

A KUTATÁS EREDMÉNYEIT ÖSSZEFOGLALÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ

(OTKA nyilvántartási szám: 46082)

A KUTATÁS CÉLJA, A MUNKATERVBEN VÁLLALT KUTATÁSI PROGRAM ISMERTETÉSE

A belek immunpatogenezisű kórképei igen gyakran lépnek fel már gyermekkorban is. Kiemelkedő jelentősége van a gyulladós bélbetegségeknek, így a Crohn betegségnek és a colitis ulcerosának, de ebbe a csoportba sorolható a coeliakia okozta enteropathia is. Ezekre a betegségekre egyaránt jellemző, hogy kialakulásukban alapvető szerepe van az orális tolerancia zavarának. Az utóbbi évek kutatásai alapján tehát nyilvánvalóvá vált, hogy az intestinális baktérium flóra és a bélnyálkahártyát fedő epithelium között szoros és finoman szabályozott kommunikáció (crosstalk) ismerhető fel, ami normális microflóra esetén az orális tolerancia irányába hat, míg a patogén baktériumok beindítják az erőteljes immunaktivációt. Amennyiben ebben a bonyolult rendszerben zavar támad, akkor vagy a patogén baktériumok elleni védekezés szenvedhet zavart, vagy indokolatlanul fokozott aktiváció esetén pedig az apatogén normális bélflóra indíthat el erőteljes gyulladást okozó immunválaszt. Feltevésünk szerint ez az utóbbi szerepet játszhat egyes immunpatogenezisű intestinalis kórképek, elsősorban a gyulladós bélbetegségek kialakulásában. Az utóbbi évek immunológiai kutatásai alapján úgy tűnik, hogy a veleszületett immunitás nagy jelentőséggel bír az adaptív immunitás szabályozásában is. Amennyiben az előbbiben zavar támad, akkor immunpatológiai folyamatok indulhatnak el. Ebből következik, hogy a gastrointestinalis immunrendszer modulálásában fontos szerepe van az enterális microflórának is. A baktériumok falának komponensei a toll receptorokhoz kötődve olyan folyamatokat indíthatnak el, amelyek közvetve befolyásolhatják az enterális immunrendszer működését. Elképzelhető az is, hogy a toll receptorok fokozott expressziója, pl. bizonyos polimorfizmusok fennállása esetén, túlzott mértékű immunválasz generálását okozza és befolyásolhatja azt is, hogy Th1, vagy Th2 irányú eltolódás alakul-e ki.

Az OTKA pályázatban végzett vizsgálatainkban gyulladós bélbetegségben és coeliakiában tanulmányoztuk a betegek bélnyálkahártyájából vett biopsziás mintákban a toll receptorok közül a TLR2, TLR3 és TLR4 expressziójának a mértékét mRNA és fehérje szinten molekuláris biológiai módszerekkel. Ugyancsak elemezni kívántuk, hogy a TLR4 Asp299Gly polimorfizmusa mennyire kifejezett az említett kórképekben a kontrollokhöz viszonyítva. A coeliakiások között olyan betegeket is vizsgáltunk, akik 1. típusú diabetes mellitusban is szenvedtek.

BETEGANYAG

16 kezeletlen coeliákiás gyermek [6 fiú, 10 leány, életkor: medián (tartomány): 9 (4-15) év], 9 kezelt [4 fiú, 5 leány, életkor: medián (tartomány): 6 (3-14) év] coeliákiás gyermek és 10 kontroll [4 fiú, 6 leány, életkor: 10 (4-15) év] duodenumából biopsziás mintákat vettünk. A minták egyik részéből rutin hisztológiai feldolgozás történt, a másik részüket pedig molekuláris biológiai vizsgálatokhoz használtam. A kezeletlen coeliákiás gyermekek duodenum biopsziáit a diagnózis felállításának időpontjában, a glutén mentes diéta megkezdése előtt vettük. A diagnózis felállítása ESPGHAN kritériumok alapján történt. A coeliákiás gyermekek széruma antiendomysium antitest pozitív volt, a szövettani kép részleges, vagy teljes boholyatrófiát mutatott (Marsh III.b vagy III.c). A glutén mentes diétát tartó gyermekek esetében teljes klinikai remisszió következett be, szérumuk antiendomysium antitest negatív volt, valamint normál bélboholy szerkezet volt megfigyelhető. A kontrollok esetében a biopszia elvégzése súly- és/vagy hosszfejlődésbeli elmaradás, illetve krónikus hasmenés miatt vált szükségessé, de a szövettani kép mindegyik esetben normális volt.

Kolon biopsziás mintákat gyűjtöttünk 23 relapszusban lévő (aktív) IBD-s gyermektől [rIBD, 14 fiú, 9 leány, életkor: medián (tartomány): 15 (8-18) év], valamint 12 frissen diagnosztizált IBD-s gyermektől [fdIBD, 8 fiú, 4 leány, életkor: 13 (6-18) év] makroszkópiusan gyulladásban lévő illetve makroszkópiusan gyulladásban nem lévő területekről. Az fdIBD-s gyermekek közül 8 Crohn-betegnek-, 4 pedig kolitisz ulcerózásnak bizonyult. Az rIBD-s gyermekek közül 16-nak volt Crohn-betegsége és 7 volt kolitisz ulcerózás. A minták egyik részéből rutin hisztológiai feldolgozás történt, a másik részüket pedig molekuláris biológiai vizsgálatokhoz használtuk fel.

Vizsgálatainkba 118 kis születési súlyú koraszülöttet (szül. súly \leq 1500g) vontunk be, akik a II. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán születtek 1995 és 1999 között. A vizsgált koraszülöttek között 41 esetben diagnosztizáltak NEC-et, 77 koraszülött esetében nem találtak NEC-re utaló tüneteket. Szepszis gyakrabban fordult elő a NEC-es csoportban, de az egyéb perinatális szövődmények egyforma gyakorisággal léptek fel. Kontrollként 146 egészséges újszülöttet vontunk be vizsgálatunkba.

A vizsgálatok megkezdése előtt a gyermekek hozzátartozóinak írásbeli hozzájárulását kértük, a molekuláris biológiai vizsgálatok a TUKEB: 73/2003-as etikai engedéllyel történtek.

A TÁRGYKÖRBE KIDOLGOZOTT MÓDSZEREK, ELJÁRÁSOK

Szemikvantitatív PCR (humán GAPDH, TLR2, TLR3, TLR4)

A szemikvantitatív PCR-eket 50 µl végtérfogatú [10% 10x PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dezoxi-nukleozid-trifoszfát (dNTP), 0,5 µM sense és antisense primerek, 1,5 U rekombináns Taq polimeráz (Invitrogen, Kalifornia, USA)] reakcióelegyben végeztük 1 µl cDNS felhasználásával.

A humán TLR2, TLR3 és TLR4 specifikus primerek és a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) specifikus primerek szekvenciáit és a PCR körülményeit az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A szemikvantitatív PCR-ek során használt primerek szekvenciái illetve a PCR reakciók körülményei.

Gén	Primer szekvencia	Anellációs hőmérséklet	Ciklusszám	Termék hossz
TLR2	S: 5'-AGTTGATGACTCTACCAGATG-3'	61 °C	31	598 bp
	AS: 5'-GTCAATGATCCACTTGCCAG-3'			
TLR3	S: 5'-ACACACTTCCAGCATCTGTC-3'	61 °C	33	623 bp
	AS: 5'-TGCTGTAAACAATTGCTTCTAG-3'			
TLR4	S: 5'-CTTATAAGTGTCTGAACTCCC-3'	59 °C	35	680 bp
	AS: 5'-TACCAGCACGACTGCTCAG-3'			
GAPDH	S: 5'-GGTGAAGTTCGGAGTCAACG-3'	56 °C	28	496 bp
	AS: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'			

A táblázat a szemikvantitatív PCR-ek során használt primerek szekvenciáit, a primerek optimális anellációs hőmérsékletét, a PCR-ek során alkalmazott ciklusszámokat, valamint a PCR során képződő termékek hosszadatait mutatja be. Rövidítések: S: sense, AS: antisense, TLR2: Toll-szerű receptor 2, TLR3: Toll-szerű receptor 3, TLR4: Toll-szerű receptor 4, GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz.

A humán duodenum biopsziák szöveti TLR2, TLR3 és TLR4 szintjének meghatározása Western blottal

A vizsgált biopsziás mintákat lizáló pufferben homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. A felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel határoztuk meg.

Pozitív kontrollként a TLR2 és TLR4 Western blotok esetében teljes vérből izolált perifériális limfocita (PBL)-, a TLR3 western blot esetében COLO320DM (kolorektális adenokarcinóma) sejtlizátumot használtunk (sc-2226, Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA).

Elsődleges humán TLR2, TLR3, TLR4 és Actin specifikus ellenanyagokként anti-humán kecske poliklonális IgG antitesteket használtam. A primer antitestek a TLR2 és TLR3 [TLR2 (N-17) és TLR3 (Q-18) Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA] esetében a fehérjék N terminális végét, a TLR4 és Actin [TLR4 (C-18) és Actin (C-11) Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA] esetében pedig a fehérjék C terminális végét ismerték fel.

Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal (HRP) konjugált egér anti-kecske IgG antitestet (Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA) használtunk.

A mintákhoz treatment puffert [30% glicerol, 20% merkapto-etanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8] adtam, majd a mintákat TLR3 és TLR4 esetében 37 °C-on, 30 perc-, TLR2 esetében 60°C-on 15 perc-, valamint az Actin esetében 100 °C-on 5 perc inkubálással denaturáltuk.

A 10 %-os SDS-poliakrilamid gél zsebeibe denaturált, 20 (TLR2, Actin), 100 (TLR3) illetve 60 (TLR4) µg összfehérjének megfelelő mennyiségeket vittünk fel. Koncentráló gélként 4%-os SDS-poliakrilamidot használtunk.. Mintáim mellé molekulasúly markert (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) és pozitív kontrollt vittünk fel.

A szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra blottoltuk.

Az immunoblottinghoz szükséges ellenanyag koncentrációkat előzetesen dot-blot technikával határoztuk meg.

Blokkolást követően a membránokat az elsődleges, TLR2, TLR3 és TLR4 specifikus ellenanyagokkal inkubáltuk. Annak céljából, hogy ellenőrizzük, vajon az SDS-poliakrilamid gélek zsebeibe egyforma mennyiséget vittünk-e fel az egyes mintákból, elsődleges, aktin specifikus ellenanyaggal inkubáltam a membránokat, az előzőekben leírt körülményeknek megfelelően.

Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECL™-en (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk.

A Western blot-ok eredményeit a Gel-Pro™ szoftverrel (Media Cybernetics, Inc., MD, USA) denzitometráltuk.

A CD14, TLR4, és CARD15 genetikai polimorfizmusainak vizsgálata

A CD14 C⁻²⁶⁰T, TLR4 A⁺⁸⁹⁶G, C⁺¹¹⁹⁶T, CARD15 G⁺²⁷²²C, C⁺²¹⁰⁴T, és 3020insC SNP-k meghatározását PCR-RFLP technikával végeztük. A PCR-RFLP-k során használt primerek szekvenciáit illetve a PCR-RFLP-k körülményeit a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: A PCR-RFLP-k során használt primerek szekvenciái, illetve a PCR-RFLP-k körülményei.

A vizsgált SNP	Primer szekvencia	Anellációs hőmérséklet (°C)	Restriktációs enzim	Restriktációs fragmentumok hossza (bp)
CD14 C ⁻²⁶⁰ T	F: 5'-atcatccttttccacacc-3' R: 5'-aactctcggtgcctct-3'	58	<i>HaeIII</i>	C allél (vad típus): 155+140 T allél (variáns): 295
TLR4 A ⁺⁸⁹⁶ G	F: 5'-gattagcatacttagactactacctccatg-3' R: 5'-gatcaactctgaaaaagcattccac-3'	56	<i>NcoI</i>	A allél (vad típus): 249 G allél (variáns): 226+23
TLR4 C ⁺¹¹⁹⁶ T	F: 5'-ggttgctgtctcaaaagtatttgggagaa-3' R: 5'-cctgaaagctggagagtgaatgct-3'	56	<i>HinfI</i>	C allél (vad típus): 406 T allél (variáns): 377+29
CARD15 G ⁺²⁷²² C	F: 5'-cttttgcctttcagattct-3' R: 5'-gggcaccactaccaatg-3'	55	<i>HhaI</i>	G allél (vad típus): 395 C allél (variáns): 373+22
CARD15 C ⁺²¹⁰⁴ T	F: 5'-tgcagctggcggatggagt-3' R: 5'-gccgagccgcacaacctca-3'	62	<i>MspI</i>	C allél (vad típus): 72+54+56 T allél (variáns): 126+56
CARD15 3020insC	F: 5'-ggcagaagccctctgcaggcc-3' R: 5'-cctcaaaattctgccattcc-3'	58	<i>ApaI</i>	Vad típus: 151 variáns (insC): 131+20

AZ ELÉRT EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE

A Toll-szerű receptor (TLR) 2, TLR3 és TLR4 expressziójának vizsgálata coeliákiás gyermekek vékonybél nyálkahártyájában

A TLR2 és TLR4 mRNS expresszió szignifikánsan fokozódott mind a kezeletlen coeliákiás-, mind a kezelt coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollokhöz képest ($p < 0,001$). A kezelt coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában még fokozottabb volt a TLR2 mRNS expresszió, mint a kezeletlen coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában ($p < 0,001$). A TLR3 mRNS expresszió a kezelt coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában szignifikánsan fokozódott ($p < 0,001$ vs. kezeletlen coeliákia, illetve kontroll), míg a kezeletlen coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában változatlan maradt a kontrollokhöz képest ($p = \text{NS}$).

A TLR2 fehérje szint a kezeletlen coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában kétszeresére emelkedett a kontrollokhöz képest ($p < 0,05$). A kezelt coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, a TLR2 fehérje szint négyszerese volt a kezeletlen coeliákiásokban mért értéknek ($p < 0,001$).

TLR3-at fehérje szinten csak a kezelt coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában tudtunk kimutatni.

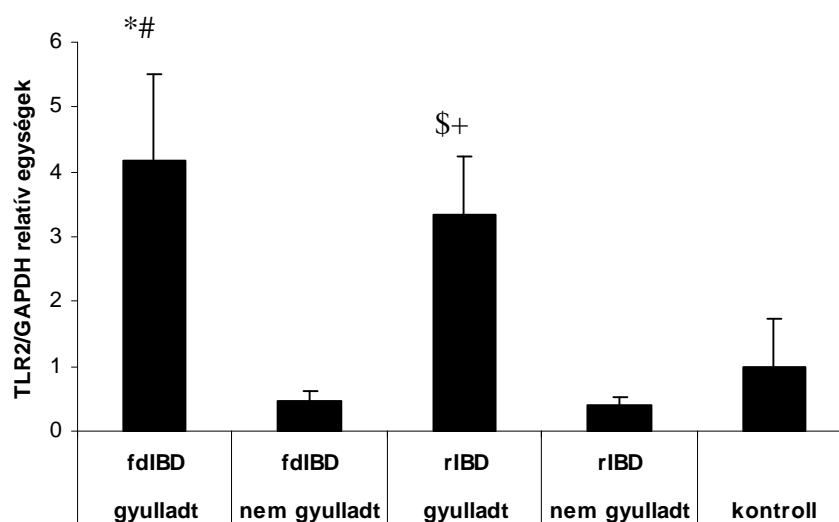
A TLR4 fehérje szint a kezeletlen coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában háromszorosára emelkedett a kontrollokhöz képest ($p < 0,01$). A kezelt coeliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, a TLR4 fehérje szint háromszorosa volt a kezeletlen coeliákiásokban mért értéknek ($p < 0,001$).

A TLR4, a CD14 genetikai polimorfizmusok frekvenciája 1-es típusú diabetesben (T1DM) és coeliakiában, valamint mindkét betegségben szenvedőkben.

A homozigóta CD14 -260TT genotípus előfordulása szignifikánsan alacsonyabb, volt a T1DM betegekben a controllokhöz képest, míg coeliakia és T1DM előfordulásakor ez nem volt kimutatható. Ez arra utal, hogy a CD14 -260TT homozigóta genotípus előfordulása T1DM-ben szenvedőkben növelheti a coeliakia kialakulásának a valószínűségét.

A Toll-szerű receptor (TLR) 2, TLR3 és TLR4 szintézisének vizsgálata krónikus gyulladós bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek vastagbél nyálkahártyájában

A TLR2 és TLR4 mRNS expresszió szignifikánsan fokozódott mind a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s gyermekek-, mind a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán a kontrollokhoz képest ($p < 0,001$ illetve $p < 0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon, a TLR2 és TLR4 mRNS expresszió nem tért el szignifikánsan a kontrollokétól, sem fdIBD-ben, sem rIBD-ben ($p = \text{NS}$). A TLR3 mRNS expresszió nem változott szignifikánsan az egyes csoportokban ($p = \text{NS}$). A 2. ábra példaként mutatja a TLR2 mRNA expressziót az egyes csoportokban.



1. ÁBRA A TLR2 mRNS expresszió szignifikánsan fokozódott a kolon nyálkahártya gyulladásban lévő szakaszán mind a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, mind a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek esetében a kontrollokhoz képest. Az adatokat átlag \pm szórás formájában vannak megadva. * fdIBD gyulladt vs. fdIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), # fd IBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,001$), \$ rIBD gyulladt vs. rIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), + rIBD gyulladt vs kontroll ($p < 0,0001$). Rövidítések: fdIBD=frissen diagnosztizált IBD-s beteg, rIBD=relapszusban lévő IBD-s beteg.

A TLR2 fehérje szint közel kilencszeresére (8,93) nőtt a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s gyermekek-, és közel 8,5-szeresére nőtt a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek

kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán a kontrollokhoz képest ($p < 0,001$ -, $p < 0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon, a TLR2 fehérje szint nem tért el szignifikánsan a kontrollokétól, sem fdIBD-ben, sem rIBD-ben ($p = \text{NS}$). A TLR3 fehérje szint nem változott szignifikánsan az egyes csoportokban ($p = \text{NS}$).

A TLR4 fehérje szint közel ötszörösére (4,97) nőtt az fdIBD-s gyermekek-, és közel 4,5-szörösére nőtt az rIBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán ($p < 0,001$ -, $p < 0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon, a TLR4 fehérje szint nem tért el szignifikánsan a kontrollokétól, sem fdIBD-ben, sem rIBD-ben ($p = \text{NS}$).

A CD14, TLR4, és CARD15 genetikai polimorfizmusai és a kis születési súlyú koraszülöttek nekrotizáló enterocolitise közötti kapcsolat vizsgálata

A vizsgált CD14, TLR4 és CARD15 genotípusok hasonló gyakoriságban fordultak elő a kis születési súlyú koraszülöttekben és az egészséges újszülöttekben ($p = \text{NS}$). A kis születési súlyú koraszülött csoportban nem találtunk összefüggést az egyes genotípusok és a gesztációs kor, valamint a NEC kialakulásának kockázata illetve tüneteinek súlyossága között ($p = \text{NS}$). A vizsgált SNP-k és egyéb perinatális szövödmények, így a szepszis, nyitott Botallo-vezeték, bronchopulmonális dysplasia és a koponyaűri vérzés kialakulásának kockázata között sem találtunk összefüggést. A logisztikus regressziós analízis igazolta, hogy a szepszis független kockázati tényező a NEC kialakulásában (OR: 3.96, CI: 1,10-14,2, $p = 0,036$).

A KUTATÁSI TÉMA TOVÁBBI LEHETSÉGES IRÁNYAI, AZ EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁNAK, HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Vizsgálataink során egyre inkább nyilvánvalóvá vált, hogy önmagában csak az adaptív immunitás vizsgálata nem elégséges a vizsgált immunmediált bélbetegségek kialakulásának megértéséhez. Annak érdekében, hogy felderítsük a TLR2, TLR4 és TLR9 expresszió hatását, a továbbiakban fontos vizsgálni, hogy a TLR-ek expressziója hogyan korrelál egyes transzkripciós faktorok aktivitásának a változásával. Különösen érdekes a downreguláló peroxiszoma proliferator aktivált receptor gammával (PPAR gamma) aktivitásának vizsgálata ebben a vonatkozásban., hiszen ez a faktor gátolni tudja számos gyulladástkeltő cytokin termelését. Fontos kutatási irány lehet a természetes immunitás és a regulátor T-sejtek száma és aktivitása közötti kapcsolat felderítése is.

Budapest, 2008. február hó

Arató András

témavezető