap között van, emiatt érthető, hogy az SCLC esetén is további kutatások szükségesek a jobb terápiás eredmények eléréséhez. A HSP-k fontosságát támasztja alá, hogy több irodalmi adat is megerősíti, hogy a túlélés szempontjából előnyös, ha a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) erősen festődik HSP72-vel. A HSP-k expresszióját a környezeti faktorokon kívül genetikai polimorfizmusok is befolyásolják. Konzervatív szerkezetüknek köszönhetően relatív alacsony fokú a polimorfizmus a HSP72 génekben. A legtöbbet tanulmányozott a HSP72 gén kódoló régiójának HSPA1B A(1267)G helye, mely igazoltan csökkent mRNS képződéssel jár együtt.

A **cöliákia** egy immun-mediált vékonybélbetegség, amelyet egy életre szóló glutén érzékenység jellemez. A bélhámsejtek nélkülözhetetlen feladata egy olyan szelektív barrier fenntartása, amelyen keresztül a tápanyagok és az elektrolitok átdiffundálhatnak, miközben a lehetséges veszélyes anyagok nem. Cöliákiában ennek a barriernek a struktúrája sérül, aminek eredményeként a növényi fehérjék felszívódnak a

bélepitéliumon keresztül. A búza gliadin aktiválja mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszert, ami a bélhámsejtek apoptózisához vezet.

CÉLKITŰZÉS

1. Első vizsgálatunkban arra kerestünk választ, hogy a dexametazon (DEX), hogyan hat a tüdő alveoláris epitélsejtjeire in vitro körülmények között?
2. A dohányfüst kivonat (DFK) hogyan befolyásolja a tüdő epitélsejtek apoptózisát, valamint, hogy mennyiben változik a DEX kezelés hatása DFK mellett?
3. A sejtvédelemben központi szerepet játszó HSP72 hogyan változik DEX, DFK, illetve kombinált (DEX-DFK) kezelés mellett alveoláris epitélsejtekben?
4. In vivo vizsgálatunkban lokálisan előrehaladott, illetve metasztatizáló SCLC-ban szenvedő páciensekben kutattuk, hogy a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmus változik-e egészségesekhez képest és ennek milyen hatása van a daganatos betegség kimenetelére?
5. SCLC páciensek szövettani mintáiban változik-e a HSP72 expresszió a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmus függvényében?
6. Hogy változik a HSP72 expressziója és lokalizációja a kezeletlen, illetve a kezelt cöliákiásokban a kontroll, egészségesekhez képest?
7. A gluténmentes diéta hogyan változtatja meg a HSP72 expresszióját?

MÓDSZEREK

Tüdő epitelsejtek vizsgálatokor immortalizált alveoláris epitelsejtvonalat (A549 alveoláris epitelsejtek) használtunk, mely a tüdő AT II epitelsejtek vizsgálatára szolgálnak.

Sejtjeinket ezt követően szteroiddal és dohányfüst kivonattal kezeltük. Több csoportot alkalmaztunk: egyrészt sejtjeinket különböző koncentrációjú dexametazonnal (DEX) kiegészített médiumban növesztettük (0; 0,1; 1; 10 μ M), másrészt dohányfüst kivonatot adtunk hozzá. A dohányfüst kivonatot minden esetben frissen, saját készítésű „dohányzó gép” segítségével állítottuk elő. Az oldatok reprodukálhatóságát tömegspektroszkópiával ellenőriztük.

A HSP72 mRNS expresszióját real time RT-PCR-rel mértük.

A HSP72 fehérje mennyiségét áramlási citofluorimetriás (FACS) mérésekkel határoztuk meg. Mind a pozitív sejtek arányát, mind a sejtek HSP72 intenzitását vizsgáltuk.

Apoptózis vizsgálata Annexin V / PI assay-vel történt.

HSP72 csendesítő transzfekciót SiPort Neo*Fx*-szel végeztük.

Statisztikai kiértékelés Mann-Whitney U-teszttel történt. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ szintet tekintettük minden esetben.

Kissejtes tüdőrákos betegek szövettani vizsgálatokor a SE Pulmonológiai Klinikáján 2003 március és 2004 szeptember között megjelent 43 (TNM IIIA-IV. stádiumú) kissejtes tüdőrákban szenvedő páciens (összes beteg 8.85%-a, SCLC-s betegek kb. 60%-a) mintáit dolgoztuk fel. A betegektől vérmintákat vettünk különböző időpontokban, felvettük a demográfiai adataikat, vizsgáltuk a

diagnóziskor megállapított TNM stádiumot, dohányzási szokásokat, COPD egyidejű jelenlétét. Túlélést 60 hónapig vizsgáltuk

Egészséges, kontroll alanyokként 97 egészséges önkéntes véradó mintáit dolgoztuk fel. Minden páciens aláírta a Helsinki deklarációnak megfelelő beleegyező nyilatkozatot.

A tumorsejtek szemikvantitatív HSP72 expresszióját immunhisztokémiai vizsgálattal végeztünk: tumorsejtek relatív HSP72 expresszióját 0-4-ig terjedő skálán azonos mintából származó bronchiális epitélisejteken mért expresszió arányaként fejeztük ki.

A leggyakrabban vizsgált HSP 72 A(1267)G polimorfizmus megállapítása PCR és RFLP segítségével történt.

Statisztika kiértékeléshez a Hardy-Weinberg ekvilibrum kiszámítása után Cox-regressziós analízist, valamint a nem parametrikus adatok esetén Fischer tesztet alkalmaztunk. Túlélést Kaplan-Meier analízis segítségével határoztuk meg. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ szintet tekintettük minden esetben.

Duodenum biopsziák vizsgálatakor a SE I.sz. Gyermekgyógyászati Klinikán megjelent, 16 kezeletlen cöliákiás gyermek duodenum biopsziáját dolgoztuk fel (9 főnél kezelés előtt és után is történt mintavétel). Egészséges, kontroll csoportként azon 10 gyermek szolgált, aki egyéb indok miatt (fejlődésbeli elmaradás, krónikus hasmenés) került a klinikusok látóterébe.

A cöliákia diagnózisát ESPHGAN kritériumok szerint állítottuk fel.

HSP72 mRNA expresszióját RT-PCR-ral, míg a fehérje expressziót Western blottal mértük.

A HSP72 sejten belüli lokalizációjának értékeléséhez immunfluoreszcens festést alkalmaztunk.

Statisztikai analízist Shapiro-Wilk's teszt elvégzése után Mann-Whitney U-teszttel (szignifikáns: $p < 0.05$ esetén) készítettünk.

EREDMÉNYEK

DEX kezelés gyengén csökkentette az apoptotikus sejtek számát a kontroll csoportokban, de statisztikailag is szignifikáns különbség csak a DEX(10) csoportban jelentkezett. A szteroid-mentes DFK-tal kezelt sejtcsoportokon az apoptózis mértéke megháromszorozódott a szteroid-mentes kontroll csoporthoz képest. DEX kezelés a DFK csoportokban szignifikánsan mérsékelte az apoptotikus sejtek számát, eltörölve ezzel a különbségeket a DFK-tal kezelt és megfelelő kontroll csoportok között a legnagyobb, DEX(10) dózisonál.

A HSP72 mRNS expresszió nem változott a szteroid kezelések során. A DFK alkalmazása önmagában alacsony HSP72 mRNS szinttel járt. Ezzel ellentétben a szteroid kezelés a DFK-tal kezelt csoportokban szignifikánsan, dózisfüggően emelte a HSP72 mRNS expresszióját.

A szteroid-mentes kontroll csoportban az egyes sejtek HSP72 fehérje expressziója alacsony volt, csakúgy, mint a HSP72-t expresszáló sejtek aránya. A kontroll csoportokban a DEX kezelés csökkentette mind a pozitív sejtek arányát, mind az egyes sejtek HSP72 tartalmát. Mindegyik DFK-tal kezelt csoportban a HSP72 pozitív sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő kontroll csoportokban. Szteroid kezelés jelentősen, és dózis-függően emelte a HSP72-t expresszáló sejtek arányát, a legnagyobb mértékben a DFK+DEX(10) csoportban, ahol a sejtek közel 80%-ában volt kimutatható a fehérje. DFK kezelés a megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan növelte a sejtek HSP72 tartalmát mind a szteroid-mentes, mind a szteroiddal kezelt csoportokban. A HSP72 pozitív sejtek átlagos

HSP72 intenzitása a DFK kezelés után az emelkedő DEX adagokkal arányosan nőtt. Az emelkedést a DEX(1) és DEX(10) csoportokban találtuk szignifikánsnak a szteroid-mentes csoporthoz képest.

Transzfekciós kísérleteink sikeresek voltak mind a szteroid-mentes kontroll, mind a DFK-tal kezelt sejteken. Mint már a korábbi kísérleteinkből láthattuk, a legmagasabb HSP72 expressziót a DFK+DEX(10) sejtekben mértük. Így ezt a csoportot választottuk, hogy bizonyítsuk a DFK és a szteroid kezelés együttes hatását a sejtek HSP72 expressziójára. Míg a negatív transzfekciós kontroll (scr-RNS) nem változtatta meg a HSP72 expressziót, a csendesítő RNS-sel történő transzfekció szignifikáns – 60-80%-os - csökkenést eredményezett a fehérjeszintézis mértékében, mind kontroll, mind DFK esetében. Hasonlóképpen alakult a HSP72-t expresszáló sejtek aránya is. A HSP72 fehérje expressziójának csökkenésével párhuzamosan a transzfectált sejtekben az apoptózis minden csoportban szignifikánsan nőtt, bizonyítva ezzel a közvetlen kapcsolatot a celluláris HSP72 és az apoptotikus sejthalál között.

A Hardy-Weinberg kritérium a HSP72 polimorfizmusra mind a vizsgált, mind az egészséges kontroll csoportnál fennállt. Az allél frekvencia kismértékű csökkenést mutatott az A allélben a SCLC betegekben a kontrollokhöz képest (OR: 0.88 [95% CI: 0.53-1.46]; $p=0.69$). Ezzel ellentétben a GG genotípus sokkal gyakoribb volt SCLC csoportban az egészségesekhez képest, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintjét (19% vs. 13%).

Az A allélt hordozó betegek átlagos túlélési ideje szignifikánsan magasabb volt a GG csoporthoz képest (AA és AG csoport: 11.97

hónap, konfidencia intervallum (CI) (95%) 6.83-17.11 vs. GG csoport: 8.15 hónap CI (95%) 6.37-9.93, $p < 0.05$). Az átlagos túlélési idő rövidebb volt azokban a betegekben, akik az AA genotípust hordozták, az AG genotípusú betegekhez képest, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Ennek hátterében részben az állt, hogy az AA csoportban volt egy beteg, aki a diagnózis felállítása után rövid időn belül (1.86 hó) meghalt. A többi, ebbe a csoportba tartozó beteg minimum 6 hónapig túlélte.

Minden sejt mutatott HSP72 fehérje expressziót, de a relatív intracelluláris HSP72 expresszió különbözött a SCLC tumorsejtek és az egészséges sejtek között. A SCLC sejtekben immunhisztokémián látott HSP72 fehérje expressziója, és a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) genotípusa közötti összefüggést vizsgálva azt találtuk, hogy a GG genotípusú betegekben a tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb HSP72 festődést, azaz HSP72 fehérje expressziót mutattak a normális sejtekhez képest (relatív festődés 28%). Az AA, illetve AG genotípusú betegek mintájában nem volt különbség a HSP72 festődést illetően (a relatív festődés ezekben a csoportokban 68%, illetve 75% volt).

Mivel a tumorsejtek HSP72 szöveti festődése nem különbözött az A allél hordozásakor, így az AA és az AG HSP72 genotípusú betegeket a túlélési görbén egy csoportként ábrázoltuk. A túlélés tekintetében, szignifikáns csökkenést láttunk a GG genotípusú SCLC-ben szenvedő betegek esetében AA+AG páciensekhez viszonyítva.

A GG genotípusú betegeknél a tüdőrák előrehaladottabb stádiumban került felfedezésre, hiszen szignifikánsan több páciensnél volt

kimutatható távoli metasztázis (M1) a diagnózis felállításakor (62% vs. 29% az AG és 28% az AA csoportban, $p < 0.05$).

A COX-regresszió analízis szignifikáns összefüggést mutatott a túlélés, és a HSP72 GG genotípusa, a dohányzás intenzitása (doboz/év), az életkor, valamint a testtömegindex (BMI) között. A nem nem befolyásolta a végkimenetelt, és a TNM stádiumok emelkedésével (TNM IIIA, IIIB, IV) sem nőtt a betegek halálozási rizikója.

A BMI szignifikánsan magasabb volt a GG genotípusú betegekben, az AA genotípusúakhoz viszonyítva ($p < 0.05$). Fontos negatív prognosztikai faktornak bizonyult a COPD egyidejű jelenléte ($p = 0.0125$), csak úgy, mint az alkalmazott kemoterápiás ciklusok száma ($p = 0.0007$). Más paraméterek, mint a mellkas röntgenen észlelt eltérések, az endobronchiális morfológia, paraneopláziás szindróma, vagy a kemo-, illetve radioterápia mellékhatásai tekintetében nem volt szignifikáns különbség a különböző HSP72 genotípusú SCLC betegek között.

A HSP72 mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett a kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, mind a kezelt, mind a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p = 0.0002$ és $p = 0.023$). A kezelt csoportban a duodenalis nyálkahártya HSP72 mRNS szintje szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz képest ($p = 0.003$).

Szignifikánsan magasabb HSP72 fehérje szintet láttunk mind a kezelt, mind a kezeletlen cöliákiás betegeknél a kontrollhoz viszonyítva ($p = 0.0001$ és $p = 0.003$). Cöliákiás betegeknél a kezelés hatására a HSP72 fehérje szint szignifikánsan csökkent a kezeletlen gyermekekhez képest ($p = 0.002$).

A HSP72 sejtbeli elhelyezkedését immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. Kezeletlen gyermekek duodenum bolyhaiban erős HSP72 festődést láttunk az enterocitákban és a lamina propria immunsejtjeiben, a kontrollhoz viszonyítva. Ugyanakkor a kezelt cöliákiások duodenum bolyhaiban gyengébb HSP72 festődést láttunk az enterocitákban és a lamina propria immunsejtjeiben a kezeletlenekhez képest. A normál duodenumban (kontroll) nagyon gyenge immunreakciót találtunk. A magban nem tudtunk HSP72-t detektálni.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Alveoláris epitélsejteket in vitro vizsgálva kontroll körülmények között a szteroid kezelés (DEX) nem befolyásolta sem az alveoláris epitélsejtek apoptózisát, sem a celluláris HSP72-expressziót.
2. A DFK szignifikánsan csökkentette az alveoláris epitélsejtek túlélését és proliferációját. A DFK súlyos sejtsérülést okozott, mely a sejtek megnövekedett apoptózisához vezetett. DFK mellett DEX-t is alkalmazva, a kezelés szignifikánsan emelte a sejtek túlélését és szaporodását, dóziszfüggően mérsékelte az apoptózist.
3. Kontroll körülmények között a szteroid kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az alveoláris epitélsejtek HSP72-expresszióját. DFK kezelés hatására a sejt HSP72-fehérje-tartalma és a HSP72-pozitív sejtek aránya is szignifikánsan nőtt. Az együttes DFK és szteroid kezelés dóziszfüggően tovább emelte a HSP72 fehérje expresszióját. Összehasonlítva a megfelelő csoportokat, minden DFK-tal kezelt csoportban a HSP72 fehérje expressziója szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportokhoz képest. HSP72 csendesítő mRNS használatával igazoltuk, hogy a DEX sejtvédő hatása DFK-tal kezelt sejteken jelentős mértékben a HSP72 által létrehozott sejtvédő mechanizmus eredménye.
4. A HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmusát vizsgálva SCLC-s és kontroll, egészséges emberek mintájában azt találtuk, hogy az allél frekvencia kismértékű csökkenést mutatott az A allélben a SCLC betegekben a kontrollokhoz képest. Ezzel

ellentétben a GG genotípus sokkal gyakoribb volt SCLC csoportban az egészségesekhez képest, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintjét. A túlélést vizsgálva kimutattuk, hogy az A allélt hordozó betegek (AA és AG csoport) átlagos túlélési ideje szignifikánsan magasabb volt a GG csoporthoz képest. GG genotípusú betegeknél a tüdőrák előrehaladottabb stádiumban került felfedezésre, szignifikánsan több páciensnél volt kimutatható távoli metasztázis a diagnózis felállításakor. Eredményeink szerint a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmusa fontos, szignifikáns prognosztikai faktor SCLC-s betegekben mind a tumorprogressziót, mind a túlélést vizsgálva.

5. A SCLC sejtekben immunhisztokémián látott HSP72 fehérje expressziója, és a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) genotípusa közötti összefüggést vizsgálva eredményeink szerint a GG genotípusú betegekben a tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb HSP72 fehérje expressziót mutattak a nem daganatos sejtekhez képest. Az AA, illetve AG genotípusú betegek mintájában nem volt különbség a HSP72 festődést illetően.
6. A duodenum biopátumokat vizsgálva szignifikánsan magasabb HSP72 mRNS és fehérje szintet láttunk mind a kezelt, mind a kezeletlen cöliákiás betegeknél a kontrollhoz viszonyítva. Cöliákiás betegeknél a kezelés hatására a HSP72 mRNS és fehérje szint szignifikánsan csökkent a kezeletlen gyermekekhez képest.

A kezeletlen gyermekek duodenum bolyhaiban erős HSP72 festődést láttunk mind a bélhámsejtekben, mind a lamina propria

immunsejtjeiben, a kontrollhoz viszonyítva. Míg a kezelt cöliákiások mintájában gyengébb HSP72 festődést észleltünk a kezeletlenekhez viszonyítva. A normál duodenumban (kontroll) nagyon gyenge immunreakciót találtunk.

7. A gluténmentes diéta szignifikánsan csökkenti az HSP72 expressziót mind a bélhámsejtekben, mind a lamina propria immunsejtjeiben.

ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink megerősítették, hogy a DFK apoptózist indukál az alveoláris epitelsejtekben. DEX csökkenti az apoptózist, ezáltal mérsékli a DFK indukálta sejtkárosodást. Kísérleteinkben bizonyítottuk a HSP72 kulcsfontosságú szerepét az epitelsejtek túlélésében DEX - DFK együttes kezelés esetén. A transzfekciós kísérleteink igazolták, hogy a dohányfüst expozíció után látott szteroid sejtvédő hatásában az emelkedett HSP72 szint elengedhetetlen. A HSP72 lehet az egyik új kulcsfontosságú molekula és potenciális terápiás célpont a dohányfüstnek kitett tüdősejtekben. Mivel dohányosok milliói részesülnek szteroid kezelésben, további adatok szükségesek a cigarettafüst és a glukokortikoidok kölcsönhatásáról. További vizsgálatok segíthetnek annak eldöntésére, hogy mi a szerepe a HSP72-nek a dohányos, illetve a nem dohányos COPD-s betegekben, különösen, ami az alveolusfal pusztulását, emfizéma kialakulását illeti.

In vivo vizsgálatunk eredményei a HSP72 (HSPA1B A(1267)G polimorfizmusának szignifikáns prognosztikai szerepét mutatták SCLC-s betegekben. SCLC-ben a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG variánsa a tumorsejtekben csökkent HSP72 fehérje expresszióval társult. A csökkent sejtvédő funkciók és gyengült tumorelleses immunitás hozzájárulhat a rosszindulatú daganat gyorsabb progressziójához, a metasztázisok képződéséhez és a rövidebb túléléshez.

A cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában emelkedett HSP72 szintet mértünk, mely a molekula lehetséges védő szerepét mutatja a gliadin toxicitás ellen. Antiapoptotikus hatása miatt elősegítheti az

epiteliális sejtek túlélését és segít visszaállítani az integritásukat, az intesztinális barrier funkcióit, ezáltal csökkentve a boholy atrófiát, ami a betegség fő tünete. A HSP72 TLR-2 és TLR-4-en keresztül a veleszületett immunrendszer sejtjei számára vészjelzőként működhet, mely által felerősíti hatásukat a sérülés ellen. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy mi a pontos szerepe a HSP72-nek cöliákiában. A HSP72 protektív szerepe miatt későbbiekben potenciális terápiás célpont lehet a gasztrointesztinális betegség kezelésében.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Gál K, Cseh A, Szalay B, Rusai K, Vannay A, Lukácsovits J, Heemann U, Szabó AJ, Losonczy G, Tamási L, Müller V. Effect of cigarette smoke and dexamethasone on HSP72 system of alveolar epithelial cells. CELL STRESS & CHAPERONES 16:(4) pp. 369-378. (2011) IF: 3.013.

Klara Szondy, Krisztina Rusai, Attila J. Szabo, Andrea Nagy, **Gál K**, Andrea Fekete, Zsuzsanna Kovats, Gyorgy Losonczy, Jozsef Lukacsovits, and Veronika Muller. Tumor Cell Expression of Heat Shock Protein (HSP) 72 is Influenced by HSP72 [HSPA1B A(1267)G] Polymorphism and Predicts Survival in Small Cell Lung Cancer (SCLC) Patients. CANCER INVESTIGATION 30:(4) pp. 317-322. (2012) IF: 2.390**.

Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prókai A, **Gál K**, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY

Gál K, Cseh Áron Dr., Szalay Balázs Dr., Rusai Krisztina Dr., Vannay Ádám Dr., Lukácsovits József Dr., Uwe Heemann Dr., Szabó J. Attila Dr., Losonczy György Dr., Tamási Lilla Dr., Kováts Zsuzsanna Dr., Müller Veronika Dr.: Dohányfüst és szteroid hatása tüdő-epithelsejtek hő sokkfehérje (HSP) 72-rendszerére. Medicina Thoracalis • LXIV. 3, 2011 Jún.

Kováts Zsuzsanna Dr., **Gál K**, Tamási Lilla Dr., Müller Veronika Dr.: A 72 kDa súlyú indukálható hősokkfehérje (HSP72) szerepe és lehetséges terápiás felhasználhatósága pulmonológiai kórképekben. *Medicina Thoracalis* • LXIII. 4, 2010.Aug.

Disszertációtól független közlemények:

Fekete Andrea, Rusai Krisztina, Müller Veronika, Prókai Ágnes, Vannay Ádám, Vér Ágota, Bánki Nóra, **Gál K**, Tulassay Tivadar, Reusz György, Szabó J Attila: Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás patomechanizmusának experimentális vizsgálata
GYERMEKGYÓGYÁSZAT 60:(1) pp. 14-20. (2009)

Kádár Krisztina Dr., Nagy Erzsébet Dr., **Gál K** OH., Oprea Valéria Dr., Hartyánszky István Dr., Gyarmati Georgina Dr., Tóth Attila Dr. és Sikos Zita Dr.: B-natriuretikus peptid meghatározás jelentősége gyermekkori szívbetegségeknél, *Orvosi Hetilap*, 2007 148(6); 265-70