

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

dr. Besenyei Tímea

Témavezető: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2	BEVEZETÉS	5
2.1	A rheumatoid arthritis etiopatogenezisének áttekintése	5
2.2	A klinikai kép – különös tekintettel a kardiovaszkuláris szövődményekre	7
2.3	Röviden a rheumatoid arthritis kezelésének sikereiről és kihívásairól	8
2.4	Az állatmodellek jelentősége a rheumatoid arthritis kutatásában	10
3	CÉLKITŰZÉSEK	11
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12
4.1	1. vizsgálat	12
4.1.1	Egerek	12
4.1.2	Irodalmi áttekintés	12
4.2	2. vizsgálat	13
4.2.1	Betegek	13
4.2.2	Vaszkuláris ultrahangvizsgálatok	14
4.2.3	PBMC és RNS izolálás	15
4.2.4	Microarray vizsgálatok és statisztikai módszerek	15
4.3	3. vizsgálat	16
4.3.1	Egerek	16
4.3.2	Betegek	17
4.3.3	PGIA-s BALB/c egerek VX-680 kezelése	17
4.3.4	RNS izolálás, cDNS szintézis és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció	17
4.3.5	PCR array technikák	18
4.3.6	Western blot analízis	18
4.3.7	Szövetkultúra	19
4.3.8	Áramlási citometria	19
4.3.9	Statisztikai elemzés	20
5	EREDMÉNYEK	21
5.1	1. vizsgálat	21
5.1.1	Megfelelő genomi lokuszok RA-ben és annak rágcslómodelljeiben	21
5.2	2. vizsgálat	24
5.2.1	A normál és patológiás érstatusú betegek génexpressziós profilja közötti különbségek	24
5.2.2	A klinikai és vaszkuláris válasz közötti összefüggés anti-TNF kezelést követően	25
5.2.3	A klinikai és vaszkuláris reszponderek kiindulási génexpressziós mintázata eltér a nonreszponderekétől	25
5.2.4	Az eltérő expressziót mutató gének hálózati elemzése	27
5.3	3. vizsgálat	28
5.3.1	Kromatin módosító enzimek betegségasszociált génexpresszió-változásai ízületi gyulladásban szenvedő egerekben, valamint RA-s betegekben	28
5.3.2	A hiszton H3 Aurora kinázok általi foszforilációja ízületi gyulladásban	29
5.3.3	Az Aurora kinázok megnövekedett expressziója arthritis-specifikus, és a polyarthritis akut fázisával mutat összefüggést a RA állatmodelljeiben	30
5.3.4	PGIA-s egerek profilaktikus és terápiás kezelése az Aurora kináz inhibitor VX-680-nal	31

6	MEGBESZÉLÉS.....	35
6.1	RA-re hajlamosító gének jelentőségének vizsgálata emberekben és megfelelő állatmodellekben.....	35
6.2	RA-s betegek vaszkuláris kórfolyamataihoz társuló génexpressziós mintázat tanulmányozása.....	35
6.3	Az epigenomot befolyásoló faktorok, különösen az Aurora kináz A és B expressziójának vizsgálata arthritises egerek és RA betegek immunsejtjeiben.....	37
7	KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS KLINIKAI JELENTŐSÉG.....	40
8	IRODALOMJEGYZÉK.....	42
9	ÖSSZEFOGLALÁS.....	62
10	SUMMARY.....	64
11	KÖZLEMÉNYEK.....	66
11.1	Közlemények listája.....	66
11.2	Konferencia absztraktok.....	70
12	TÁRGYSZAVAK.....	71
13	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	72

1 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 nonreszponder (clinical non-responder)
cR	klinikai rezponder (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 rezponder (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-tirozinfoszfátáz 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	egyponos 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 nonreszponder
vR	vaszkuláris rezponder

2 BEVEZETÉS

2.1 A rheumatoid arthritis etiopatogenezisének áttekintése

A rheumatoid arthritis (RA) autoimmun gyulladáscsökkentő betegség, mely főként a synoviális ízületeket érinti. Prevalenciája körülbelül 0.5-1% (1). Genetikai és környezeti/életmódbeli tényezők, valamint az autoimmunitás vesznek részt a kórfolyamat kialakulásában (2-9); az etiológiához epigenetikai faktorok is hozzájárulnak (10).

A genetikai tényezők szerepét kb. 60%-ra becsülik (11). Humán leukocita antigének (HLA-DR) és nem-HLA gének egyaránt fontos szerepet játszanak a RA patogenezisében (4,12,13). 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 (14). 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 (15), melynek alapja, hogy a RAA szekvencia jelentette hajlamosító tényezőt a 70. és 71. pozícióban található aminosavak árnyalják. Az új klasszifikációs rendszer a SE allélokot 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 (16). 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 (13,17). Több, mint 30 további egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP) hozható összefüggésbe a RA kialakulásával, melyek közül kiemelendő az *IL23R*, *FCGR*, *IRF5*, *CD40*, *STAT4*, *PADI4*, *CCR6* és *CCL21* (1. táblázat) (4). A *HLADRB1*, *PTPN22* és *IL23R* SNP-k szerepét magyar RA-s betegeknél is megerősítették (12,18,19).

1. táblázat A legfontosabb rheumatoid arthritisre hajlamosító gének (4)

Jelölt gén	Kódolt fehérje
<i>HLA-DRB1</i>	II. osztályú humán leukocita antigén / fő hisztokompatibilitási komplex
<i>PTPN22</i>	Nem receptor típusú protein-tirozinfoszfataz 22
<i>TRAF1/C5</i>	TNF-receptor asszociált faktor 1
<i>STAT4</i>	Szignál transzducer és transzkripció aktivátor-4
<i>PADI4</i>	Peptidilarginin-deimináz-4
<i>IFR5</i>	Interferonhoz kapcsolt faktor-5
<i>FCGR</i>	Fc-gamma receptor
<i>IL2RA, IL2RB</i>	Interleukin-2 A és B
<i>CD40</i>	CD40
<i>CCL21</i>	CC chemokin ligand-21
<i>CCR6</i>	CC chemokin receptor-6

Környezeti és életmódbeli tényezők (dohányzás, szilikátpor, koffein, cukrozott üdítőitalok [fruktóz], orális antikoncepciensek, stb.) szintén hozzájárulnak a RA kialakulásához. Protein citrullinációt idézhetnek elő, mely ACPA termelődéshez vezet (3,7,8). A dohányzó SE hordozóknál tapasztalható szignifikánsan magasabb ACPA-pozitív RA rizikót magyar RA-s betegek esetén is megerősítették (20); 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 antikoncepciensek használata között.

A genetikai és környezeti/életmódbeli tényezők, valamint az autoimmunitás váltják ki a synovitist, a RA központi gyulladási eseményét (21,22). Ez igen összetett folyamat, melyben számos gyulladási sejt és mediátor vesz részt. A T-sejteknek kulcsszerepük van a synovitis kiváltásában és fenntartásában (23-25). Ezt alátámasztja az antigénprezentáció (14,15), illetve a citrullinált autoantigének T-sejtek által történő felismerésének genetikai jelentősége (26). A B-sejteket célzó terápia hatékonysága hangsúlyozza ezen sejtek jelentőségét a RA patogenezisében. A B-sejteknek fontos szerepük van az antitestek, citokinek és chemokinek termelésében, valamint az antigénprezentációban (27). A veleszületett immunrendszer sejtjei közül a neutrophil granulocyták alkotják a RA-s synovialis folyadékban (SF) található sejtek fő populációját (28), azonban szerepük korántsem egyértelmű: habár proteolitikus enzimek és gyulladási mediátorok szekretálása révén károsíthatják az ízületi struktúrát, az ízületet infiltráló T-sejteket is károsíthatják (24). A RA-s synoviumban nagy számban vannak jelen

makrofágok és endothelsejtek, az általuk termelt angiogén mediátorok pedig angiogenezist okoznak. Az így megnövekedett endothelfelszín lehetővé teszi a gyulladással leukocyták synovialis extravazációját, ezáltal a RA progresszióját (29).

A tény, hogy RA esetében a monoizigóta ikrek konkordancia aránya csupán kb. 15% (30), felhívta a figyelmet a génextpressziót szabályozó, ezáltal a genetikai és környezeti tényezőket összekapcsoló epigenetikai faktorok jelentőségére (31,32). A RA-s synovialis fibroblastok számos hypo-, illetve hypermetilált genomikai régiót tartalmaznak. Az érintett gének többsége a matrix remodellációban, leukocytá toborzásban, immunválaszban és gyulladásban játszik szerepet (33). 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 (34).

2.2 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 (1). A többletalálkozás fő oka a kardiovaszkuláris betegség (35), melyet főként az – már a betegség korai fázisában észlelhető RA-asszociált atherosclerosis idéz elő (36). A RA-asszociált atherosclerosis kialakulásában egyaránt fontos szerepet játszanak a tradicionális, Framingham rizikótényezők és a gyulladással kapcsolatos faktorok (mint az ACPA, immunglobulin M [IgM] típusú rheumatoid faktor (RF), keringő immunkomplexek, proinflammatorikus citokinek és Th0/Th1 T-sejtek) (37).

A manifeszt atherosclerosis általában endothelialis dysfunkció előzi meg, mely klasszikus képzővizsgálatokkal, 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 (38), mivel a carotis IMT jól korrelál a RA aktivitásával és fennállásával, a hagyományos rizikófaktoroktól függetlenül (39).

Bár RA-ben a szisztémás gyulladással van kulcsszerepe az akcelerált atherosclerosis létrejöttében, a tradicionális rizikófaktorok ugyanúgy jelen vannak, ami megnehezíti a kezelést

(40). Ugyanakkor az alacsony betegségaktivitás mindenképp jótékony hatású az érstatusz szempontjából (38).

2.3 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 fogyatékosságot és kedvezőtlen betegségkimenetelt. Alapvető fontosságú tehát a korai diagnózis és az azonnal megkezdett terápia (41-44). Habár továbbra is a methotrexát (MTX), mint konvencionális, szintetikus betegségmódosító szer (csDMARD) jelenti a kezelés alapját, az elmúlt évek során számos biológiai terápia és célzott szintetikus betegségmódosító szer (tsDMARD; biologikumok és tirozinkináz-gátlók) vált elérhetővé. Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a biológiai terápia szerek nem csak az ízületi gyulladás progresszióját lassítják, hanem jótékony hatással bírnak a szisztémás manifesztációk és a társbetegségek, pl. kardiovaszkuláris betegség kezelésében is (45).

A terápia lehetőségek nagymértékű fejlődése ellenére még mindig számos betegnél tapasztalunk gyógyszer mellékhatást vagy épp hatástalanságot. A terápia válasz hátterében számos génextpressziós mintázatot azonosítottak (46-50), 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 (2. táblázat) (4), illetve biológiai terápia szerekre – főként tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) inhibitorokra (3. táblázat) (4) - adott válasszal összefüggésben. Ezen kihívások miatt alapvető szükség van új terápia fejlesztésére.

2. táblázat A konvencionális betegségmódosító szerek farmakogenomikája (4)

Gyógyszer	Gén	Variáns	Klinikai hatás
Methotrexát	<i>SLC19A1 (RFC-1)</i>	G80A	Fokozott vagy változatlan hatékonyság
	<i>MTHFR</i>	C677T	Fokozott toxicitás a legtöbb tanulmányban
	<i>MTHFR</i>	A1298C	Ellentmondásos adatok
	<i>SHMT1</i>	C1420T	Fokozott toxicitás
	<i>ABCB1 (MDR1)</i>	C3435T	Csökkent hatékonyság
	<i>TYMS</i>	5'-UTR ismétlődés	Csökkent hatékonyság és valószínűleg fokozott toxicitás
	<i>TYMS</i>	3'-UTR deléció	Fokozott hatékonyság
	<i>ATIC</i>	C347G	Fokozott hatékonyság és toxicitás a legtöbb tanulmányban
	<i>IL1RN</i>	IL-1RN*3	Csökkent hatékonyság
Sulfasalazin	<i>NAT2</i>	NAT2*4	Fokozott toxicitás a lassú acetilálóknban a legtöbb tanulmányban, fokozott hatékonyság a gyors acetilálóknban (?)
Leflunomid	<i>DHODH</i>	C19A	Fokozott hatékonyság és toxicitás
	<i>ESR1</i>	SNP	Fokozott hatékonyság
	<i>CYP1A2</i>	CYP1A2*1 F	Fokozott toxicitás
Hydroxychloroquin	<i>IL10</i>	A1082G	Fokozott hatékonyság
		C819T	
		C592A	
		<i>TNF</i>	A308G
Azathioprin	<i>TPMT</i>	TPMT*2, *3A, *3C	Fokozott toxicitás
	<i>ITPA</i>	C94A	Fokozott toxicitás

3. táblázat A biológiai terápiás szerek farmakogenomikája (4)

Gyógyszer	Gén	Variáns	Klinikai hatás
Anti-TNF szerek	<i>TNF</i>	G308A	Fokozott hatékonyság a legtöbb tanulmányban
	<i>TNF</i>	A238G	Fokozott hatékonyság
	<i>TNFRSF1B</i>	T196G	Csökkent vagy változatlan hatékonyság
	<i>FCGR3A</i>	Val158Phe	Változatlan hatékonyság
	<i>PTPRC</i>	SNP	Fokozott hatékonyság
	<i>MAPK14</i>	SNP	Az anti-TNF antitestek (influximab, adalimumab) fokozott hatékonysága
Rituximab	<i>FCGR3A</i>	Val158Phe	Fokozott vagy változatlan hatékonyság

Large gene signature studies are not included.

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. (51,52)

2.4 Az állatmodellek jelentősége a rheumatoid arthritis kutatásában

A Humán Genom Projekt megvalósítása (53) óriási lendületet adott a reumatológiai kutatásnak, azonban a teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWAS) kezdeti, biztató eredményei után (54) 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 korlátoi 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 (55-57). 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.

3 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 rizikógének áttekintése RA-ben és állatmodellek szintenikus kromoszómarégióiban, különös tekintettel saját munkacsoportunk eredményeire.

2. vizsgálat

RA-s betegek vaszkuláris kórfolyamataihoz társuló génexpressziós mintázat tanulmányozása

- Kardiovaszkuláris 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.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 1. vizsgálat

4.1.1 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 kromoszómaregión 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 hímeik és nőstények keresztezésével létrehozzunk egy homozigóta intervallum-specifikus kongenikus törzset (IVSC).

Az IVSC egereknél ezután vizsgáltuk az arthritisre való fogékonyságot, a betegség kialakulását és súlyosságát, valamint több, mint 15 RA szempontjából releváns biomarkert (58).

4.1.2 Irodalmi áttekintés

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

4.2 2. vizsgálat

4.2.1 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 (41).

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-től 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 (59).

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.

4.2.2 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 fújta 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 (60). 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 (60). 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) (61,62).

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.

4.2.3 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.

4.2.4 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 ($p < 0,05$).

4.3 3. vizsgálat

4.3.1 Egerek

Az idős tenyésznőstény BALB/c egereket a National Cancer Institute-tól (NCI, Frederick, MD) vásároltuk, és standard protokoll szerint (63,64) immunizáltuk őket PGIA előidézéséhez. Röviden: az egereket artrózisban szenvedő, ízületpótló 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 (64,65). 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 (63–66). A VX-680 kezelés ízületi gyulladásra gyakorolt terápiás hatásának meghatározására az ízületek vastagságát mértük mikrokaliper segítségével (66). 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 adjuvánsban, a standard CIA protokoll szerint (66–68). 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 kezeléseket 17–18. napján) gyűjtöttük be. Az autoantitestek IgG1 és IgG2a izotípusait (anti-egér PG) BALB/c egerek szérummintáiban mértük (63–65,67,69). Az állatkísérleteket az Institutional Animal Care and Use Committee hagyta jóvá.

4.3.2 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.

4.3.3 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 (70), 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 gyulladással 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.

4.3.4 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™ 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 specifikusát 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 ΔCt módszert alkalmaztuk. A mért Ct 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.

4.3.5 PCR array technikák

Emberi (PHS-085) és egér (PMM-085) „RT2Profiler™” PCR array-t (SABioscience, Frederick, MD) alkalmaztunk az ízületi gyulladással 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.

4.3.6 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-től).

4.3.7 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.

4.3.8 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.

4.3.9 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.

5 EREDMÉNYEK

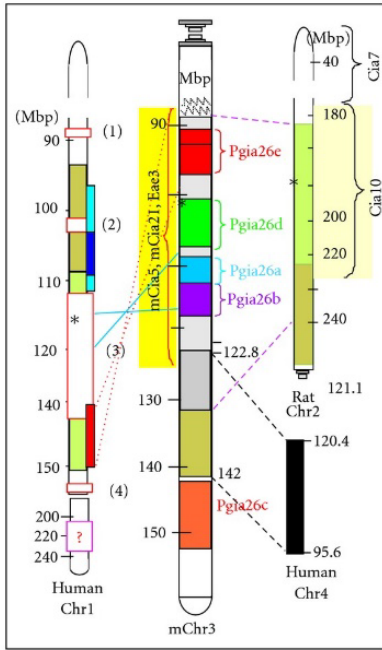
5.1 1. vizsgálat

5.1.1 Megfelelő genomi lokuszok RA-ben és annak rágcslómodelljeiben

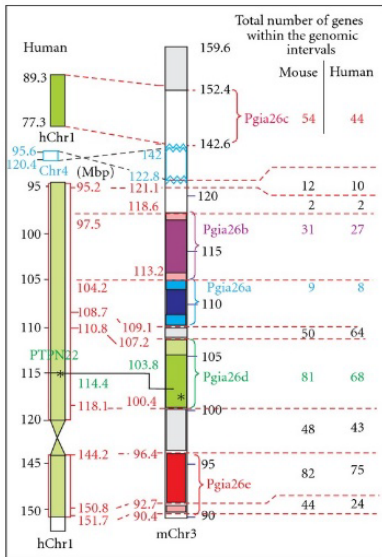
Mi és más kutatócsoportok eddig 29 PGIA-asszociált és 40 CIA-asszociált lokuszt azonosítottunk egerekben (56, 67, 69, 71-79), valamint néhány megfelelő QTL-t patkányokban (80–85). Áttekintettük az egér genom vizsgálatok során azonosított QTL-k közül azokat (58, 69, 71, 73-76, 78, 86-97), melyek megfelelnek a metaanalízisekkel igazolt fő RA rizikógénnek (98–105) valamelyikének, és kiválasztottunk közülük kettőt további vizsgálatok céljára: *Pgia26/Cia5/mCia21/Eae3* a 3-as egérokromoszómán (1. ábra), 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 (2. ábra), 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 rizikógénnek megfelelő lokuszok közvetlen közelében helyezkedtek el.

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

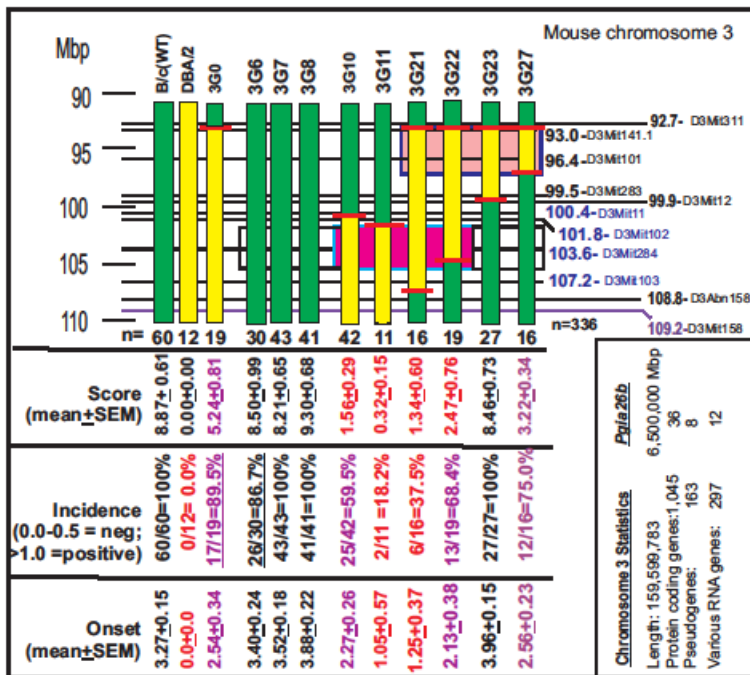


(a)



(b)

1. ábra A 3-as egéerkromoszóma a Pgia26 szublokuszokkal, valamint az azonos rizikóallélokot hordozó humán és patkány kromoszómaregiók



2. ábra A szülői vonal, a Pgia26 lokuszt hordozó kongenikus (3G0) és a Pgia26 szublokuszokat hordozó szubkongenikus törzsek geno- és fenotípusos jellemzőinek összessége

5.2 2. vizsgálat

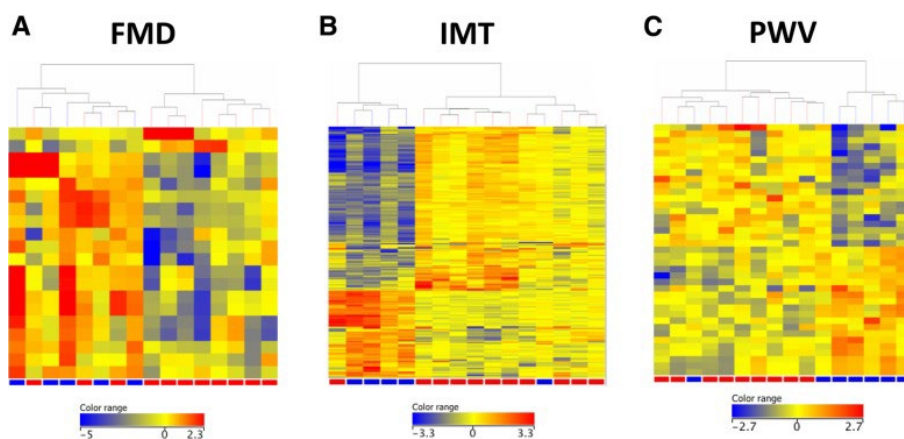
5.2.1 A normál és patológiás érstátuszú betegek génexpressziós profilja közötti különbségek

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 m/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.



3. ábra RA-s betegek vaszkuláris kórfolyamataihoz társuló génexpressziós mintázat. A hő térkép a génexpresszióbeli különbségeket ábrázolja alacsony (vörös), illetve magas (kék) FMD (a), IMT (b) és PWV (c) esetén.

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

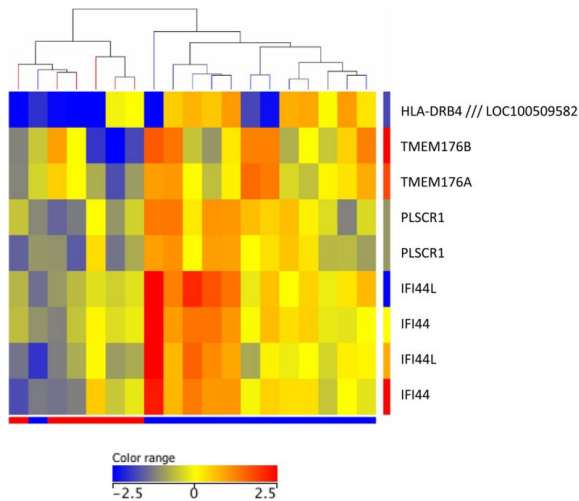
A 2. vizsgálat 2. részében 13 beteg bizonyult klinikai reszpondernek, 6 pedig nonreszpondernek. 10 beteg volt FMD-20% reszponder, 9 IMT-20% reszponder és 8 PWV-20% reszponder. Nyolcan értek el $\geq 20\%$ javulást a háromból legalább 2 paraméterben, közülük öten mindháromban.

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.

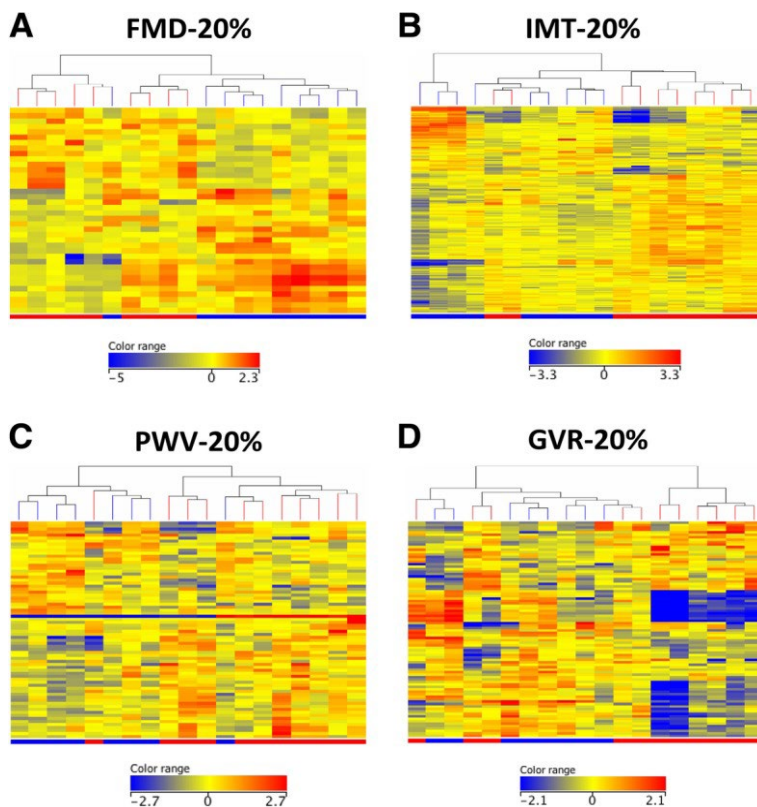
5.2.3 A klinikai és vaszkuláris reszponderek kiindulási génextpressziós mintázata eltér a nonreszponderekéétől

A kiindulási génextpressziós vizsgálat csak 5 olyan gént talált (*HLADRB4*, *TMEM176A*, *TMEM176B*, *IFI44* és *PLSCRI*), melyek szignifikánsan ($\geq 2x$) up-reguláltak voltak a cR betegekben 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 *CESI/CESIP1*) down-regulációjával társult.



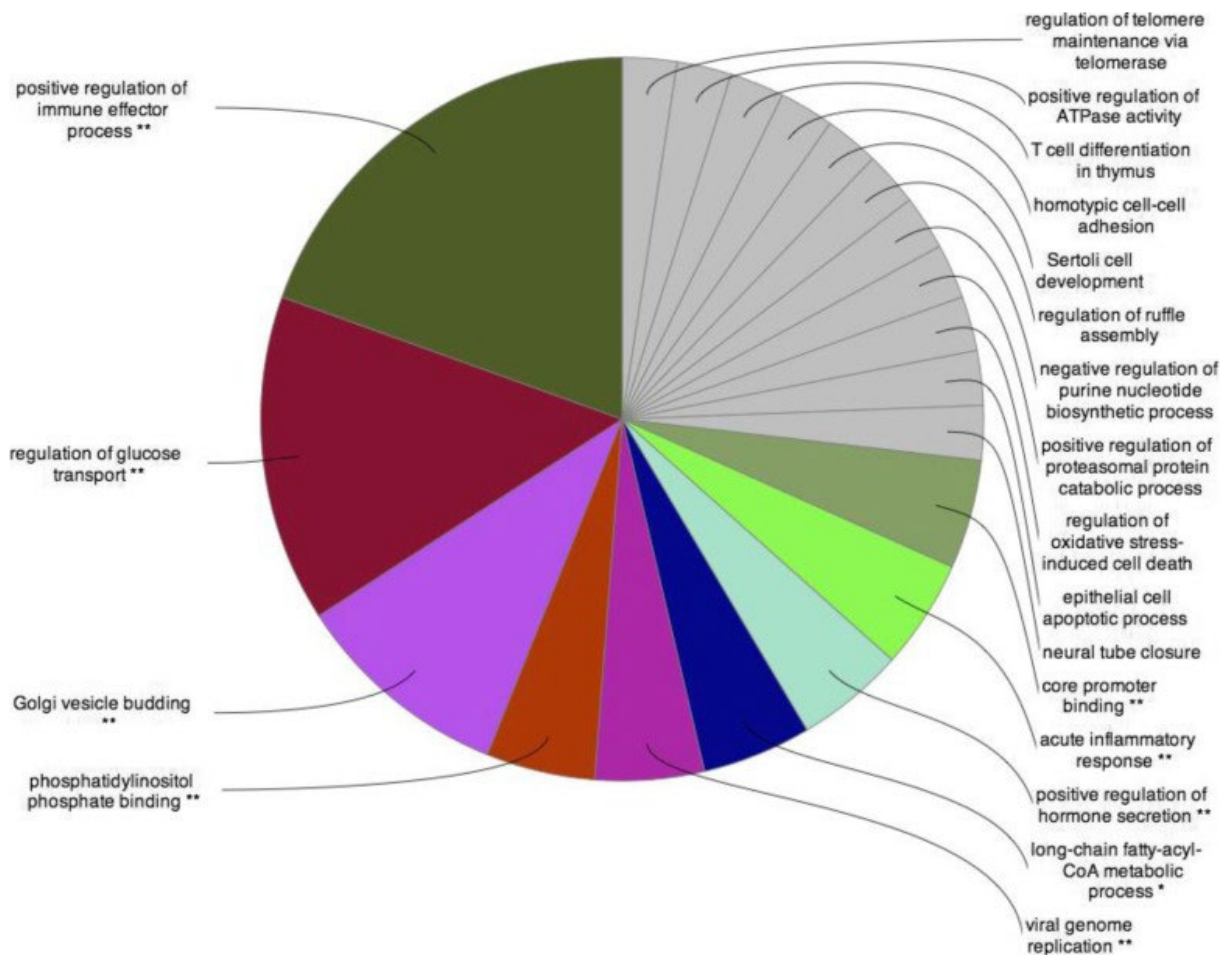
4. ábra A klinikai válaszhoz társuló géneexpressziós mintázat 12 hónapnyi anti-TNF kezelést követően. A hőtérkép a klinikai reszponderek (kék) és nonreszponderek (vörös) közötti géneexpresszióbeli különbségeket ábrázolja.



5. ábra A vaszkuláris válaszhoz társuló géneexpressziós mintázat 12 hónapnyi anti-TNF kezelést követően. A hőtérkép a FMD-20% (a), IMT-20% (b), PWV-20% (c) és GVR-20% (d) reszponderek (kék) és nonreszponderek (vörös) közötti géneexpresszióbeli különbségeket ábrázolja.

5.2.4 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 (6. ábra).



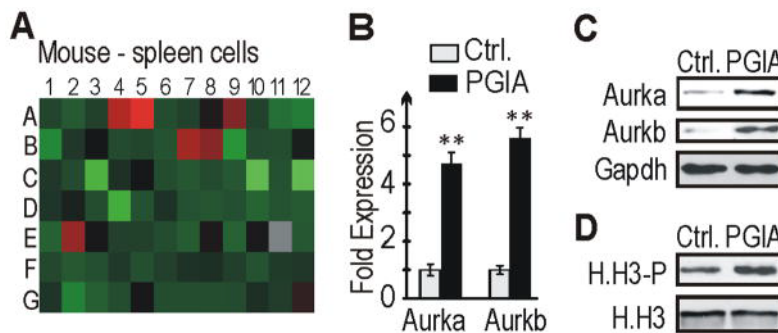
6. ábra A kördiagram az IMT-asszociált, felülreprezentált funkcionális kategóriákat ábrázolja a ClueGO analízis eredménye alapján (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, csillag nélkül $p < 0.05$)

5.3 3. vizsgálat

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

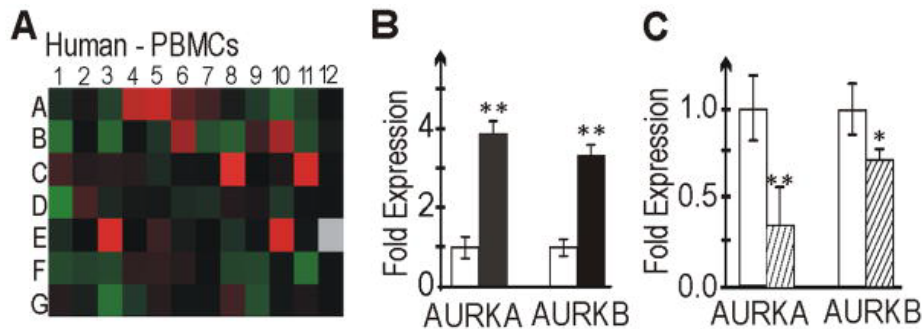
Az ízületi gyulladás patogenezisében szerepet játszó kromatin módosító tényezők azonosításához 84 gén expresszióját elemeztük, amelyek olyan kulcsfontosságú enzimeket kódolnak, amelyekről ismert, hogy specifikus kromatin-módosítók. PCR array-t alkalmaztunk a génexpresszió változásainak kimutatására. Az RNS minták PGIA és kontroll egerek lépsejtjeiből származtak. Analóg PCR array-t használtunk az identikus humán gének expressziójának vizsgálatára, DMARD-naív 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 (7A. ábra). 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 (7B. ábra).



7. ábra Kromatin módosító enzimek betegségasszociált génexpresszió-változásai arthritises egerekben. (A) A hő térkép a PGIA-s egerek lépsejtjeiben kimutatható génexpresszióbeli eltéréseket ábrázolja, adjuvánsal immunizált kontrollokhoz hasonlítva (három vizsgálatból álló reprezentatív kísérlet). A vörös négyzetek az upregulált, a zöldek pedig a downregulált géneket jelzik. (B) Az Aurora kináz A (Aurka) és B (Aurkb) expressziója PGIA-s (n=6) és adjuvánsal immunizált kontroll egerek (n=6) B sejtjeiben. A mért Ct értékek normalizálásához Gapdh gént használtuk belső kontrollként. A szignifikanciaszint a következő volt: ** P < 0.01. (C) Az Aurora kinázok Western blot analízise. (D) A hiszton H3 foszforilációjának mértéke PGIA-s egerek B sejtjeiben. A Western blot panelek három független kísérlet egyikének eredményét ábrázolják.

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 (8A. ábra).



8. ábra Kromatin módosító enzimek eltérő expressziója RA betegekben. (A) A hőterkép kezelésben még nem részesült RA betegek (n=3) PBMC-ben kimutatható génexpresszióbeli eltéréseit ábrázolja, korban és nemben illeszkedő egészséges kontrollokhoz hasonlítva. A vörös négyzetek az upregulált, a zöldek pedig a downregulált géneket jelzik. (B) Kezelésben még nem részesült (n=15) (az ábrán a fekete oszlopok jelzik) és (C) MTX-terápiában részesülő RA betegek (n=10) (harántcsíkos oszlopok) RNS-ének qRT-PCR vizsgálata. A mért Ct értékek normalizálásához β -aktin gént használtuk belső kontrollként. Az Aurora kináz A és B expressziós szintjét korban és nemben illeszkedő egészséges kontrollokhoz hasonlítottuk (n=8) (fehér oszlopok) (B és C panel). A szignifikanciaszintek a következők voltak: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

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 (8B. ábra). 5 további gén szignifikáns szuppressziót mutatott RA-s betegeknel 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 (8C. ábra).

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.

5.3.2 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 sejtlizátumokkal 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 artritises egerekben erősek, míg a kontrollesoportban szinte kimutathatatlanok voltak (7C. ábra). Az a tény, hogy az Aurora kináz A és B szelektíven foszforilálják a H3 hisztont a 10-es szerinen (106), lehetővé teszi e kinázok enzimatis aktivitásának értékelését. Megállapítottuk, hogy a 10-es szerin foszforilációs szintje legalább 7-szer magasabb volt az ízületi gyulladásban szenvedő egerekben a kontroll állatokhoz képest (7D. ábra).

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

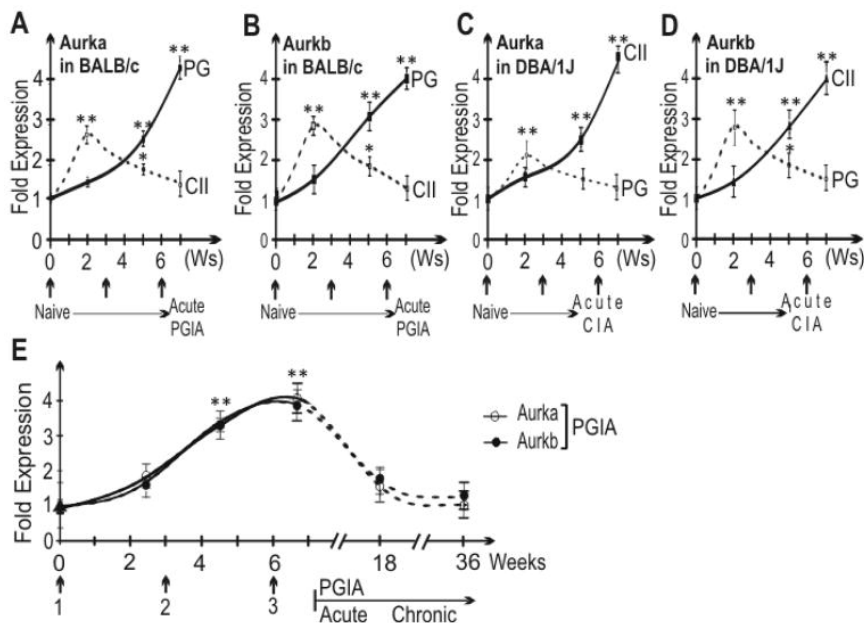
Korábbi kísérleteink nem tudták tisztázni a kérdést, hogy vajon az Aurora kinázok expressziójának ezen változásai specifikusak-e az ízületi gyulladással összefüggő limfocita-aktivációra, vagy sem. A BALB/c egér törzs nagyon fogékony a PGIA-ra és rezisztens a CIA-val szemben (megjegyzendő, hogy a CII-vel végzett immunizálás immunreakciót válthat ki ezekben az egerekben (69)); 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 (9A és 9B. ábra). 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 (9C és 9D. ábra).

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 (9E. ábra).



9. ábra Az Aurka és Aurkb expressziója PGIA-s és CIA-s egerekben. (A és B) Az Aurora kinázok expressziós szintjének változása BALB/c egerek B sejtjeiben PG-nal (folytonos vonal), illetve CII-nel (szaggatott vonal) végzett ismételt immunizálást követően (n=6). (C és D) Az Aurora kinázok expressziós szintjének változása DBA/1J egerek B sejtjeiben PG-nal, illetve CII-nel végzett ismételt immunizálást követően (n=6). A folytonos vonal az Aurora kinázok CII immunizálást követő, a szaggatott vonal a PG immunizálást követő expresszióját mutatja. (E) Az Aurora kinázok expressziója a PGIA kialakulása és progressziója során BALB/c egerekben. Az arthritis klinikai tünetei 9–10 nappal a 3. immunizálás után jelentkeztek. Kontrollként DDA-val oltott BALB/c egereket használtunk. RNS-t alkalmanként 3-4 egér B sejtjeiből izoláltunk, a Ct értékek normalizálásához a β -aktin gént használtuk. A szignifikanciaszintek a következők voltak: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Az immunizálás időpontjait minden panelen a nyilak jelölik.

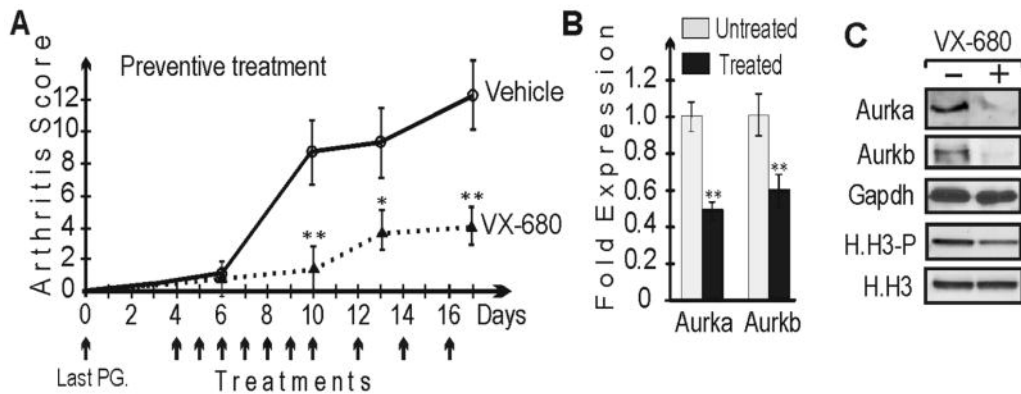
5.3.4 PGIA-s egerek profilaktikus és terápiás kezelése az Aurora kináz inhibitor VX-680-nal

A VX-680 mindkét Aurora kináz specifikus gátlója (107), amely - poliploiditást okozva - végül apoptotikus sejthalálhoz vezet (108).

A VX-680 hatását először az arthritises BALB/c egerekből izolált lépsejtkultúrán vizsgáltuk. 300 μ M VX-680 az apoptózist elősegítő p53 transzkripciós faktor és a Puma gének megnövekedett expresszióját okozta (109), melyhez a lépsejtek csökkent életképessége társult.

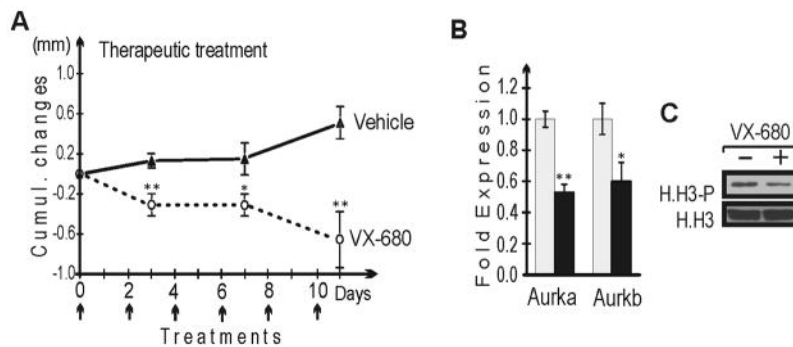
Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a VX-680 vajon képes-e megakadályozni az ízületi gyulladás kialakulását PGIA egerekben (10. ábra). 6-7 nappal az ízületi gyulladás várható megjelenése előtt kezdtük beadni a VX-680-at, és a kísérlet végéig

folytattuk a kezelést (10A. ábra). 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 (10B és 10C. ábra). Az össz B-sejtszám (CD19 +) is szignifikánsan csökkent a kezelt állatokban ($49.2 \pm 1.3\%$ -ról $38.4 \pm 2.8\%$ -ra; $P=0.0044$).



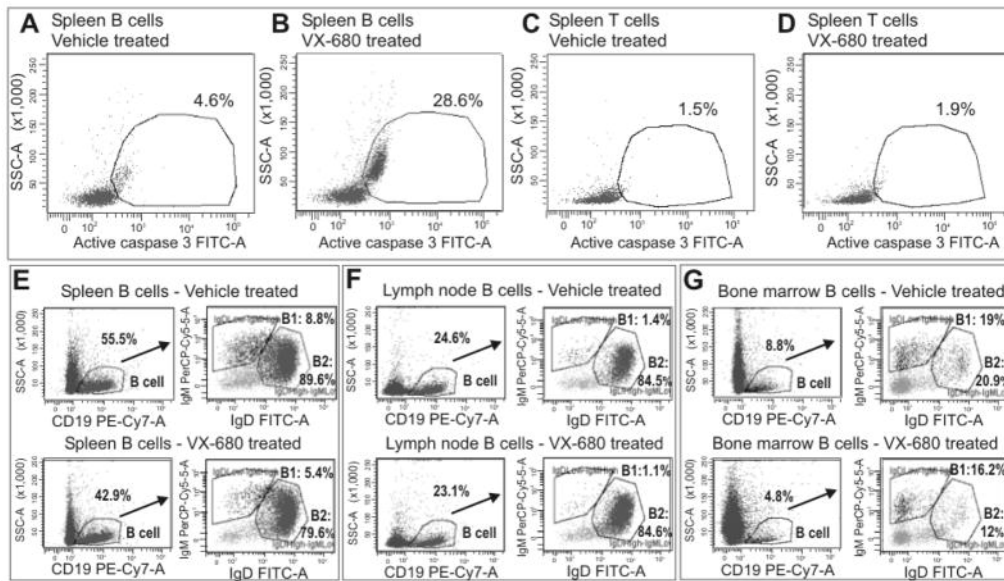
10. ábra PG-nal immunizált egerek profilaktikus VX-680 kezelése. (A) A kezelést a 3. immunizálás után 4 nappal kezdtük, és 2 héten át folytattuk 40 mg/kg VX-680-nal, illetve a kontrollcsoport esetében csak vivőanyaggal ($n=10$ mindkét csoportban). A kezelések időpontjait a nyilak mutatják. (B) Az Aurora kinázok génexpressziója. A Ct értékek normalizálásához a β -aktin gént használtuk, a kontrollcsoportban mért expressziót tekintettük 1-szeres értéknek. (C) Az Aurka, Aurkb és H.H3-P immundetektálása B sejtekben. A panel három független kísérlet egyikének eredményét ábrázolja. Töltési kontrollként Gapdh és H.H3 antitesteket használtunk. A szignifikanciaszintek a következők voltak: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

A PGIA-szel szembeni terápiás potenciál értékeléséhez megkezdjük a VX-680 (vagy vivőanyag, mint placebo) beadását az ízületi gyulladás első jeleit követően, amit minden másnap folytattuk a kísérlet végéig (11. ábra). 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 (11B és 11C. ábra).



11. ábra A már kialakult PGIA kezelése. (A) Az arthritises egereket (n=9 mindkét csoportban, átlagosan 2.5-es arthritis score) 50 mg/kg VX-680-nal, illetve a kontrollcsoport esetében csak vivőanyaggal kezeltük 10 napig. A kezelések időpontjait a nyilak mutatják. A gyulladt csukló- és bokaízületek vastagságát mikrokaliperrel mértük, a változást az y tengelyen ábrázoltuk. (B) Az Aurora kinázok génextpressziója a kísérlet 11. napján. A szürke oszlopok jelzik a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot, a feketék a VX-680-nal kezelt egereket (n=4 mindkét csoportban). A kontrollcsoportban mért expressziót tekintettük 1-szeres értéknek, a Ct értékek normalizálásához a β -aktin gént használtuk. (C) A H.H3-P immundetektálása B sejtekben. Három független kísérlet egyikének eredménye látható. Töltési kontrollként H.H3 antitestet használtunk. A szignifikanciaszintek a következők voltak: * P<0.05, **P<0.01.

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 (12A és 12B. ábra). 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 (12A–D. ábra). 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 (12F. ábra). A CD19+CD138+ B sejtek (antitestet szekretáló plazmablasztok és plazmasejtek) aránya azonban nem csökkent.



12. ábra Az arthritises egerek VX-680 kezelése B lymphocytá apoptózist indukál és csökkenti a B sejtek számát a lépben és csontvelőben. (A–D) A lép lymphocytáinak kaszpáz 3-mediált apoptózisa VX-680 kezelést követően a kísérlet 11. napján, a kontrollcsoport eredményeivel összehasonlítva. (E–G) A B1 és B2 alsó csoportok további vizsgálata a VX-680-nal, illetve vivőanyaggal kezelt egerek (E) lépében, (F) ízület drenáló nyirokcsomójában és (G) csontvelőjében. A panel 3-5 független kísérlet egyikének eredményét ábrázolja.

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 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-illetsett, arthritisre fogékony és arthritiszel 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 arthritiszel. 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.

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

Ismert, hogy a RA akcelerált atherosclerosis, valamint megnövekedett kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással jár (40,60,110,111). HLA és nem-HLA gének egyaránt állhatnak a RA-re (4,14,112) és az atherosclerosisra (113-115) való hajlam hátterében, valamint a közös genetikai rizikótényezők szerepe is felmerült a két kórkép esetében (116-118). Bár egyes SNP-eket *-HLA-DRB1* (114,116,119) és nem HLA (117,118) - találtak a RA-elődézte 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 gyulladáshoz kapcsolódó molekulákat kódoló géneket érintő- SNP-t azonosítottak a RA-előidézte atherosclerosis háttérében, 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 $\geq 2x$ -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 (120) és atherosclerosis háttérében álló vaszkuláris folyamatok és fibrosis esetén (121), 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 (122).

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 (123), ezenkívül a RA-s synovialis cytoskeletonban is kimutathatók (124).

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 (125).

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 (126-129).

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

6.3 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 (130). Ezen vizsgálatok megállapították, hogy DNS-hipometiláció (131) és bizonyos hisztonmódosítók megnövekedett expressziója (132,133) jellemzi ezeket az aktivált synovialis sejteket. Ezek a hisztonmódosítók fokozzák a proinflammatorikus citokinek termelését, valamint serkentik az immunkompetens sejtek bejutását a synoviumba (134). 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 enzimes családot, amelyek szerepet játszhatnak az autoimmun ízületi gyulladásban (7. és 8. ábra). 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 transzkripciós 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 (135). A *SETD6*, amely az NF- κ B útvonal ismert negatív szabályozója, az ízületi gyulladásban down-regulált (136). A *SETD6*-nak az ízületi gyulladás patogenezisében játszott jelentőségét támasztja alá az a tény, hogy kölcsönhatásba léphet a *NEK6*-tal és az Aurora kinázokkal (137), 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 antigénprezentációt, ezáltal jelentős szerepet játszik az autoimmunitás kialakulásában (138). A *KDM6B* eliminálja az erős represszív epigenetikus transzkripciós jeleket (azaz a hiszton H3 K27 tri-metilációt), fokozott expressziója a makrofág aktivációban játszik szerepet (139).

Bár az összes fent említett enzimet elsősorban hisztonmódosítónak tekintik, számos tanulmány szerint más intracelluláris fehérjéket is megcélozhatnak. Például a *NEK6* képes foszforilálni a *STAT3* transzkripciós faktort (140), amelyről ismert, hogy szerepet játszik az IL-6 citokincsalád indukciójában (141,142). 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-sejtjeiben körülbelül kétszer akkora expressziót észleltünk, ami arra utal, hogy a patológus mértékben fokozott Aurora kináz expresszió a B-sejtjeire jellemző. Az Aurora kinázok a hiszton H3 foszforilációjával fokozzák a B-sejtje 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 (135) 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-sejtje eliminációját a B-sejtje apoptózisának indukciójával. Az autoantitestek szintjének jelentős csökkenését nem figyeltük meg a B-sejtje 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-sejtje 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 (27).

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.

7 KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS KLINIKAI JELENTŐSÉG

A RA kórfolyamatának jobb megértése lehetővé teszi új terápiás stratégiák fejlesztését. Bár egyre többet tudunk a genetikai és környezeti tényezők szerepéről a RA etiopatogenezisében, számos kérdés vár még tisztázásra.

Az utóbbi évtizedekben új perspektívák nyíltak a reumatológiai gyógyszerfejlesztésben, ugyanakkor továbbra is számos esetben tapasztalható terápiás hatástalanság vagy éppen olyan súlyos gyógyszer mellékhatás, amely a kezelés elhagyását teszi szükségessé. Következésképp továbbra is óriási szükség van az új terápiás lehetőségekre.

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, cytokin, adhéziós molekula, integrin és interferon gének esetén igazolt a vaszkuláris patológiával összefüggésbe hozható eltérő expressziós mintázatot. A TNF-gátlókra adott válasszal összefüggésben immunoglobulin, HLA, cytokin, 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 enzimcsaládot, 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 IRODALOMJEGYZÉK

1. Alamanos Y, Drosos AA: **Epidemiology of adult rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 2005;4(3):130-6.
2. Cooles FA, Isaacs JD: **Pathophysiology of rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2011;23(3):233-40.
3. Klareskog L, Padyukov L, Lorentzen J, Alfredsson L: **Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(8):425-33.
4. Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z: **Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review.** *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 45(2):170-9.
5. Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L: **Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases.** *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(1):49-54.
6. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L: **A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2004;50(10):3085-92.
7. van der Woude D, Alemayehu WG, Verduijn W, de Vries RR, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TW, Toes RE: **Gene-environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis.** *Nat Genet* 2010; 42(10):814-6; author reply 816.
8. Szodoray P, Szabó Z, Kapitány A, Gyetvai A, Lakos G, Szántó S, Szücs G, Szekanecz Z: **Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 2010;9(3):140-3.

9. Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Végvári A, Sipka S, Szücs G, Szántó S, Lakos G: **Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets?** *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34(1):26-31.
10. Ballestar E: **Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases.** *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:263–71.
11. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ: **Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.** *Arthritis Rheum* 2000;43(1):30-7.
12. Kapitány A, Zilahi E, Szántó S, Szücs G, Szabó Z, Végvári A, Rass P, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z: **Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary.** *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:263-70.
13. van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW: **Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(3):299-304.
14. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: **The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1987;30(11):1205-13.
15. du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, Pierlot C, Quillet P, Bardin T, Prum B, Cornelis F, Clerget-Darpoux F: **New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility.** *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1063-8.
16. Gyetvai A, Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Teodorescu M, Sipka S, Szegedi G, Lakos G: **New classification of the shared epitope in rheumatoid arthritis: impact on the production of various anti-citrullinated protein antibodies.** *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(1):25-33.
17. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A,

- Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK: **TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genome-wide study.** *N Engl J Med* 2007;357(12):1199-209.
18. Faragó B, Magyari L, Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maász A, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirják L, Melegh B: **Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis.** *Ann Rheum Dis* 2008;67(2):248-50.
19. Farago B, Talian GC, Komlosi K, Nagy G, Berki T, Gyetvai A, Szekanecz Z, Nyarady Z, Kiss CG, Nemeth P, Czirjak L, Melegh B: **Protein tyrosine phosphatase gene C1858T allele confers risk for rheumatoid arthritis in Hungarian subjects.** *Rheumatol Int* 2009;29(7):793-6.
20. Besenyei T, Gyetvai A, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Szodoray P, Laki J, Soós L, Sipka S, Szegedi G, Lakos G, Szekanecz Z: **Associations of HLA-shared epitope, anti-citrullinated peptide antibodies and lifestyle-related factors in Hungarian patients with rheumatoid arthritis: data from the first Central-Eastern European cohort.** *Joint Bone Spine* 2011;78(6):652-3.
21. Szekanecz Z, Koch AE: **Update on synovitis.** *Curr Rheumatol Rep* 2001;3(1):53-63.
22. Weissmann G: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006;64(1-2):12-5.
23. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH: **The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1992;35(7):729-35.
24. Wehrens EJ, Prakken BJ, van Wijk F: **T cells out of control--impaired immune regulation in the inflamed joint.** *Nat Rev Rheumatol* 2013;9(1):34-42.

25. Kobezda T, Ghassemi-Nejad S, Mikecz K, Glant TT, Szekanecz Z: **Of mice and men: how animal models advance our understanding of T-cell function in RA.** *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(3):160-70.
26. Law SC, Street S, Yu CH, Capini C, Ramnорuth S, Nel HJ, van Gorp E, Hyde C, Lau K, Pahau H, Purcell AW, Thomas R: **T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles.** *Arthritis Res Ther* 2012;14(3):R118.
27. Nakken B, Munthe LA, Konttinen YT, Sandberg AK, Szekanecz Z, Alex P, Szodoray P: **B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis--current concepts and future perspectives.** *Autoimmun Rev* 2011;11(1):28-34.
28. Bjelle A, Norberg B, Sjögren G: **The cytology of joint exudates in rheumatoid arthritis. Morphology and preparation techniques.** *Scand J Rheumatol* 1982;11(2):124-8.
29. Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE: **Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis.** *Front Biosci (Elite Ed)* 2009;1:44-51.
30. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE: **Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study.** *Br J Rheumatol* 1993;32(10):903-7.
31. Karlson EW, Deane K: **Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 2012;38(2):405-26.
32. Costenbader KH, Gay S, Alarcón-Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A: **Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases?** *Autoimmun Rev* 2012;11(8):604-9.
33. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS: **DNA methylome signature in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2013;72(1):110-7.

34. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, Reinius L, Acevedo N, Taub M, Ronninger M, Shchetynsky K, Scheynius A, Kere J, Alfredsson L, Klareskog L, Ekström TJ, Feinberg AP: **Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis.** *Nat Biotechnol* 2013;31(2):142-7.
35. Van Doornum S, Mc Coll G, Wicks IP: **Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis?** *Arthritis Rheum* 2002;46:862–73.
36. Hollan I, Meroni PL, Ahearn JM, Cohen Tervaert JW, Curran S, Goodyear CS, Hestad KA, Kahaleh B, Riggio M, Shields K, Wasko MC: **Cardiovascular disease in autoimmune rheumatic diseases.** *Autoimmun Rev* 2013;12(10):1004-15.
37. Sherer Y, Shoenfeld Y: **Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(2):99-106.
38. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, McInnes IB, Haentzschel H, Gonzalez-Gay MA, Provan S, Semb A, Sidiropoulos P, Kitas G, Smulders YM, Soubrier M, Szekanecz Z, Sattar N, Nurmohamed MT: **EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2010;69(2):325-31.
39. Del Rincón I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A: **Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects.** *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1833-40.

40. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJ, Kvien TK, Dougados M, Radner H, Atzeni F, Primdahl J, Södergren A, Wallberg Jonsson S, van Rompay J, Zabalán C, Pedersen TR, Jacobsson L, de Vlam K, Gonzalez-Gay MA, Semb AG, Kitas GD, Smulders YM, Szekanecz Z, Sattar N, Symmons DP, Nurmohamed MT: **EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update.** *Ann Rheum Dis* 2017;76(1):17-28
41. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G: **2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis* 2010;69(9):1580-8.
42. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gossec L, Nam J, Ramiro S, Winthrop K, de Wit M, Aletaha D, Betteridge N, Bijlsma JW, Boers M, Buttgerit F, Combe B, Cutolo M, Damjanov N, Hazes JM, Kouloumas M, Kvien TK, Mariette X, Pavelka K, van Riel PL, Rubbert-Roth A, Scholte-Voshaar M, Scott DL, Sokka-Isler T, Wong JB, van der Heijde D: **EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update.** *Ann Rheum Dis* 2014;73(3):492-509.
43. Szekanecz Z, Szamosi Sz: **A rheumatoid arthritis kezelése szintetikus és biológiai betegségmódosító gyógyszerekkel. (Az EULAR terápiás ajánlásának 2013-as megújítása).** *Immunol Szle* 2014;VI(1-2):59-65.

44. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, Kvien TK, Navarro-Compán MV, Oliver S, Schoels M, Scholte-Voshaar M, Stamm T, Stoffer M, Takeuchi T, Aletaha D, Andreu JL, Aringer M, Bergman M, Betteridge N, Bijlsma H, Burkhardt H, Cardiel M, Combe B, Durez P, Fonseca JE, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Graninger W, Hannonen P, Haraoui B, Kouloumas M, Landewe R, Martin-Mola E, Nash P, Ostergaard M, Östör A, Richards P, Sokka-Isler T, Thorne C, Tzioufas AG, van Vollenhoven R, de Wit M, van der Heijde D: **Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force.** *Ann Rheum Dis* 2016;75(1):3-15.
45. Szekanecz Z, Szántó S, Szabó Z, Vánca A, Szamosi S, Bodnár N, Szücs G: **Biologics - beyond the joints.** *Autoimmun Rev* 2010;9(12):820-4.
46. Cronstein BN: **Pharmacogenetics in the rheumatic diseases, from pret-a-porter to haute couture.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(1):2-3.
47. Davila L, Ranganathan P: **Pharmacogenetics: implications for therapy in rheumatic diseases.** *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(9):537-550.
48. Simkovics E, Gal, I., Szekanecz, Z: **Farmakogenetika és farmakogenomika a reumatológiában.** *Magyar Reumatol* 2007;48:20-9.
49. Szekanecz Z, Meskó B, Poliska S, Vánca A, Szamosi S, Végh E, Simkovics E, Laki J, Kurkó J, Besenyi T, Mikecz K, Glant TT, Nagy L: **Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology.** *Immunol Res* 2013;56(2-3):325-33.
50. Szekanecz Z: **Farmakogenomika és biológiai terápia.** *Figyelő* 2011;1/3:4-6.

51. Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC: **Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins.** *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(6):796-805.
52. Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J, El-Rifai W: **Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics?** *Mol Cancer Ther* 2010;9(2):268-78.
53. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, et al: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001;409(6822):860-921.
54. Lessard CJ, Ice JA, Adrianto I, Wiley GB, Kelly JA, Gaffney PM, Montgomery CG, Moser KL: **The genomics of autoimmune disease in the era of genome-wide association studies and beyond.** *Autoimmun Rev* 2012;11(4):267-75.
55. van den Berg WB: **Lessons from animal models of arthritis over the past decade.** *Arthritis Res Ther* 2009;11(5):250.
56. Ahlqvist E, Hultqvist M, Holmdahl R: **The value of animal models in predicting genetic susceptibility to complex diseases such as rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2009;11(3):226.
57. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP: **Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis?** *Arthritis Rheum* 2010;62(8):2192-205.

58. Glant TT, Adarichev VA, Boldizsar F, Besenyei T, Laszlo A, Mikecz K, Rauch TA: **Disease-promoting and -protective genomic loci on mouse chromosomes 3 and 19 control the incidence and severity of autoimmune arthritis.** *Genes Immun* 2012;13(4):336-45.
59. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL: **Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria.** *Arthritis Rheum* 1996;39(1):34-40.
60. Kerekes G, Szekanecz Z, Dér H, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipő I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomják E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P: **Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity.** *J Rheumatol* 2008;35(3):398-406.
61. Soltész P, Dér H, Kerekes G, Szodoray P, Szücs G, Dankó K, Shoenfeld Y, Szegedi G, Szekanecz Z: **A comparative study of arterial stiffness, flow-mediated vasodilation of the brachial artery, and the thickness of the carotid artery intima-media in patients with systemic autoimmune diseases.** *Clin Rheumatol* 2009;28(6):655-62.
62. Timár O, Soltész P, Szamosi S, Dér H, Szántó S, Szekanecz Z, Szücs G: **Increased arterial stiffness as the marker of vascular involvement in systemic sclerosis.** *J Rheumatol* 2008;35(7):1329-33.

63. Mikecz K, Glant TT, Poole AR: **Immunity to cartilage proteoglycans in BALB/c mice with progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis induced by injection of human cartilage proteoglycan.** *Arthritis Rheum* 1987;30(3):306-18.
64. Glant TT, Mikecz K: **Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis.** *Methods Mol Med* 2004;102:313-38.
65. Glant TT, Radacs M, Nagyeri G, Olasz K, Laszlo A, Boldizsar F, Hegyi A, Finnegan A, Mikecz K: **Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2011;63(5):1312-21.
66. Mikecz K, Brennan FR, Kim JH, Glant TT: **Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis.** *Nat Med* 1995;1(6):558-63.
67. Adarichev VA, Valdez JC, Bárdos T, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: **Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci.** *J Immunol* 2003;170(5):2283-92.
68. Myers LK, Seyer JM, Stuart JM, Kang AH: **Suppression of murine collagen-induced arthritis by nasal administration of collagen.** *Immunology* 1997;90(2):161-4.
69. Glant TT, Adarichev VA, Nesterovitch AB, Szanto S, Oswald JP, Jacobs JJ, Firneisz G, Zhang J, Finnegan A, Mikecz K: **Disease-associated qualitative and quantitative trait loci in proteoglycan-induced arthritis and collagen-induced arthritis.** *Am J Med Sci* 2004;327(4):188-95.
70. Yang D, Liu H, Goga A, Kim S, Yuneva M, Bishop JM: **Therapeutic potential of a synthetic lethal interaction between the MYC proto-oncogene and inhibition of aurora-B kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(31):13836-41.

71. Glant TT, Finnegan A, Mikecz K: **Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics.** *Crit Rev Immunol* 2003;23(3):199-250.
72. Popovic M, Ahlqvist E, Rockenbauer E, Bockermann R, Holmdahl R: **Identification of new loci controlling collagen-induced arthritis in mouse using a partial advanced intercross and congenic strains.** *Scand J Immunol* 2008;68(4):405-13.
73. Yu X, Bauer K, Koczan D, Thiesen HJ, Ibrahim SM: **Combining global genome and transcriptome approaches to identify the candidate genes of small-effect quantitative trait loci in collagen-induced arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2007;9(1):R3.
74. Yu X, Teng H, Marques A, Ashgari F, Ibrahim SM: **High resolution mapping of Cia3: a common arthritis quantitative trait loci in different species.** *J Immunol* 2009;182(5):3016-23.
75. Bauer K, Yu X, Wernhoff P, Koczan D, Thiesen HJ, Ibrahim SM: **Identification of new quantitative trait loci in mice with collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3721-8.
76. Yu X, Bauer K, Wernhoff P, Koczan D, Möller S, Thiesen HJ, Ibrahim SM: **Fine mapping of collagen-induced arthritis quantitative trait loci in an advanced intercross line.** *J Immunol* 2006;177(10):7042-9.
77. Johannesson M, Olsson LM, Lindqvist AK, Möller S, Koczan D, Wester-Rosenlöf L, Thiesen HJ, Ibrahim S, Holmdahl R: **Gene expression profiling of arthritis using a QTL chip reveals a complex gene regulation of the Cia5 region in mice.** *Genes Immun* 2005;6(7):575-83.
78. Lindvall T, Karlsson J, Holmdahl R, Andersson A: **Dissection of a locus on mouse chromosome 5 reveals arthritis promoting and inhibitory genes.** *Arthritis Res Ther* 2009;11(1):R10.

79. Ibrahim SM, Koczan D, Thiesen HJ: **Gene-expression profile of collagen-induced arthritis.** *J Autoimmun* 2002;18(2):159-67.
80. Gulko PS, Kawahito Y, Remmers EF, Reese VR, Wang J, Dracheva SV, Ge L, Longman RE, Shepard JS, Cannon GW, Sawitzke AD, Wilder RL, Griffiths MM: **Identification of a new non-major histocompatibility complex genetic locus on chromosome 2 that controls disease severity in collagen-induced arthritis in rats.** *Arthritis Rheum* 1998;41(12):2122-31.
81. Kawahito Y, Remmers EF, Wilder RL, Longman RE, Gulko PS, Wang J, Chen S, Chang L, Reese VR, Dracheva S, Ge L, Hoffman JH, Shepard J, Cannon GW, Griffiths MM: **A genetic linkage map of rat chromosome 20 derived from five F2 crosses.** *Immunogenetics* 1998;48(5):335-8.
82. Shepard JS, Remmers EF, Chen S, Chang L, Kawahito Y, Gulko PS, Joe B, Longman RE, Dracheva S, Ge L, Wang J, Reese VR, Cannon GW, Griffiths MM, Wilder RL: **A genetic linkage map of rat Chromosome 15 derived from five F2 crosses.** *Mamm Genome* 1999;10(2):186-8.
83. Joe B, Remmers EF, Dobbins DE, Salstrom JL, Furuya T, Dracheva S, Gulko PS, Cannon GW, Griffiths MM, Wilder RL: **Genetic dissection of collagen-induced arthritis in Chromosome 10 quantitative trait locus speed congenic rats: evidence for more than one regulatory locus and sex influences.** *Immunogenetics* 2000;51(11):930-44.
84. Wester L, Olofsson P, Ibrahim SM, Holmdahl R: **Chronicity of pristane-induced arthritis in rats is controlled by genes on chromosome 14.** *J Autoimmun* 2003;21(4):305-13.
85. Wester L, Koczan D, Holmberg J, Olofsson P, Thiesen HJ, Holmdahl R, Ibrahim S: **Differential gene expression in pristane-induced arthritis susceptible DA versus resistant E3 rats.** *Arthritis Res Ther* 2003;5(6):R361-72.

86. Jensen JR, Peters LC, Borrego A, Ribeiro OG, Cabrera WH, Starobinas N, Siqueira M, Ibañez OC, De Franco M: **Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse.** *Genes Immun* 2006;7(1):44-50.
87. Otto JM, Cs-Szabó G, Gallagher J, Velins S, Mikecz K, Buzás EI, Enders JT, Li Y, Olsen BR, Glant TT: **Identification of multiple loci linked to inflammation and autoantibody production by a genome scan of a murine model of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999;42(12):2524-31.
88. Glant TT, Szántó S, Vegvari A, Szabo Z, Kis-Toth K, Mikecz K, Adarichev VA: **Two loci on chromosome 15 control experimentally induced arthritis through the differential regulation of IL-6 and lymphocyte proliferation.** *J Immunol* 2008;181(2):1307-14.
89. Ahlqvist E, Bockermann R, Holmdahl R: **Fragmentation of two quantitative trait loci controlling collagen-induced arthritis reveals a new set of interacting subloci.** *J Immunol* 2007;178(5):3084-90.
90. Liljander M, Sällström MA, Andersson S, Andersson A, Holmdahl R, Mattsson R: **Identification of collagen-induced arthritis loci in aged multiparous female mice.** *Arthritis Res Ther* 2006;8(2):R45.
91. Adarichev VA, Nesterovitch AB, Bárdos T, Bieszczał D, Chandrasekaran R, Vermes C, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: **Sex effect on clinical and immunologic quantitative trait loci in a murine model of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003;48(6):1708-20.
92. Otto JM, Chandrasekeran R, Vermes C, Mikecz K, Finnegan A, Rickert SE, Enders JT, Glant TT: **A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 2000;165(9):5278-86.

93. Johannesson M, Karlsson J, Wernhoff P, Nandakumar KS, Lindqvist AK, Olsson L, Cook AD, Andersson A, Holmdahl R: **Identification of epistasis through a partial advanced intercross reveals three arthritis loci within the Cia5 QTL in mice.** *Genes Immun* 2005;6(3):175-85.
94. Firneisz G, Zehavi I, Vermes C, Hanyecz A, Frieman JA, Glant TT: **Identification and quantification of disease-related gene clusters.** *Bioinformatics* 2003;19(14):1781-6.
95. Yang HT, Jirholt J, Svensson L, Sundvall M, Jansson L, Pettersson U, Holmdahl R: **Identification of genes controlling collagen-induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat.** *J Immunol* 1999;163(5):2916-21.
96. Van Houten N, Blake SF: **Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction.** *J Immunol* 1996;157(4):1337-41.
97. Studelska DR, Mandik-Nayak L, Zhou X, Pan J, Weiser P, McDowell LM, Lu H, Liapis H, Allen PM, Shih FF, Zhang L: **High affinity glycosaminoglycan and autoantigen interaction explains joint specificity in a mouse model of rheumatoid arthritis.** *J Biol Chem* 2009;284(4):2354-62.
98. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, Li Y, Kurreeman FA, Zhernakova A, Hinks A, et al: **Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci.** *Nat Genet* 2010;42(6):508-14.
99. Coenen MJ, Gregersen PK: **Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape.** *Genes Immun* 2009;10(2):101-11.
100. Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Gibbons L, Plant D; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P; YEAR consortium, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Worthington J: **Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility.** *Hum Mol Genet* 2008;17(15):2274-9.

101. Hughes LB, Reynolds RJ, Brown EE, Kelley JM, Thomson B, Conn DL, Jonas BL, Westfall AO, Padilla MA, Callahan LF, Smith EA, Brasington RD, Edberg JC, Kimberly RP, Moreland LW, Plenge RM, Bridges SL Jr.: **Most common single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis in persons of European ancestry confer risk of rheumatoid arthritis in African Americans.** *Arthritis Rheum* 2010;62(12):3547-53.
102. Cui J, Saevarsdottir S, Thomson B, Padyukov L, van der Helm-van Mil AH, Nititham J, Hughes LB, de Vries N, Raychaudhuri S, Alfredsson L, Askling J, Wedrén S, Ding B, Guiducci C, Wolbink GJ, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Herenius M, Weinblatt ME, Shadick NA, Worthington J, Batliwalla F, Kern M, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Hyrich K, Seldin MF, Moreland LW, Behrens TW, Allaart CF, Criswell LA, Huizinga TW, Tak PP, Bridges SL Jr, Toes RE, Barton A, Klareskog L, Gregersen PK, Karlson EW, Plenge RM: **Rheumatoid arthritis risk allele PTPRC is also associated with response to anti-tumor necrosis factor alpha therapy.** *Arthritis Rheum* 2010;62(7):1849-61.
103. Thompson SD, Sudman M, Ramos PS, Marion MC, Ryan M, Tsoras M, Weiler T, Wagner M, Keddache M, Haas JP, Mueller C, Prahalad S, Bohnsack J, Wise CA, Punaro M, Zhang D, Rosé CD, Comeau ME, Divers J, Glass DN, Langefeld CD: **The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1.** *Arthritis Rheum* 2010;62(11):3265-76.
104. Morgan AW, Robinson JI, Conaghan PG, Martin SG, Hensor EM, Morgan MD, Steiner L, Erlich HA, Gooi HC, Barton A, Worthington J, Emery P; UKRAG Consortium; YEAR Consortium: **Evaluation of the rheumatoid arthritis susceptibility loci HLA-DRB1, PTPN22, OLIG3/TNFAIP3, STAT4 and TRAF1/C5 in an inception cohort.** *Arthritis Res Ther* 2010;12(2):R57.
105. Freudenberg J, Lee HS, Han BG, Shin HD, Kang YM, Sung YK, Shim SC, Choi CB, Lee AT, Gregersen PK, Bae SC: **Genome-wide association study of rheumatoid**

- arthritis in Koreans: population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci.** *Arthritis Rheum* 2011;63(4):884-93.
106. Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P: **Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases.** *Mol Cell Biol* 2002;22(3):874-85.
107. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM: **VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo.** *Nat Med* 2004;10(3):262-7.
108. Gizatullin F, Yao Y, Kung V, Harding MW, Loda M, Shapiro GI: **The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function.** *Cancer Res* 2006;66(15):7668-77.
109. Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L: **PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(4):1931-6.
110. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Martin J, Llorca J: **Endothelial dysfunction, carotid intima-media thickness, and accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis.** *Semin Arthritis Rheum* 2008;38(2):67-70.
111. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, Jara LJ, Abu-Shakra M, Meroni PL, Sherer Y: **Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases.** *Circulation* 2005;112(21):3337-47.
112. de Vries R: **Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change!** *Curr Opin Rheumatol* 2011;23(3):227-32.
113. Lusis AJ: **Genetics of atherosclerosis.** *Trends Genet* 2012;28(6):267-75.

114. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ, Piñeiro A, Garcia-Porrúa C, Miranda-Filloy JA, Ollier WE, Martin J, Llorca J: **HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2007;57(1):125-32.
115. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AF, Barbalic M, Gieger C, et al: **Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease.** *Nat Genet* 2011;43(4):333–8.
116. Farragher TM, Goodson NJ, Naseem H, Silman AJ, Thomson W, Symmons D, Barton A: **Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis.** *Arthritis Rheum* 2008;58(2):359-69.
117. Remuzgo-Martínez S, Genre F, López-Mejías R, Ubilla B, Mijares V, Pina T, Corrales A, Blanco R, Martín J, Llorca J, González-Gay MA: **Expression of osteoprotegerin and its ligands, RANKL and TRAIL, in rheumatoid arthritis.** *Sci Rep* 2016;6:29713.
118. López-Mejías R, Castañeda S, González-Juanatey C, Corrales A, Ferraz-Amaro I, Genre F, Remuzgo-Martínez S, Rodríguez-Rodríguez L, Blanco R, Llorca J, Martín J, González-Gay MA: **Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers.** *Autoimmun Rev* 2016;15(11):1013-1030.
119. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Ollier WE, Martin J: **Contribution of HLA-DRB1 shared epitope alleles and chronic inflammation to the increased incidence of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: comment on the article by Farragher et al.** *Arthritis Rheum* 2008;58(8):2584; author reply 2584-5.
120. van Diepen JA, Jansen PA, Ballak DB, Hijmans A, Rutjes FP, Tack CJ, Netea MG, Schalkwijk J, Stienstra R: **Genetic and pharmacological inhibition of vanin-1 activity in animal models of type 2 diabetes.** *Sci Rep* 2016;6:21906.

121. Hu YW, Wu SG, Zhao JJ, Ma X, Lu JB, Xiu JC, Zhang Y, Huang C, Qiu YR, Sha YH, Gao JJ, Wang YC, Li SF, Zhao JY, Zheng L, Wang Q: **VNN1 promotes atherosclerosis progression in apoE^{-/-} mice fed a high-fat/high-cholesterol diet.** *J Lipid Res* 2016;57(8):1398-411.
122. García-Bermúdez M, López-Mejías R, Genre F, Castañeda S, Llorca J, González-Juanatey C, Corrales A, Ubilla B, Miranda-Filloo JA, Pina T, Gómez-Vaquero C, Rodríguez-Rodríguez L, Fernández-Gutiérrez B, Balsa A, Pascual-Salcedo D, López-Longo FJ, Carreira P, Blanco R, Martín J, González-Gay MA: **Interferon regulatory factor 5 genetic variants are associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2014;16(4):R146.
123. Trysberg E, Nylen K, Rosengren LE, Tarkowski A: **Neuronal and astrocytic damage in systemic lupus erythematosus patients with central nervous system involvement.** *Arthritis Rheum* 2003;48(10):2881-7.
124. Grönblad M, Konttinen YT, Korkala O, Liesi P, Hukkanen M, Polak JM: **Neuropeptides in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.** *J Rheumatol* 1988;15(12):1807-10.
125. Li N, Ma J, Li K, Guo C, Ming L: **Different Contributions of CDKAL1, KIF21B, and LRRK2/MUC19 Polymorphisms to SAPHO Syndrome, Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Seronegative Spondyloarthropathy.** *Genet Test Mol Biomarkers* 2017;21(2):122-126.
126. Dooley S, Herlitzka I, Hanselmann R, Ermis A, Henn W, Remberger K, Hopf T, Welter C: **Constitutive expression of c-fos and c-jun, overexpression of ets-2, and reduced expression of metastasis suppressor gene nm23-H1 in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1996;55(5):298-304.
127. Sozen E, Karademir B, Yazgan B, Bozaykut P, Ozer NK: **Potential role of proteasome on c-jun related signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis.** *Redox Biol* 2014;2:732-8.

128. Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS: **Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis.** *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(1):124-30.
129. Kwok KHM, Cheng KKY, Hoo RLC, Ye D, Xu A, Lam KSL: **Adipose-specific inactivation of JNK alleviates atherosclerosis in apoE-deficient mice.** *Clin Sci (Lond)* 2016;130(22):2087-2100.
130. Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M: **Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Nat Rev Rheumatol* 2009;5(5):266-72.
131. Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M: **DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheum* 2009;60(12):3613-22.
132. Huber LC, Brock M, Hemmatzad H, Giger OT, Moritz F, Trenkmann M, Distler JH, Gay RE, Kolling C, Moch H, Michel BA, Gay S, Distler O, Jüngel A: **Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients.** *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1087-93.
133. Meinecke I, Cinski A, Baier A, Peters MA, Dankbar B, Wille A, Drynda A, Mendoza H, Gay RE, Hay RT, Ink B, Gay S, Pap T: **Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(12):5073-8.
134. Ospelt C, Gay S: **The role of resident synovial cells in destructive arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22(2):239-52.
135. Wolter S, Doerrie A, Weber A, Schneider H, Hoffmann E, von der Ohe J, Bakiri L, Wagner EF, Resch K, Kracht M: **c-Jun controls histone modifications, NF-kappaB recruitment, and RNA polymerase II function to activate the ccl2 gene.** *Mol Cell Biol* 2008;28(13):4407-23.
136. Levy D, Kuo AJ, Chang Y, Schaefer U, Kitson C, Cheung P, Espejo A, Zee BM, Liu CL, Tangsombatvisit S, Tennen RI, Kuo AY, Tanjing S, Cheung R, Chua KF, Utz PJ, Shi X, Prinjha RK, Lee K, Garcia BA, Bedford MT, Tarakhovsky A, Cheng X, Gozani

- O: Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling.** *Nat Immunol* 2011;12(1):29-36.
137. Levy D, Liu CL, Yang Z, Newman AM, Alizadeh AA, Utz PJ, Gozani O: **A proteomic approach for the identification of novel lysine methyltransferase substrates.** *Epigenetics Chromatin* 2011;4:19.
138. Villagra A, Cheng F, Wang HW, Suarez I, Glozak M, Maurin M, Nguyen D, Wright KL, Atadja PW, Bhalla K, Pinilla-Ibarz J, Seto E, Sotomayor EM: **The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance.** *Nat Immunol* 2009;10(1):92-100.
139. Satoh T, Takeuchi O, Vandenberg A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S: **The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection.** *Nat Immunol* 2010;11(10):936-44.
140. Jeon YJ, Lee KY, Cho YY, Pugliese A, Kim HG, Jeong CH, Bode AM, Dong Z: **Role of NEK6 in tumor promoter-induced transformation in JB6 C141 mouse skin epidermal cells.** *J Biol Chem* 2010;285(36):28126-33.
141. Kishimoto T: **IL-6: from its discovery to clinical applications.** *Int Immunol* 2010;22(5):347-52.
142. Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, Asakawa M, Kawasumi M, Kobayashi T, Morioka H, Chiba K, Toyama Y, Yoshimura A: **IL-1 β and TNF α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis.** *Int Immunol* 2011;23(11):701-12.

9 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 többlethalálzásának 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 egérekromoszómán lévő *Pgia26* (az emberi 1-es kromoszómán lévő *PTPN22/CD2*-nek felel meg) és a 2-es egérekromoszómán 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 expressziós 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 expressziós mintázat, de citokin-, chemokin- és interferongének is voltak az érintettek között.

3. vizsgálat

Elsőként azonosítottuk az összes kromatin módosító enzimes családot, 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 arthritisszel specifikusnak bizonyult. A VX-680-nal végzett preventív kezelés sikeresen késleltette az arthritisszel kialakulását, míg a terápiás alkalmazás jelentősen csökkentette annak súlyosságát. Mindez azt engedni sejtetni, hogy ez a reumatológiai gyógyszerfejlesztés egy ígéretes új iránya lehet.

10 SUMMARY

The main characteristic of RA is chronic synovitis that may lead to joint destruction, thus pain, disability and deterioration of life quality. Moreover RA is associated with accelerated atherosclerosis, the primary cause of increased mortality in RA. Genetics, environment and autoimmunity is involved in the pathogenesis of RA; there is also growing evidence about the contribution of epigenetic factors. Although this is a thoroughly studied and very important field of science, many aspects of RA etiopathogenesis are yet to be clarified. The prevalence and the burden of the disease make a highly effective treatment necessary and there is still a huge demand of new therapeutic possibilities.

This thesis consists of 3 studies investigating the background and the treatment of rheumatoid arthritis. We evaluated RA risk alleles in humans and in corresponding animal models (Study 1). We performed gene expression analysis of vascular pathophysiology in RA patients (Study 2). We investigated arthritis-associated epigenetic factors and the therapeutic opportunities in their targeted inhibition (Study 3).

Our observations are summarized below:

Study 1

Detailed examination of *Pgia26* locus on mChr3 (corresponding to the *PTPN22/CD2* allele on human Chr1) and *Pgia2* locus on mChr2 (corresponding to the *TRAF1/C5* allele on human Chr9) revealed a few RA risk alleles, some of these had not been formerly associated with arthritis.

Study 2

We performed the first complex genomic study regarding RA-associated cardiovascular pathophysiology, along with clinical and vascular response to anti-TNF treatment. The differentially expressed genes we found in association with vascular pathophysiology primarily included MHC-related ones, but there were also cytokine-, adhesion molecule-, integrin- and interferon-related genes among them. With regard to the clinical and vascular response to anti-TNF therapy, the differential expression was observed principally in immunoglobulin- and

HLA-related genes, among the other affected genes there were cytokine-, chemokine- and interferon-related ones.

Study 3

We were the first to identify all major chromatin-modifying enzyme families that can be involved in autoimmune arthritis. Aurora kinase A and B were chosen for further analyses because these encode the best characterized histone-modifying enzymes out of them. The increased expression of the Aurora kinases proved to be arthritis specific. Preventive treatment with VX-680 delayed the onset, while therapeutic application significantly diminished the severity of arthritis, suggesting that it can be a promising new direction of antirheumatic drug development.

11 KÖZLEMÉNYEK

11.1 Közlemények listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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., Vánca, 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.



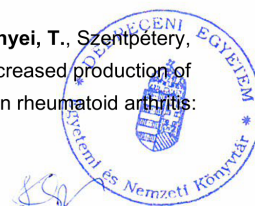
További közlemények

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.**, Trynieszewska, 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'angiogenése 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.



11.2 Konferencia absztraktok

Vida, A., **Besenyei, T.**, Tryniszewska, B., Ocsko, T., Szekanecz, Z., Rauch, T.A., Mikecz, K.: Arthritis associated sequence alterations within a genetic susceptibility region of mouse chromosome 3; a genomic region which is syntenic with a prominent non-MHC locus in rheumatoid arthritis. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2013, San Diego, CA, USA. Arthritis Rheum 2013; 65 Suppl 10: 1896.

Besenyei, T., Kurko, J., Mikecz, K., Glant, T. T., Rauch, T. A.: Selective inhibition of epigenetic factors provide potential new tools for arthritis therapy. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2011, Chicago, IL. Arthritis Rheum 2011; 63 Suppl 10: 1928.

Besenyei, T., Kadar, A., Tryniszewska, B., Adarichev, V. A., Mikecz, K., Glant, T. T.: Narrowing the *Protein Tyrosine Phosphatase-22* locus in mice with cartilage proteoglycan-induced arthritis explores disease-promoting and disease-suppressive sub-loci neutralizing their *in vivo* arthritis susceptibility and severity. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2011, Chicago, IL. Arthritis Rheum 2011; 63 Suppl 10: 1921.

Kurko, J, Egelston, C., **Besenyei, T.**, Tryniszewska, B., Kobezda, T., Rauch, T. A., Glant T. T., Mikecz, K.: Myeloid-derived suppressor cells present in the synovial fluid of mice with proteoglycan-induced arthritis are potent suppressors of dendritic cell maturation and T cell proliferation. Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 2011, Chicago, IL. Arthritis Rheum 2011; 63 Suppl 10: 1008.

Besenyei T., Váróczy L., Szekanecz Z., Zehner M., Szegedi G., Szamosi Sz.: Autológ őssejt-transzplantáció alkalmazása terápia-refrakter rheumatoid arthritisben. Magyar Reumatológusok Egyesülete Vándorgyűlése, 2009, Kecskemét. Magyar Reumatológia, 2009, 50, 162-163.

Besenyei T., Szamosi Sz., Váróczy L., Szűcs G.: Fialat sclerodermás betegünk acutan jelentkező cervicalis fájdalma. Magyar Reumatológusok Egyesülete Ifjúsági Fóruma, 2008, Hajdúszoboszló. Magyar Reumatológia, 2009, 50, 29–30.

Besenyei T., Nagy K.: Derékfájás differenciáldiagnosztikája egy eset kapcsán. Magyar Reumatológusok Egyesülete Vándorgyűlése, 2008, Budapest. Magyar Reumatológia, 2008, 49, 171.

Simkovics E., **Besenyei T.**, Szabó Z., Szentpétery Á., Szodoray P., Szűcs G., Szántó S., Szekanecz Z.: Első hazai tapasztalatok a rheumatoid arthritis rituximab kezelésével. Magyar Reumatológusok Egyesülete Vándorgyűlése, 2007, Szeged. Magyar Reumatológia, 2007, 48 170-171.

Besenyei T., Bazsó A., Szántó S., Szekanecz Z., Szűcs G.: Szisztémás sclerosisban jelentkező cryoglobulinaemiás vasculitis. Magyar Reumatológusok Egyesülete Ifjúsági Fóruma, 2006, Nagyberény. Magyar Reumatológia, 2007, 48, 115.

Besenyei T., Bazsó A., Szántó S., Szekanecz Z., Szűcs G.: Szisztémás sclerosisban jelentkező cryoglobulinaemiás vasculitis. Magyar Reumatológusok Egyesülete Vándorgyűlése, 2006, Debrecen. Magyar Reumatológia, 2006, 47, 184.

Besenyei T., Szekanecz Z.: Tüdőcarcinoma rheumatoid arthritisben – két eset ismertetése. Magyar Reumatológusok Egyesülete Vándorgyűlése, 2005, Sopron. Magyar Reumatológia, 2005, 46, 169.

12 TÁRGYSZAVAK

Tárgyszavak

rheumatoid arthritis, proteoglikán-indukált arthritis, intervallum-specifikus kongenikus törzs, egy pontos nukleotid-polimorfizmus, genomika, szív- és érrendszeri betegség, biológiai terápia, epigenetika, Aurora kináz, VX-680

Keywords

rheumatoid arthritis, cartilage proteoglycan aggrecan-induced arthritis, interval-specific congenic strain, single nucleotide polymorphism, genomics, cardiovascular disease, biological therapy, epigenetics, Aurora kinase, VX-680

13 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 mindenem átsegít.