

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**SPONDYLARTHROPATHIA GENETIKAI HÁTTERÉNEK  
VIZSGÁLATA EGÉRMODELLBEN**

Dr. Végvári Anikó



**DEBRECENI EGYETEM**  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**SPONDYLARTHROPATHIA GENETIKAI HÁTTERÉNEK VIZSGÁLATA  
EGÉRMODELLBEN**

**Dr. Végvári Anikó**

DEBRECENI EGYETEM  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

**Klinikai Orvostudományok** doktori iskola

**Immunológia** doktori program

**A Szigorlati Bizottság elnöke:**

Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

**A Szigorlati Bizottság tagjai:**

Prof. Dr. Módis László, az MTA doktora

Prof. Dr. Poór Gyula, az MTA doktora

**A Védési Bizottság elnöke:**

Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

**Opponensek:**

Dr. Gergely Péter, Ph.D.

Dr. Harjit Bhattoa, Ph.D.

**A Védési Bizottság tagjai:**

Prof. Dr. Módis László, az MTA doktora

Prof. Dr. Poór Gyula, az MTA doktora

**Az értekezés védésének időpontja és helye:**

2009. június 15. 13.00h: I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

## 1. Bevezetés

A spondylitis ankylopoetica (SPA), a gyulladássos reumatológiai kórképek közé tartozó, jellegzetes genetikai meghatározottsággal és klinikai sajátosságokkal bíró betegségcsoport, a spondylarthropathiák vagy spondylarthritisek (SpA) jellegzetes képviselője. (Itt jegyezzük meg, hogy az angolszász nomenklaturának megfelelően a spondylarthropathia csoport elfogadott rövidítése az "SpA", ellentétben az "SPA"-val, amely magát a spondylitis ankylopoeticát jelenti.) Annak ellenére, hogy a betegség etiológiája pontosan nem ismert, környezeti tényezők és genetikai faktorok együttes hatását feltételezik a háttérben.

A családi halmozódás az SPA jellegzetessége és ez a genetikai faktorok szerepét sugallja a betegség kialakulásában. Erre utal, hogy SPA-s betegek családjában további SPA-s esetek többnyire a humán leukocita antigén B27 variánsát (HLA-B27) hordozó rokonok körében fordulnak elő. SPA-s ikervizsgálatok közül egy finn tanulmányban a konkordancia 50% volt az egypetéjű ikrek között, 15% a kétpetéjű és 20% a HLA-B27<sup>+</sup> kétpetéjű ikrek között. Egy Nagy-Britanniában végzett vizsgálatban ezen értékek a fenti sorrendben 75, 12,5 és 27%-nak adódtak. A konkordancia arányok monozigóta és dizigóta ikrek között észlelt különbségei valóban a genetikai faktorok alapvető szerepét mutatják az SPA iránti fogékonyságban.

Az SPA és a HLA-B27 kapcsoltságának magyarázatára két alapvető elmélet ismert. A receptor teória azt feltételezi, hogy bizonyos T sejt receptorok képesek felismerni az idegen és saját MHC peptidek komplexét, de ez a feltételezett patogén peptid egyelőre nem ismert. A molekuláris mimikri hipotézis viszont arra vonatkozik, hogy mikroorganizmusok melyek részben hasonlóak, vagy keresztreakálnak a HLA molekulákkal, antigén tulajdonságú alkotóelemek lehetnek. Az utóbbi hipotézis kapcsán elsősorban *Klebsiella* és *Yersinia*

antigének szerepe vetődött fel, de az ennek megfelelő patogén mikroorganizmust eddig még nem sikerült kimutatni SPA-s betegekben.

A gének szerepét tekintve, a major hisztokompatibilitási komplex (MHC) önmagában nem elégséges az SPA öröklődésének magyarázatára. Amíg a kaukázusi SPA-s betegpopuláció több mint 90%-a HLA-B27<sup>+</sup>, addig a populáció HLA-B27<sup>+</sup> tagjainak csupán <5%-ában alakul ki SPA. A HLA-B27 összességében az SPA iránti genetikai fogékonyságnak csak mintegy 20-50%-áért felelős. Következésképpen kiterjedt vizsgálatok vannak folyamatban, amelyek más, nem MHC jellegű genetikai faktorok azonosítására irányulnak. Máig tucatnyi kromoszomális régiót, vagy géncsoportot hoztak összefüggésbe az SPA iránti fogékonysággal.

A nem MHC gének szerepét génkapcsoltsági vizsgálattal ("linkage analízissel"), a teljes genom szűrésével ("genome-wide screening") vagy kandidáns gén asszociációs vizsgálatokkal igyekeznek feltérképezni. Ezen lókuszok közül néhányat egymástól függetlenül több kutatócsoport is egybehangzóan leírt, így ezek patogenetikai jelentősége valószínűsíthető. Ilyen pl. az interleukin-1 (IL-1) géncsoport több tagja, melyek a 2. kromoszóma hosszú karján található. Más gének, mint pl. az ARTS1 (Aminopeptidase Regulator of TNF receptor Shedding; másik elnevezése: Endoplasmic Reticulum-associated Aminopeptidase 1; ERAP1) és az IL-23 receptor (IL-23R) gének szerepére a közelmúltban mutattak rá a Wellcome Trust Case-Control Consortium (WTCCC) kutatócsoport keretein belül. Ebben a nagyméretű, a teljes genomot elemző vizsgálatban hét gyakori kórkép génasszociációs vizsgálatát végezték el, összesen 14000 eset mintáin. Mindent egybevéve azonban még mindig jóval kevesebb információval rendelkezünk az SPA és más SpA-k genetikáját illetően, mint pl. a rheumatoid arthritis esetében.

Az egyre növekvő mennyiségű, a genetikai faktorokra vonatkozó adat ellenére, az SPA multifaktoriális betegség, ahol a gének és környezeti faktorok „konspirációja” vezet a

jól ismert klinikai tünetek kialakulásához. Ezek lehetnek mind szkeletális (axiális és oligoartikuláris) és extraszkeletális manifesztációk (uveitis, gyulladásoos bélbetegség, cardialis és pulmonalis érintettség, stb.), melyek megfelelő kezelés nélkül végsősoron rokkantságot eredményezhetnek és az életkilátásokat is veszélyeztethetik.

Jelen munkánkban először irodalmi adatok és saját korábbi eredményeink alapján összefoglaljuk az SPA genetikai hátterére vonatkozó jelenlegi, mind humán, mind állatkísérletes vizsgálatok során nyert ismereteinket. Ezt követően saját, az SpA állatmodelljéből származó kísérletes adatainkat mutatjuk be. Reményeink szerint munkánk hozzájárul a SpA-k kialakulásának jobb megértéséhez és ezáltal újabb lépéseket tehetünk a betegség leküzdése irányában.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A HLA-B27 és más MHC gének pathogenetikai szerepe

#### 2.1.1. A HLA-B27 jelentősége

A HLA-B27 és az SPA közötti asszociációt először az 1970-es évek elején írták le. Mint láttuk, a HLA-B27 prevalenciája az átlagpopulációban 6-8%, az SPA-s betegek körében viszont >90%. A másik oldalról megközelítve a kérdést, amíg az SPA a HLA-B27<sup>+</sup> egyének 1.2-1.3%-ában alakul ki, addig az SPA-s betegek első fokú HLA-B27<sup>+</sup> rokonainak 15-21%-ában. A HLA-B27<sup>+</sup> mono-, és dizigóta ikreknél a konkordancia aránya 63% illetve 23%. Mindezek alapján megbecsülve, a HLA-B27 SPA-ban a genetikai rizikó mintegy 20-30%-áért felelős.

Bár nem kétséges, hogy a HLA-B27 az SPA fő szuszceptibilitási génje, annak mechanizmusa, hogyan jön létre a betegséget kiváltó hatás, teljesen még ma sem tisztázott. A SpA minden manifesztációja kiváltható HLA-B27 transzgén patkányokban, ami a gén közvetlen szerepét mutatja a betegségre való fogékonyság szempontjából. A 25 ismert HLA-B27 alléltípus közül a HLA-B\*2705, a kaukázusi populációban meghatározó allél lehet az eredeti allél, és minden más allélforma valószínűleg a HLA-B\*2705-ből származtatható, mutációk révén. Az allélmutációk legnagyobb része a variábilis régiót érinti, ami felerősíti a T sejt receptorok és antigenikus peptidek közti kölcsönhatást. Bár a többi HLA-B27 allél közül csaknem mindegyiket összefüggésbe hozták a SpA kialakulásával, a HLA-B\*2706 és a HLA-B\*2709 allélvariánsok, melyek Dél-Kelet Ázsiában illetve Szardínián fordulnak elő, nem mutatnak asszociációt a betegséggel.

### *2.1.2. Egyéb HLA-B allélek*

A HLA-B27 mellett Togóban a HLA-B\*1403 asszociációját mutatták ki SpA-val, míg a HLA-B60, HLA-B35 és HLA-B39 valószínűleg csekély szerepet játszanak a betegség kialakulásában.

### *2.1.3. A HLA-B molekulák szerepe az antigénprezentációban*

Mint láttuk, a környezeti tényezők közül elsősorban a bakteriális antigéneknek tulajdonítanak jelentőséget a SpA kifejlődésében. Ami az antigénprezentációt illeti, az SpA iránti fogékonyságban szerepet játszó HLA-B molekulák szerkezetében a 45. pozícióban levő glutaminsav és a 67. pozícióban található cisztein valószínűleg alapvető jelentőségűek, miután ez az aminosav-mintázat hiányzik a SpA-ra nem hajlamosító alléltípusokból. Ezen szerkezeti jellegzetességen alapuló funkcionális teóriák láttak napvilágot. Az "arthritisogén peptid" elmélet lényege, hogy a jellegzetes molekuláris struktúra teszi lehetővé specifikus peptidek prezentálását, melyek autoimmun választ eredményeznek. A "károsodott felgombolyodás" (impaired folding) teória szerint diszulfid hidak képződnek a 67-es pozícióban lévő két cisztein között, ami a molekulák megváltozott intracelluláris transzportját eredményezi.

### *2.1.4. Egyéb MHC gének lehetséges szerepe*

HLA-B allélektől különböző MHC gének is szerepet játszhatnak az SpA-k kialakulásában. Ezen gének között valószínűleg vannak MHC-II osztályú allélek (HLA-DR gének), a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) génjei, komplement gének, valamint néhány gén, amelyek az I. osztályú MHC révén történő antigén prezentálásban vesznek részt (pl. TAP, LMP2, LMP7). Sajnos a HLA-B27 meghatározó szerepe nagyban befolyásolja a többi gén szerepének értelmezését, mivel ezen genetikai asszociációk valószínűleg csak az említett lókuszok és a HLA-B27 közötti kapcsoltságra vezethetők vissza ("linkage disequilibrium").

Ezen gének közül egyedül a HLA-DR4 direkt additív szerepét erősítették meg SpA-s betegek HLA-B27<sup>+</sup> rokonaiban.

## **2.2. Nem-MHC allélek SPA-ban**

Miután, mint láttuk, a HLA-B és egyéb MHC allélek az SpA-k genetikai meghatározottságának csupán egy kisebb hányadát képezik, nyilvánvaló, hogy egyéb nem MHC-hez kötött ("non-HLA") gének is felelősek a betegséggel szembeni fogékonyságért. Ezen genetikai asszociációk vizsgálatára különböző módszerek alkalmasak.

### *2.2.1. Kapcsoltsági vizsgálatok*

Genetikai kapcsoltság ("linkage") áll fenn amikor egy kandidáns gén és egy másik ismert lókuszt nagyon közel van egymáshoz, aminek következtében a két lókuszt együttesen öröklődik. Ilyen kapcsoltsági vizsgálatokat lehet végezni nagy családokban, ahol egy adott betegség több családtagot érint. Ezekben a vizsgálatokban az eredményeket ún. nem-parametrikus kapcsoltsági értékként ("non-parametric linkage score"; NPL) adják meg, amit aztán LOD (logarithm of odds) érték formájába konvertálnak. Anélkül, hogy a LOD számításának részleteit ismertetnénk, magas LOD értékek ( $LOD \geq 3.6$ ) szignifikáns asszociációra utalnak, míg a "szuggesztív"  $LOD \geq 2.2$  érték valószínű kapcsoltságot jelez.

Az SPA-ra való hajlammal kapcsolatosan négy nagy humán kapcsoltsági vizsgálat történt. Az Észak-Amerikai Spondylitis Konzorcium (NASC) tanulmányában 185 család 255 betegség által érintett testvérpárát vizsgálták. A legmagasabb szignifikanciájú asszociációkat természetesen a 6. kromoszómán található MHC lókuszt ( $LOD=15.6$ ), valamint egyetlen, a 16. kromoszómán elhelyezkedő non-HLA lókuszt ( $LOD=4.7$ ) mutatta. Más, az 1., 3., 4., 5., 10., 11., 17. és 19. kromoszómán kimutatott lókusztok szuggesztív LOD értékkel rendelkeztek. A francia SPA genetikai kohorszban (French AS Genetics Cohort; GFEGS) 180 családot

vizsgáltak 244 érintett testvérpárral. Itt szintén az MHC régió mutatta a legerősebb kapcsoltságot. Ugyancsak ebben a vizsgálatban a 9. kromoszóma rövid karjának egy régiója szignifikáns asszociációt mutatott az akut anterior uveitisszel, de az SPA-val nem. Két oxfordi vizsgálat szintén megerősítette a kapcsoltságot az MHC régióval, és szuggesztív szintű kapcsoltságot mutatott a 2., 3., 9., 10., 11., 16. és 19. kromoszómákon elhelyezkedő lókuszosokkal.

A négy tanulmány és további kisebb vizsgálatok alapján végzett nagy metaanalízis szolgáltatja a legegyszerűsebb bizonyítékot a 6. kromoszómán lévő MHC-val való kapcsoltságról. További erős kapcsoltságot figyeltek meg a 10. és 16. kromoszómákon elhelyezkedő lókuszosokkal, illetve mérsékelt kapcsoltságot találtak a 2., 3., 4., 5., 6., 11. és 17. kromoszómák egyes lókuszaival.

Néhány említett lókuszos összefüggést mutatott a betegségaktivitással és a funkcionális károsodás mértékével is. Amíg az MHC régió ezen paraméterekkel nem mutatott kapcsoltságot, a 18. kromoszómán lévő régiók szignifikáns asszociációt mutattak a BASDAI értékkel. Ezen túlmenően a 2. kromoszóma hosszú karjának egyes régiói szuggesztív kapcsoltsági szintet értek el a BASFI funkcionális index tekintetében.

### 2.2.2. Kandidáns gén asszociációk

Az IL-1 géncsalád vonatkozásában számos, részben ellentmondó adat született. Ez a génekompexum a 2. kromoszómán helyezkedik el és az IL-1 $\alpha$  (*IL-1A*), IL-1 $\beta$  (*IL-1B*), IL-1 receptor antagonist (*IL-1RN*), valamint más járulékos géneket (*IL1F5*, *IL1F10*) tartalmaz. Ez a géncsoport megfelel a fentebb említett kapcsoltsági vizsgálatok által a 2. kromoszómán azonosított géncsoportnak. Az IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  proinflammatorikus citokinek, melyeket elsősorban monociták és makrofágok termelnek. Ezek stimulálni képesek más gyulladásos mediátorok felszabadulását, beleértve a prosztaglandinokat, mátrix metalloproteinázokat és

más citokineket, valamint elősegítik különböző adhéziós receptorok expresszióját is. Az IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) kompetitív módon gátolja az IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  kötődését receptorához és így kivédi ezen citokinek proinflammatorikus hatásait. Amíg kisebb korai vizsgálatok felvetették az SPA és az IL-1Ra-t kódoló *IL1RN* gén kapcsolatát, később nagyobb tanulmányok ezt nem tudták megerősíteni. Később néhány kisebb vizsgálatban és egy közelmúltban publikált metaanalízisben kimutatták az *IL1RN* gén 2. intronja VNTR (variable nucleotide tandem repeat) polimorfizmusának gyakoribb expresszióját SPA-s betegekben, egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Ezen felül, két, az *IL1RN* gén 6. exonjában kimutatott egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism; SNP) szintén asszociációt mutatott SPA-val. Más gének vonatkozásában az IL-1 családon belül, az *IL-1A* és *IL-1B* génekben összesen 14 SNP esetében írták le az SPA-val való szignifikáns asszociációt. Ezen SNP-k közül az *IL-1A* gén rs3783526, valamint az *IL-1B* gén rs1143627 polimorfizmusa mutatta a legerősebb asszociációt. Más vizsgálatokban az *IL-1A* gén rs2856836, rs17561 és rs1894399 polimorfizmusait is összefüggésbe hozták az SPA kialakulásával.

### 2.2.3. Genom szintű vizsgálatok

Amint azt korábban már említettük, a WTCCC konzorcialis kutatócsoport két új lókuszt, az *IL-23R* és *ARTS1* esetében talált erős asszociációt az SPA-val. Az *IL-23R*-nak szerepet tulajdonítanak a RA, psoriasis, és gyulladásoz bélbetegségek (elsősorban Crohn-betegség) patogenezisében. Az IL-23 erőteljes hatású proinflammatorikus citokin, mely stimulálja a fenti kórképek patogenezisében ugyancsak kiemelt szerepet játszó Th17 sejtek képződését, valamint más citokinek, így a TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 és IL-22 termelődését. Az *IL-23R* fehérje génje az 1. kromoszómán helyezkedik el. A Crohn betegségre és psoriasisra való fogékonyság az rs11209026 SNP-vel mutat asszociációt. Emellett az rs7530511 SNP-t szintén összefüggésbe hozták a psoriasisal. Az említett SNP-k mellett az rs10889677 és rs2201841

polimorfizmusoknak szintén szignifikánsan magasabb az előfordulási gyakorisága Crohn betegségben. A közelmúltban erősítették meg, hogy az rs10889677 és rs2201841 SNP-k nemcsak a Crohn betegséggel, hanem a RA-szel is összefüggést mutatnak. Az említett WTCCC kutatócsoport összesen 8 IL-23R SNP-t genotipizált 1000 SPA-s beteg és 1500 kontroll személy vizsgálata során. Ebből a 8 SNP-ből 7 mutatott asszociációt SPA-val. Ezen belül erősen szignifikáns összefüggést találtak az rs11209032, rs11209026 és rs10489629 SNP-k esetében. Az IL-23R génpolimorfizmus és SPA közötti asszociációkat nemrégiben egy spanyol vizsgálat is megerősítette. Az *IL-23R* gén az SPA-ra való fogékonyság populáció szintű rizikójának 9%-áért felelős.

Ami az ARTS1-et illeti, ez a fehérje az endoplazmás reticulumban található aminopeptidáz. Az ARTS1 (ERAP1) több citokin, így a TNF- $\alpha$  (TNF-R1), IL-1 (IL-1R2) és IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) receptorait hasítja le a sejtfelszínről. Az ARTS1 az antigén peptidok feldolgozásában is szerepet játszik, melynek során az antigén prezentáláshoz optimális hosszúságú peptidszakaszok keletkeznek. Az ARTS1-et kódoló három gén az 5. kromoszómán helyezkedik el. A WTCCC tanulmányban, majd utánkövetéses vizsgálatokban 5 SNP, az rs27044, rs30187, rs17482078, rs10050860 és rs2287987 esetében találtak asszociációt az SPA-val. Ezzel szemben egyetlen SNP sem mutatott összefüggést a gyulladásos bélbetegségekkel. Ez alapján az ARTS1 valószínűleg nem minden SpA patogenezisében játszik szerepet, hanem hatásai SPA-ra specifikusnak tűnnek. Az *ARTS1* gén az SPA teljes genetikai rizikójának 26%-áért tehető felelőssé.

#### 2.2.4 Egyéb gének meg nem erősített asszociációi

Mint láttuk, az IL-1 géncsalád, az IL-23R és ARTS1 géneknek a betegséggel való asszociációja több nagy vizsgálatban is megerősítést nyert. Egyéb, kisebb vizsgálatok más gének lehetséges szerepét is felvetették SPA-ban.

A citokróm P450 CYP2D6 gén 22. kromoszómán elhelyezkedő néhány allélje esetében gyenge asszociációt találtak SPA-val. Ellentmondásosak az adatok a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ANKH és Toll-like receptor 4 (TLR4) gének vonatkozásában. Amíg néhány vizsgálatban felvetették ezen gének SPA-val való gyenge asszociációját, más tanulmányokban ezt nem tudták megerősíteni. Korábbi vizsgálatok azt is valószínűsítették, hogy az IL-10 allél egyes polimorfizmusai védő hatásúak lehetnek a reaktív arthritis kialakulásával szemben, de SPA vonatkozásában ilyen összefüggést nem találtak. Végül, a NOD2/CARD15 mutációkat kapcsolatba hozták a Crohn betegséggel, azonban számos tanulmány alapján SPA-ban hasonló asszociáció nem került megerősítésre.

### **2.3. SpA állatmodellek és alkalmazásuk genetikai vizsgálatokban**

Az állatmodellek nélkülözhetetlen segítséget jelentenek a humán autoimmun-reumatológiai betegségek kutatása szempontjából. Míg azonban a RA-nek számos elfogadott állatmodellje létezik, az emberi SPA vizsgálatára csak jóval kevesebb jól alkalmazható modell alkalmas. Az *ank/ank* egerekben egy funkcióvesztést eredményező mutáció érinti az *ank* gént és ezen állatokban progresszív SpA fejlődik ki, mely a humán SPA-hoz hasonló, annak ellenére, hogy az *ank* gén sem emberben, sem egérben nem játszik szerepet autoimmun folyamatokban. A SpA-k további modelljei között említhetők a HLA-B27 transzgén rágszálók, a mutáns IX. típusú kollagént vagy a TNF- $\alpha$  “csonka” formáját expresszáló transzgén egerek.

Munkacsoportunk évek óta folytat vizsgálatot a proteoglikán-indukált spondylitis (PGIS) egérmodellel. Jelen kutatásaink során is ezt az állatmodellt alkalmaztuk. Mint a továbbiakban részletesen ismertetjük, a PGIS modell szintén hasznos adatokat szolgáltat a genetikai háttér és pathomechanizmus vonatkozásában.

## 2.4. Korábbi vizsgálatok a PGIS modellben

Fogékony egértörzsekben polyarthrititis és spondylitis indukálható humán porc proteoglikánnal (PG) történő immunizálással. A PGIS klinikai és radiológiai szempontból sok hasonlóságot mutat a humán SPA-val. A PG-indukált arthritissre (PGIA) és PGIS-re való fogékonyág elkülönülése kevert genetikai háttér esetében arra utal, hogy a PGIA és a PGIS két hasonló pathomechanizmusú, de különálló betegség. Következésképpen ez a modell lehetővé teszi a SpA-k etiológiájában szerepet játszó genetikai összetevők vizsgálatát, függetlenül a PGIA-re való hajlamot meghatározó tényezőktől.

PG aggregánnal történő szisztémás immunizálással PGIS-t hoztunk létre fogékony BALB/c és C3H/HeJCr (C3H) egerekben, valamint ezeknek DBA/2 (arthrititis és spondylitis rezisztens) és DBA/1 (csak kollagén indukálta arthritissre [CIA] fogékony) törzsekkel létrehozott F1 és F2 generációiban. Csaknem minden PG-vel immunizált BALB/c és C3H egér esetében (97-100%) perifériás arthritiss fejlődött ki 2 héttel a 3. antigén injekciót követően. Az érintett ízületeket hisztológiailag masszív gyulladáisos sejtes infiltráció, pannus képződés, valamint a porc- és csonterosiók kialakulása jellemezte. Sem a DBA/1 vagy DBA/2 szülők, sem a (DBA/2 x BALB/c) F1 hibridek esetében nem alakult viszont ki arthritiss a 14-18 hetes kísérleti periódus alatt.

A PG immunizált BALB/c ill. C3H egerek 62-70%-ában fejlődött ki spondylitis. Ezzel szemben csak enyhe (1-2 porckorongot involváló peridiscitis) és sporadikus csigolya érintettséget észleltünk a PG + dimethyldioctadecylammonium bromiddal (DDA-val) immunizált DBA/2 törzs néhány állata esetében (4%). A PG-vel vagy humán II. típusú kollagénnel (CII) immunizált DBA/1 egerekben egyáltalán nem alakult ki spondylitis. A spondylitis incidenciája és súlyossága nagyban hasonló volt mindkét PGIS fogékony szülői törzs (BALB/c és C3H) esetében.

Legújabbán egy kiterjesztett longitudinális vizsgálat, mely in vivo ProSense és OsteoSense módszert alkalmazott röntgen vizsgálatokkal alátámasztva, ill. később hisztopatológiai vizsgálatot használva arra utal, hogy a DBA/2 egerek fogékonyak a spondylitisre, de az arthritisre nem (szerzők nem publikált megfigyelése).

Annak ellenére, hogy a BALB/c x DBA/2 keresztezés F1 hibridjei teljesen rezisztensek voltak PGIA-ra nézve, váratlanul több mint 30%-uk esetében alakult ki PGIS. Ezzel ellentétben a (BALB/c x DBA/1) F1 egerekben egyáltalán nem alakult ki spondylitis. Ennél is meglepőbb volt, hogy a BALB/c x DBA/2 keresztezés F2 generációja (PGIS érzékeny versus rezisztens) és a (BALB/c x C3H) F2 egerek (két PGIS érzékeny szülői törzs) hasonlóan magas spondylitis incidenciát (63-70%) és súlyosságot mutattak, míg a (BALB/c x DBA/1) keresztezés egyetlen F2 hibridje sem mutatta gerincérintettség jeleit.

Ez a megfigyelés annál is inkább váratlan volt, mivel mindkét keresztezés (BALB/c x DBA/2 és BALB/c x DBA/1) F2 generációja hasonló PGIA incidenciát és súlyosságot mutatott azonos protokoll szerint immunizálva. Ezek a megfigyelések azt sugallták, hogy a DBA/1 törzs valószínűleg igen erős protektív gént, vagy géneket hordoz a spondylitis tekintetében, míg a DBA/2 genom erős supportív gént, vagy géneket kell hordozzon, amelyek "némák" ("inaktívak") az eredeti DBA/2 törzsben.

A BALB/c és DBA/2 törzsek ugyanazt a H2-d allélt hordozzák. Ez azt mutatja, hogy az MHC önmagában (pl. a DBA/2 törzsben) nem elégséges a PGIA-re való fogékonyság meghatározásában, de elősegíti a PGIS kialakulását. Ezt támasztották alá a (BALB/c x DBA/1) F2 generációval kapcsolatos megfigyeléseink, ahol az immunizált egerek kb. 25%-a homozigóta volt a H2-d allélra nézve, de egyetlen F2 hibridben sem alakult ki spondylitis.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Kísérleti állatok, antigének, immunizálás

A National Cancer Institute (NCI)-től származó nőstény BALB/C és hím DBA/2 egereket keresztezve nyertük az F1, majd azokat keresztezve az F2 generációt. A kísérleteket a chicagói Rush Egyetem Orvosi Központjának Állatgondozói és Felhasználói Bizottságának jóváhagyásával végeztük. A különböző kísérleti egércsoportokat azonos, csíramentes körülmények között tartottuk. A kísérleti állatokat 12 hetes korukban immunizáltuk intraperitonealisan (ip) adott 100 µl steril PBS-ben (0,15M NaCl, 0,01M káliumfoszfát, pH 7,4) oldott 100 µg PG proteinnel és 1 mg dimethyldioctadecylammonium bromiddal (DDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA), a standard protokollt követve. Az egerek összesen 4 injekciót kaptak 3 hetente (0.,21.,42., és 63. nap) és a 4. PG injekciót követően 3-4 héttel kerültek leölésre (84-91. nap között).

#### 3.2. Klinikai és immunológiai fenotípusok

A kísérleti állatok gerincét a középső nyaki szakasztól a lumbális szakasz disztális részéig kiperaráltuk, fixáltuk (10% formalin), dekalifikáltuk, majd paraffinba ágyazva készültek a szövettani metszetek. A metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük meg hisztopatológiai vizsgálat céljára. A PGIS súlyosságának jellemzése a szövettani eltérések alapján volt lehetséges, a korábban közölt pontozási rendszer alapján:

- I. stádium* (pontérték: 1): az enthesitis, gyulladással járó sejtes infiltráció az intervertebrális discus körül (discitis), és/vagy az anulus fibrosus infiltrációja
- II. stádium* (pontérték: 2): a porckorong kevesebb, mint 50%-ának felszívódása
- III. stádium* (pontérték: 3): a porckorong csaknem teljes reszorpciója (50-100%)
- IV. stádium* (pontérték: 4): ankylosis

Egerenként átlag 18 intervertebrális discust (IVD) értékeltünk. Végül minden állat esetében egy ún. spondylitis index (SPI) értéket számoltunk ki elosztva a pontérték összegét az értékelt porckorongok számával (SPI: kumulatív pontérték az adott metszet esetében / vizsgált porckorongok száma), tekintve, hogy az egyes metszetek technikai okokból nem pontosan azonos számú porckorongot jelentettek. Ezen túlmenően egy speciális, ún. „késői kezdetű” spondylitis score (SPI<sub>LS</sub>) is meghatározásra került. az SPI<sub>LS</sub> 1-es értéket kapott, ha legalább egy IVD 1-es súlyossági pontértéket ért el. Egyébként a progresszív spondylitist mutató egerek SPI<sub>LS</sub> értéke 0 lett, ha a porckorongok előrehaladott súlyosságú spondylitisnek feleltek meg (SPI: 2,3,4.). Az antigén (PG)- specifikus T sejt proliferációt <sup>3</sup>H-thymidin beépülés mérésével határoztuk meg, a lépsejteket 50 µg PG protein/ml hozzáadásával stimulálva. A méréseket négy párhuzamos mintában végeztük (3x10<sup>5</sup> sejt/lyuk, 96 lyukú tenyésztőlemez). Az antigén indukált citokin termelést (IL-2, IFN-γ, IL-4, TNF-α) és szérumban antitest szinteket, valamint a szérumban amyloid-A (SAA) és szérumban citokin szinteket (IL-1, IL-4, IL-6, and TNF- α) kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztekkel határoztuk meg.

### 3.3. Genomikus markerek

A szülői BALB/c és DBA/2 törzsek között kimutatható egyszerű szekvencia hosszúság polimorfizmusok (SSLP) vizsgálatához a markereket az egér genom adatbázisból választottuk ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)), vagy alternatívaként olyan primereket használtunk melyek ismert, általában rövid, < 100 bázispárnyi (bp) ismétlődő szakaszokat (tandem repeat) szegélyeztek az egér genomban. A PCR fragmentumok hosszkülönbsége a BALB/c és DBA/2 allélek esetében >3% volt. A törzsek közötti polimorfizmusokat 3,5%-os, nagy felbontású Aquapore agaróz gélen vizsgáltuk (National Diagnostics), ethidium bromid festés és UV fény segítségével. Mind a 20 egér kromoszóma (kivéve az Y kromoszómát) lefedésre

került, összesen 224 polimorfikus markerrel, átlagosan 6.2 centimorgan (cM) (10.8 megabázispár [Mbp]) távolságokban.

### 3.4. Genomszűrés és statisztikai analízis

DNS izolálás történt az egér vesékből proteináz kálium- és nátrium-lauril-szulfát használatával. A DNS genotipizálása SSLP markerekkel (MWG Biotech), hagyományos PCR-al és gél elektroforézissel történt a korábban közöltek szerint. A kiindulási kapcsoltsági térkép Map Manager QTX program segítségével készült a Kosambi „térkép” funkció használatával. A markerek sorrendje további igazításra került a „ripple” parancs segítségével, majd megerősítést nyert az oligonukleotid primerek fizikai pozícióinak megfelelően a National Center for Biotechnology Information (NCBI) egér genom könyvtárában ([www.ensembl.org/Mus\\_musculus/](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/)) és a Celera Discovery System genom adatbázisában ([www.celeradiscoverysystem.com](http://www.celeradiscoverysystem.com)). Az egyszeri markerhatást marker regresszióval becsültük meg a Map Manager QTX segítségével. A genomikus markerekkel  $\chi^2 > 10$ -nél ( $p < 0,01$ ) erősebb asszociációt mutató tulajdonságok esetében mind az egyszerű, mind a komplex intervallum térképezést elvégeztük az egész genomon, a Windows QTL Cartographer segítségével. A „valószínűségi arány statisztika” (likelihood ratio statistic, LRS) kísérlet specifikus, empirikus küszöbértékét minden tulajdonság esetében permutációs teszttel határoztuk meg ( $n = 2000$ ) a Churcill és Doerge szerinti algoritmus szerint, melyet a Map Manager QTX és a Windows QTL Cartographer is alkalmaz. A genom szintű kapcsoltság kifejezetten szignifikáns ( $\alpha < 0,001$ ) és szignifikáns ( $\alpha < 0,05$ ) szintjeit alkalmaztuk. Szuggesztív kapcsoltsági szintként a  $p < 0,05$  kromoszóma szintű szignifikancia szintet alkalmaztuk ( $\alpha < 0,63$ ), mely megfelel egy fals pozitív QTL-nek (quantitative trait locus; „funkció kapcsolt lókusz”) a teljes genomot tekintve.

A statisztikai analízist az SPSS 10.0 szoftverrel (SPSS, Chicago, IL, USA) végeztük. Minthogy a spondylitis indexek nem parametrikus eloszlást mutattak az F2 generációban, a Mann-Whitney U tesztet alkalmaztuk a csoportok közötti különbségek vizsgálatára és a Spearman féle korrelációs koefficiens ( $r_s$ ) a tulajdonságok közötti eltéréseknél. A  $\chi^2$  próbát és a Kruskal-Wallis H tesztet használtuk, hogy meghatározzuk a különböző tulajdonságok (traits) eloszlásbeli különbségeit. Kétmintás Student-féle  $t$  próbát használtunk a két csoport átlagértékeinek összehasonlításánál, amikor az adatok normál eloszlást mutattak. Két adatscsoport között a különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha a  $p$  érték  $<0,05$  volt.

## 4. Eredmények

### 4.1. A spondylitis klinikai és immunológiai jellegzetességei a szülői BALB/c és DBA/2 törzsekben

Porc PG-nal történő szisztémás immunizálást követően a BALB/c egerekben átlagosan 61,5%-os incidenciával alakul ki spondylitis. Ugyanezen immunizálási protokollt használva a DBA/2 egerek lényegesen kisebb fogékonyságot mutatnak (4%) és legfeljebb csak enyhe IVD károsodás jeleit láthatjuk. Összehasonlítva a BALB/c egerekkel, pl. ankylosis egyáltalán nem volt észlelhető DBA/2 egerekben.

A fő immunológiai paraméterek lemérésre kerültek a szülői törzsek esetében és korrelációt kerestünk a betegségre való fogékonysággal. A DBA/2 törzsben csaknem háromszor magasabb immunglobulin-G1 (IgG1) szérumszinteket mértünk összehasonlítva a BALB/c egerekkel (17,8 illetve 6,5 mg/ml). Az IgG1 volt a fő izotípus mindkét törzsben. Az IgG2a izotípus szérumszintjei fordított megoszlást mutattak a törzsek között: BALB/c esetében volt háromszoros szint mérhető. Az IgG1/IgG2a arány alapján mindkét törzs T helper 2 (Th2) túlsúlyú immunválaszt mutatott, de a PG-vel immunizált DBA/2 egerekben ez a Th2 válasz lényegesen erősebb volt. A törzsek között hisztológiai értékeléssel talált különbségek jól korreláltak a proinflammatorikus citokinek emelkedett koncentrációival, elsősorban a BALB/c egerek IL-1 és IL-6 szérumszintjeivel. Mindemellett az IL-4 és TNF $\alpha$  szintek hasonlóak voltak a két törzs esetében.

A BALB/c egerek antigén (PG) stimulált limfocitái szignifikánsan magasabb IFN- $\gamma$  és IL-4 termelést mutattak, mint a DBA/2 limfociták és az IFN- $\gamma$ /IL-4 arány 2,2x magasabb volt a BALB/c egerekben (5,1), mint a DBA/2 állatok esetében (2,3). Ez a megfigyelés azt is jelenti, hogy a PG indukált spondylitises BALB/c egerek szignifikánsan erőteljesebb Th1 irányú „shift”-et mutatnak, szemben a látszólag rezisztens DBA/2 törzsszel.

#### **4.2. A klinikai és immunológiai „tulajdonságok” (traits) közötti korrelációk az F1 és F2 hibrid populációk esetében**

A spondylitis incidenciája a BALB/c és DBA/2 törzs F1 hibridjeiben 35,5 % volt, mely kb. a szülői törzsek közötti középértéknek felel meg, bár a betegség súlyossága viszonylag alacsony értéket mutatott (SPI 0,16). Az F2 hibrid egerek spondylitis incidenciája, váratlanul csaknem megegyező értéket mutatott, a fogékony BALB/c szülői törzsével, míg a súlyossági score érték csaknem kétszer magasabb volt, mint a BALB/c egerek esetében.

Mivel az F1 generáció egyedei genetikailag homogének, csak a környezeti faktorok tehetők valószínűleg felelőssé a tulajdonságok varianciájáért. Ezzel szemben az F2 hibrid egerek genetikailag heterogének, így esetükben mind genetikai, mind környezeti faktorok hatása feltételezhető. Ennek megfelelően a spondylitis és az immunológiai paraméterek korrelációja az F1 és F2 generációk esetében különböző forrásból kell, hogy származzon. Az egyik legjobb példa erre a SPI, mely igen szoros korrelációt mutat az SPI<sub>LS</sub> értékkel az F1 generációt tekintve ( $r_s = 0,97$ ), de ez a korreláció jelentősen gyengébb volt az F2 hibrid egerek esetében ( $r_s = 0,54$ ), mert a gének heterozigóta kombinációja különbözőképpen befolyásolta az SPI és SPI<sub>LS</sub> értékeket a (BALB/c x DBA/2) F2 generációban.

A spondylitisszel az F1 és F2 hibrid populációkban valószínűleg összefüggést mutató, legfontosabb immunológiai paraméterek jellemzéséhez meghatároztuk a Spearman féle korrelációs koefficiens ( $r_s$ ). A PGIS legerősebb pozitív korrelációit a szérum amyloid-A akut fázis protein (SAA) koncentrációk és IL-6 értékek esetében találtuk ( $r_s = 0,28$  és  $0,43$ ), mely egybevág a SAA és IL-6 értékek közötti még erősebb korrelációval ( $r_s = 0,74$ ). A spondylitis pozitív korrelációt mutatott az antitest (Ab) termeléssel (mind az IgG1, mind az IgG2a izotípusra nézve) az F2 hibrid populációban. Meglepő módon a spondylitis negatív korrelációt mutatott viszont minden lemerített T sejt válasz tekintetében (T sejt proliferáció, IFN- $\gamma$ , IL-4 és TNF- $\alpha$  termelés), de csak az F2 egerek esetében. Nem találtunk korrelációt a spondylitis és az

antigén specifikus T sejt válaszok (ill. az antitestek szérumszintjei) között a homozigóta F1 hibrid egerekben. Ezzel szemben, ezen korrelációk erősnek mutatkoztak a genetikailag elkülönülő F2 populációban, mely azt sugallja, hogy a spondylitist immunválasszal kapcsolatos gének és/vagy allélkombinációk irányítják ebben az állatmodellben. Összefoglalva, az emelkedett IL-6, SAA szérumszintek és antitest titerek, a PG stimulált T sejtek csökkent IFN- $\gamma$ , IL-4 és TNF- $\alpha$  termelésével együtt tekinthetők a spondylitis legerősebb előjeleinek, a PGIS-re fogékony és rezisztens egereknek ebben az MHC azonos keresztezésében.

#### **4.3. A spondylitis kapcsolttság (linkage) analízise a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridekben**

A nem-MHC spondylitis fogékonysági gének feltérképezéséhez a BALB/c x DBA/2 keresztezést használtuk, ahol mindkét szülői törzs ugyanazt a H-2d haplotípust mutatja. Ezzel szándékosan kizártuk az MHC gének hatásait a kapcsolttsági vizsgálat tekintetében. Az SPI és SPI<sub>LS</sub> klinikai jellemzőket („trait”) meghatározó egér gének effektív kereséséhez, hím és nőstény F2 hibrid egereket PG-al immunizáltunk, majd meghatároztuk a spondylitis súlyosságát, és egy sor „immunparaméter” került lemérésre. Szintén ennek érdekében az összes egér genotipizálása megtörtént a teljes egér genomra (20 kromoszóma), 224 marker segítségével. Az intervallum térképezés és egyszeri marker hatás analízis, a spondylitist (SPI és SPI<sub>LS</sub>), antitest szérumszinteket (egér PG elleni IgG2a), és IL-6 szérumszintet kontrolláló nagyon korlátozott számú kromoszóma lókuszt meglétét jelezte az F2 egerek esetében, míg más jellemzők nem mutattak szignifikáns kapcsolttságot.

A spondylitist „irányító” legfőbb genetikai lókuszt a 18. kromoszóma telomerikus részén lehetett azonosítani (Pgis1). Az LRS érték elérte a 31-et, mely meghaladja a Lander és Kruglyak szerinti magasan szignifikáns határértéket és empirikusan meghatározott magasan szignifikáns küszöbértéket eredményezett ( $\alpha < 0,001$ ). Az összetett intervallum térképezés

(Windows QTL Cartographer, standard 6. modell, 5 kontrollált marker 10 cM-os ablakon belül) megerősítette a D18Mit51 és D18Mit142 markerek QTL csúcspozícióját.

A második fő spondylitis QTL-t a 2. kromoszómán azonosítottuk (Pgis2). Ez a lókuszon azonban meglehetősen bizonytalanul meghatározható volt az egyszerű intervallum térképezés használatával, és csaknem a kromoszóma egyharmadát elfoglalta. Összetett intervallum térképezés használatával, az ezen QTL-nek megfelelő csúcsot (LRS 16,9 ;  $\alpha < 0,05$ ) a D2Mit241 marker mellett találtuk. Az egyes kromoszómák spondylitis fogékonyságra kifejtett együttes hatásának kiszámolásánál az látszott, hogy a 2. és 18. kromoszóma közösen a teljes SPI jelleg variancia 40,5%-át kontrollálja az F2 populációban.

Egy kiegészítő spondylitis fenotípus index ( $SPI_{LS}$ ) került bevezetésre ebben a vizsgálatban. Ez egy bináris index, mely 1-es értéket jelent a „késői kezdetű” spondylitist mutató egerekben, és szoros korrelációt mutat az alacsony PGIS súlyossággal (ld. metodikák). A SPI és  $SPI_{LS}$  közötti szoros korreláció ellenére, ezen két klinikai jelleg genetikai alapja különbözőnek tűnik. Például a 18. kromoszómán nincs  $SPI_{LS}$  QTL, amíg a késői/enyhe spondylitist kontrolláló fő QTL-t a Pgis2 lókusszal azonos pozícióban találtuk. Mindamellet a Pgis2 lókuszon kiemelkedőbb és keskenyebb volt a  $SPI_{LS}$ -re nézve, mint a SPI-re. A Pgis2 egymagában a teljes  $SPI_{LS}$  jelleg variancia 28,7 %-ához járult hozzá az F2 populációban. A Pgis2 csúcserőteke a D2Mit296 marker mellett volt (LRS 21,1 ;  $\alpha < 0,05$ , egyszerű intervallum térképezés), és ezt a pozíciót megerősítette az összetett intervallum térképezés is (LRS 25,9 ;  $\alpha < 0,001$ ).

Mivel a spondylitis az F2 hibrid egerekben szignifikáns korrelációt mutatott bizonyos immunológiai fenotípusokkal (T és B sejt válaszok, szérumban citokinek), elvégeztük a kapcsoltsági vizsgálatot a közbeeső immunológiai jellegzetességekre vonatkozóan is. Az IgG2a izotípusú autoantitestek szérumban koncentrációját számos különböző QTL látszott kontrollálni. Két fő, egymáshoz közeli lókuszt találtunk a 11. egér kromoszómán (LRS 17,1

és 19,4 ;  $\alpha < 0,001$ ), és két gyengébb QTL látszott az 1. és 5. kromoszómákon (LRS 11,8 és 10,8 ;  $\alpha < 0,63$ ). Az IL-6 proinflammatorikus citokin szérum koncentráció egyetlen QTL-el mutatott összefüggést, mely a 14. kromoszóma centrális részén helyezkedett el (LRS 11,9;  $\alpha < 0,05$ ) és az összetett intervallum térképezés megerősítette a csúcspozíciót.

#### **4.4. A 2. és 18. kromoszómán lévő két fő klinikai QTL kölcsönhatásai**

Annak ellenére, hogy mind a BALB/c, mind a DBA/2 törzsek hordoznak spondylitis fogékonysági géneket, ezen egerek nagyon különbözően válaszoltak a PG immunizálásra. A betegséget kontrolláló allélek forrásának megtalálásához az F2 populációban, melyek jöhettek a BALB/c és a DBA/2 törzsből egyaránt, kiszámoltuk az átlagos SPI értékeket külön a BALB/c homozigóta ( $P_{gis}^B$ ), DBA/2 homozigóta ( $P_{gis}^D$ ), és BALB/c-DBA/2 heterozigóta egerekben ( $P_{gis}^H$ ) mindkét QTL-re. Váratlanul azt találtuk, hogy a  $P_{gis1}$  allélra nézve DBA/2 homozigóta F2 egerek ( $P_{gis}^D$ ) esetében szignifikánsan magasabb incidenciájú és súlyosságú spondylitis fejlődik ki, összehasonlítva a BALB/c homozigóta állatokkal ( $P_{gis}^B$  vs.  $P_{gis}^D$ ,  $p < 0,000003$ ), amely azt sugallta, hogy a fő betegség fogékonysági allél a rezisztens DBA/2 törzsből származik. A másik QTL, a  $P_{gis2}$  a 2. kromoszómán, „normál” fenotípus-genotípus kapcsolatot mutatott, és az ezen régióra nézve BALB/c homozigóta egerek szignifikánsan fogékonyabbak voltak spondylitisre, mint a DBA/2 homozigóta F2 állatok ( $P_{gis}^B$  vs.  $P_{gis}^D$ ,  $p < 0,0005$ ). Ez azt mutatja, hogy ezen betegség allél a spondylitisre fogékony BALB/c törzsből származik. Mind a  $P_{gis1}$ , mind a  $P_{gis2}$  QTL-re nézve a BALB/c allélek dominánsak voltak a DBA/2 alléllal szemben, minthogy a BALB/c-DBA/2 heterozigóta egerek ugyanolyan magas SPI értéket mutattak, mint a BALB/c homozigóta állatok.

Mindezeknek megfelelően, az F2 hibrid egerekben a legmagassabb spondylitisre való fogékonyság a DBA/2 homozigóták esetében volt megfigyelhető ( $P_{gis1}^D$ ), mely ellentmondani látszik a szülői DBA/2 egerek látszólagos rezisztenciájának, akiknél ugyanaz a

Pgis1 lókuszt genotípusa. Minthogy csak két fő, spondylitist kontrolláló lókuszt találtunk a BALB/c x DBA/2 keresztezés során, a Pgis1<sup>D</sup> allél szülői DBA/2 törzsben való némaságának megmagyarázásához megvizsgáltuk ezen lókusztok egymásra kifejtett hatását. Az SPI érték és betegség incidenciája kiszámolása a Pgis1 és Pgis2 lókusztok kooperációját alapul vevő hipotézisen alapult. A fenotípusokra jellemző átlagértékek külön-külön a 9 allélkombináció mindegyikére kiszámolásra kerültek. Amikor a Pgis1 genotípusok klinikai jellemzőkre kifejtett hatását a Pgis2 lókusztól függetlenül értékeltük, a Pgis1<sup>D</sup> homozigóta egerek bizonyultak legfogékonyabbnak a spondylitisre, a Pgis1<sup>B</sup> homozigótáknak volt a legkisebb a fogékonyaságuk, és a Pgis1<sup>H</sup> heterozigóta állatok fogékonyasága a kettő között volt. Meglepő módon, az egyes Pgis1 allélek közötti kapcsolat kritikus módon függőnek bizonyult a Pgis2 lókuszt genetikai összetételétől. Úgy tűnt, hogy a Pgis2-nek legalább egy másolata BALB/c eredetű kellett, hogy legyen (Pgis2<sup>B</sup>) a Pgis1<sup>D</sup> allél magas penetranciájához és spondylitis-megengedő géneként való működéséhez. Ennek megfelelően a Pgis1<sup>D</sup> allélt hordozó egerek voltak a legsúlyosabb spondylitist mutatók (átlag SPI = 0,96), a Pgis1<sup>B</sup> alléllal rendelkezők pedig a legkevésbé érintettek (SPI = 0,13). A Pgis1<sup>D</sup> és Pgis1<sup>B</sup> alléleket hordozó egerek közötti fenotípusos különbségek azonban elhalványultak tiszta Pgis2<sup>D</sup> genetikai háttér esetén. Következésképpen a spondylitist megengedő Pgis1<sup>D</sup> allél számára szükséges a Pgis2<sup>B</sup> allél, a jellemzők teljes penetranciájához és a fenotípusos hatás kifejtéséhez. A „legrosszindulatúbb” Pgis1<sup>D</sup> - Pgis2<sup>B</sup> allélkombinációt hordozó F2 hibrid egerek mutatták a legsúlyosabb spondylitist és a betegség 100%-os incidenciáját, ami szintén megerősíti mindkét lókuszt együttes fontosságát a betegség kifejlődésében.

## 5. Megbeszélés, új eredmények

Vizsgálatunkban elsőként mutattuk be az egér spondylitisre való fogékonyság genetikai lókuszaik keresésére irányuló teljes genomszűrés eredményeit. Meghatároztuk a fenotípusos variancia genetikai alapjait egy komplex fenotípus tekintetében, mely természetes genetikai variációk révén alakult ki, mesterséges módosítás, pl. géndeficiencia helyett. Annak ellenére, hogy számos spondylarthropathia egérmódellet hoztak létre és tanulmányoztak korábban, a betegségre való fogékonyság genetikai alapja nem ismert, eltekintve a HLA-B27 és néhány egyéb gén patogenezisben betöltött szerepétől.

Korábbi munkánk során bemutattuk, hogy különböző szülői törzsek és genetikai keresztezésük spondylitisre való fogékonysága, bizonyos H-2 permisszív haplotípusokkal mutat összefüggést, mely az MHC vezető szerepére utal egér arthritisben és spondylitisben. Jelen vizsgálatunk legfőbb célja a nem-MHC gének megtalálása volt. Mindössze 2 fő genetikai lókuszt találtunk, mely a spondylitist „irányítja” a BALB/c x DBA/2 keresztezés esetén: a Pgis1 betegség-kontrolláló allélt, mely a DBA/2 törzsből származik (bár a gén néma maradt ebben a törzsből), valamint a Pgis2 allélt, mely a BALB/c törzsből származik. Nyilvánvalóan ezen két lókuszt együttes hatásai eredményezték a magas betegség incidenciát a BALB/c x DBA/2 F1 hibridekben (35,5%), és a még nagyobb fogékonyságot az F2 hibrid egerekben (61,7%-os incidencia), amikor a két gén spondylitist elősegítő két allélje kiegészítette egymást. Hasonlóképpen a betegség súlyosság, ami csak az SPI-re pozitív értéket adó egereknél volt definiálva, még magasabb volt az F2 hibridekben, mint a BALB/c ősökben, két permisszív gén kumulatív hatásának köszönhetően ebben a populációban.

A spondylitisre fogékony és rezisztens egerek között az immun-funkcióval összefüggő jellemzők tekintetében (T és B sejt válaszok és szérumban citokinek) látott különbségek, valamint a Pgis1 és Pgis2 lókuszon belüli SPI-kapcsolt gének ismert kölcsönhatás mintázata ellenére a vizsgálat jelenlegi stádiumában nem lehetséges a spondylitishez hozzájáruló, elsődleges

okozati géneket azonosítani ezen lókuszokon belül. A betegség-kontrolláló lókuszok genomikus térképeinek összehasonlítása humán betegekben és egerekben, és a szintenikus térképezés segíthet a kandidáns gének azonosításában a jövőbeli vizsgálatok során.

A BALB/c x DBA/2 keresztezés esetében a fő SPI lókuszt az egér 18. kromoszómájának telomerikus régiójában találtuk. A Pgis1 lókuszt a D18Mit55 és D18Mit80-as markerek határolják és 54 Mbp-tól foglal el egy régiót a kromoszóma telomerig. A Pgis1 lókusz átfedést mutat számos egér QTL-el az autoimmun betegségek tekintetében, mint pl. az egér lupus (Lbw6), PG-, és kollagén indukált arthritis (Pgia11 és Cia18), experimentális allergiás encephalomyelitis (Eae25), sebgyógyulás (Heal9), és krónikus multifokális osteomyelitis (Cmo).

Az egér Pgis1 lókusz (54-81 Mbp) homológ a humán 5. kromoszóma hosszú karjának szegmentumaival (110-129 Mbp és 137-150 Mbp) és a 18. kromoszóma szegmentumaival (17-52 Mbp és 64-76 Mbp) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)). Ezen humán kromoszóma szegmentumok két SPA lókuszt tartalmaznak, egyiket (18q) oxfordi családvizsgálat során találták (AS(Ox)). Az AS(Eu) lókusz pedig európai családtanulmányból származó, az 5. kromoszóma hosszú karján. A kandidáns gének listája a lókuszon belül magában foglalja a következőket: metalloproteináz Adamts 19, IL (IL-17b), MHC-II asszociált invariáns lánc (Cd74), makrofág CSF1 receptor (Csf1r) és mások. A régió szintén tartalmazza az Nfatc1 gént, mely az aktivált T sejtek calcineurin dependens NF1-ét kódolja. Ez a gén regulálja az IL-2 és IL-4 gén transzkripcióját, a differenciálódást, proliferációt és aktiváció indukált sejthalált a T limfocitákban (<http://harvester.embl.de/harvester/>). Minthogy szignifikáns korrelációt találtunk a SPI és T sejt válaszok között, ez a gén a Pgis1 lókuszon belül kézenfekvő kandidánsnak tűnik, mint elsődleges okozati faktor.

A második fő lókusz, a Pgis2 mérete nagyobb, mint a Pgis1-é. A Pgis2 lókuszt a D2Mit293 és D2Mit156 markerek határolják, és 26,4 és 57,0 Mbp között helyezkedik el. Az

egyszerű intervallum térképezés kissé eltérő pozíciókat mutatott az SPI és SPI<sub>LS</sub> vonatkozásában, az egér 2. kromoszómán. Ennek ellenére fenntartjuk a hipotézist, hogy ezen régió belül egyetlen gén/lókuszt kontrollálja a betegségre való fogékonyságot, a következő megfontolások alapján. Először is, az öröklődés módja az SPI és SPI<sub>LS</sub> „csúcsmarkerek” esetében azonos, és a BALB/c allél domináns hatását mutatja. Másodszor, az összetett intervallum térképezés során nem sikerült két lókuszt szétválasztanunk a Pgis2-t, a markerek számának változtatásával. Harmadszor, a SPI és az SPI<sub>LS</sub> klinikai jellemzők szoros korrelációt mutattak a BALB/c x DBA/2 keresztezés F1 és F2 generációjában is.

Az egér Pgis2 lókuszt (26,4-57 Mbp) számos „autoimmun” lókuszt magában foglal, mely pl. összefüggést mutat az antigén-indukált fokozott bronchialis válaszkészséggel (Abhr1 és Abhr2), az experimentális autoimmun gastritisszel (Aig), kollagén indukálta arthritisszel (Cia2 és Cia4), a szérum transzfer indukálta arthritisszel (Stia2), és experimentális allergiás encephalomyelitisszel (Eae21). Érdekes módon a Pgis2 szintén átfed olyan QTL-ekkel, melyek kontrollálják a csontváz anatómiai fejlődését, mint pl. a femoralis keresztmetszeti terület (Fcsa5) és a periostealis körfogat és femurhossz (Pcfm1) QTL.

A nyilvánosság számára hozzáférhető online genom adatbázisok és a publikált irodalmi adatok összevetése alapján ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)) azt találtuk, hogy a Pgis2 lókuszt megfeleltethető két szegmentumnak a humán genomban: az egyik a 2. kromoszóma hosszú karján (2q) 143 és 161 Mbp között helyezkedik el, a másik a 9. kromoszómán, 120 és 137 Mbp között. Mindkét intervallum a 2. és a 9. kromoszómán lévő is, SPA QTL-eket tartalmaz, melyeket brit családvizsgálatok azonosítottak.

Mindezek mellett szintén kapcsoltságot találtunk a szintenikus humán lókusztok tekintetében a C5 deficiencia monogénes szindrómával, mely visszatérő lokális és szisztémás infekciókat és systemas lupus erythematosust eredményez (Mendeli öröklődésű emberben).

A gén kandidánsok közé tartozik a lókuszon belül a komplement  $8\gamma$  komponense (C8  $\gamma$ ) és az IL-1 géncsoport, nevezetesen az IL-1R antagonistá és az IL-1 család öt tagja. Ez utóbbi géncsoportot tartják a legfőbb gén kandidánsnak SPA-ban, a 2. humán kromoszómán, az oxfordi tanulmány szerint. A kezdeti genomszűrést és a 2. kromoszómával való kapcsoltság megállapítását követően, az oxfordi csoport szignifikáns asszociációt talált egyes génpolimorfizmusok és IL-1 kapcsolt haplotípusok között. Saját vizsgálatunkban maga az IL-1 nem mutatott semmilyen szignifikáns kapcsoltságot, valószínűleg mert az IL-1 szérumkoncentrációk nem különböztek szignifikánsan a BALB/c és DBA/2 egerek között. Bármely génkandidáns, mely a Pgis2 lókusztelomerikus vége és az IL-1 géncsoport között helyezkedik el, valószínűleg szintén funkcionálisan kapcsoltságot mutat a spondylitis fenotípussal.

A legismertebb gén, melyről azt tartják, hogy alapvető szerepe van az ankylosis kialakulásában egerekben, az Ank gén. A 15. kromoszómán bekövetkező spontán mutáció(ka)t, melyek progresszív ankylosishoz vezetnek, 1981-ben és 1988-ban írták le. Később a mutációt az Ank génen belülre lokalizálta a térképezés. Jelenleg úgy gondolják, hogy ezen gén mutációja felelős az ún. craniometaphysealis dysplasiáért és a kristálylerakódásos arthropathiáért (emberben Mendeli öröklődésű). Genomszűrésünk során mindössze egyetlen szuggesztív QTL-t találtunk az egér 15. kromoszómán, melyen az Ank gén helyezkedik el. Azonban ez a lókuszt kapcsoltságot mutatott a PGIA-szel korábbi tanulmányainkban, mely azt sugallja, hogy a 15. kromoszóma részben talán szerepet játszik a spondylitis kialakulásában ebben az egérmodellben.

A 2. és 18. kromoszómán lévő két fő SPI lókuszon és a 15. kromoszómán lévő szuggesztív lókuszon kívül négy további lókuszt mutatott valószínű kapcsoltságot. QTL-eket találtunk a 11., 12. és 19. kromoszómákon (LRS érték sorrendben 11,0; 12,5; 12,1). A 12. kromoszóma telomerikus részén talált szuggesztív szintű spondylitis QTL tartalmazza az Ig H

lác gécsoportot ([www.ensembl.org/Mus\\_musculus/](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/)). Ezt a lókuszt, mely a PGIA-t, vagy az IgG2a szérum koncentrációt, vagy mindkettőt kontrollálja, a laboratóriumunkban létrehozott számos keresztezett egércsoportban megtaláltuk, bár szignifikáns kapcsoltsági szintet csak a C3H x C57BL/6 keresztezés esetén ért el ez a QTL.

A fő IgG2a és IL-6 QTL-ek nem estek sem a Pgis1, sem a Pgis2 régió belülre a 2. és 18. kromoszómán. Azonban átfedés van a spondylitis és az immunológiai QTL-ek között, ha a szuggesztív kapcsoltsági határértéket vesszük figyelembe. A 11. kromoszóma telomerikus része egy szuggesztív spondylitis fogékonsági lókuszt hordoz, mely egybe esik az IgG2a-ra vonatkozó legnagyobb csúccsal. Ezen túlmenően korábbi vizsgálataink két arthritist kontrolláló QTL-t mutattak a 11. kromoszómán (Pgia7 és Pgia8), melyek ugyanazon régiókat foglalják el, mint az újonnan felfedezett IgG2a QTL-ek ebben a keresztezésben. A 14. kromoszóma pedig a Pgia29 arthritis lókuszt hordozza, mely az IL-6 QTL-el mutat közös pozíciót.

Mind a T, mind a B sejtek egér arthritis és spondylitis indukcióban betöltött központi szerepét megmutatták munkacsoportunk korábbi adoptív betegség transzferes kísérletei. A donor limfociták T helper és T szuppresszor sejtekre specifikus antitestekkel való depléciója, hasonlóan a B sejtek depléciójához, megakadályozta a sikeres betegség transzfert. Sem anti-PG antitestek, sem önmagukban a PG-specifikus B sejtek nem tudták átvinni a betegséget, hanem a T és B sejt alpopulációk közötti kooperáció volt szükséges. A szülői BALB/c egerek PG immunizálás mellett kétszer több IL-6-ot termeltek, mint a DBA/2 egerek (57,8 pg/ml vs 30,1 pg/ml,  $p < 0.013$ ); az IgG2a Ig szérum koncentráció háromszor magasabb volt, míg az IgG1 koncentráció háromszor alacsonyabb volt a BALB/c egerek esetében, összevetve a DBA/2-vel. A betegség súlyosság és Th2 mediált antigén specifikus Ig szintek közötti korrelációk a BALB/c x DBA/2 F2 hibrid egerekben is szignifikánsak voltak. A spondylitissel a legerősebb korrelációt az IL-6 és az IgG1 antitest izotípus esetében találtuk: az SPI vs IL-6

korrelációs koefficiens ( $r_s$ ) 0,43, az SPI vs IgG1 0,23 volt. A PG stimulált limfociták általi Th1 asszociált in vitro IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelés negatív korrelációt mutatott a spondylitissel az F2 hibrid egerekben. Ez alátámasztotta a Th2 típusú válasz vezető szerepét a betegség patogenezisében. Ennek megfelelően azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az erőteljes genetikai predispozíció a Th2 válasz irányában, és az arthritisre és spondylitisre való fogékonyság hasonló a szülői törzsekben és a genetikailag kevert F2 hibrid egerekben. Az F2 populáció hasonló patológiát mutat, mint azt a szülői BALB/c törzsben láttuk.

A klinikai és immunológiai jellegzetességek QTL-jeinek együttes lokalizációja, mint azt a 11. és 12. kromoszómák esetében láttuk, hatékony megközelítésnek látszik a spondylitis fogékonysági gének effektív feltérképezéséhez és ezen lókuszek szerepének jobb megértéséhez, ezáltal a spondylitis mechanizmusának megvilágításához.

## 6. Összefoglalás

Régóta ismert, hogy az MHC alapvető szereppel bír az SPA-ra való genetikai fogékonyság tekintetében. A HLA-B27 antigén tehető felelőssé a betegség teljes genetikai rizikójának 20-50%-áért. Az SPA-ra való fogékonyság mégsem magyarázható meg teljes egészében az MHC kapcsoltsággal. A legutóbbi vizsgálatok, köztük kapcsoltsági analízisek, valamint kandidáns gén asszociációs, ill. legújabban genom szintű asszociációs vizsgálatok az SPA interleukin-1 géncsaláddal, interleukin-23 receptorral és ARTS1 génekkel, valamint más lehetséges lókuszekkel való szignifikáns kapcsoltságát mutatják.

Kísérleteink során autoimmun spondylitist hoztunk létre BALB/c egerekben és ezeknek MHC azonos (BALB/c x DBA/2) F1 és F2 hibridjeiben, porc proteoglikánnal (PG) történő szisztémás immunizálással. Az MHC volt a fő „megengedő” genetikai lókus az egér PG-indukált spondylitise (PGIS) szempontjából is, csakúgy mint humán spondylitis ankylopoetica esetén. Két fő nem-MHC kromoszóma lókuszt találtunk a 2. (Pgis2) és a 18. kromoszómákon (Pgis1), melyek szignifikáns kapcsoltságot mutattak a spondylitissel és a teljes F2 jelleg-variancia 40%-áért feleltek. A Pgis2 lókus domináns spondylitis fogékonysági allélje a BALB/c törzsből származott, míg a Pgis1 recesszív allél a betegségre rezisztens DBA/2 törzsből volt jelen. A Pgis1 lókus szignifikáns módon befolyásolta a betegséget kontrolláló Pgis2 lókuszt, ami a spondylitisre fogékony BALB/c szülői törzshöz hasonlóan magas spondylitis incidenciát eredményezett az F2 hibridekben. További, szuggesztív szintű kapcsoltságot mutató „betegség kontrolláló” lókuszeket találtunk a 12., 15. és 19. kromoszómákon. Az F2 hibrid egerekben a spondylitis súlyossága pozitív korrelációt mutatott az amyloid-A, IL-6 és PG specifikus antitest szérumszintekkel, negatív korrelációt pedig az antigén indukált T sejt proliferációval, IFN- $\gamma$ , IL-4 és TNF- $\alpha$  termeléssel. Egy, az IL-6 szintet kontrolláló fő lókuszt találtunk a 14. kromoszómán, az osteoclast differenciálódási faktor Tnfsf11 mellett. A 11. kromoszómán, a Stat3 és Stat5 génekhez közeli lókus

kontrollálta az IgG2a antitest szérumszinteket. A két fő lókuszt (Pgis1 és Pgis2) homológoknak bizonyult a humán genom egyes kromoszóma régióival, melyek a spondylitis ankylopoetica genetikai kontrolljában vesznek részt. Eredményeink alapján e kísérletesen indukált spondylitis modell elősegítheti humán spondylitis fogékonysági gének azonosítását is.

## 7. Saját közlemények

### 7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. **Vegvari, A.**, Szabo, Z., Szanto, S., Nesterovitch, A.B., Mikecz, K., Glant, T.T., Adarichev, V.A.: Two major interacting chromosome loci control disease susceptibility in murine model of spondylarthropathy. *J Immunol*, 2005, 175(4):2475-2483. **(IF: 6.48)**
2. **Végyári A**, Szabó Z, Szántó S, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z: The genetic background of ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine*, in press. **(IF 1.66)**

**Összes: IF 8.14**

### 7.2. Az értekezéshez fel nem használt közlemények jegyzéke

1. Szabo, Z., Szanto, S., **Vegvari, A.**, Szekanecz, Z., Mikecz, K., Glant, T.T.: Genetic control of experimental spondylarthropathy. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52(8): 2452-2460. **(IF: 7.41)**
2. Glant TT, Szabó Z, **Végyári A**, Szántó S, Mikecz K. A TSG-6/Tnfip6 gyulladásgátló hatása arthritisben. *Magyar Reumatológia*, 2005, 46: 5-13. **(IF 0)**
3. Glant TT, Szántó S, **Vegvari A**, Szabo Z, Kis-Toth K, Mikecz K, Adarichev VA. Two loci on chromosome 15 control experimentally induced arthritis through the differential regulation of IL-6 and lymphocyte proliferation. *J Immunol*. 2008 Jul 15;181(2):1307-14. **(IF 6.29)**
4. Adarichev VA, **Vegvari A**, Szabo Z, Kis-Toth K, Mikecz K, Glant TT. Congenic strains displaying similar clinical phenotype of arthritis represent different immunologic models of inflammation. *Genes Immun*. 2008 Oct;9(7):591-601. **(IF 4.53)**
5. Kapitány A., Szabó Z., Lakos G., Aleksza M., **Végyári A.**, Soós L., Karányi Z., Sipka S., Szegedi G., Szekanecz Z.: Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J (IMAJ)*, 10: 32-36, 2008. **(IF 0,58)**
6. Szekanecz Z., Soós L., Szabó Z., Fekete A., Kapitány A., **Végyári, A.**, Sipka, S., Szűcs G., Szántó S., Lakos, G.: Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol*, 34: 26-31, 2008. **(IF 2.07)**
7. Besenyi T, **Végyári A**, Szabó Z, Szekanecz Z.: Az endothelsejtek, leukocita migráció, chemokinek és angiogenezis jelentősége gyulladásos reumatológiai kórképekben. *Magy Immunol*, 2008/1-2: 4-21, 2008. **(IF 0)**

8. Szántó S., Aleksza M., Mihály E., Lakos G., Szabó Z., **Végyári A.**, Sipka S., Szekanecz Z.: Intracytoplasmic cytokine expression and T cell subset distribution in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2008 Nov 1 [Epub ahead of print] **(IF 3.15)**
9. Szekanecz, Z., Aleksza, M., Antal-Szalmás, P., Soltész, P., Veres, K., Szántó, S., Szabó, Z., **Végyári, A.**, Szamosi, S., Lakos, G., Sipka, S., Szegedi, G., Varga, J., Szűcs G. Combined plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment in systemic sclerosis for 12 months: follow-up of immunopathological and clinical effects. *Clin Rheumatol*, 2008 Dec 6 [Epub ahead of print] **(IF 1.64)**
10. Kerekes G, Soltész P, Dér H, Veres K, Szabó Z, **Végyári A**, Shoenfeld Y, Szekanecz Z.: Effects of biologics on vascular function and atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*, in press. **(IF 1.73)**
11. Kerekes G, Soltész P, Dér H, Veres K, Szabó Z, **Végyári A**, Szegedi G, Shoenfeld Y, Szekanecz Z. Effects of rituximab treatment on endothelial dysfunction, carotid atherosclerosis and lipid profile in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2009 March 25 [Epub] **(IF 1.64)**

**IF: 29.05**

### **7.3. Az értekezés témájához kapcsolódó publikált, idézhető absztraktok:**

1. Szabó, Z., **Végyári, A.**, Szántó, S., Adarichev, V.A., Nesterovich, A.B., Tunyogi-Csapo, M., Glant, T.T.: Spondylitis induced by systemic immunization with cartilage proteoglycan aggrecan in genetically susceptible inbred strains and their F1 and F2 hybrids. *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:212. (ACR 2004, poszter)
2. Szabó, Z., Szántó, S., **Végyári, A.**, Szekanecz, Z., Adarichev, V.A., Mikecz, K., Glant, T.T.: Clinical and immunological characterization of spine involvement according to genetic background and differentially activated innate immunity in a murine model of spondylarthropathy. *Ann Rheum Dis.* 2005. (EULAR, poszter)
3. Szabo, Z., Szanto, S., **Vegvari, A.**, Szekanecz, Z., Adarichev, V.A., Mikecz, K., Glant, T.T.: Characterisation of proteoglycan induced spondylarthropathy. *Allergology and Clinical Immunology (Hungarian)*, 2005;8:84.

### **7.4. Lektorált folyóiratban megjelent idézhető kongresszusi absztraktok:**

1. Szekanecz, Z., Rass, P., Pákozdi, A., Szabó, Z., **Végyári, A.**, Szántó, S., Szűcs, G.: Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 1 Suppl, 57, 2002.

2. **Végyvári, A.**, Illés, A., Szeles, M., Aleksza, M., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., Szabó, Z., Csiki, Z., Szántó, S., Sipka, S., Szegedi, G., Szekanecz, Z.: Effects of isoprinosine on parameters of cellular and humoral immunity in patients with rheumatoid arthritis and Hodgkin's disease. *Ann Rheum Dis* 2002; S61:171. (EULAR 2002, poszter)
3. Szekanecz, Z., Rass, P., Pákozdi, A., Szántó, S., Szabó, Z., **Végyvári, A.**, Bakó, G., Szegedi, G.: Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; S61:282. (EULAR 2002, poszter)
4. **Vegvari, A.**, Illes, A., Aleksza, M., Antal-Szalmas, P., Lakos, G., Szabo, Z., Sipka, S., Szekanecz, Z.: Effects of isoprinosine on cellular and humoral immunity in [Hungarian] *Magyar Belorv Arch.* 2/2002 Suppl: 38, 2002.
5. **Végyvári, A.**, Szabó, Z., Adarichev, V.A., Glant, T.T.: Genome-wide screening of experimentally induced spondylitis in mice. *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:703. (ACR 2004, előadás).
6. **Végyvári, A.**, Szabó, Z., Szántó, S., Nesterovich, A.B., Adarichev, V.A., Szekanecz, Z., Glant, T.T.: Mapping genes controlling spondylitis susceptibility in (BALB/c x DBA/2) F2 hybrid mice. *Ann Rheum Dis.* 2005. (EULAR, előadás)

#### **Egyéb absztraktok, előadások:**

1. **Végyvári A.**, Soltész P., Veres K., Szabó Z., Szűcs G., Surányi P., Szekanecz Z.: Idegrendszeri manifesztációk rheumatoid arthritisben I. Rheumatoid arthritis és Guillain-Barré szindróma társulása. *Magyar Reumatológusok Egyesülete Északkelet-Magyarországi Szekció XV. Tudományos Ülése, Tiszaújváros, 2003.*
2. Adarichev V. A., Szanto S., Bardos T., Nesterovitch A. B., Gonda A., Szabo Z., **Vegvari A.**, Glant T. T.: Quantitative trait loci (QTLs) on chromosome 15 play crucial role in male and female susceptibility of proteoglycan induced arthritis (PGIA). Rush University, Forum for research and clinical investigation, 2004, Chicago.

**In extenso megjelent vagy elfogadott közlemények száma: 13**

**Összes IF: 37.19**