

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A rheumatoid arthritis hátterének és kezelésének
egyres kérdései – A mi történetünk egerekről és
emberekről**

dr. Besenyei Tímea

Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

**A rheumatoid arthritis hátterének és kezelésének egyes kérdései – A mi történetünk
egerekről és emberekről**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: dr. Besenyei Tímea, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Mozgásszervi betegségek doktori programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nagy György, az MTA doktora
Prof. Dr. Balogh István, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „B” épület tanterme
2022. december 6., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Balog Attila, PhD
Dr. Griger Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Balog Attila, PhD
Dr. Griger Zoltán, PhD
Prof. Dr. Nagy György, az MTA doktora
Prof. Dr. Balogh István, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „B” épület tanterme
2022. december 6., 12:30 óra

1 BEVEZETÉS

1.1 A rheumatoid arthritis etiopatogenezisének áttekintése

A rheumatoid arthritis (RA) autoimmun gyulladásos betegség, mely főként a synoviális ízületeket érinti. Prevalenciája körülbelül 0.5-1%. Genetikai és környezeti/életmódbeli tényezők, valamint az autoimmunitás vesznek részt a kórfolyamat kialakulásában; az etiológiához epigenetikai faktorok is hozzájárulnak.

A genetikai tényezők szerepét kb. 60%-ra becsülik. Humán leukocyta antigének (HLA-DR) és nem-HLA gének egyaránt fontos szerepet játszanak a RA patogenezisében. Az 1980-as évek óta ismert, hogy a RA-s betegek többségében a II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC-II) β 1 lánc harmadik hipervariábilis régiójának 70-74. pozíciójában közös aminosav szekvencia van. A kódoló "shared-epitóp" (SE) allélek (*HLA-DRB1*01*, *DRB1*04*, *DRB1*10*) állnak a legszorosabb kapcsolatban a RA-re való fogékonysággal. Du Montcel és munkatársai újragondolták az eredeti SE hipotézist és megalkottak egy új klasszifikációs rendszert, melynek alapja, hogy a RAA szekvencia jelentette hajlamosító tényezőt a 70. és 71. pozícióban található aminosavak árnyalják. Az új klasszifikációs rendszer a SE allélokat S1, S2, S3P és S3D csoportokra osztja 70. és 71. pozícióban lévő aminosavak alapján. Ezek közül az S2 és S3P allél hordozása hajlamosít ciklikus citrullinált protein elleni antitest (ACPA) - pozitív RA kialakulására. A nem-HLA gének közül a nem receptor típusú protein-tirozinfoszfátáz 22 (*PTPN22*) és a TNF-receptor asszociált faktor 1 (*TRAF1*) lokuszok mutatják a legszorosabb összefüggést a - főként ACPA-pozitív – RA kialakulásával. Több, mint 30 további egyponos nukleotid-polimorfizmus (SNP) hozható összefüggésbe a RA kialakulásával, melyek közül kiemelendő az *IL23R*, *FCGR*, *IRF5*, *CD40*, *STAT4*, *PADI4*, *CCR6* és *CCL21*. A *HLADRB1*, *PTPN22* és *IL23R* SNP-k szerepét magyar RA-s betegeknél is megerősítették.

Környezeti és életmódbeli tényezők (dohányzás, szilikátpor, koffein, cukrozott üdítőitalok [fruktóz], orális antikoncipiensek, stb.) szintén hozzájárulnak a RA kialakulásához. Protein citrullinációt idézhetnek elő, mely ACPA termelődéshez vezet. A dohányzó SE hordozóknál tapasztalható szignifikánsan magasabb ACPA-pozitív RA rizikót magyar RA-s betegek esetén is megerősítették; ugyanez a vizsgálat – az első közép-kelet-európai study, mely a RA és az életmódbeli tényezők összefüggését vizsgálta- nem talált szignifikáns összefüggést az ACPA termelődés és a koffeinfogyasztás, illetve az orális antikoncipiensek használata között.

A genetikai és környezeti/életmódbeli tényezők, valamint az autoimmunitás váltják ki a synovitist, a RA központi gyulladásos eseményét. Ez igen összetett folyamat, melyben számos gyulladásos sejt és mediátor vesz részt. A T-sejteknek kulcsszerepük van a synovitis kiváltásában és fenntartásában. Ezt alátámasztja az antigénprezentáció, illetve a citrullinált autoantigének T-sejtek által történő felismerésének genetikai jelentősége. A B-sejteket célzó terápia hatékonysága hangsúlyozza ezen sejtek jelentőségét a RA patogenezisében. A B-sejteknek fontos szerepük van az antitestek, cytokinek és chemokinek termelésében, valamint az antigenprezentációban. A veleszületett immunrendszer sejtjei közül a neutrophil granulocyták alkotják a RA-s synovialis folyadékban (SF) található sejtek fő populációját, azonban szerepük korántsem egyértelmű: habár proteolitikus enzimek és gyulladásos mediátorok szekretálása révén károsíthatják az ízületi struktúrát, az ízületet infiltráló T-sejteket is károsíthatják. A RA-s synoviumban nagy számban vannak jelen makrofágok és endothelsejtek, az általuk termelt angiogén mediátorok pedig angiogenesisist okoznak. Az így megnövekedett endothelfelszín lehetővé teszi a gyulladásos leukocyták synovialis extravazációját, ezáltal a RA progresszióját.

A tény, hogy RA esetében a monozigóta ikrek konkordancia aránya csupán kb. 15%, felhívta a figyelmet a génexpressziót szabályozó, ezáltal a genetikai és környezeti tényezőket összekapcsoló epigenetikai faktorok jelentőségére. A RA-s synovialis fibroblastok számos hypo-, illetve hypermetilált genomikai régiót tartalmaznak. Az érintett gének többsége a matrix remodellációban, leukocyta toborzásban, immunválaszban és gyulladásban játszik szerepet. Egy, a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) DNS metilációs profilját vizsgáló study során eltérő metilációs mintázatot találtak a fő hisztokompatibilitási komplex lokuszok régiójában, mely jelentősen hozzájárult a RA kialakulásának kockázatához.

1.2 A klinikai kép – különös tekintettel a kardiovaszkuláris szövődményekre

A RA karakterisztikus tünete a krónikus synovitis, amely hosszú távon az ízület tönkremeneteléhez vezethet. Ugyanakkor a betegség extraartikuláris manifesztációi számos egyéb szerv, pl. a bőr, szemek, tüdők, sőt a központi idegrendszer károsodását okozhatják. Ezenkívül a RA 3-10 évvel rövidíti meg a várható élettartamot. A többlethalálozás fő oka a kardiovaszkuláris betegség, melyet főként a – már a betegség korai fázisában észlelhető- RA-asszociált atherosclerosis idéz elő. A RA-asszociált atherosclerosis kialakulásában egyaránt fontos szerepet játszanak a tradicionális, Framingham rizikótényezők és a gyulladásos faktorok (mint az ACPA, immunglobulin M [IgM] típusú rheumatoid faktor (RF), keringő immunkomplexek, proinflammatorikus cytokinek és Th0/Th1 T-sejtek).

A manifest atherosclerosis általában endothelialis dysfunkció előzi meg, mely klasszikus képalkotó vizsgálatokkal, mint az arteria carotis intima-media vastagság (IMT), az arteria brachialis áramlás-mediált vazodilatáció (FMD) és nitrát-mediált vazodilatáció (NMD) diagnosztizálható. Ugyancsak megfigyelhető az artériafal merevségének (stiffness) fokozódása, melyet a pulzushullám terjedési sebesség (pulse-wave velocity, PWV) fokozódása jelez. Az IMT vizsgálata az Európai Reumatológiai Társaságok Szövetsége (European Alliance of Associations for Rheumatology, EULAR) ajánlásai között is szerepel, mivel a carotis IMT jól korrelál a RA aktivitásával és fennállásával, a hagyományos rizikófaktoroktól függetlenül.

Bár RA-ben a szisztémás gyulladásnak van kulcsszerepe az akcelerált atherosclerosis létrejöttében, a tradicionális rizikófaktorok ugyanúgy jelen vannak, ami megnehezíti a kezelést. Ugyanakkor az alacsony betegségaktivitás mindenképp jótékony hatású az érstatusz szempontjából.

1.3 Röviden a rheumatoid arthritis kezelésének sikereiről és kihívásairól

RA-ben nagyon szűk a „terápiás ablak”, hogy remissziót vagy alacsony betegségaktivitást érjünk el, ami ahhoz szükséges, hogy megelőzzük az ízületi károsodást, funkcionális fogyatékoságot és kedvezőtlen betegségkimenetelt. Alapvető fontosságú tehát a korai diagnózis és az azonnal megkezdett terápia. Habár továbbra is a methotrexát (MTX), mint konvencionális, szintetikus betegségmódosító szer (csDMARD) jelenti a kezelés alapját, az elmúlt évek során számos biológiai terápiás és célzott szintetikus betegségmódosító szer (tsDMARD; biologikumok és tirozinkináz-gátlók) vált elérhetővé. Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a biológiai terápiás szerek nem csak az ízületi gyulladás progresszióját lassítják, hanem jótékony hatással bírnak a szisztémás manifesztációk és a társbetegségek, pl. kardiovaszkuláris betegség kezelésében is.

A terápiás lehetőségek nagymértékű fejlődése ellenére még mindig számos betegnél tapasztalunk gyógyszer mellékhatást vagy épp hatástalanságot. A terápiás válasz hátterében számos génexpressziós mintázatot azonosítottak, pl. a MTX hatásosságának, illetve toxicitásának hátterében számos, a gyógyszer celluláris transzportját, valamint a folát metabolizmusát meghatározó gén SNP-át. Számos SNP-t írtak le egyéb csDMARD-okra, illetve biológiai terápiás szerekre – főként tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) inhibitorokra - adott válasszal összefüggésben. Ezen kihívások miatt alapvető szükség van új terápiák fejlesztésére.

Mivel a RA etiopatogeneziséhez epigenetikai faktorok is hozzájárulnak, és – a génmutációktól eltérően- ezek reverzibilisek, komoly terápiás lehetőség rejlik bennük. Az Aurora kinázok a sejtproliferáció szabályozásában vesznek részt, inhibitoraik pedig tumorellenes gyógyszerek. A szerin/treonin kináz szupercsaládhoz tartoznak és – a centroszóma képződés és kromoszóma szétválás különböző lépéseinek szabályozása révén – a sejtosztódásban játszanak fontos szerepet.

1.4 Az állatmodellek jelentősége a rheumatoid arthritis kutatásában

A Humán Genom Projekt megvalósítása óriási lendületet adott a reumatológiai kutatásnak, azonban a teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWAS) kezdeti, biztató eredményei után lelassult a folyamat, köszönhetően a humán populáció extrém heterogenitásának, a betegség poligénes természetének és annak a ténynek, hogy a legtöbb szignifikáns SNP a genom nem kódoló régiójában található. Az utóbbi évek során csupán megerősítő tanulmányokat, különböző etnikai csoportok vizsgálatának eredményeit és terápiával kapcsolatos metaanalíziseket publikáltak; az etiológiai összefüggésektől pedig még mindig nagyon távol vagyunk.

A RA egér modelljeinek tanulmányozása segíthet kitölteni azokat a réseket, melyeket a human GWAS-k korláta eredményeztek, mivel itt alaposabb rálátásunk van az autoimmun T- és B-sejtes válaszra, lehetővé válik funkcionális vizsgálatok végzése és a genom manipulációja, valamint potenciális új kezelési eljárások tesztelése. Bár az állatkísérletek munka- és időigényesek, a megfelelő genetikai kombinációk alkalmazása segítheti a betegségre hajlamosító gének felfedezését, akár egyes gének vizsgálatát is lehetővé teszi. Ezenkívül -mivel segítenek jobban megértenünk a betegség folyamatát- hasznos eszközei lehetnek az új, hatékonyabb kezelés fejlesztésének.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Jelen tézis három vizsgálat eredményeit foglalja össze, melyekben a RA hátterének és kezelésének egyes kérdéseit vizsgáltuk. RA-re hajlamosító gének jelentőségét vizsgáltuk emberekben és megfelelő állatmodellekben (1. vizsgálat). A RA-s betegek vaszkuláris kórfolyamataihoz társuló génexpressziós mintázatot tanulmányoztuk (2. vizsgálat). Epigenetikus faktorok RA patogenezisében betöltött szerepét vizsgáltuk (3. vizsgálat).

Specifikus célkitűzéseink a következők voltak:

1. vizsgálat

RA-re hajlamosító gének jelentőségének vizsgálata emberekben és megfelelő állatmodellekben

- Non-MHC rizikó gének áttekintése RA-ben és állatmodellek szinténikus kromoszómaregióiban, különös tekintettel saját munkacsoportunk eredményeire.

2. vizsgálat

RA-s betegek vaszkuláris kórfolyamataihoz társuló génexpressziós mintázat tanulmányozása

- Kardiiovaszkuláris szövődménnyel rendelkező RA-s betegek genomikus analízise.
- A génexpressziós profil vizsgálata a biológiai terápiára adott klinikai és vaszkuláris válasszal összefüggésben.

3. vizsgálat

Az epigenomot befolyásoló faktorok, különösen az Aurora kináz A és B expressziójának vizsgálata arthritises egerek és RA betegek immunsejtjeiben

- Arthritishez társuló epigenetikus faktorok azonosítása egerekben és RA-s betegekben.
- Ezen faktorok célzott gátlásában rejlő új terápiás lehetőségek felkutatása.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 1. vizsgálat

3.1.1 Egerek

Évek hosszú sora alatt munkacsoportunk több, mint 5000 beltenyésztett vad típusú szülő, kb. 500 F1 hibrid (mindegyik negatív proteoglikán (PG)-indukált arthritisre (PGIA)) és 3200, 6 féle genetikai keresztezésű F2 hibrid genotipizálását végezte el, összesen 240 szekvencia hosszúság polimorfizmus (SSLP) marker felhasználásával. Célunk PGIA-hez, illetve kollagén-indukált arthritishez (CIA) kapcsolódó mennyiségi jelleget meghatározó lokuszok (QTL) azonosítása volt az egér genomon belül. A folyamat során egy szupresszív kromoszómarégió inszerciója történt egy teljesen fogékony genetikai környezetbe. PGIA-re fogékony BALB/c nőstények és rezisztens DBA/2 hímek (mindkét típus MHC H2d-vel rendelkezik) keresztezéséből származó F1 hímeket választottunk, melyek a kívánt DBA/2 eredetű genomikus régióval rendelkeztek, majd ezeket számos alkalommal visszakereszteltük vad típusú BALB/c nőstényekkel, amíg az N1-NX generációk már elégséges rekombinációval rendelkeztek. Az Nx hímeket vad típusú BALB/c nőstényekkel kereszteztük, hogy az így létrejött Nx+1 hímek és nőstények keresztezésével létrehozzunk egy homozigóta intervallum-specifikus kongenikus törzset (IVSC).

Az IVSC egereknél ezután vizsgáltuk az artritisre való fogékonyságot, a betegség kialakulását és súlyosságát, valamint több, mint 15 RA szempontjából releváns biomarkert.

3.1.2 Irodalmi áttekintés

Fő célunk az volt, hogy állatkísérleteinknek humán relevanciát találjunk. Ezért a vonatkozó irodalmi adatok áttekintése során összevetettük saját és az egyéb rágcslómodell alkalmazó kísérletek eredményeit a humán autoimmun betegségekben -főként RA-ben- eddig azonosított lokuszokkal.

3.2 2. vizsgálat

3.2.1 Betegek

A vizsgálat első részébe 16 kaukázusi rasszhoz tartozó, biológiai terápiában korábban nem részesült RA beteget (15 nő, 1 férfi) vontunk be. Az átlagos életkoruk 53.7 ± 5.7 év (42 és 60 év között), a betegségük átlagos időtartama 10.0 ± 10.2 év volt (2 és 44 év között). A vizsgálat második részében 19, biológiai terápiában korábban nem részesült RA beteg (18 nő, 1 férfi) vett részt; az átlagéletkoruk 54.3 ± 4.8 év volt (43 és 60 év között), a betegségük átlagos időtartama 12.1 ± 10.9 év volt (2 és 44 év között). Később 12 beteg kapott etanerceptet (ETN) és 7 certolizumab-pegolt (CZP). Minden beteg megfelelt a RA EULAR/ACR 2010-es klasszifikációs kritériumainak.

Az összes vérmintát azután vettük le reggel 8:00 és 9:00 óra között a biológiai terápia első dózisa előtt, hogy az alanyok egy éjszakán át, legalább 12 órán keresztül éheztek. A betegek gyógyszeres kezelése a vizsgálat során változatlan maradt.

A vizsgálat mindkét részében az alábbi beválogatási kritériumokat alkalmaztuk: RA diagnózis; 20 és 60 év közötti életkor; legalább két DMARD hatástalansága; aktív betegség (DAS28 > 3.2); anti-TNF terápia naivitás. Kortikoszteroid terápia (prednizon ≤ 10 mg/nap) megengedett volt, feltéve, hogy a dózis a vizsgálat kezdete előtt legalább 2 hónapig változatlan maradt. A nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) alkalmazása is megengedett volt, ha változatlan dózisban használták azokat a vizsgálat kezdete előtti egy hónapban. Minden beteg 10-25 mg/hét dózisú orális MTX kezelésben részesült, a MTX dózisának a vizsgálat kezdete előtt legalább 4 hétig változatlannak kellett lennie. A vizsgálat kizárási kritériumai voltak a terhesség; a szoptatás; az aktív vagy 5 éven belüli malignus betegség; az aktív fertőző betegség; a RA-tól eltérő ízületi gyulladás vagy egyéb autoimmun betegség a kórtörténetben; valamint a dohányzás.

A betegség aktivitását a vizsgálat indulásakor, illetve a vizsgálat 2. részében 12 hónappal az anti-TNF kezelés megkezdése után értékeltük a Disease Activity Score 28 (DAS28) meghatározásával.

A klinikai reszponder (cR, illetve cNR) státuszt 12 hónapos ETN vagy CZP kezelés után ítéltük meg a Van Gestel és munkatársai által leírt EULAR terápiás válasz kritériumok alapján.

Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta a vizsgálatunkat (9732-2 2012/EHR). Emellett a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága is jóváhagyta a vizsgálati protokollt. A tanulmány összhangban volt a Helsinki Nyilatkozattal. Minden olyan vizsgálatba vont beteg, aki vérmintát adott, aláírta a Tájékoztató és Beleegyezési Nyilatkozatot.

3.2.2 Vaszkuláris ultrahangvizsgálatok

Az a. brachialis FMD meghatározása a jobb karon, a fossa antecubitalis fölött történt ultrahangvizsgálattal: 10 MHz lineáris transzducer (HP Sonos 5500). A nyugalmi értéket egy standard hőmérsékletű helyiségben történő 30 perces pihenő után határozta meg a szonográfus: B mód, longitudinális metszet. Egy előzetesen 4.5 percen át suprasystolés érték fölé fűjt mandzsetta felengedésével reaktív hyperaemiát idéztünk elő. Felengedést követően 90 másodpercig rögzítettük a maximális áramlási sebességet és az artéria átmérőjét. Az áramlási sebességek, a nyugalmi átmérő és a FMD mérése EKG-kapuzással, offline történt. Az FMD értékét a nyugalmi átmérő százalékos arányában adtuk meg (FMD%). Kutatócsoportunk egy korábbi munkájában 5%-os cut-off értéket határozott meg, ezáltal elkülönítve a magas (normál) és alacsony (kóros) értékeket. Jelen munkánk során is ezt az értéket alkalmaztuk.

Az a. carotis IMT meghatározását egyetlen vizsgáló végezte duplex ultrahang rendszer (HP Sonos 5500, 10 MHz lineáris transzducer) segítségével. B módban, R-szinkron módon magas felbontású hosszanti metszeteket vettünk fel mindkét oldali a. carotis communisról. Az offline mérések a bulbustól 1 cm-re proximálisan, a távoli falon történtek. Az IMT-t a lumentől számított első és második echogén vonal távolságaként adtuk meg, 10 mérés átlagából számítva, mm-ben kifejezve. Korábbi munkánk során 0.65 mm-es cut-off értéket határoztunk meg, ezáltal elkülönítve a magas (emelkedett) és alacsony (normál) értékeket. Jelen munkánk során is ezt az értéket alkalmaztuk.

A PWV-t az aortán automata TensioClinic arteriograph rendszerrel (Tensiomed Kft., Budapest) határoztuk meg a fossa jugularis – symphysis távolság és a reflexiós idő hányadosaként. Az arteriograph az a. brachialis feletti nyomáshullámot rögzíti, 35 Hgmm-es suprasystolés nyomást alkalmazva. Az eredmények reprodukálhatósága érdekében a mérést 10 perces pihenést követően végeztük. A PWV értékét m/s-ban fejeztük ki. Rugalmas érrendszer esetén a PWV értéke alacsony, a rugalmasság csökkenésével az érték növekszik. Korábbi

tapasztalataink alapján 8 m/s-os cut-off értéket határoztunk meg, ahol a 8 m/s alatti érték alacsony (normál), míg az afölötti magas (emelkedett).

A vizsgálat 2. részében az egy éves ETN vagy CZP kezelést követően a FMD, IMT és PWV értékekben bekövetkezett változás alapján meghatároztuk a vaszkuláris reszponder státuszt (vR, illetve vNR). Azokat a betegeket tekintettük vaszkuláris reszpondernek, akiknél legalább 20%-os javulás következett be a FMD, IMT vagy PWV értékben. Akiknél legalább 2 paraméter esetében tapasztaltunk minimum 20%-os javulást, jó vaszkuláris reszpondernek (Good Vascular Responder, GVR) tekintettük.

3.2.3 PBMC és RNS izolálás

A perifériás vérmintákat (10 ml) EDTA tartalmú vérvételi csövekbe (BD Vacutainer K2EDTA) gyűjtöttük. A mononukleáris sejtek szeparálása Ficoll gradiens-centrifugálással történt, a sejtek teljes RNS tartalmát Trizol reagenssel (Invitrogen) vontuk ki, a gyártó előírásainak megfelelően. Az RNS minőségét Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) segítségével ellenőriztük, minden minta esetében 1.5 és 2.0 között volt a 28S/18S arány, az RNS integritási szám pedig 9 és 10 között. A mennyiség meghatározása NanoDrop (Thermo Scientific) használatával történt.

3.2.4 Microarray vizsgálatok és statisztikai módszerek

Affymetrix GeneChip Human Primeview array-t használtunk 28869 jól ismert lokusz globális expressziós mintázatának elemzésére. 3'IVT Expression Kit-et (Affymetrix), illetve a GeneChip WT Terminal Labeling and Control Kit-et (Affymetrix) használtuk 250 ng RNS-minta amplifikálásához majd jelöléséhez. A mintákat 16 órán át 45 °C-on hibridizáltuk, majd a szokásos mosási protokollt hajtottuk végre a GeneChip Fluidics Station 450 alkalmazásával, és a mintákat a GeneChip Scanner 7G-vel (Affymetrix) szkenneltük.

A mikroarray adatokat a Genespring GX12 szoftverrel (Agilent Technologies) elemeztük. Az Affymetrix adatfájlokat az RMA algoritmus segítségével dolgoztuk fel, és medián normalizálást hajtottunk végre. A klinikailag eltérő csoportok közötti génexpressziós különbségek azonosításához statisztikai elemzést végeztünk Mann-Whitney féle U-próba alkalmazásával, ahol a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek. Hierarchikus klaszterezéssel és főkomponens-analízissel (PCA) vizsgáltuk tovább a klinikailag különböző

csoportok eltérő génexpressziós mintázatát. A mikroarray adatokat beküldtük a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisába (access number: GSE126476).

A génontológiai (GO) elemzést a Cytoscape 3.4.0 szoftver (cytoscape.org) segítségével, ClueGO alkalmazással végeztük. A beállítások a következők voltak: GO biológiai folyamat, GO immunrendszer folyamat és KEGG emberi betegségek útvonal; statisztikai módszerek: kétoldalas hipergeometrikus teszt, valamint Benjamini-Hochberg FDR a multiplex tesztek korrekciójához. A szignifikánsan megnövekedett amplifikációjú GO kategóriákat $p < 0,05$ és $\kappa < 0,4$ szignifikancia értékek segítségével határoztuk meg.

A klinikai és a különböző vaszkuláris kimenetek közötti kapcsolatot Pearson-féle korrelációval elemeztük ($p < 0,05$).

3.3 3. vizsgálat

3.3.1 Egerek

Az idős tenyésznőstény BALB/c egereket a National Cancer Institute-től (NCI, Frederick, MD) vásároltuk, és standard protokoll szerint immunizáltuk őket PGIA előidézéséhez. Röviden: az egereket artrózisban szenvedő, ízületi pótló műtéten átesett betegek rezezált térdízületi porcából tisztított PG-nal immunizáltuk. A PG-t intraperitoneálisan (i.p.), összesen háromszor (három hetes időközönként, 100 μ g PG core protein/injekció) injektáltuk 2 mg dimetil-dioktadecil-ammónium-bromid (DDA) adjuvánssal a BALB/c egerekbe. Az egereket hetente háromszor értékeltük a végtagokban kialakult ízületi gyulladás súlyossága szempontjából; vizuális skála szerint minden egyes mancsra 0-tól 4-ig terjedő pontszámot adtunk, így az elérhető maximális arthritis score 16 volt. A VX-680 kezelés ízületi gyulladásra gyakorolt terápiás hatásának meghatározására az ízületek vastagságát mértük mikrokaliper segítségével. A CIA-t hím DBA/1J egerek (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) immunizálásával állítottuk elő 100 μ g humán II típusú kollagénnel (CII) teljes vagy részleges Freund adjuvánssal, a standard CIA protokoll szerint. Mind a PGIA-val, mind a CIA-val szemben rezisztens DBA/2 egereket (NCI) vagy porc PG-vel vagy CII-vel immunizáltuk, a fentiek szerint. A szérummintákat a VX-680-nal végzett kezelés előtt és a kísérlet végén (a kezelések 17–18. napján) gyűjtöttük be. Az autoantitestek IgG1 és IgG2a izotípusait (anti-egér PG) BALB/c egerek szérummintáiban mértük. Az állatkísérleteket az Institutional Animal Care and Use Committee hagyta jóvá.

3.3.2 Betegek

RA betegeket (15 igazolt RA-ben szenvedő beteget, akik kezelésben még nem részesültek és 10 MTX-kezelt RA beteget), valamint egészséges kontroll személyeket vontunk be a vizsgálatunkba, akik mind aláírták a Tájékoztató és Beleegyező Nyilatkozatot. Az embereken végzett vizsgálatainkat és azok vizsgálati protokollját a Rush University Medical Center (Chicago, IL, USA) Institutional Review Board-ja hagyta jóvá.

3.3.3 PGIA-s BALB/c egerek VX-680 kezelése

A VX-680-nal történő profilaktikus kezelést a PGIA várható megjelenése előtt hat nappal kezdtük meg (az ízületi gyulladás általában 9-10 nappal a harmadik PG-immunizálás után alakul ki). Az egereket i.p. 40 mg/kg VX-680-nal (Sellekchem, Houston, TX) injektáltuk, amely a rák kezelésében leírt hatékony dózis, és amely nem befolyásolta a peritoneális lavage során gyűjtött sejtek életképességét. A VX-680-at dimetil-szulfoxidban (DMSO, 100 mg/ml) oldottuk fel és 25% izopropil-alkohollal hígítottuk. A VX-680-at minden nap beadtuk a kísérlet első hetében, majd minden másnap a vizsgálatok végéig, amikor az állatokat leöltük.

Terápiás kezelés céljából az ízületi gyulladásos BALB/c egereket i.p. 50 mg/kg VX-680 injekcióval kezeltük. A kezelés előtt olyan arthritises egereket választottunk ki, amelyek megközelítőleg azonos kumulatív ízületi gyulladás pontszámokkal rendelkeztek ($\sim 2.5 \pm 1.0$, $n=8-10$). Az egerek az első VX-680 kezelést az ízületi gyulladás első tüneteinek (vörösség és a mancsok duzzanata) megjelenése után kapták, majd minden másnap, a vizsgálatok végéig.

3.3.4 RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

Sejteket gyűjtöttünk az egerek lépéből, csontvelőjéből, valamint az ízületeket drenáló nyirokcsomókból a harmadik PG injekció utáni 17. napon. A lép, a csontvelő és a nyirokcsomó sejtek limfocita tisztítás előtti alikvotjaiból RNS-t izoláltunk. A T- és B-sejteket antitesttel bevont mágnesgyöngyökkel tisztítottuk (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada). A lépsejtek és a megtisztított limfociták alikvotjaiból RNS-t izoláltunk TRI reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alkalmazásával a szeparálást és a tisztítást követően azonnal. A teljes RNS 1 μ g-ját használtuk fel a cDNS szintéziséhez iScript kit (Bio-Rad, Hercules, CA) alkalmazásával. A kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót (qRT-PCR) iQ5 RT-PCR gép (Bio-Rad) és az SsoFast TM EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) alkalmazásával végeztük. A

primereket a PrimerQuest szoftver segítségével terveztük meg, majd az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) gyártotta le azokat. A qRT-PCR termék specifikitását a PCR-t követő olvadási görbe-analízissel ellenőriztük. A mintákat triplikátumként teszteltük, az elemzéshez az iQ5 PCR szoftvert használtuk, a normalizált expressziós változási érték kiszámításához a ΔC_t módszert alkalmaztuk. A mért C_t értékek normalizálásához a β -aktin és a Gapdh géneket használtuk belső kontrollként.

A vizsgálatban részt vevő, egészséges személyek és a DMARD-kezelésben nem részesült RA betegek vérmintáinak PBMC-jeit Ficoll-gradienssel különítettük el egy órán belül a vérvételt követően. A szeparált mononukleáris sejteket az RNS izolálásáig RNAlater®-ben (Ambion/LifeTechnologies, Grand Island, NY) tároltuk. A cDNS szintézist és a qRT-PCR-t az egérminták kapcsán leírtak szerint hajtottuk végre.

3.3.5 PCR array technikák

Emberi (PHS-085) és egér (PMM-085) „RT2Profiler™” PCR array-t (SABioscience, Frederick, MD) alkalmaztunk az ízületi gyulladásal összefüggő epigenetikai változások vizsgálatára, melyhez 84 különböző, a kromatin módosításában részt vevő enzim génexpressziójának változását követtük. Az utóbbi vállalat reagenseit használtuk a cDNS szintéziséhez, és követtük a gyártó előírásait a qRT-PCR esetében is.

3.3.6 Western blot analízis

A Western blot analízishez ugyanazon sejteket használtuk, mint amelyeket a teljes RNS izolálásához szeparáltunk. A sejteket RIPA pufferben extraháltuk Protease Inhibitor Cocktail® segítségével (Roche, Indianapolis, IN). A fehérjekoncentrációkat a BCA Protein Assay kit™ (Pierce, Rockford, IL) alkalmazásával határoztuk meg. A fehérjéket (30 μ g/sáv) 8%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) futtattuk, majd nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad) vittük át. A membránokat 5% szarvasmarha-szérum albumint (Sigma-Aldrich) tartalmazó foszfát-pufferolt sóoldattal (PBS, pH 7.5) blokkoltuk 1 órán keresztül, majd primer antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. A következő primer antitesteket használtuk: nyúl poliklonális anti-Aurora A (ab61114, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), nyúl poliklonális anti-Aurora B (#3094, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) és egér monoklonális (mAb) anti-Gapdh (6C5 klón, Abcam). A peroxidázzal konjugált szekunder antitesteket a Santa Cruz Biotechnology-től (Santa Cruz, CA) szereztük be. A Western blotokat

a Plus Western Blotting Substrate (Pierce) használatával hívtuk elő. A hiszton frakciókat tisztított B sejtekből állítottuk elő, és 12% SDS-PAGE gélen futtattuk. A foszforilációval módosított, valamint a módosítatlan H3 hiszton immundetektálását a fent leírtak szerint hajtottuk végre. A primer antitestek nyúl poliklonális antitestek voltak a foszforilált H3 Ser10 hiszton (H.H3-P, ab5176), valamint a módosítatlan H3 hiszton (H.H3, ab1791) ellen (mindkettő az Abcam-tól).

3.3.7 Szövetkultúra

Az apoptózissal kapcsolatos génexpressziós vizsgálatokhoz PGIA-val rendelkező egerek lépsejtjeit 24 lyukú szövettenyésztő plate-eken tenyésztettük 3 napig Dulbecco féle módosított Eagle-mediumban (DMEM) melyet 10%-os magzati szarvasmarha-szérummal (FBS) egészítettünk ki. A sejteket 60, 300, illetve 1500 nM VX-680-nal, vagy DMSO-val kezeltük. RNS-t naponta izoláltunk a kezelt lépsejtekből a következő három napon. A p53 és Puma gének expressziós szintjét qRT-PCR alkalmazásával mértük.

3.3.8 Áramlási citometria

Az egerek lépéből, nyirokcsomóiból vagy csontvelőjéből izolált T- és B-sejteket többszínű áramlási citometriával vizsgáltuk. Röviden összefoglalva, 106 sejtet oltottunk lyukanként 96 lyukú U-fenekű plate-ekre (BD Falcon), majd az Fc-receptorokat anti-CD16/CD32 mAb-vel (BioLegend, San Diego, CA) 15 percig 4 °C-on blokkoltuk. A mintákat fluorokrómmal konjugált egér CD3, CD19, aktív kaszpáz 3, IgM, IgD és CD138 elleni monoklonális antitestekkel (BioLegend vagy BD Biosciences, San Diego, CA) inkubáltuk 100 µl áramlási citometria festő/mosó pufferben (0.1% szarvasmarha-szérumalbumin PBS-ben, 0.1% NaN₃-dal), 30 percig, sötétben, 4 °C-on. A sejteket kétszer mostuk és ugyanazon a napon vizsgáltuk. Az adatgyűjtést és elemzést egy FACS Canto II áramlási citométerrel, HTS modullal és FACS DIVA szoftverrel (BD Flow Cytometry Systems, San Jose, CA) végeztük. A kezdeti kapuzást limfoid sejteken végeztük (az előre irányuló/oldalirányú szórás (FSC/SSC) alapján). A CD19 pozitivitás alapján határoztuk meg a teljes B-sejt számot, a CD3 pozitivitás alapján pedig a teljes T-sejt számot. Az intracelluláris kaszpáz 3-at Cytofix/Cytoperm-rel (BD Biosciences) végzett permeabilizálás után detektáltuk. A B-sejtek alcsoportjait anti-CD19, anti-IgM és anti-IgD monoklonális antitestekkel (B1 és B2 sejtek) vagy anti-CD19 és antiCD138 mAb-kkel (plazmablasztok/plazmasejtek) történő együttes festés után elemeztük.

3.3.9 Statisztikai elemzés

Deskriptív statisztikai módszereket alkalmaztunk a csoportok átlagának és az átlag standard hibájának (átlag $\pm$ SEM) meghatározásához, hacsak másképp nem jeleztük. Két csoport közötti különbséget Student féle kétmintás t-próbával vizsgáltuk. Amikor nem parametrikus eloszlást észleltünk (pl. az emberi minták esetében), akkor a Mann-Whitney féle U-próbát használtuk az csoportok összehasonlításához. A $P \leq 0.05$ -t tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4 EREDMÉNYEK

4.1 1. vizsgálat

4.1.1 Megfelelő genomi lokuszok RA-ben és annak rágcslómodelljeiben

Mi és más kutatócsoportok eddig 29 PGIA-asszociált és 40 CIA-asszociált lokuszt azonosítottunk egerekben, valamint néhány megfelelő QTL-t patkányokban. Áttekintettük az egér genom vizsgálatok során azonosított QTL-k közül azokat, melyek megfelelnek a metaanalízisekkel igazolt fő RA rizikógének valamelyikének, és kiválasztottunk közülük kettőt további vizsgálatok céljára: *Pgia26/Cia5/mCia21/Eae3* a 3-as egérokromoszómán, mely az emberi 1-es kromoszómán lévő *PTPN22/CD2* lokusznak; *Pgia2/Cia2/Cia3* a 2-es egérokromoszómán, mely az emberi 9-es kromoszómán lévő *TRAF1/C5* lokusznak felel meg. A kiválasztott egerekből IVSC-t hoztunk létre, a többi kongenikus és szubkongenikus törzset krioprezerváltuk.

A betegségre fogékony és betegséggel szemben ellenálló IVSC egerek megfelelő genomi régiójának párhuzamos szekvenálása révén sikerült néhány génmutációt azonosítani. Ezek arthritissel való kapcsolata korábban nem minden esetben volt ismert, azonban kivétel nélkül ismert humán RA rizikógéneknek megfelelő lokuszok közvetlen közelében helyezkedtek el.

Vizsgálatunk eredményei alapján elindult ezen gének és megfelelő humán DNS minták nagy teljesítményű szekvenciaanalízise.

4.2 2. vizsgálat

4.2.1 A normál és patológiás érstátuszú betegek génexpressziós profilja közötti különbségek

A 16 betegből 11-nek volt alacsony ($<5\%$), 5-nek pedig magas ($\geq 5\%$) FMD értéke. Szintén 11 betegnek volt alacsony (≤ 0.65 mm) és 5-nek magas (>0.65 mm) IMT értéke. Kilenc betegnek volt alacsony (≤ 8 m/s), 7-nek pedig magas (>8 mm/s) PWV értéke.

Kettő up-regulálódott és 12 down-regulálódott gént találtunk a kóros FMD-vel összefüggően. A *CD74* és *ZNF718* voltak up-reguláltak, a *FOLR3*, *ADM*, *HP*, *DSC2*, *ANXA3*, *LILRA5*, *PLSCR1*, *AKAP12*, *VNN2*, *TCN1*, *HDC* és *NFIL3* pedig down-reguláltak.

Összesen 62 gén volt up- és 129 down-regulált a magas IMT-vel rendelkező betegeknél, a normál értéket mutatókhoz viszonyítva. Többek közt a *G0S2*, *NRGN*, *ITGA2B*, *C3*, *FLNA*, *IRF5*, *ABCC3*, *CAPNS1*, *IL2RG*, *CCL4L1*, *ACTN1*, *HLAB*, *HLAC*, *TNFAIP3* és *MYO1G* voltak up-reguláltak. Down-reguláltak voltak a *PPP1CB*, *HLADRB4*, *IFNGR1*, *LRRN3*, *CCR2*, *CD46*, *IFI44L*, *IFIT1*, *TLR10*, *CD164*, *IFIT2*, *SMAD4* és *SGPP1*.

Összesen 32 gén mutatott eltérő expressziót az emelkedett PWV értékű betegeknél a normál értéket mutatókhoz viszonyítva. Ezen változások többsége kismértékű volt, csupán 2 gén esetében volt legalább 2x-es különbség: a *HLAB/HLAC* up-, a *LRRN3* down-regulálódott.

4.2.2 A klinikai és vaszkuláris válasz közötti összefüggés anti-TNF kezelést követően

A 2. vizsgálat 2. részében 13 beteg bizonyult klinikai reszpondernek, 6 pedig nonreszpondernek. 10 beteg volt FMD-20% reszponder, 9 IMT-20% reszponder és 8 PWV-20% reszponder. Nyolcan érték el $\geq 20\%$ javulást a háromból legalább 2 paraméterben, közülük öten mindháromban.

A kezelésben részesült betegek klinikai és vaszkuláris reszponder státuszát is összehasonlítottuk: az IMT válasz konzekvensen korrelált a klinikaival ($R=0.418$, $p=0.075$). 8 FMD, 8 IMT és 6 PWV reszponder, valamint 7 GVR volt klinikai reszponder is. Ezzel szemben 4 FMD, 5 IMT, 4 PWV és 5 globális vaszkuláris nonreszponder bizonyult klinikailag is nonreszpondernek.

4.2.3 A klinikai és vaszkuláris reszponderek kiindulási génexpressziós mintázata eltér a nonreszponderektől

A kiindulási génexpressziós vizsgálat csak 5 olyan gént talált (*HLADRB4*, *TMEM176A*, *TMEM176B*, *IFI44* és *PLSCR1*), melyek szignifikánsan ($\geq 2x$) up-reguláltak voltak a cR betegeken a cNR-vel összehasonlítva ($p<0.05$). Szignifikánsan down-regulált gént nem találtunk.

Az FMD-20% reszponder státusz egyetlen gén (*NEFL*) szignifikáns ($\geq 2x$) up-regulációjával és 2 gén (*JUN* és *GYPB*) szignifikáns down-regulációjával járt együtt ($p<0.05$). Az IMT-20% reszponder státusz 18 gén (pl. különféle immunoglobulin és HLA gének,

TNFRSF17, *CD74*, *FCRL5*, *CD79A*, *IFITM3*) up-regulációjával és 12 gén (pl. *CXCL5*, *ITGB3*, *NEFL*) down-regulációjával társult. A PWV-20% reszponder státusz 3 gén (*IFNG*, *JUN* és *CCL4L1/L2*) up-regulációjával és 5 gén (*HLAC*, *GNB4*, *NRG1*, *NEFL* és *FKBP5*) down-regulációjával járt együtt. A GVR-20% reszponder státusz 11 gén (pl. különféle immunoglobulin gének, *SCN3A*, *CD79A* és *FCRL5*) up-regulációjával és 2 gén (*NEFL* és *CES1/CES1P1*) down-regulációjával társult.

4.2.4 Az eltérő expressziót mutató gének hálózati elemzése

Mivel az IMT-reszponder státusz esetén kellően nagyszámú gén mutatott eltérő expressziót, úgy döntöttünk, hogy a GO analízist elvégezzük az IMT-asszociált géneken, az FMD- és PWV-asszociáltakon viszont nem. A GO analízis célja a legalább 2x-es mértékű up- vagy down-regulációt mutató gének funkcionális kategóriákba történő besorolása volt. Az eltérő expressziót mutató IMT-asszociált gének felülreprezentált funkcionális kategóriái többek között ezek voltak: az immunválasz pozitív regulációja, a Golgi vezikula lefűződése, valamint a glükóz transzport szabályozása.

4.3 3. vizsgálat

4.3.1 Kromatin módosító enzimek betegségasszociált génexpresszió-változásai ízületi gyulladásban szenvedő egerekben valamint RA-s betegekben

Az ízületi gyulladás patogenezisében szerepet játszó kromatin módosító tényezők azonosításához 84 gén expresszióját elemeztük, amelyek olyan kulcsfontosságú enzimeket kódolnak, amelyekről ismert, hogy specifikus kromatin-módosítók. PCR array-t alkalmaztunk a génexpresszió változásainak kimutatására. Az RNS minták PGIA és kontroll egerek lépsejtjeiből származtak. Analóg PCR array-t használtunk az identikus humán gének expressziójának vizsgálatára, DMARD-naiv RA betegek PBMC-ből tisztított RNS-mintáinak felhasználásával.

Vizsgálatunkban 6 gén expressziójában 2.58-4.44-szeres növekedést detektáltunk, 9 pedig 2.15-4.60-szoros downregulációt mutatott PGIA-s egerekben. A fent említett gének közül az Aurora kináz A-t és B-t választottuk további elemzésre, mivel a vizsgálatunkban

azonosított gének közül ez a két kináz volt a legjobban dokumentált az irodalomban. Mindkét gén expressziója több, mint 2-szeres növekedést mutatott az összes vizsgált alanyánál.

RA-ben szenvedő betegekben összesen 9 gén upregulációját észleltük, melyek közül 4 (*AURKA*, *AURKB*, *ESCO2* és *NEK6*) szintén fokozott expressziót mutatott az indukált akut ízületi gyulladásban szenvedő egerekben.

Az adatokat qRT-PCR-rel ellenőriztük, amely mindkét Aurora kináz 2.8–4.2-szeres ($P < 0.01$) és a többi gén 1.5–3.5-szeres upregulációját mutatta. 5 további gén szignifikáns szuppressziót mutatott RA-s betegeknél egészséges kontroll személyekhez képest, és közülük kettő (*HDAC1* és *SETDB2*) szintén downregulált volt PGIA-s egerekben.

Vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy az alacsony dózisú MTX-tal kezelt betegekben mindkét Aurora kináz expressziója szignifikánsan csökkent volt.

Annak a kérdésnek a tisztázására, hogy mely sejttípus(ok) mutatnak módosult Aurora kináz expressziót ízületi gyulladásban, a PGIA-s egerek lépsejtjeiből T- és B-limfocitákat izoláltunk, és így az egyes limfocitátípusokon megismételve a vizsgálatot azt találtuk, hogy a T-sejtekben volt alacsonyabb az expresszió szintje. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a mononukleáris sejttípusok közül a B limfociták jelenthetik az Aurora kinázok fokozott expressziójának forrását ízületi gyulladásban. További kísérleteink azt mutatták, hogy mindkét enzim génjének expressziója szignifikánsan emelkedik a PGIA-s egerek csontvelőjében, de a nyirokcsomókban nem.

4.3.2 A hiszton H3 Aurora kinázok általi foszforilációja ízületi gyulladásban

A hiszton H3 foszforilációja kromatin kondenzációt és azt követő mitózist okoz, amely megnövekedett B-sejt aktivitást eredményezhet ízületi gyulladásos egerekben. Western blot-analízist végeztünk egér B-limfocitákból származó tisztított sejt-lizátumokkal és kináz-specifikus antitestekkel, hogy megvizsgáljuk, az Aurora kinázok fokozott expressziója egyúttal magasabb fehérje-szintet is eredményezett-e. Megállapítottuk, hogy a kináz-specifikus jelek az artritiszes egerekben erősek, míg a kontrollcsoportban szinte kimutathatatlanok voltak. Az a tény, hogy az Aurora kináz A és B szelektíven foszforilálja a H3 hisztont a 10-es szerinen, lehetővé teszi e kinázok enzimatisz aktivitásának értékelését. Megállapítottuk, hogy a 10-es szerin foszforilációs szintje legalább 7-szer magasabb volt az ízületi gyulladásban szenvedő egerekben a kontroll állatokhoz képest.

4.3.3 Az Aurora kinázok megnövekedett expressziója arthritis-specifikus, és a polyarthritis akut fázisával mutat összefüggést a RA állatmodelljeiben

Korábbi kísérleteink nem tudták tisztázni a kérdést, hogy vajon az Aurora kinázok expressziójának ezen változásai specifikusak-e az ízületi gyulladásal összefüggő limfocita-aktivációra, vagy sem. A BALB/c egér törzs nagyon fogékony a PGIA-ra és rezisztens a CIA-val szemben (megjegyzendő, hogy a CII-vel végzett immunizálás immunreakciót válthat ki ezekben az egerekben); míg a DBA/1J egér törzs érzékeny a CIA-ra és ellenálló a PGIA-val szemben. A BALB/c egerek humán PG-vel vagy CII-vel történő immunizálása után az Aurora kináz A és B expressziós szintjét qRT-PCR alkalmazásával mértük. Bár a CII első injekcióját követően mindkét Aurora kináz közepesen megnövekedett expressziós arányát tapasztaltuk, a későbbi immunizációk már nem változtatták meg az expresszió szintjeit, amelyek a hetedik hétre egymás után visszatértek az alapszintre. Az expressziós mintázat jelentősen különbözött a PG immunizálás esetén, amely az Aurora kináz expressziójának fokozatos növekedését váltotta ki. Az expressziós szintek az ízületi gyulladás kezdetén voltak a legmagasabbak.

A CIA modell DBA/1J egerekben megerősítette az Aurora kináz ezen expressziós mintázatát. Ahogy az egereknél fokozódtak a CIA tünetei, ezzel párhuzamosan mindkét Aurora kináz transzkriptum-szintje fokozatosan emelkedett.

Végül kipróbáltuk, hogy a PG immunizálás képes-e stimulálni az Aurora kinázok expresszióját PGIA- és CIA-rezisztens DBA/2 egerekben. Annak ellenére, hogy az expresszió enyhe növekedését észleltünk, ez szignifikánsan alacsonyabb volt, mint ami a PG-vel, vagy CII-vel immunizált BALB/c egereknél volt detektálható.

Összességében az Aurora kinázok expressziójának folyamatos növekedését tapasztaltuk az ízületi gyulladás megjelenéséig, vagy közvetlenül az ízületi gyulladás megjelenése előtti időpontig, amikor a csúcsexpressziót észleltük. A betegség krónikus fázisában azonban az expresszió alapszintre csökkent.

4.3.4 PGIA-s egerek profilaktikus és terápiás kezelése az Aurora kináz inhibitor VX-680-nal

A VX-680 mindkét Aurora kináz specifikus gátlója, amely - poliploiditást okozva - végül apoptotikus sejthalálhoz vezet.

A VX-680 hatását először az artritises BALB/c egerekből izolált lépsejtkultúrán vizsgáltuk. 300 μ M VX-680 az apoptózist elősegítő p53 transzkripció faktor és a Puma gén megnövekedett expresszióját okozta, melyhez a lépsejtek csökkent életképessége társult.

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a VX-680 vajon képes-e megakadályozni az ízületi gyulladás kialakulását PGIA egerekben. 6-7 nappal az ízületi gyulladás várható megjelenése előtt kezdtük beadni a VX-680-at, és a kísérlet végéig folytattuk a kezelést. A qRT-PCR és a hiszton foszforilációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a VX-680 kezelés csökkentette mind a két Aurora kináz expresszióját, és azok aktivitását is. Az össz B-sejtszám (CD19 +) is szignifikánsan csökkent a kezelt állatokban ($49.2 \pm 1.3\%$ -ról $38.4 \pm 2.8\%$ -ra; $P=0.0044$).

A PGIA-szel szembeni terápiás potenciál értékeléséhez megkezdtük a VX-680 (vagy vivőanyag, mint placebo) beadását az ízületi gyulladás első jeleit követően, amit minden másnap folytattuk a kísérlet végéig. A perifériás ízületek duzzanata szignifikánsan csökkent a VX-680-nal kezelt állatokban a kontroll csoporthoz képest. A vizsgálataink igazolták az Aurora kináz gének downregulációját, ezzel párhuzamosan a hiszton szubsztrátok csökkent foszforilációját.

A terápiás kezelés végén (11. nap) megnövekedett számú aktív kaszpáz 3+ B-limfocitát detektáltunk, ami arra utal, hogy a VX-680 apoptotikus eseményeket indukált a B-sejtekben. Összességében az apoptotikus CD19+ sejtek száma $4.66 \pm 1.88\%$ -ról $28.57 \pm 3.5\%$ -ra ($P=0.00048$) nőtt, és a B-sejtek abszolút száma 30% -kal kisebb volt a VX-680-tal kezelt állatokban ($47 \pm 5.4\%$) a kontrollcsoportéhoz képest ($76.9 \pm 2.2\%$) ($P=0.0068$). Az intracelluláris aktív kaszpáz 3+ B limfociták (de nem a T-sejtek) aránya megemelkedett a VX-680-tal kezelt egerek lépében. Kimutattuk a B-sejtek számának csökkenését (mind a B1 [IgM magas/IgD alacsony], mind a B2 [IgD magas/IgM alacsony] alcsoportokban) a lépben és a csontvelőben, de a nyirokcsomókban nem. A CD19+CD138+ B sejtek (antitestet szekretáló plazmablasztok és plazmasejtek) aránya azonban nem csökkent.

5 MEGBESZÉLÉS

5.1 1. vizsgálat: RA-re hajlamosító gének jelentőségének vizsgálata emberekben és megfelelő állatmodellekben

Az állatmodellek óriási jelentőséggel bírnak a RA etiopatogenezisének és kezelésének tanulmányozása szempontjából, így érthető, hogy sok típusuk van, azonban tudatában kell lennünk a köztük lévő különbségeknek. Genetikai és klinikai szempontból a PGIA és CIA hasonlít leginkább a RA-re. A PGIA-ban jellemző a RF és ACPA pozitivitás, ami miatt a szeropozitív RA modelljének tekinthető, míg a CIA egy szeronegatív RA modell. Ahhoz, hogy kísérleteinkhez létrehozzuk a megfelelő kongenikus és szubkongenikus törzseket, MHC-illesztett, arthritisre fogékony és arthritisszel szemben ellenálló egereket használtunk, hogy az MHC domináns hatását kiküszöböljük.

A 3-as egérokromoszómán található *Pgia26/Cia5/mCia21/Eae3* (az emberi 1-es kromoszómán lévő *PTPN22/CD2*-nek felel meg) és a 2-es egérokromoszómán található *Pgia2/Cia2/Cia3* lokusz (az emberi 9-es kromoszómán lévő *TRAF1/C5*-nek felel meg) részletes vizsgálata során sikerült néhány génmutációt azonosítani, melyek egy részét korábban nem hozták kapcsolatba arthritisszel. Azonban nem csupán a genomi egyezés, hanem a megegyező funkcionális hiba azonosítására is szükség van ahhoz, hogy ezen géneknek a RA kialakulásában betöltött szerepét megerősíthessük.

Munkánkat nagy teljesítményű szekvenciaanalízissel folytattuk, szem előtt tartva, hogy a miénk csak egyetlen a számos lehetséges mód közül, mely lehetővé teszi a RA-hez társuló genetikai eltérések azonosítását.

5.2 2. vizsgálat: RA-s betegek vaszkuláris kórfolyamataihoz társuló génexpressziós mintázat tanulmányozása

Ismert, hogy a RA akcelerált atherosclerosissal, valamint megnövekedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással jár. HLA és nem-HLA gének egyaránt állhatnak a RA-re és az atherosclerosisra való hajlam hátterében, valamint a közös genetikai rizikótényezők szerepe is felmerült a két kórkép esetében. Bár egyes SNP-eket *-HLA-DRB1* és nem HLA - találtak a RA-előidézte atherosclerosis hátterében, korábban egyetlen komplex genomikai study sem vizsgálta a RA kardiovaszkuláris kórfolyamatait. Úgyszintén nem

vizsgálták az anti-TNF kezelés vaszkuláris funkciókra gyakorolt hatását RA-ben. Ezért folytattunk egy pilot study-t, melyben klinikai adatokat, vaszkuláris kórfolyamatokat vetettünk össze a génexpressziós mintázattal.

Eltérő regulációs mintázatot találtunk mind a vaszkuláris patológiával, mind pedig a TNF-gátlókra adott klinikai és vaszkuláris válasszal összefüggésben. Korábban több - HLA-t, proinflammatorikus cytokineket, autoimmunitáshoz és gyulladásához kapcsolódó molekulákat kódoló géneket érintő- SNP-t azonosítottak a RA-előidézte atherosclerosis hátterében, saját tanulmányunk is hasonló eredményt hozott. Korábban viszont nem történt komplex genomikai vagy genetikai vizsgálat biológiai terápiában részesülő betegeken, melyhez eredményeinket hasonlíthattuk volna.

Kóros (alacsony) FMD-vel rendelkező betegek esetében néhány, kóros (magas) IMT-jű betegek esetében több gén mutatott eltérő expressziós mintázatot. A ≥ 2 x-es változást tekintettük szignifikánsnak. Kóros (alacsony) PWV-jű betegek esetében 1 gén szignifikáns up- és 1 gén szignifikáns down-regulációját találtuk. Az eltérő expressziós mintázatú gének főként MHC-asszociáltak voltak, de akadtak köztük cytokin, adhézións molekula, integrin és interferon gének is.

Vizsgálatunk 2. részében 19 RA-s beteg részesült TNF-gátló kezelésben (ETN vagy CZP) 1 éven át. 13 mutatott klinikai javulást az év elteltével, de közülük csak 10 beteg esetében volt összhangban a klinikai és bármilyen vaszkuláris válasz. A klinikai válasz mindössze 5 gén up-regulációjával volt összefüggésben. Néhány gén eltérő expressziója volt megfigyelhető az IMT-reszponderekben, de nagyon kevés gén korrelált az anti-TNF terápiára adott FMD, PWV vagy GVR válasszal. Itt az eltérő expressziós mintázat főként az immunoglobulin és HLA gének esetében volt megfigyelhető, az egyéb érintett gének között voltak cytokin, chemokin és interferon gének.

Vizsgálatunk első részében 2 vanin gén (*VNN1*, *VNN2*) is eltérő expressziót mutatott. Ezek szerepe korábban felmerült bizonyos autoimmun betegségek és atherosclerosis hátterében álló vaszkuláris folyamatok és fibrosis esetén, de a RA patogenezisében betöltött szerepük ismeretlen.

Számos interferon gén (pl. *IFI44*, *IFIT1*, *IFITM3*, *IRF5*) mutatott eltérő expressziós mintázatot vizsgálatunk mindkét részében. Közülük az *IRF5* kapcsolata ismert a RA kardiovaszkuláris szövődményeivel.

A neurofilament könnyű lánc (*NEFL*) gén szignifikáns korrelációt mutatott az FMD, IMT, PWV és GVR válaszokkal. A neurofilament fehérjék kapcsolata az SLE idegrendszeri manifesztációival ismert, ezenkívül a RA-s synovialis cytoskeletonban is kimutathatók.

A leucinban gazdag ismétlődő neuronális fehérje 3 (*LRRN3*) génexpressziója eltérő volt kóros IMT-vel és PWV-vel rendelkező RA-soknál. A leucinban gazdag ismétlődő kinázoknak (*LRRK*) az öregedésben, illetve különféle megbetegedésekben (RA, egyéb arthritisek, neuroinflammáció) van szerepük.

A protoonkogén *JUN* gén eltérő expresszióját észleltük FMD-20% és PWV-20% válasznál. A Jun, c-Jun N-terminális kináz (*JNK*) és a RA, illetve atherosclerosis patogenezise közti kapcsolat régóta ismert.

Az itt felsoroltak csak néhány példát szolgáltatnak arra, hogy bemutassák az eltérő expressziójú gének RA-ben és egyéb autoimmun betegségekben betöltött szerepét.

5.3 3. vizsgálat: Az epigenomot befolyásoló faktorok, különösen az Aurora kináz A és B expressziójának vizsgálata arthritises egerek és RA betegek immunsejtjeiben

A RA vonatkozásában végzett korábbi epigenetikai vizsgálatok nagy részét synovialis fibroblastokon végezték. Ezen vizsgálatok megállapították, hogy DNS-hipometiláció és bizonyos hisztonmódosítók megnövekedett expressziója jellemzi ezeket az aktivált synovialis sejteket. Ezek a hisztonmódosítók fokozzák a proinflammatorikus citokinek termelését, valamint serkentik az immunkompetens sejtek bejutását a synoviumba. Tanulmányunkban az arthritis-specifikus expressziós változásokat vizsgáltuk indukált ízületi gyulladásban szenvedő egerekből és RA betegekből izolált mononukleáris sejtekben. 14 olyan gént találtunk, melyek expressziója szignifikánsan növekedett, vagy csökkent az összes vizsgált RA beteg esetében.

Először azonosítottuk az összes olyan kromatin módosító enzimsaládot, amelyek szerepet játszhatnak az autoimmun ízületi gyulladásban. Ide tartoznak a hiszton kinázok (*AURKA*, *AURKB* és *NEK6*), acetiltranszferázok (*ESCO2* és *KAT2B*), deacetilázok (*HDAC1* és *HDAC11*), metiltranszferázok (*SETD6*, *SETDB2* és *PRMT6*), demetilázok (*KDM5C* és *KDM6-B*) és a proteindegradációt elősegítő ubiquitin ligázok (*DZIP3* és *UBE2B*). Ezek közül számos gén rendelkezik olyan enzimtermékekkel, amelyek olyan aktiváló vagy represszáló funkcióval rendelkeznek, mellyel képesek modulálni az NF- κ B transzkripció faktor aktivitását. Mivel ismert, hogy a RA-t számos NF- κ B által regulált proinflammatorikus citokin szabályozza, ezért reálisan merült fel ezen gének szerepe RA-ben. Például a H3-P fontos epigenetikus szignál az NF- κ B számos citokin gén promóteréhez történő rekrutálása

szempontjából. A *SETD6*, amely az NF- κ B útvonal ismert negatív szabályozója, az ízületi gyulladásban down-regulált. A *SETD6*-nak az ízületi gyulladás patogenezisében játszott jelentőségét támasztja alá az a tény, hogy kölcsönhatásba léphet a NEK6-tal és az Aurora kinázokkal, amelyeket ízületi gyulladást elősegítő génekként azonosítottunk. Más gének, mint a *HDAC11* és a *KDM6B*, másképpen befolyásolhatják a gyulladásos útvonalakat. A *HDAC11* fokozott expressziója elnyomja a gyulladásgátló IL-10-et, erősítve az antigén-prezentációt, ezáltal jelentős szerepet játszik az autoimmunitás kialakulásában. A *KDM6B* eliminálja az erős represszív epigenetikus transzkripció jeleket (azaz a hiszton H3 K27 tri-metilációt), fokozott expressziója a makrofág aktivációban játszik szerepet.

Bár az összes fent említett enzimet elsősorban hisztonmódosítónak tekintik, számos tanulmány szerint más intracelluláris fehérjéket is megcélozhatnak. Például a NEK6 képes foszforilálni a STAT3 transzkripció faktort, amelyről ismert, hogy szerepet játszik az IL-6 citokinsalád indukciójában. Ezért a célgén azonosítása, valamint az egyes enzimek közötti komplex szabályozó hálózat feltárása feltétlenül szükséges az ízületi gyulladás epigenetikus komponenseinek teljes megértéséhez. Munkánk megtette az első lépéseket ebben az irányban. Kimutattuk - a RA különböző egérmódeljeinek alkalmazásával -, hogy az Aurora kinázok fokozott expressziója nem része a limfociták fiziológus aktivációjának és differenciálódásának, hanem kifejezetten specifikus az ízületi gyulladásra. Noha az egerek T-sejtjeiben és B-sejtjeiben egyaránt megnövekedett az Aurora kinázok expressziója, a B sejtekben körülbelül kétszer akkora expressziót észleltünk, ami arra utal, hogy a patológus mértékben fokozott Aurora kináz expresszió a B sejtekre jellemző. Az Aurora kinázok a hiszton H3 foszforilációjával fokozzák a B-sejtek aktivitását az ízületi gyulladásban szenvedő egerekben. Az Aurora kináz A és B expressziós szintje az immunizálást követően az ízületi gyulladás kezdetéig fokozatosan emelkedett, akkor érte el a csúcspontját, mely értéken átmenetileg platózott, majd csökkenni kezdett. Egyes NF- κ B által kontrollált gének szabályozásában való részvételük miatt észszerű az a feltételezés, hogy az Aurora kinázok jelentős szerepet játszhatnak az ízületi gyulladás patogenezisében.

A specifikus Aurora kináz inhibitorral, a VX-680-nal végzett profilaktikus kezelés késleltette az arthritis kifejlődésének kezdetét, a terápiás alkalmazás pedig jelentősen csökkentette az ízületi gyulladás súlyosságát. Bizonyítani tudtuk, hogy a VX-680 kezelés elősegítette a B-sejtek eliminációját a B-sejtek apoptózisának indukciójával. Az autoantitestek szintjének jelentős csökkenését nem figyeltük meg a B-sejtek apoptózisával összefüggésben, valószínűleg azért, mert az autoantitestek felezési ideje hosszú. Ezen hipotézis bizonyításához azonban lényegesen hosszabb kezelési periódusra, vagy a VX-680-nal kezelt B-sejtek adaptív

transzferére lenne szükség immunglobulin deficiens egerekbe, ami messze meghaladta tanulmányunk kereteit. Az anti-CD20 kezelés eredményessége az anti-TNF terápiára rezisztens RA-ben ugyancsak hangsúlyozza eredményeink jelentőségét.

Noha az Aurora kinázok kétszeres up-regulációját detektáltuk az egér T-sejtekben, a VX-680 kezelés nem vezetett jelentős T-sejt apoptózishoz. Feltételezhetőek további anti-apoptotikus faktorok, amelyek kivédik a VX-680 hatását az aktivált T-sejtekben.

A kezeletlen RA betegek mononukleáris sejtjeiben magas Aurora kináz expressziót figyeltünk meg, amely az MTX kezelést követően csökkent. Az a tény, hogy mind az alacsony dózisú MTX, mind a VX-680 csökkentette az Aurora kinázok expresszióját, arra mutat rá, hogy ezek a kinázok ígéretes farmakológiai célpontot jelenthetnek RA-ben.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A RA legfőbb jellemzője a krónikus synovitis, mely az ízület károsodását, ezáltal pedig fájdalmat, rokkantságot és az életminőség romlását idézheti elő. Ráadásként akcelerált atherosclerosis is társul hozzá, mely a RA-s betegek többlethalálózásának legfőbb oka. Genetika, környezeti tényezők és autoimmunitás a RA patogenezisének résztvevői; de egyre több bizonyíték támasztja alá az epigenetikai tényezők szerepét. Bár ez egy rendkívül fontos és alaposan tanulmányozott tudományterület, a RA etiopatogenezisének számos aspektusa még tisztázásra vár. A betegség gyakorisága és az általa jelentett teherterhelés miatt nagy szükség van a hatékony kezelésre, és még mindig óriási az igény az új terápiás lehetőségekre.

Jelen értekezés 3 vizsgálat eredményeit foglalja össze, melyek a RA hátterét és kezelését vizsgálták. Emberekben és állatmodellekben tanulmányoztunk RA rizikógéneket (1. vizsgálat). RA-s betegek vaszkuláris patofiziológiájának génexpressziós hátterét vizsgáltuk (2. vizsgálat). Arthritisszel összefüggő epigenetikus faktorokat és a célzott gátlásukban rejlő terápiás lehetőségeket elemeztük (3. vizsgálat).

Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

1. vizsgálat

A 3-as egérokromoszómán lévő *Pgia26* (az emberi 1-es kromoszómán lévő *PTPN22/CD2*-nek felel meg) és a 2-es egérokromoszómán lévő *Pgia2* lokusz (az emberi 9-es kromoszómán lévő *TRAF1/C5*-nek felel meg) részletes vizsgálata során sikerült néhány rizikógént azonosítani, melyek arthritissel való kapcsolata addig nem minden esetben volt ismert.

2. vizsgálat

Elsőként végeztük RA-hez társuló kardiovaszkuláris betegségek, valamint a TNF- α gátlókra adott klinikai és vaszkuláris válasz komplex genomikai vizsgálatát. MHC-, valamint citokin-, adhéziós molekula, integrin- és interferongének mutattak eltérő expresziós mintázatot a vaszkuláris patofiziológiával összefüggésben. A TNF- α gátlókra adott klinikai és vaszkuláris válasszal összefüggésben elsősorban az immunoglobulin- és HLA-gének esetén volt észlelhető eltérő expresziós mintázat, de citokin-, chemokin- és interferongének is voltak az érintettek között.

3. vizsgálat

Elsőként azonosítottuk az összes kromatin módosító enzimcsaládot, mely összefüggésbe hozható autoimmun arthritisszel. Ezek közül az Aurora kináz A és B a legismertebb, ezért ezeket választottuk ki további vizsgálatok céljára. Az Aurora kinázok fokozott expressziója arthritis specifikusnak bizonyult. A VX-680-nal végzett preventív kezelés sikeresen késleltette az arthritis kialakulását, míg a terápiás alkalmazás jelentősen csökkentette annak súlyosságát. Mindez azt engedi sejteni, hogy ez a reumatológiai gyógyszerfejlesztés egy ígéretes új iránya lehet.

7 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, EREDMÉNYEK ÉS KLINIKAI JELENTŐSÉG

Jelen tézis 3 vizsgálat eredményeit foglalja össze, melyekben a rheumatoid arthritis etiopatogenezisét és egy ígéretes kezelési lehetőséget vizsgáltunk.

A klinikai jelentőség és az új megállapítások az alábbiakban következnek:

1. vizsgálat

Olyan kongenikus és szubkongenikus törzseket hoztunk létre, melyek lehetővé teszik a 3-as egérekromoszómán található *Pgia26* (az emberi 1-es kromoszómán lévő *PTPN22/CD2*-nek felel meg) és a 2-es egérekromoszómán található *Pgia2* (az emberi 9-es kromoszómán lévő *TRAF1/C5*-nek felel meg) lokusz részletes vizsgálatát. Ennek révén sikerült néhány olyan génmutációt azonosítani, melyek arthritissel való kapcsolata korábban nem volt ismert. Állatmodellek további vizsgálatával lehetőség nyílt az újonnan azonosított génmutációk funkcionális vizsgálatára, mely hosszabb távon az emberi kórfolyamat jobb megismeréséhez vezethet.

2. vizsgálat

Lefolytattuk az első olyan komplex genomikus vizsgálatot, mely a RA-hez társuló kardiovaszkuláris kórfolyamatokra, valamint az anti-TNF kezelésre adott klinikai és vaszkuláris válaszra fókuszált. Vizsgálatunk MHC, citokin, adhézións molekula, integrin és interferon gének esetén igazolt a vaszkuláris patológiával összefüggésbe hozható eltérő expressziós mintázatot. A TNF-gátlókra adott válasszal összefüggésben immunoglobulin, HLA, citokin, chemokin és interferon gének megváltozott expressziója volt észlelhető. A vizsgálatokat folytatva lehetővé válik az RA-asszociált atherosclerosis hátterének, valamint a TNF-inhibitorok hatásmechanizmusának jobb megértése.

3. vizsgálat

- Elsőként azonosítottuk az összes kromatin módosító enzimesaládot, mely összefüggésbe hozható autoimmun arthritisszel. Ezek legtöbbjét már vizsgálták karcinogenezissel összefüggésben, azonban az arthritis patogenezisében való jelentőségük új, korábban sosem vizsgálták.
- Bebizonyítottuk, hogy az Aurora kináz inhibitor VX-680 alkalmazásával kedvezőbbé válik a PGIA kimenetele, emiatt ez egy ígéretes új jelöltje lehet a reumatológiai gyógyszerfejlesztésnek.

8 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACPA	ciklikus citrullinált protein elleni antitest (anticyclic citrullinated peptide antibody)
ACR	American College of Rheumatology
Aurka	Aurora kináz A
Aurkb	Aurora kináz B
CIA	kollagén-indukált arthritis (collagen-induced arthritis)
CII	humán II típusú kollagén (human type II collagen)
cNR	klinikai nonresponder (clinical non-responder)
cR	klinikai reszponder (clinical responder)
csDMARD	konvencionális, szintetikus betegségmódosító szer (conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drug)
CZP	certolizumab pegol
DAS28	Disease Activity Score 28 (rheumatoid arthritis betegségaktivitási index)
DDA	dimetil-dioktadecil-ammónium-bromid
DMEM	Dulbecco féle módosított Eagle-medium
DMSO	dimetil-szulfoxid
ETN	etanercept
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology (Európai Reumatológiai Társaságok Szövetsége)
FBS	magzati szarvasmarha-szérum (fetal bovine serum)
FMD	áramlás-mediált vazodilatáció (flow-mediated vasodilation)
FSC	előre irányuló szórás (forward scatter)
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	génontológia
GVR	jó vaszkuláris reszponder (Good Vascular Responder)
GWAS	teljes genom asszociációs vizsgálat (genome-wide association study)
H.H3	hiszton H3
HLA	humán leukocytá antigén
Ig	immunglobulin
IMT	intima-media vastagság (intima-media thickness)
IVSC	intervallum-specifikus kongenikus

mAb	monoklonális antitest
MHC-II	II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
MTX	methotrexát
NCI	National Cancer Institute
NMD	nitrát-mediált vazodilatáció (nitrate-mediated vasodilation)
NSAID	nem szteroid gyulladáscsökkentő (non-steroidal anti-inflammatory drug)
PAGE	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	foszfát-pufferolt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCA	főkomponens-analízis (principal component analysis)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PG	proteoglikán
PGIA	proteoglikán-indukált arthritis
PTPN22	nem receptor típusú protein-tirozinfoszfataz 22
PWV	pulzushullám terjedési sebesség (pulse-wave velocity)
RA	rheumatoid arthritis
RF	rheumatoid faktor
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction)
QTL	mennyiségi jelleget meghatározó lokusz (quantitative trait locus)
SE	shared-epitóp
SEM	az átlag standard hibája (standard error of mean)
SF	synovialis folyadék
SNP	egypontos nukleotid-polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
SSC	oldalirányú szórás (side scatter)
SSLP	szekvencia hosszúság polimorfizmus (single sequence length polymorphism)
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
TRAF1	TNF-receptor asszociált faktor 1
tsDMARD	célzott szintetikus betegségmódosító szer (targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drug)
vNR	vaszkuláris nonresponder
vR	vaszkuláris responder

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni mély és őszinte hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Szekanecz Zoltánnak a PhD időszaka során nyújtott állandó támogatásért, útmutatásért, bátorításért és türelemért. Tudása és mentalitása inspirált, hogy én is reumatológussá váljak.

Őszintén hálás vagyok mentoromnak, Prof. Dr. Glant T. Tibornak, amiért lehetőséget adott, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassam és rengeteget tanulhassak tőle.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Mikecz Katalinnak a rengeteg segítséget, melyet a Chicagóban töltött idő alatt és azóta kaptam tőle.

Nagyon hálás vagyok Dr. Rauch A. Tibornak a támogatásáért és barátságáért.

A jelen tézisben bemutatott munka nem lett volna lehetséges társszerzőim, valamint a Debreceni Egyetemen és a Rush University Medical Centerben (Chicago, IL) dolgozó egykori kollégáim nélkül; szeretném ezt valamennyiüknek megköszönni.

Hálával tartozom a vizsgálatokban résztvevő betegeknek.

Nagyra értékelem a kísérleteinkben résztvevő egerek áldozatát.

Örökké hálás leszek családomnak: a szüleimnek, amiért egyszerre óvtak és bátorítottak, valamint példát mutattak; a húgomnak, amiért mindig velem volt, amikor szükségem volt rá; a férjemnek, aki a kutatásban is társam volt; kisfiamnak, akinek szeretete mindenben átsegít.



Nyilvántartási szám: DEENK/241/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Besenyei Tímea
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047984

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Pólska, S., **Besenyei, T.**, Végh, E., Hamar, A. B., Pusztai, A., Váncsa, A., Bodnár, N., Szamosi, S., Csumita, M., Kerekes, G., Szabó, Z., Nagy, Z., Szűcs, G., Szántó, S., Zahuczky, G., Nagy, L., Szekanecz, Z.: Gene expression analysis of vascular pathophysiology related to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis.
Arthritis Res. Ther. 21 (1), 94, 2019.
IF: 4.103
2. Glant, T. T., **Besenyei, T.**, Kádár, A., Kurkó, J. E., Tryniszewska, B., Gál, J., Soós, G., Szekanecz, Z., Hoffmann, G., Block, J. A., Katz, R. S., Mikecz, K., Rauch, T. A.: Differentially expressed epigenome modifiers, including aurora kinases A and B, in immune cells in rheumatoid arthritis in humans and mouse models.
Arthritis Rheum. 65 (7), 1725-1735, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.37986>
IF: 7.871
3. **Besenyei, T.**, Kádár, A., Tryniszewska, B., Kurkó, J. E., Rauch, T. A., Glant, T. T., Mikecz, K., Szekanecz, Z.: Non-MHC Risk Alleles in Rheumatoid Arthritis and in the Syntenic Chromosome Regions of Corresponding Animal Models.
Clin. Dev. Immunol. 2012, 1-14, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/284751>
IF: 3.064



Az 1. közleménynél Pólska Szilárd és Besenyei Tímea megosztott első szerzők.



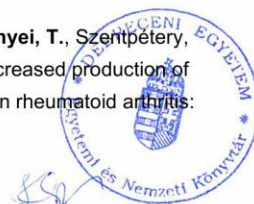
További közlemények

4. Soós, B., Kurkó, J. E., **Besenyei, T.**, Szabó, Z., Szántó, S., Meskó, B., Pólska, S., Nagy, L., Laki, J., Glant, T., Mikecz, K., Szekanecz, Z.: A rheumatoid arthritis genetikája és genomikája: I. patogenetikai vonatkozások.
Magyar Reumatol. 54 (1), 7-17, 2013.
5. Kurkó, J. E., **Besenyei, T.**, Laki, J., Glant, T. T., Mikecz, K., Szekanecz, Z.: Genetics of Rheumatoid Arthritis: a Comprehensive Review.
Clin. Rev. Allergy Immunol. 45 (2), 170-179, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-012-8346-7>
IF: 4.728
6. Szekanecz, Z., Meskó, B., Pólska, S., Váncsa, A., Szamosi, S., Végh, E., Simkovics, E., Laki, J., Kurkó, J. E., **Besenyei, T.**, Mikecz, K., Glant, T. T., Nagy, L.: Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology.
Immunol. Res. 56 (2-3), 325-333, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-013-8405-z>
IF: 3.525
7. Glant, T. T., Adarichev, V. A., Boldizsár, F., **Besenyei, T.**, László, A., Mikecz, K., Rauch, T. A.: Disease-promoting and -protective genomic loci on mouse chromosomes 3 and 19 control the incidence and severity of autoimmune arthritis.
Genes Immun. 13 (4), 336-345, 2012.
IF: 3.675
8. Egelston, C., Kurkó, J. E., **Besenyei, T.**, Tryniszewska, B., Rauch, T. A., Glant, T. T., Mikecz, K.: Suppression of dendritic cell maturation and T cell proliferation by synovial fluid myeloid cells from mice with autoimmune arthritis.
Arthritis Rheum. 64 (10), 3179-3188, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.34494>
IF: 7.477
9. Szekanecz, Z., **Besenyei, T.**, Paragh, G., Koch, A. E.: Actualités sur l'angiogenèse synoviale.
Revue du Rhumatisme. 77 (1), 14-20, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rhum.2009.11.014>
10. Szekanecz, Z., **Besenyei, T.**, Szentpétery, Á., Koch, A. E.: Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis.
Curr. Opin. Rheumatol. 22 (3), 299-306, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e328337c95a>
IF: 4.497





11. Szekanecz, Z., **Besenyei, T.**, Paragh, G., Koch, A. E.: New insights in synovial angiogenesis.
Joint Bone Spine. 77 (1), 13-19, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.05.011>
IF: 2.46
12. Szekanecz, Z., **Besenyei, T.**, Paragh, G., Koch, A. E.: Angiogenesis in rheumatoid arthritis.
Autoimmunity. 42 (7), 563-573, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/08916930903143083>
IF: 2.813
13. Szekanecz, Z., Pákozdi, A., Szentpétery, Á., **Besenyei, T.**, Koch, A. E.: Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis.
Front. Biosci. (Elite Ed). 1, 44-51, 2009.
14. Pákozdi, A., **Besenyei, T.**, Paragh, G., Koch, A. E., Szekanecz, Z.: Endothelial progenitor cells in arthritis-associated vasculogenesis and atherosclerosis.
Joint Bone Spine. 76 (6), 581-583, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.04.007>
IF: 2.25
15. **Besenyei, T.**, Pákozdi, A., Végvári, A., Szabó, Z., Szekanecz, Z.: Az endothelsejtek, a leukocytamigráció, a kemokinek és az angiogenezis jelentősége a gyulladásos reumatológiai kórképekben.
Magyar Immunol. 7 (1-2), 4-21, 2008.
16. Szekanecz, Z., Kerekes, G., Dér, H., Sándor, Z., Szabó, Z., Végvári, A., Simkovics, E., Soós, L., Szentpétery, Á., **Besenyei, T.**, Szűcs, G., Szántó, S., Tamási, L., Szegedi, G., Shoenfeld, Y., Soltész, P.: Accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1108, 349-358, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1422.036>
IF: 1.731
17. Simkovics, E., **Besenyei, T.**, Szabó, Z., Szentpétery, Á., Szodoray, P., Szűcs, G., Szántó, S., Szekanecz, Z.: Első hazai tapasztalat a rheumatoid arthritis rituximabkezelésével: egy polirezisztens beteg esete.
Magyar Immun. 6 (3), 42-47, 2007.
18. Szekanecz, É., Sándor, Z., Antal-Szalmás, P., Soós, L., Lakos, G., **Besenyei, T.**, Szentpétery, Á., Simkovics, E., Szántó, J., Kiss, E., Koch, A. E., Szekanecz, Z.: Increased production of the soluble tumor-associated antigens CA19-9, CA125, and CA15-3 in rheumatoid arthritis: potential adhesion molecules in synovial inflammation?
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1108, 359-371, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1422.037>
IF: 1.731





19. Szántó, S., Szűcs, G., Szamosi, S., **Besenyi, T.**, Szentpétery, Á., Szekanecz, Z.: Rheumatoid arthritises betegek adalimumab kezelésével szerzett kezdeti tapasztalataink.
Magyar Reumatol. 48, 98-104, 2007.
20. **Besenyi, T.**: A reumatológiában alkalmazott biológiai terápia nemkívánatos következményei és a megelőzés lehetőségei.
Magyar Reumatol. 45 (1), 23-28, 2004.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 49,925

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
15,038**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.05.04.

