

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

SJÖGREN-SZINDRÓMÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ GENETIKAI
FAKTOROK VIZSGÁLATA

MÁRKA MARIETTA

Témavezető: Dr. Semsei Imre

Programvezető: Prof. Dr. Szegedi Gyula

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum

III. sz. Belgyógyászati Klinika

Molekuláris Biológiai Kutató Laboratórium

Debrecen, 2005

BEVEZETÉS

Az autoimmun folyamatok során az immunrendszer elveszíti a toleráns viselkedését a saját molekulákkal szemben. A tolerancia elvesztésének okai lehetnek centrálisak (thymus) és perifériásak (az autoreaktív limfociták abnormális szelekciójának vagy szabályozásának eredménye). Az autoimmun betegségek patogenetikai láncolatában nagy jelentőséget tulajdonítanak az autoantigének szerkezeti, strukturális változásainak és ezek perzisztációjának.

A Sjögren-szindróma (Ss) a poliszisztémás autoimmun betegségek közé tartozik, mely elsődlegesen az exokrin mirigyekben jut kifejeződésre, szem-és szájszárazságban nyilvánul meg. A betegség ezen két jellegzetessége, a keratoconjunctivitis sicca illetve a xerostomia a könny-és nyálmirigyek destrukciójának és csökkent szekréciójának a következménye. A könny-és nyálmirigyekben egy progresszív limfocitás infiltráció figyelhető meg, mely az acináris és duktális epithéliális sejtek leépüléséhez és a mirigyparenchima elvesztéséhez vezet. A Ss betegek szérumában nagy gyakorisággal jelennek meg ribonukleoprotein elleni antitestek (antiRo/SSA, antiLa/SSB). A Ss B-sejt hiperaktivitással és hipergammaglobulinémiával jellemezhető. A Sjögren-szindrómának primer (pSs) és szekunder formája ismert, aszerint, hogy társul-e a betegséghez valamilyen más szisztémás autoimmun betegség vagy sem. Néhány citokin, mint például az interleukin-1 (IL-1 β), IL-6, IL-10, tumor nekrosis faktor- α , interferon- γ és néhány autoantitest is szerepet játszhat e betegség kialakulásában.

Az Ro/SSA és La/SSB autoantigének ellen termelődő antitesteknek nemcsak az autoimmun betegségek diagnosztikájában, hanem ezen betegségek patomechanizmusában is szerepük van. Emellett egyéb faktorok, mint ahogy az ultraibolya sugárzás (UV) és a hormonális tényezők is jól ismert kofaktorai a betegségeknek. Az antiRo/SSA és az antiLa/SSB a Sjögren-szindróma jellegzetes autoantitestjei, de előfordulnak szisztémás lupus

erythematosusban (SLE) és egyéb autoimmun betegségben is. Míg a Ro/SSA több autoimmun betegségben is kimutatható (SLE, SCLE, Ss/SLE, NLE), addig az La/SSB Ss-ben és SLE-ben található meg. A Ro/SSA esetében három gént azonosítottak, melyek 60, 46 és 52 kDa méretű antigéneket kódolnak. A 46 kDa méretű Ro protein elsősorban az endoplazmatikus retikulumban található meg, a másik két Ro antigén intracitoplazmatikusan és a sejtmagban helyezkedik el. UVB-re, illetve ösztrogén kezelés és bizonyos vírusok hatására ezek a fehérjék a sejtfelszínre transzlokálódhatnak, ahol képesek megkötni a keringő Ro/SSA autoantitesteket. Az La/SSB antigén, mely elsősorban a sejtmagban lokalizálódik, részt vesz a humán YRNS osztály molekuláinak szintézisében, érésében, nukleáris exportjában. Az La/SSB mRNS-ének háromféle splicing variánsát, az exon 1-t, exon 1'-t és exon 1''-t írták le. Az exon1' variáns esetében az exon1-t egy alternatív 5' vég helyettesíti, míg az 1' és 1'' variáns között mindössze 4 nukleotid a különbség.

Munkánk során egyrészt azt vizsgáltuk, hogy transzformált humán keratinocita sejtvonalban (HaCaT) detektálható-e a háromféle Ro/SSA antigén mRNS-e, illetve az La/SSB különböző splicing variánsai. Vizsgáltuk továbbá az UVB és az ösztrogén hatását is vizsgáltuk a Ro/SSA és La/SSB antigén mRNS-ek expressziójára.

Az autoimmun betegségekben számos esetben figyeltek meg rendellenes citokin mintázatot. A proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-6, IL-15) mellett ismertek az úgynevezett regulatív citokinek, melyek részt vesznek az inflammatorikus válasz szabályozásában, például ilyen citokin az interleukin 10 (IL-10). Az IL-10 olyan pleiotrópikus citokin, melyet többféle sejt (monociták, dendritikus sejtek, T sejtek) termel. Képes gátolni a T helper 1-es típusú (Th1) sejtek citokintermelését, monociták és makrofágok TNF α , IL-1, 6, 12 termelését, az IFN γ valamint a T sejtek IL-2 szekrécióját. Az IL-10-et a Th1 sejtek és a makrofágok citokin termelésére kifejtett hatása miatt az anti-inflammatorikus citokinek csoportjába soroljuk. Emellett szabályozza a T sejt aktivációt azáltal, hogy csökkenti az MHC

II molekuláinak expresszióját az antigénprezentáló sejteken, de ugyanakkor stimuláló hatással van a B sejtekre az MHC II expressziót, a celluláris proliferációt, differenciációt indukálva. Az IL-10-et kódoló gén az 1-es kromoszómán helyezkedik el, promóter régiója több mint 4 kb hosszúságú. Számos genetikai eltérést, polimorfizmust írtak már le ezen a szakaszon. A proximális területen három SNP-t (Single Nucleotide Polymorphism) is azonosítottak: a transzkripció kezdőhelyétől számított -1082 G/A, -819 C/T és a -592 C/A pozíciókban. Ennek megfelelően háromféle haplotípus fordul elő a kaukázusi populációban: GCC, ACC és ATA. Az IL-10 termelést a -1082-es pozícióban levő G nukleotid befolyásolja. Ennek megfelelően a kaukázusi populációban magas IL-10 termeléssel jellemezhető GG és alacsony IL-10 termeléssel jellemzhető AA genotípusokat különböztethetünk meg. Az inflammatorikus és humorális immunválaszok egyensúlyának kontrollálása révén az interleukin-10 szintje kritikus tényező az immunszabályozásban. A normálistól eltérő IL-10 szintet mértek már több autoimmun betegségben, például Sjögren szindrómában, rheumatoid arthritisben, SLE-ben is.

Munkánk során vizsgáltuk az IL-10 promóterének -1082-es pozíciójában levő polimorfizmusát és a szolubilis IL-10 szinteket Sjögren szindrómás betegek és egészségesek csoportjában. Meghatároztuk a genotípus gyakoriságokat PCR-RFLP módszerrel, illetve tanulmányoztuk az IL-10 polimorfizmus és a betegség klinikai és immunológiai jellegzeteségeinek összefüggéseit is.

CÉLKITŰZÉSEK

Az antiLa/SSB és az antiRo/SSA a Sjögren-szindróma jellegzetes autoantitestjei. Míg az antiRo/SSA önmagában is előfordulhat a szérumban, addig az antiLa/SSB általában az antiRo/SSA antitest mellett jelenik meg a betegekben. A Sjögren-szindróma többnyire nőknél jelentkezik, így valószínűsíthető a női nemi hormonok hatása a betegség etiopatogenezisében. Az ösztrogén metabolizmus kóros elváltozását Ss-ben klinikai és kísérleti eredmények is alátámasztják. Kimutatták, hogy a Ro és La autoantigének kötődése keratinociták felületéhez megnő, ha a sejteket ösztradiollal kezelik. Ugyanakkor megfigyelték, hogy UVB besugárzás hatására a keratinocita sejtek felszínén Ro/SSA és La/SSB antigének jelennek meg, így a keringő antitestek a sejtfelszíni antigénekhez kötődhetnek. A kísérleteinkhez HaCaT sejteket választottunk, mivel ez a kötődés csak gyorsan osztódó, nem differenciálódott sejtekben mutatható ki, s ez a sejtvonal az erősen proliferálódó, bazális keratinociták in vitro modelljének tekinthető. A fentieknek megfelelően a következő kérdésekre kerestük a választ:

- mekkora a HaCaT sejtek Ro/SSA és La/SSB antigén mRNS alapszintje,
- van-e valamilyen hatása az UVB sugárzásnak és a 17- β -ösztradiolnak a Ro/SSA és La/SSB antigén mRNS expressziójára,
- van-e, ha igen akkor milyen összefüggés áll fenn a Ro/SSA és La/SSB autoantigén mRNS-ek expressziója és az ösztradiol illetve az UVB sugárzás betegségben játszott szerepe között?

Több betegség esetében találtak összefüggést az interleukin-10 gén polimorfizmusa és a betegség kialakulása, illetve a betegségre való fogékonyság között. Az IL-10 polimorfizmus jelentőségét hangsúlyozzák számos autoimmun betegség esetén is, így pl. autoimmun hepatitisben. Ezen betegségek mellett több malignus elváltozás is kapcsolható a különböző IL-10 genotípusokkal és IL-10 szintekkel. Az a megfigyelés, hogy a magas IL-10 termelő

képesség genetikailag kódolt, fontos tényező lehet az autoimmunitás és a malignitás tanulmányozásában.

Munkánk során az IL-10-el kapcsolatban azt kívántuk vizsgálni, hogy prognosztikai szempontból mennyire indokolt az egyes betegcsoportokon belül megkülönböztetni az irodalom szerint különböző IL-10 termelő képességgel jellemezhető genotípusokat, azaz az alacsony (AA), közepes (GA) és magas (GG) citokintermelő genotípust. A következő kérdésekre kerestük a választ vizsgálatainkkal:

- van-e összefüggés a betegségek és az IL-10 gén promóter nt -1082 polimorfizmusa között,
- van-e kapcsolat a genotípusok és a szolubilis IL-10 szintek között,
- lehet-e prognosztikai szerepe a genotípusnak, illetve az IL-10 szintnek a betegségek lefolyásában, illetve kialakulásukban?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A Ro/SSA és La/SSB autoantigének mRNS expressziójának vizsgálata

A humán keratinocita sejtek és a HaCaT sejtek teljes tápfolyadékban, CO₂ inkubátorban történő tenyésztése után 17-béta-ösztadiol kezelésben (10⁻⁸M koncentrációban) és UVB (200 J/m² dózisban) besugárzásban részesültek. A minták feldolgozására a kezelést követő 12, 24, 48 és 72 óra elteltével került sor.

A sejtekből Chomczynsky - guanidin-tiocianát-fenol alapú - módszer segítségével RNS-t izoláltunk, majd az izolált RNS-ből SuperScript II Preamplification Kit segítségével történt meg a cDNS szintézis. PCR technika alkalmazásával mértük az mRNS szinteket a különböző kezelések után.

IL-10 promóter polimorfizmus vizsgálata

135 egészséges kontroll személyt és 99 primer Sjögren-szindrómás beteget vizsgáltunk meg az IL-10 polimorfizmus tekintetében. A vizsgált személyek perifériás vérének limfocitáiból származó DNS izolálást követően az egyedi nukleotidot érintő génpolimorfizmus meghatározása az IL-10 promóter régió -1082-es nt pozíciójában PCR-RFLP módszerrel történt.

A szolubilis IL-10 szinteket, a vizsgált személyek szérumból, klasszikus szendvics ELISA módszerrel lett határozott meg.

Az IL-10 szinteket Kruskal-Wallis teszt segítségével hasonlítottuk össze, a varianciát kétmintás Student-t teszt segítségével határozottuk meg. A genotípus gyakoriságok összehasonlításánál a Yates által módosított χ^2 tesztet alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A Ro/SSA és La/SSB autoantigének mRNA expressziójának vizsgálata

Az epidermális keratinociták -főleg a bazális sejtek- az immunológiai károsodás célpontjai például a fényérzékeny SLE-ben is. A HaCaT sejtek spontán transzformálódott humán keratinociták a bazális epidermális keratinociták főbb jellegzetességeivel. Eredményeink azt mutatják, hogy a HaCaT sejtekben megtalálható a Ro/SSA antigén mindhárom mRNA formája (46, 52, 60 kDa). A 60 kDa-os forma mRNA szintje alacsonyabb volt, mint a kalretikulin (46 kDa) és az 52 kDa-os forma mRNA szintje, mely eredmény megegyezik más munkacsoport eredményeivel.

Ss betegekből származó perifériás limfocitákban már azonosították az La/SSB antigén mRNA-ének két alternatív formáját, melyek alternatív splicing révén jönnek létre. HaCaT sejtekben szintén kimutathatóak ezek az La/SSB mRNA alternatív splicing variánsok, az La/SSB exon1' és az La/SSB exon1'', mint a leggyakoribb La/SSB variáns formák. Az La/SSB exon1' mRNA szintje jelentősen alacsonyabb volt HaCaT sejtekben, mint a Ss betegek perifériás limfocitáiban.

Feltételezték, hogy a normális körülmények között a citoplazmában és a sejtmagban levő Ro/SSA és La/SSB antigének UVB hatására a sejtfelszínre orientálódnak. A tenyésztett keratinociták UVB besugárzása apoptotikus változásokat és az autoantigének sejtfelszínen való csoportosodását (clustering) indukálta, mely kisebb csoportokat (blebs) eredményez Ro/SSA antigénből, kalretikulinból, riboszómákból és endoplazmatikus retikulumból, valamint nagyobbakat Ro/SSA és La/SSB antigénekből és nukleoszómás DNS-ből. Van azonban egy másik lehetséges útja a Ro/SSA és La/SSB antigének sejtfelszínen való megjelenésének. Fiziológias UV dózis -főleg UVB- számos olyan molekula termelődését

eredményezi az epidermális keratinocitákban, melyek bőrgyulladást indíthatnak el apoptotikus változások nélkül. Számos ilyen molekula közvetlenül az UV sugárzás hatására termelődik, miután aktiválódnak a transzkripció faktorai egy oxigén-függő mechanizmusban. Lehetséges, hogy az UV sugárzás hatására a Ro/SSA és La/SSB proteinek regulátor transzkripció faktorai aktiválódnak, s ennek eredménye a fehérjék sejtfelszínen való megjelenése. Ezen molekulák szabályozó mechanizmusában bekövetkező bármiféle genetikai eltérés szerepet játszhat bizonyos autoimmun betegségek (pl: fényérzékeny SLE) kialakulásában.

Még nem bizonyított, hogy amikor a keratinocitákat sugárzás éri, a Ro/SSA proteinek kódoló összes gén vagy csak a komplex néhány tagja upregulálódik. Vizsgáltuk a háromféle Ro/SSA polipeptid mRNS expresszióját 12h, 24h, 48h, és 72h UVB besugárzás után. A fiziológiás dózis esetén szignifikánsan magasabb kalretikulin mRNS szintet detektáltunk HaCaT sejtekben 24 órás besugárzás után, de nem volt változás az 52 és 60 kDa méretű Ro/SSA mRNS szintekben. Különbség volt tapasztalható az mRNS szintekben 24h és 48h után a kontroll sejtekben is, bár a besugárzott sejtekben magasabb volt az mRNS szint, mint a kontroll sejtekben. Az eltérő kalretikulin mRNS szintek nehezen magyarázhatók, mivel a kalretikulin szintje számos különböző faktor eredménye, például hatással van rá a stressz (hősokk), perturbáció az endoplazmatikus retikulumban, a nehéz fémek stb.

A Ro/SSA és La/SSB antigének elleni autoantitestek elsősorban bizonyos autoimmun betegségben szenvedőkben termelődnek. Számos bizonyíték van arra, hogy ezen autoantitestek nemcsak diagnosztikai szerepet játszhatnak, de patológiai szerepük is lehet az autoimmun betegségekben. A legtöbb bizonyíték például az NLE-s (neonatal lupus erythematosus) és SCLE-s (szisztémás cutaneous lupus erythematosus) betegek vizsgálatából származik. NLE-ben az újszülött bőrbetegségének kialakulása az anyai IgG antiRo/SSA

antitesteknek köszönhető, ugyanakkor a szívblokk kialakulása is szoros kapcsolatban van olyan antitestek jelenlétével, melyek ugyanezen antigén ellen termelődnek.

UVB sugárzás után a Ro/SSA és La/SSB autoantigének megjelenése a normál humán keratinociták felszínén, valamint a cirkuláló antiRo/SSA és antiLa/SSB autoantitestek antigénjeikhez való kötődése komplement-mediált lízisen keresztül eredményezhet szövetkárosodást vagy antitest-dependens sejt-mediált citotoxicitást is. Eredményeink korrelálnak más kísérletek eredményeivel, azaz a kalretikulin nagy valószínűséggel kritikus komponense a Ro/SSA komplexnek, annak a komplexnek, mely a keratinociták sejtfelszínén jelenik meg UVB hatására.

A hormonális környezet, a női nemi hormonok szintén fontos szerepet játszhatnak a Ro/SSA és La/SSB asszociált betegségekben. Ugyanakkor a női dominancia számos autoimmun betegségben, például az SLE-ben, Ss-ben már bizonyított. Megfigyelték, hogy ezen betegségek aktivitása fokozódik a menstruáció és fogamzásgátló tabletták szedése alatt. Továbbá egerekben végzett kísérletek szerint az androgén kezelés késlelteti az autoimmun betegség megjelenését illetve a betegség súlyosságának mértékét csökkenti. A tenyésztett keratinociták esetén is az ösztrogén kezelés fokozott Ro/SSA és La/SSB antigén expressziót eredményezett a sejtek felszínén. Az ösztradiol kezelésből származó eredményeink azonban eltértek mások által leírt eredményektől, miszerint a 10^{-8} és 10^{-7} M 17-béta-ösztadiol indukálja mind az 52 kDa-os, mind a 60 kDa-os Ro/SSA mRNS-ek expresszióját humán keratinocitákban (mégpedig ötszörös arányban) a kezeletlen sejtekkel összehasonlítva. HaCaT sejtekben 10^{-8} M koncentrációjú ösztradiol nem okozott szignifikáns különbséget sem a kalretikulin, sem az 50, sem a 60 kDa-os Ro/SSA proteinek mRNS szintjében. Még kérdéses, hogy a HaCaT sejtek miért mutatnak eltérő viselkedést a sejttenyésztett humán keratinocitákhoz képest ösztrogén hatására, míg UVB hatására hasonlóan reagálnak.

A különböző La/SSB mRNS szinteket illetően nem tapasztaltunk változást az exon1' mRNS szintekben UVB hatására, míg ösztadiol hatására csökkent az exon1' mRNS szintje. Egy korábbi közleményben beszámoltak arról, hogy az NF-kappaB elem jelen van az exon1' variánsok regulátor helyein, így szerepet játszhat ezen mRNS-ek expressziójának szabályozásában. Az NF-kappaB elem valószínűleg aktív oxigén formák hatására aktiválódik, melyek például UV sugárzás hatására termelődnek, de különböző hormonok is szerepet játszhatnak szabályozásában.

Összefoglalva tehát, kimutattuk a háromféle Ro/SSA antigén formát és a három, alternatív splicing La/SSB variánsokat is a humán keratinocitákban. UVB sugárzás hatására a kalretikulin mRNS szintek növekedtek, míg ösztadiol kezelés hatására fokozatos csökkenést tapasztaltunk az La/SSB exon1' mRNS szintekben. Eredményeink alátámasztják azt a feltevést, miszerint a Ro/SSA és La/SSB antigének szerepet játszhatnak a különböző autoimmun betegségek patogenezisében.

IL-10 promóter polimorfizmus vizsgálata

A SNP (Single Nucleotide Polymorphism) több mint 3 millió bázispárnyi eltérést eredményez két ember genomja között még azonos populáción belül is. Ez az eltérés nem nukleotidok deléciójából, inzerciójából, duplikációjából vagy egyéb eltéréseiből származik, hanem egy adott pozícióban az egyik nukleotid helyett egy másik áll (például G helyett A). Mégis ez a legjelentősebb mértékű genetikai eltérések egyike.

Az SNP-k elhelyezkedésük szerint előfordulhatnak kódoló szakaszon kívül, ahol vagy van valamilyen hatásuk, például a gén promóter régiójában, ahol a gén működésének szabályozását befolyásolhatják, vagy előfordulhat, hogy nincs semmiféle hatásuk. Előfordulhatnak nukleotid eltérések génen belül is. Amennyiben a nukleotid eltérés

következtében nem változik meg az aminosavsorrend (szinonim változás), akkor az eltérés hatása nem jelentkezik fehérjeszinten, illetve vannak olyan SNP-ek is (non-szinonim), melyek hatása már fehérjeszinten is jelentkezik, megváltoztatva az aminosav sorrendet. Léteznek olyan aminosavváltozások is, melyek jelentős mértékben befolyásolják vagy akár teljes mértékben el is törölhetik az adott fehérje funkcióját.

A genetikai variabilitás ismerete számos probléma megoldásában nyújthat segítséget. Az SNP-k ismeretében nyomon követhetők az evolúciós változások, a természetes szelekció alakulása, mivel a legtöbb változás a fokozott rekombinációjú régiókban fordul elő. Így a fajok közötti, illetve a fajon belüli evolúciós változások is nyomon követhetők. Fontos szerepe lehet az SNP-k ismeretének a farmakológiában, mivel ismert jelenség, hogy az emberek különbözőképpen reagálnak ugyanazon gyógyszerekre, illetve fontos lehet a gyógyszerek metabolizációjában szerepet játszó gének SNP-éinek ismerete is a gyógyszerek hatásmechanizmusának feltérképezése szempontjából.

Az SNP-k egyik legismertebb kérdésköre azonban a betegségre való fogékonyság, a szuszeptibilitás. Számos közlemény bizonyítja, hogy egyes nukleotid polimorfizmusok összefüggésbe hozhatók a betegségek kialakulásával, mivel egyes nukleotidok gyakrabban fordulnak elő bizonyos betegségben szenvedőknél, mint ugyanabban a pozícióban a populáció egészénél. Azaz bizonyos SNP-k jelenléte esetén egy adott betegség gyakorisága szignifikánsan nagyobb lehet összehasonlítva ezen betegségben nem szenvedő csoporttal.

A Sjögren-szindróma etiológiájában a genetikai tényezőknek fontos szerepük lehet, melyet alátámaszt az a tény, hogy növekvő gyakorisággal fordul elő a betegség a már pSs-ben szenvedő betegek rokonságában. Számos tanulmány vizsgálta már a lehetséges összefüggést az IL-10 polimorfizmusa és bizonyos autoimmun betegségek között, például SLE-ben, rheumatoid arthritis esetén. A vizsgálatok szerint magas IL-10 szintet detektáltak a pSs betegek perifériás vérének monocitáiban és a nyálmirigyekben, két újabb vizsgálat pedig az

IL-10 gén promoterének polimorfizmusait tanulmányozta Ss betegekben. Megnövekedett GCC haplotípus gyakoriságot és csökkent ACC haplotípus gyakoriságot találtak a vizsgált Ss betegcsoportban, de nem találtak összefüggést az extraglanduláris manifesztációk és az IL-10 haplotípusok között, valamint nem találtak szignifikáns különbségeket a klinikai és immunológiai paraméterek esetén sem a betegekben.

Számos megfigyelés mutatja, hogy egyes SNP-k megléte a magas életkort megért emberekkel is összefüggésbe hozhatók. Ezek az eredmények, ha nem is vezetnek a maximális élettartam kitolásához, megmutathatják, hogy mely géneknek lehet nagyobb szerepük az élethossz alakításában. Ebben a megközelítésben az SNP-ket olyan faktoroknak tekinthetjük, melyek befolyásolhatják az egyén sejtjeinek információs szintjét, s ezért az SNP-ket az öregedési folyamat egyik meghatározójának tekinthetjük. A Sjögren szindróma a korfüggő betegségek közé tartozik, hiszen a gyakorisága -hasonlóan egyes malignus elváltozásokhoz- nő a kor előrehaladtával, így felmerült, hogy a betegségnek közös gyökerei lehetnek az öregedéssel is. Az IL-10 promóter régiójának -1082-es polimorfizmusát részletesen tanulmányozták mind az Ss, mind az öregedés tekintetében. A -1082G allél szignifikánsan gyakoribb az idős férfi populációban, míg a GCC/ATA genotípus aránya nagyobb a Ss-ás nőkben. A vizsgálataink szerint a -1082-es pozícióban a Sjögren szindrómában gyakoribb az AA homozigóta típus, mint a kontroll csoportban, ugyanakkor a betegek csoportjában a GG homozigóta nők száma kisebb az AA genotípusú nőknél, a kontroll csoportban ez a két szám egyenlő. Nyilvánvaló, hogy sem a betegségre való fogékonyságot, sem a magas életkort nem lehet egy nukleotid polimorfizmusával magyarázni, de ugyanakkor egyértelműnek tűnik, hogy a -1082G allél férfiakban inkább a magas életkorhoz, míg a nőknél a -1082A allél a Ss megjelenési esélyének növekedéséhez köthető.

A DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinikáján gondozott pSs betegcsoportban vizsgáltuk az IL-10 gén promoterének polimorfizmusát a -1082 nt pozícióban. A GG

genotípus gyakorisága szinte azonos, az AA genotípus gyakorisága kismértékben nagyobb volt a pSs betegek körében összehasonlítva a kontroll csoport genotípus gyakoriságaival. Ezek az eredmények megegyeznek egy japán vizsgálat eredményeivel, ahol a GCC haplotípus -mely a fehér populációban predomináns- kevésbé volt gyakori a japán pSs betegekben, ugyanakkor az AA genotípus gyakorisága nagyobb volt. A genotípus gyakoriság meghatározása mellett mértük a szolubilis IL-10 szinteket is a betegek szérumában. A betegek esetében az IL-10 szint szignifikáns mértékben magasabb volt, amely eredmény korrelál mononukleáris sejteken végzett vizsgálatok eredményeivel, miszerint emelkedett IL-10 mRNS és fehérje szinteket detektáltak pSs betegek perifériás mononukleáris sejteiben. Egy finn kutatócsoport által végzett vizsgálat szerint azon személyeknél tapasztaltak emelkedett IL-10 szinteket, akik negatívak voltak az A allélra a -1082-es pozícióban, összehasonlítva az A allél pozitív személyekkel, ezzel szemben mi jelentős mértékben emelkedett szolubilis IL-10 szintet detektáltunk az A allélt hordozóknál összehasonlítva az A allélra negatív személyek IL-10 szintjével. Az IL-10 szintje fontos faktor, mert az IL-10 és az IL-6 központi szerepet játszik a B sejtek és a plazma-sejtek érésében is, az immunglobulinok szintézisének aktivációjában. Mi nem találtunk közvetlen összefüggést az IL-10 szintek és az IgG szintek között SSA/SSB antitestek jelenléte, vagy hiánya esetén sem, de lehetséges, hogy az emelkedett IL-10 szint hozzájárul a hipergammaglobulinémiához, mely az Ss egyik jellegzetessége, illetve az autoantitestek termelődését aktiválja, mely szintén jellemző a Ss-re. A pSs betegeknek nagyobb az esélyük, hogy limfómák alakuljanak ki szervezetükben, s lehetséges, hogy a hosszú távon magas szolubilis IL-10 szint fokozza az esélyét ezen limfómák kialakulásának.

Egy vizsgálat szerint azon pSs betegek körében, akik GCC haplotípus hordozók voltak, a betegség hamarabb, fiatalabb korban manifesztálódott. Mi nem találtunk ilyen összefüggést a betegség megjelenése és a genotípusok között. Mindemellett vizsgáltuk a

különbségeket a klinikai és az immunológiai paraméterek tekintetében is a háromféle IL-10 promóter genotípus alapján csoportosított betegek esetén. Emelkedettnek találtuk a szisztémás érintettség gyakoriságát a GG genotípust hordozó betegek körében. Az irodalom alapján is valószínűnek tűnik, hogy mérhető hatása van a primer Sjögren-szindróma klinikai megjelenésére is az IL-10 promóter polimorfizmusnak.

Összefoglalva tehát, magas szolubilis IL-10 szintet detektáltunk a Sjögren szindrómás betegek körében az egészséges kontroll személyekkel összehasonlítva, a -1082 GG genotípus nem felelős ezért a fenotípusért. Emelkedett A allél és AA genotípus gyakoriságot detektáltunk a Ss betegekben hasonlóan egy japán vizsgálathoz. Mindazonáltal az IL-10 gén polimorfizmusa fontos komponense lehet a betegség genetikai hátterének, a betegségre való fogékonyságnak és a betegség klinikai expressziójának, de további átfogó genetikai vizsgálatok szükségesek, melyek magukba foglalják az IL-10 gén más polimorfizmusait is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az autoimmun betegségek igen összetett kórképek, számos tényező befolyásolja a kialakulásukat: különböző genetikai eltérések, például az SNP-k (pl: IL-10), a különböző autoantitestek (többek között: antiRo/SSA, antiLa/SS), s az öregedés is szerepet játszhat, hiszen sok autoimmun betegség megjelenése életkorhoz köthető.

A Ro/SSA és La/SSB autoantigének ellen termelődő antitesteknek nemcsak a diagnosztikában, hanem az autoimmun betegségek patomechanizmusában is szerepük van. Több más tényező mellett az UVB besugárzás és a hormonális hatások is ismert kofaktorai ezen betegségeknek. A célunk az volt, hogy tanulmányozzuk a háromféle Ro/SSA és a kétféle La/SSB alternatív splicing formáinak különböző mRNS szintjeit transzformált humán keratinocitákban UVB besugárzás és 17-béta-ösztadiol kezelés hatására. PCR technika segítségével határoztuk meg a különböző mRNS szinteket 24, 48, 72 órás UVB besugárzás után. A kalretikulin mRNS szintje megnövekedett, míg az 52 és 60 kDa Ro/SSA mRNS-ek szintje nem változott. Ösztadiol kezelés hatására nem volt változás a Ro/SSA és az La/SSB exon1 mRNS szintekben, de csökkent az La/SSB exon1' mRNS szint. A két variáns (exon1 és exon1') arányának szerepe már bizonyított Sjögren szindrómában, s a mi eredményeink is megerősítik azt a feltételezést, miszerint a Ro és La antigének részt vesznek a különböző autoimmun betegségek pathogenezisében, így a Sjögren szindrómáéban is.

Az IL-10 promóterének -1082-es pozíciójában levő polimorfizmust és a szolubilis IL-10 szinteket vizsgáltuk Sjögren szindrómás betegek és egészségesek csoportjában. PCR-RFLP módszert alkalmaztunk a genotípusok meghatározásához, a szérum IL-10 szintjét ELISA módszerrel mértük. Az IL-10 szignifikánsan magasabb volt a Ss betegek ($36,4 \pm 57,5$ pg/ml) esetén, mint a kontroll személyekben ($9,9 \pm 20,3$ pg/ml; $p=10^{-6}$). A magas citokintermelő képességgel jellemezhető fenotípus és a nagyobb G allél gyakoriság között

nem találtunk összefüggést a Ss betegekben szemben a korábbi vizsgálatok eredményeivel, viszont a kontroll csoportban emelkedett IL-10 szinteket detektáltunk azok között, akik GG genotípus hordozók voltak ($17,7 \pm 23,2$ pg/ml), összehasonlítva a másik két genotípust hordozó csoporttal (AA: $8,98 \pm 16,5$ pg/ml; GA: $8,5 \pm 21,1$ pg/ml; $p=0,01$). Vizsgálataink nem támasztják alá a korábbi vizsgálatokat, miszerint Ss-ben összefüggés lenne a magas G allél gyakoriság és a szabályozatlan IL-10 szekréció között. Az eredményeink szerint viszont a GG homozigótáság kapcsolatban van az emelkedett IL-10 szinttel az egészséges populációban, de ez nem magyarázza az IL-10-zel összefüggésbe hozható azon specifikus betegség paramétereit, melyeket általában vizsgálnak Ss-ben. Valószínűleg más genetikai faktorok is részt vesznek a betegség klinikai spektrumának kialakításában a magyar beteg populációban.

SUMMARY

Autoimmune diseases have a very complex clinical picture, several factors may play a role in the onset of the autoimmune disease and the disease susceptibility such as genetic polymorphisms (e.g. interleukins), autoantibodies (antiRo/SSA, antiLa/SSB, etc.) and aging may play a role in it as well, since the onset of several autoimmune diseases is age-dependent.

Antibodies produced against the Ro/SSA and La/SSB autoantigens are not only of diagnostic value but they may even play a role in the pathogenesis of several autoimmune diseases (Sjögren's syndrome, subacute cutaneous lupus erythematosus, neonatal lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus). Among other factors, such as ultraviolet (UV) radiation and also the hormonal milieu are well-known cofactors in the pathogenesis of these autoimmune diseases. The goal of our research was to study the possible alterations in mRNA levels of three different Ro antigens and that of two La species produced by alternative splicing in transformed human keratinocytes (HaCaT cells) after UVB irradiation as well as after 17- β -estradiol treatment. The polymerase chain reaction technique was used to determine the mRNA levels of the Ro and La species after 24, 48, and 72 hours of irradiation. mRNA levels of calreticulin increased as a function of time after UV irradiation but mRNA levels of Ro 52 kDa and 60 kDa Ro mRNAs were unaltered. After treating the cells with 17- β -estradiol, there was no change observed in the levels of Ro mRNAs or La exon1 mRNA, but a gradual decrease was noted in the mRNA levels of La exon1'. The importance of alterations in the ratio of La exon1 to exon1' is supported by the observations in patients with Sjögren's syndrome, and our results strengthen their role in the pathogenesis of different autoimmune diseases.

A further aim of our study was to investigate the frequency of the -1082 polymorphism of the interleukin-10 (IL-10) gene and soluble IL-10 levels in Hungarian

primary Sjögren's syndrome (Ss) patients. Ninety-nine Ss patients and 135 healthy volunteers were examined. Samples were analyzed by the PCR-RFLP method and IL-10 plasma levels were assessed by a commercial ELISA assay. IL-10 plasma levels were higher in the primary Ss patients (36.4 ± 57.5 pg/ml $n=99$) compared with healthy subjects (9.9 ± 20.3 pg/ml, $n=135$, $p=10^{-6}$). The elevated IL-10 phenotype of Ss patients was not associated with increased G allele frequency as reported earlier, while in the control group, we found higher IL-10 levels among the subjects who were carriers of the GG genotype (17.7 ± 23.2 pg/ml) as compared to the other two genotype carriers (AA 8.98 ± 16.5 and GA 8.5 ± 21.1 pg/ml, $p=0.01$). Our data do not support some previous observations that indicated an association between deregulated IL-10 secretion in Ss and higher G allele frequency. However, our results clearly demonstrate that GG homozygosity is associated with elevated IL-10 levels in apparently healthy subjects, but this can not account for the IL-10 related specific disease features observed in Ss. Thus, other genetic factors contribute to the clinical spectrum of this heterogeneous disease at least in the Hungarian population.

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Szegedi A, Irinyi B, Bessenyei B, **Márka M**, Hunyadi J, Semsei I. (2001): UVB light and 17- β -estradiol have different effects on the expression of Ro/SSA and La/SSB autoantigens in HaCaT cells.

Archives of Dermatological Research 293:275-282 (IF: 1,35)

Márka M, Bessenyei B, Urbán L, Zeher M, Semsei I. (2004): A genetikai polimorfizmus kapcsolata az öregedéssel és a betegségekkel.

Magyar Belorvosi Archivum 57:10-19.

Márka M, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. (2005): IL-10 promoter -1082 polymorphism is associated with elevated IL-10 levels in control subjects but does not explain elevated plasma IL-10 observed in Sjögren's syndrome in a Hungarian cohort.

Scandinavian Journal of Immunology 62:474-480. (IF: 1,912)

IF: 3,62

Egyéb közlemények:

Urbán L, Bessenyei B, **Márka M**, Semsei I. (2001): On the role of the aging in the etiology of autoimmunity.

Gerontology 48:179-184 (IF: 1,42)

Urbán L, **Márka M**, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. (2003): A t(14;18) kromoszóma transzlokáció és a bcl-2 gén Sjögren-szindrómában: kapcsolat egyes tüdőkarcinómákkal.

Medicina Thoracalis LVIII/1:1-3

Bessenyei B, Márka M, Urbán L, Zeher M, Semsei I. (2004): Single nucleotide polymorphisms: Aging and diseases.

Biogerontology 5:291-303 (IF: 2,3)

Semsei I, Bessenyei B, Márka M, Zeher M. (2005): A nukleotid polimorfizmus (SNP) szerepe és jelentősége: különös tekintettel egyes autoimmun betegségekre.

Allergia és Klinikai Immunológia (nyomdában)

Összesített IF: 6,982

Előadások, poszterek:

1. Márka M, Bessenyei B, Urbán L, Bakó Gy, Semsei I. (2001): Az AIRE gén az APECED diagnosztikájában.

Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Debrecen, június 8-9.

2. Bessenyei B, Márka M, Zeher M, Szegedi Gy, Semsei I. (2001): Mutációk az La/SSB autoantigén 7-es exonjában.

Magyar Immunológiai Társaság XXXI. Kongresszusa, Eger, október 17-19.

3. Bessenyi B, Márka M, Urbán L, Zeher M, Szegedi Gy, Semsei I. (2002): Mutations in the hotspot region of exon 7 of La (SS-B) autoantigen: Appearance in certain autoimmun diseases.

VIIIth International Symposium on Sjögren's Syndrome, Kanazawa, május 16-18.

4. Urbán L, Márka M, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. (2003): Molecular biology approach of Sjögren's syndrome.
35th Annual Scientific Meeting of the Hungarian Medical Association of America, Sarasota, október 27-29.
5. Márka M, Bessenyei B, Urbán L, Zeher M, Semsei I. (2004): Genetic polymorphisms: Aging and diseases.
2nd International Conference on Functional Genomics of Ageing, Kréta, április 28- május 1.