

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**SPONDYLARTHROPATHIA GENETIKAI HÁTTERÉNEK  
VIZSGÁLATA EGÉRMODELLBEN**

**DR. VÉGVÁRI ANIKÓ**



**DEBRECENI EGYETEM**  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. A HLA-B27 és más MHC gének pathogenetikai szerepe.....</b>	<b>8</b>
2.1.1. <i>A HLA-B27 jelentősége.....</i>	8
2.1.2. <i>Egyéb HLA-B allélek.....</i>	9
2.1.3. <i>A HLA-B molekulák szerepe az antigénprezentációban.....</i>	9
2.1.4. <i>Egyéb MHC gének lehetséges szerepe.....</i>	9
<b>2.2. Nem-MHC allélek SPA-ban.....</b>	<b>10</b>
2.2.1. <i>Kapcsoltsági vizsgálatok.....</i>	10
2.2.2. <i>Kandidáns gén asszociációk.....</i>	12
2.2.3. <i>Genom szintű vizsgálatok.....</i>	13
2.2.4. <i>Egyéb gének meg nem erősített asszociációi.....</i>	15
<b>2.3. SpA állatmodellek és alkalmazásuk genetikai vizsgálatokban.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Korábbi vizsgálatok a PGIS modellben.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Anyag és módszer .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Kísérleti állatok, antigének, immunizálás.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Klinikai és immunológiai fenotípusok.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Genomikus markerek.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Genomszűrés és statisztikai analízis.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Eredmények.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. A spondylitis klinikai és immunológiai jellegzetességei a szülői BALB/c és DBA/2 törzsekben.....</b>	<b>24</b>

<b>4.2. A klinikai és immunológiai „tulajdonságok” (traits) közötti korrelációk az F1 és F2 hibrid populációk esetében.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. A spondylitis kapcsolttság (linkage) analízise a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridekben.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4. A 2. és 18. kromoszómán lévő két fő klinikai QTL kölcsönhatásai.....</b>	<b>34</b>
<b>5. Megbeszélés, új eredmények .....</b>	<b>38</b>
<b>6. Összefoglalás.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Saját közlemények.....</b>	<b>56</b>
<b>10. Tárgyszavak.....</b>	<b>57</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>58</b>
<b>12. Függelék.....</b>	<b>59</b>

## Rövidítések jegyzéke:

ARTS-1 – Aminopeptidase Regulator of TNF receptor shedding -1  
BASDAI – Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index  
BASFI – Bath Ankylosing Spondylitis Functionality Index  
CII – collagen II. (II. típusú kollagén)  
cM – centimorgan  
DDA – dimethyl-dioctadecyl-ammonium bromid  
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
ERAP-1 – Endoplazmatikus Retikulum Asszociált Aminopeptidáz-1  
HLA – Human Leukocita Antigen  
IFN – interferon  
IL – interleukin  
IVD – intervertebralis discus  
LOD – logarithm of odds  
MHC – Major Histocompatibility Complex  
NASC – North American Spondylitis Consortium  
NPL – non-parametric linkage score  
NCI – National Cancer Institute  
Mbp – megabázispár  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
LRS – likelihood ratio statistics  
PG – proteoglikán  
PGIA – proteoglikán indukálta arthritis  
PGIS – proteoglikán indukálta spondylitis  
QTL – quantitative trait locus; „funkció kapcsolt lókuszt”  
RA – rheumatoid arthritis  
SAA – szérumban amyloid-A  
SNP – single nucleotide polymorphism  
SPA – spondylitis ankylopoetica  
SpA – spondylarthropathia / spondylarthritis  
SPI – spondylitis index  
SPI<sub>LS</sub> - „késői kezdetű” spondylitis pontszám  
SSLP – single sequence length polymorphism (egyszerű szekvencia hosszúság polimorfizmus)  
TGF – transforming growth factor (transzformáló növekedési faktor)  
TLR – Toll-like Receptor  
TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor – alfa  
VNTR – variable nucleotide tandem repeat  
WTCCC – Wellcome Trust Case Control Consortium

## 1. Bevezetés

A spondylitis ankylopoetica (SPA), a gyulladós reumatológiai kórképek közé tartozó, jellegzetes genetikai meghatározottsággal és klinikai sajátosságokkal bíró betegségcsoport, a spondylarthropathiák vagy spondylarthritisek (SpA) jellegzetes képviselője (1). (Itt jegyezzük meg, hogy az angolszász nomenklaturának megfelelően a spondylarthropathia csoport elfogadott rövidítése az "SpA", ellentétben az "SPA"-val, amely magát a spondylitis ankylopoeticát jelenti.) Annak ellenére, hogy a betegség etiológiája pontosan nem ismert, környezeti tényezők és genetikai faktorok együttes hatását feltételezik a háttérben (2-4,13,14).

A családi halmozódás az SPA jellegzetessége és ez a genetikai faktorok szerepét sugallja a betegség kialakulásában (2,3). Erre utal, hogy SPA-s betegek családjában további SPA-s esetek többnyire a humán leukocita antigén B27 variánsát (HLA-B27) hordozó rokonok körében fordulnak elő (4-6). SPA-s ikervizsgálatok közül egy finn tanulmányban a konkordancia 50% volt az egypetűjű ikrek között, 15% a kétpetűjű és 20% a HLA-B27<sup>+</sup> kétpetűjű ikrek között (8). Egy Nagy-Britanniában végzett vizsgálatban ezen értékek a fenti sorrendben 75, 12,5 és 27%-nak adódtak (9). A konkordancia arányok monozigóta és dizigóta ikrek között észlelt különbségei valóban a genetikai faktorok alapvető szerepét mutatják az SPA iránti fogékonyságban (9).

Az SPA és a HLA-B27 kapcsoltságának magyarázatára két alapvető elmélet ismert. A receptor teória azt feltételezi, hogy bizonyos T sejt receptorok képesek felismerni az idegen és saját MHC peptidek komplexét, de ez a feltételezett patogén peptid egyelőre nem ismert (2-4). A molekuláris mimikri hipotézis viszont arra vonatkozik, hogy mikroorganizmusok melyek részben hasonlóak, vagy keresztreakálnak

a HLA molekulákkal, antigén tulajdonságú alkotóelemek lehetnek. Az utóbbi hipotézis kapcsán elsősorban *Klebsiella* és *Yersinia* antigének szerepe vetődött fel, de az ennek megfelelő patogén mikroorganizmust eddig még nem sikerült kimutatni SPA-s betegekben (13,15-17).

A gének szerepét tekintve, a major hisztokompatibilitási komplex (MHC) önmagában nem elégséges az SPA öröklődésének magyarázatára. Amíg a kaukázusi SPA-s betegpopuláció több mint 90%-a HLA-B27<sup>+</sup>, addig a populáció HLA-B27<sup>+</sup> tagjainak csupán <5%-ában alakul ki SPA (6,9-11). A HLA-B27 összességében az SPA iránti genetikai fogékonyságnak csak mintegy 20-50%-áért felelős (8,12,13). Következésképpen kiterjedt vizsgálatok vannak folyamatban, amelyek más, nem MHC jellegű genetikai faktorok azonosítására irányulnak. Májig tucatnyi kromoszomális régiót, vagy géncsoportot hoztak összefüggésbe az SPA iránti fogékonysággal (2-4).

A nem MHC gének szerepét génkapcsoltsági vizsgálattal ("linkage analízissel"), a teljes genom szűrésével ("genome-wide screening") vagy kandidáns gén asszociációs vizsgálatokkal igyekeznek feltérképezni (2,3). Ezen lókuszok közül néhányat egymástól függetlenül több kutatócsoport is egybehangzóan leírt, így ezek patogenetikai jelentősége valószínűsíthető. Ilyen pl. az interleukin-1 (IL-1) géncsoport több tagja, melyek a 2. kromoszóma hosszú karján találhatóak (2,18). Más gének, mint pl. az ARTS1 (Aminopeptidase Regulator of TNF receptor Shedding; másik elnevezése: Endoplasmic Reticulum-associated Aminopeptidase 1; ERAP1) és az IL-23 receptor (IL-23R) gének szerepére a közelmúltban mutattak rá a Wellcome Trust Case-Control Consortium (WTCCC) kutatócsoport keretein belül. Ebben a nagyméretű, a teljes genomot elemző vizsgálatban hét gyakori kórkép génasszociációs vizsgálatát végezték el, összesen 14000

eset mintáin (19,20). Mindent egybevéve azonban még mindig jóval kevesebb információval rendelkezünk az SPA és más SpA-k genetikáját illetően, mint pl. a rheumatoid arthritis esetében.

Az egyre növekvő mennyiségű, a genetikai faktorokra vonatkozó adat ellenére, az SPA multifaktoriális betegség, ahol a gének és környezeti faktorok „konspirációja” vezet a jól ismert klinikai tünetek kialakulásához. Ezek lehetnek mind szkeletális (axiális és oligoartikuláris) és extraszkeletális manifesztációk (uveitis, gyulladáscsökkentő bélbetegség, cardialis és pulmonalis érintettség, stb.), melyek megfelelő kezelés nélkül végsősoron rokkantságot eredményezhetnek és az életkilátásokat is veszélyeztethetik.

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

## 2. Irodalmi áttekintés

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

#### 2.1.1. A HLA-B27 jelentősége

A HLA-B27 és az SPA közötti asszociációt először az 1970-es évek elején írták le (21,22). Mint láttuk, a HLA-B27 prevalenciája az átlagpopulációban 6-8%, az SPA-s betegek körében viszont >90% (3,9). A másik oldalról megközelítve a kérdést, amíg az SPA a HLA-B27<sup>+</sup> egyének 1.2-1.3%-ában alakul ki, addig az SPA-s betegek első fokú HLA-B27<sup>+</sup> rokonainak 15-21%-ában (6,23). A HLA-B27<sup>+</sup> mono-, és dizigóta ikreknél a konkordancia aránya 63% illetve 23% (8). Mindezek alapján megbecsülve, a HLA-B27 SPA-ban a genetikai rizikó mintegy 20-30%-áért felelős (8,24-26).

Bár nem kétséges, hogy a HLA-B27 az SPA fő szuszeptibilitási génje, annak mechanizmusa, hogyan jön létre a betegséget kiváltó hatás, teljesen még ma sem tisztázott. A SpA minden manifesztációja kiváltható HLA-B27 transzgén patkányokban, ami a gén közvetlen szerepét mutatja a betegségre való fogékonyság szempontjából (27). A 25 ismert HLA-B27 alléltípus közül a HLA-B\*2705, a kaukázusi populációban meghatározó allél lehet az eredeti allél, és minden más allélforma valószínűleg a HLA-B\*2705-ből származtatható, mutációk révén. Az allélmutációk legnagyobb része a variábilis régiót érinti, ami felerősíti a T sejt receptorok és antigenikus peptidek közti kölcsönhatást (28). Bár a többi HLA-B27 allél közül csaknem mindegyiket összefüggésbe hozták a SpA kialakulásával, a HLA-B\*2706 és a HLA-B\*2709 allélvariánsok, melyek Dél-Kelet Ázsiában illetve Szardínián fordulnak elő, nem mutatnak asszociációt a betegséggel (28).

### *2.1.2. Egyéb HLA-B allélek*

A HLA-B27 mellett Togóban a HLA-B\*1403 asszociációját mutatták ki SpA-val (29), míg a HLA-B60, HLA-B35 és HLA-B39 valószínűleg csekély szerepet játszanak a betegség kialakulásában (30).

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

Mint láttuk, a környezeti tényezők közül elsősorban a bakteriális antigéneknek tulajdonítanak jelentőséget a SpA kifejlődésében (9;10). Ami az antigénprezentációt illeti, az SpA iránti fogékonyságban szerepet játszó HLA-B molekulák szerkezetében a 45. pozícióban levő glutaminsav és a 67. pozícióban található cisztein valószínűleg alapvető jelentőségűek, miután ez az aminosav-mintázat hiányzik a SpA-ra nem hajlamosító alléltípusokból (31,32). Ezen szerkezeti jellegzetességen alapuló funkcionális teóriák láttak napvilágot. Az “arthritogén peptid” elmélet lényege, hogy a jellegzetes molekuláris struktúra teszi lehetővé specifikus peptidek prezentálását, melyek autoimmun választ eredményeznek. A “károsodott felgombolyodás” (impaired folding) teória szerint diszulfid hidak képződnek a 67-es pozícióban lévő két cisztein között, ami a molekulák megváltozott intracelluláris transzportját eredményezi (31,32).

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

HLA-B allélektől különböző MHC gének is szerepet játszhatnak az SpA-k kialakulásában (8). Ezen gének között valószínűleg vannak MHC-II osztályú allélek (HLA-DR gének), a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) génjei, komplement gének, valamint néhány gén, amelyek az I. osztályú MHC révén történő antigén prezentálásban

vesznek részt (pl. TAP, LMP2, LMP7) (30). Sajnos a HLA-B27 meghatározó szerepe nagyban befolyásolja a többi gén szerepének értelmezését, mivel ezen genetikai asszociációk valószínűleg csak az említett lókuszek és a HLA-B27 közötti kapcsoltságra vezethetők vissza ("linkage disequilibrium"). Ezen gének közül egyedül a HLA-DR4 direkt additív szerepét erősítették meg SpA-s betegek HLA-B27<sup>+</sup> rokonaiban (30,31).

## **2.2. Nem-MHC allélek SPA-ban**

Miután, mint láttuk, a HLA-B és egyéb MHC allélek az SpA-k genetikai meghatározottságának csupán egy kisebb hányadát képezik, nyilvánvaló, hogy egyéb nem MHC-hez kötött ("non-HLA") gének is felelősek a betegséggel szembeni fogékonyságért. Ezen genetikai asszociációk vizsgálatára különböző módszerek alkalmasak, melyeket az 1. táblázat foglal össze (2-4).

### *2.2.1. Kapcsoltsági vizsgálatok*

Genetikai kapcsoltság ("linkage") áll fenn amikor egy kandidáns gén és egy másik ismert lókuszek nagyon közel van egymáshoz, aminek következtében a két lókuszek együttesen öröklődik. Ilyen kapcsoltsági vizsgálatokat lehet végezni nagy családokban, ahol egy adott betegség több családtagot érint. Ezekben a vizsgálatokban az eredményeket ún. nem-parametrikus kapcsoltsági értékként ("non-parametric linkage score"; NPL) adják meg, amit aztán LOD (logarithm of odds) érték formájába konvertálnak. Anélkül, hogy a LOD számításának részleteit ismertetnénk, magas LOD értékek ( $LOD \geq 3.6$ ) szignifikáns asszociációra utalnak, míg a "szuggesztív"  $LOD \geq 2.2$  érték valószínű kapcsoltságot jelez (39).

**1. táblázat** Non-HLA genetikai asszociációk meghatározása különböző technikákkal

<b>Vizsgálat típusa</b>	<b>Genetikai kapcsoltság</b>	<b>Referenciák</b>
<i>Genom szintű asszociációs vizsgálatok (WTCCC)</i>	Interleukin-23 receptor (IL-23R; 1. kromoszóma)*	19,20
	ARTS1 (5. kromoszóma)*	19,20
<i>Kandidáns gén asszociációs vizsgálatok</i>	Interleukin-1 géncsalád (IL-1A, IL-1B, IL1RN) (2. kromoszóma)*	18,45,46,48-51,53
<i>Kapcsoltsági(linkage) vizsgálatok</i>	1. kromoszóma	33,41
	3. kromoszóma	25,41
	4. kromoszóma	24
	9. kromoszóma	25,33
	10. kromoszóma*	24,25,33,41
	11. kromoszóma	24,41
	13. kromoszóma	26
	16. kromoszóma*	124-26,33,41
	17. kromoszóma	24,26
	19. kromoszóma	24,25,33

\**Mege erősített asszociáció*

Az SPA-ra való hajlammal kapcsolatosan négy nagy humán kapcsoltsági vizsgálat történt. Az Észak-Amerikai Spondylitis Konzorcium (NASC) tanulmányában 185 család 255 betegség által érintett testvérpárát vizsgálták. A legmagasabb szignifikanciájú asszociációkat természetesen a 6. kromoszómán található MHC lókuszt (LOD=15.6), valamint egyetlen, a 16. kromoszómán elhelyezkedő non-HLA lókuszt (LOD=4.7) mutatta. Más, az 1., 3., 4., 5., 10., 11., 17. és 19. kromoszómán kimutatott lókusztok szuggesztív LOD értékkel rendelkeztek (24). A francia SPA genetikai kohorszban (French AS Genetics Cohort; GFEGS) 180 családot vizsgáltak 244 érintett testvérpárral. Itt szintén az MHC régió mutatta a legerősebb kapcsoltságot (26).

Ugyancsak ebben a vizsgálatban a 9. kromoszóma rövid karjának egy régiója szignifikáns asszociációt mutatott az akut anterior uveitisszel, de az SPA-val nem (40). Két oxfordi vizsgálat szintén megerősítette a kapcsoltságot az MHC régióval, és szuggesztív szintű kapcsoltságot mutatott a 2., 3., 9., 10., 11., 16. és 19. kromoszómákon elhelyezkedő lókuszokkal (33,41) (1. táblázat).

A négy tanulmány és további kisebb vizsgálatok alapján végzett nagy metaanalízis szolgáltatva a legegységesebb bizonyítékot a 6. kromoszómán lévő MHC-val való kapcsoltságról. További erős kapcsoltságot figyeltek meg a 10. és 16. kromoszómákon elhelyezkedő lókuszokkal, illetve mérsékelt kapcsoltságot találtak a 2., 3., 4., 5., 6., 11. és 17. kromoszómák egyes lókuszaival (18).

Néhány említett lókuszt összefüggést mutatott a betegségaktivitással és a funkcionális károsodás mértékével is. Amíg az MHC régió ezen paraméterekkel nem mutatott kapcsoltságot, a 18. kromoszómán lévő régiók szignifikáns asszociációt mutattak a BASDAI értékkel. Ezen túlmenően a 2. kromoszóma hosszú karjának egyes régiói szuggesztív kapcsoltsági szintet értek el a BASFI funkcionális index tekintetében (34).

### 2.2.2. Kandidáns gén asszociációk

Az IL-1 géncsalád vonatkozásában számos, részben ellentmondó adat született. Ez a génkomplexum a 2. kromoszómán helyezkedik el és az IL-1 $\alpha$  (*IL-1A*), IL-1 $\beta$  (*IL-1B*), IL-1 receptor antagonist (*IL-1RN*), valamint más járulékos géneket (*IL1F5*, *IL1F10*) tartalmaz (42). Ez a géncsoport megfelel a fentebb említett kapcsoltsági vizsgálatok által a 2. kromoszómán azonosított génszakasznak (18,33,41). Az IL-1 $\alpha$  és

IL-1 $\beta$  proinflammatorikus citokinek, melyeket elsősorban monociták és makrofágok termelnek. Ezek stimulálni képesek más gyulladási mediátorok felszabadulását, beleértve a prosztaglandinokat, mátrix metalloproteinázokat és más citokineket, valamint elősegítik különböző adhéziós receptorok expresszióját is (43,44). Az IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) kompetitív módon gátolja az IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$  kötődését receptorához és így kivédi ezen citokinek proinflammatorikus hatásait (44). Amíg kisebb korai vizsgálatok felvetették az SPA és az IL-1Ra-t kódoló *IL1RN* gén kapcsolatát (45,46), később nagyobb tanulmányok ezt nem tudták megerősíteni (47-49). Később néhány kisebb vizsgálatban és egy közelmúltban publikált metaanalízisben kimutatták az *IL1RN* gén 2. intronja VNTR (variable nucleotide tandem repeat) polimorfizmusának gyakoribb expresszióját SPA-s betegekben, egészséges kontrollokhoz viszonyítva (45,46,50). Ezen felül, két, az *IL1RN* gén 6. exonjában kimutatott egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism; SNP) szintén asszociációt mutatott SPA-val (51,52). Más gének vonatkozásában az IL-1 családon belül, az *IL-1A* és *IL-1B* génekben összesen 14 SNP esetében írták le az SPA-val való szignifikáns asszociációt (49,53). Ezen SNP-k közül az *IL-1A* gén rs3783526, valamint az *IL-1B* gén rs1143627 polimorfizmusa mutatta a legerősebb asszociációt (49). Más vizsgálatokban az *IL-1A* gén rs2856836, rs17561 és rs1894399 polimorfizmusait is összefüggésbe hozták az SPA kialakulásával (53) (1. táblázat).

### 2.2.3. Genom szintű vizsgálatok

Amint azt korábban már említettük, a WTCCC konzorciális kutatócsoport két új lókuszt, az *IL-23R* és *ARTS1* esetében talált erős asszociációt az SPA-val (19,20) (1.

táblázat). Az IL-23R-nak szerepet tulajdonítanak a RA, psoriasis, és gyulladásos bélbetegségek (elsősorban Crohn-betegség) patogenezisében (54-57). Az IL-23 erőteljes hatású proinflammatorikus citokin, mely stimulálja a fenti kórképek patogenezisében ugyancsak kiemelt szerepet játszó Th17 sejtek képződését, valamint más citokinek, így a TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 és IL-22 termelődését (58). Az IL-23R fehérje génje az 1. kromoszómán helyezkedik el. A Crohn betegségre és psoriasisra való fogékonyság az rs11209026 SNP-vel mutat asszociációt (54-56). Emellett az rs7530511 SNP-t szintén összefüggésbe hozták a psoriasisal (56). Az említett SNP-k mellett az rs10889677 és rs2201841 polimorfizmusoknak szintén szignifikánsan magasabb az előfordulási gyakorisága Crohn betegségben (54). A közelmúltban erősítették meg, hogy az rs10889677 és rs2201841 SNP-k nemcsak a Crohn betegséggel, hanem a RA-szel is összefüggést mutatnak (57). Az említett WTCCC kutatócsoport összesen 8 IL-23R SNP-t genotipizált 1000 SPA-s beteg és 1500 kontroll személy vizsgálata során. Ebből a 8 SNP-ből 7 mutatott asszociációt SPA-val. Ezen belül erősen szignifikáns összefüggést találtak az rs11209032, rs11209026 és rs10489629 SNP-k esetében (20,59). Az IL-23R génpolimorfizmus és SPA közötti asszociációkat nemrégiben egy spanyol vizsgálat is megerősítette (60). Az *IL-23R* gén az SPA-ra való fogékonyság populáció szintű rizikójának 9%-áért felelős (19,20).

Ami az ARTS1-et illeti, ez a fehérje az endoplazmás reticulumban található aminopeptidáz. Az ARTS1 (ERAP1) több citokin, így a TNF- $\alpha$  (TNF-R1), IL-1 (IL-1R2) és IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) receptorait hasítja le a sejtfelszínről (61,62). Az ARTS1 az antigén peptidek feldolgozásában is szerepet játszik, melynek során az antigén prezentáláshoz optimális hosszúságú peptidszakaszok keletkeznek (63). Az ARTS1-et kódoló három

gén az 5. kromoszómán helyezkedik el (64). A WTCCC tanulmányban, majd utánkövetéses vizsgálatokban 5 SNP, az rs27044, rs30187, rs17482078, rs10050860 és rs2287987 esetében találtak asszociációt az SPA-val (20). Ezzel szemben egyetlen SNP sem mutatott összefüggést a gyulladásos bélbetegségekkel (20). Ez alapján az ARTS1 valószínűleg nem minden SpA patogenezisében játszik szerepet, hanem hatásai SPA-ra specifikusnak tűnnek. Az *ARTS1* gén az SPA teljes genetikai rizikójának 26%-áért tehető felelőssé (19,20).

#### 2.2.4 Egyéb gének meg nem erősített asszociációi

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

A citokróm P450 CYP2D6 gén 22. kromoszómán elhelyezkedő néhány allélje esetében gyenge asszociációt találtak SPA-val (65). Ellentmondásosak az adatok a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ANKH és Toll-like receptor 4 (TLR4) gének vonatkozásában. Amíg néhány vizsgálatban felvetették ezen gének SPA-val való gyenge asszociációját (66-68), más tanulmányokban ezt nem tudták megerősíteni (69-72). Korábbi vizsgálatok azt is valószínűsítették, hogy az IL-10 allél egyes polimorfizmusai védő hatásúak lehetnek a reaktív arthritis kialakulásával szemben (73), de SPA vonatkozásában ilyen összefüggést nem találtak (74). Végül, a NOD2/CARD15 mutációkat kapcsolatba hozták a Crohn betegséggel, azonban számos tanulmány alapján SPA-ban hasonló asszociáció nem került megerősítésre (75,76).

### 2.3. SpA állatmodellek és alkalmazásuk genetikai vizsgálatokban

Az állatmodellek nélkülözhetetlen segítséget jelentenek a humán autoimmun-reumatológiai betegségek kutatása szempontjából. Míg azonban a RA-nek számos elfogadott állatmodellje létezik, az emberi SPA vizsgálatára csak jóval kevesebb jól alkalmazható modell alkalmas. Az ank/ank egerekben egy funkcióvesztést eredményező mutáció érinti az *ank* gént és ezen állatokban progresszív SpA fejlődik ki, mely a humán SPA-hoz hasonló (24,33), annak ellenére, hogy az *ank* gén sem emberben, sem egérben nem játszik szerepet autoimmun folyamatokban (33,34). A SpA-k további modelljei között említhetők a HLA-B27 transzgén rágsálók (26), a mutáns IX. típusú kollagént vagy a TNF- $\alpha$  “csonka” formáját expresszáló transzgén egerek (35,36).

Munkacsoportunk évek óta folytat vizsgálatot a proteoglikán-indukált spondylitis (PGIS) egérmodellben. Jelen kutatásaink során is ezt az állatmodellt alkalmaztuk. Mint a továbbiakban részletesen ismertetjük, a PGIS modell szintén hasznos adatokat szolgáltat a genetikai háttér és pathomechanizmus vonatkozásában (37,38).

### 2.4. Korábbi vizsgálatok a PGIS modellben

Fogékony egértörzsekben polyarthritis és spondylitis indukálható humán porc proteoglikánnal (PG) történő immunizálással (77,78). A PGIS klinikai és radiológiai szempontból sok hasonlóságot mutat a humán SPA-val. A PG-indukált arthritisre (PGIA) és PGIS-re való fogékonyág elkülönülése kevert genetikai háttér esetében arra utal, hogy a PGIA és a PGIS két hasonló pathomechanizmusú, de különálló betegség. Következésképpen ez a modell lehetővé teszi a SpA-k etiológiájában szerepet játszó

genetikai összetevők vizsgálatát, függetlenül a PGIA-re való hajlamot meghatározó tényezőktől (37,77,78).

PG aggregánnal történő szisztémás immunizálással PGIS-t hoztunk létre fogékony BALB/c és C3H/HeJCr (C3H) egerekben, valamint ezeknek DBA/2 (arthritis és spondylitis rezisztens) és DBA/1 (csak kollagén indukálta arthritisre [CIA] fogékony) törzsekkel létrehozott F1 és F2 generációiban. Csaknem minden PG-vel immunizált BALB/c és C3H egér esetében (97-100%) perifériás arthritis fejlődött ki 2 héttel a 3. antigén injekciót követően. Az érintett ízületeket hisztológiailag masszív gyulladásos sejtes infiltráció, pannus képződés, valamint a porc- és csonterosiók kialakulása jellemezte. Sem a DBA/1 vagy DBA/2 szülők, sem a (DBA/2 x BALB/c) F1 hibridek esetében nem alakult viszont ki arthritis a 14-18 hetes kísérleti periódus alatt (37).

A PG immunizált BALB/c ill. C3H egerek 62-70%-ában fejlődött ki spondylitis. Ezzel szemben csak enyhe (1-2 porckorongot involváló peridiscitis) és sporadikus csigolya érintettséget észleltünk a PG + dimethyldioctadecylammonium bromiddal (DDA-val) immunizált DBA/2 törzs néhány állata esetében (4%). A PG-vel vagy humán II. típusú kollagénnel (CII) immunizált DBA/1 egerekben egyáltalán nem alakult ki spondylitis. A spondylitis incidenciája és súlyossága nagyban hasonló volt mindkét PGIS fogékony szülői törzs (BALB/c és C3H) esetében (37).

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

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

Ez a megfigyelés annál is inkább váratlan volt, mivel mindkét keresztezés (BALB/c x DBA/2 és BALB/c x DBA/1) F2 generációja hasonló PGIA incidenciát és súlyosságot mutatott azonos protokoll szerint immunizálva (28). Ezek a megfigyelések azt sugallták, hogy a DBA/1 törzs valószínűleg igen erős protektív gént, vagy géneket hordoz a spondylitis tekintetében, míg a DBA/2 genom erős supportív gént, vagy géneket kell hordozzon, amelyek "némák" ("inaktívak") az eredeti DBA/2 törzsben (37).

A BALB/c és DBA/2 törzsek ugyanazt a H2-d allélt hordozzák. Ez azt mutatja, hogy az MHC önmagában (pl. a DBA/2 törzsben) nem elégséges a PGIA-re való fogékonyság meghatározásában, de elősegíti a PGIS kialakulását. Ezt támasztották alá a (BALB/c x DBA/1) F2 generációval kapcsolatos megfigyeléseink, ahol az immunizált egerek kb. 25%-a homozigóta volt a H2-d allélra nézve (79), de egyetlen F2 hibridben sem alakult ki spondylitis.

### **3. Anyag és módszer**

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

A National Cancer Institute (NCI)-től származó nőstény BALB/C és hím DBA/2 egereket keresztezve nyertük az F1, majd azokat keresztezve az F2 generációt. A kísérleteket a chicagói Rush Egyetem Orvosi Központjának Állatgondozói és Felhasználói Bizottságának jóváhagyásával végeztük. A különböző kísérleti egércsoportokat azonos, csíramentes körülmények között tartottuk. A kísérletek során a „standard” immunizálási protokollok szerint jártunk el (81,82.) A kísérleti állatokat 12 hetes korukban immunizáltuk intraperitonealisan (i.p.) adott 100 µl steril PBS-ben (0,15M NaCl, 0,01M káliumfoszfát, pH 7,4) oldott 100 µg PG proteinnel és 1 mg dimethyl-dioctadecyl-ammonium bromiddal (DDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA), a standard protokollt követve (81, 82). Az egerek összesen 4 injekciót kaptak 3 hetente (0.,21.,42., és 63. nap) és a 4. PG injekciót követően 3-4 héttel kerültek leölésre (84-91. nap között).

#### **3.2. Klinikai és immunológiai fenotípusok**

A kísérleti állatok gerincét a középső nyaki szakasztól a lumbális szakasz disztális részéig kiperaráltuk, fixáltuk (10% formalin), dekalifikáltuk, majd paraffinba ágyazva készültek a szövettani metszetek. A metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük meg hisztopatológiai vizsgálat céljára. A PGIS súlyosságának jellemzése a szövettani eltérések alapján volt lehetséges, a korábban közölt pontozási rendszer alapján (83) (2. táblázat).

## 2. táblázat A PGIS súlyosságának megítélése pontrendszer alapján

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

Egerenként átlag 18 intervertebrális discust (IVD) értékeltünk. Végül minden állat esetében egy ún. spondylitis index (SPI) értéket számoltunk ki elosztva a pontérték összegét az értékelt porckorongok számával (SPI: kumulatív pontérték az adott metszet esetében / vizsgált porckorongok száma), tekintve, hogy az egyes metszetek technikai okokból nem pontosan azonos számú porckorongot jelentettek. Ezen túlmenően egy speciális, ún. „késői kezdetű” spondylitis score ( $SPI_{LS}$ ) is meghatározásra került. az  $SPI_{LS}$  1-es értéket kapott, ha legalább egy IVD 1-es súlyossági pontértéket ért el. Egyébként a progresszív spondylitist mutató egerek  $SPI_{LS}$  értéke 0 lett, ha a porckorongok előrehaladott súlyosságú spondylitisnek feleltek meg (SPI: 2,3,4,).

Az immunizált állatoktól szérummintát gyűjtöttünk a kísérletek végén, valamint a lépsejtekből nyert szuszpenziót használva vizsgáltuk a PG specifikus T sejt válaszokat. Az antigén (PG)- specifikus T sejt proliferációt az ötödik napon  $^3H$ -thymidin beépülés mérésével határoztuk meg, a lépsejteket 50  $\mu$ g PG protein/ml hozzáadásával stimulálva. A méréseket négy párhuzamos mintában végeztük ( $3 \times 10^5$  sejt/lyuk, 96 lyukú tenyésztőlemez). Az antigén specifikus T sejt válaszok arányát stimulációs index érték (SI) formájában fejeztük ki, mely a beépült  $^3H$ -thymidine percenkénti beütésszámának

arányát jelenti az antigén stimulált tenyészetek és a nem stimulált lyukak esetében (82). Az lépsejtek antigén indukált citokin termelését (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ ) és szérumban antitest szinteket, valamint a szérumban amyloid-A (SAA) és szérumban citokin szinteket (IL-1, IL-4, IL-6, and TNF-  $\alpha$ ) kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kiték segítségével határoztuk meg (BD Biosciences, San Diego, CA vagy R&D Systems, Minneapolis, MN) (81,82).

A PG specifikus IgG antitest szérumban szintek meghatározásához szintén ELISA módszert használtunk. 96 lyukú Maxisorp tenyésztőlemezeket (Nunc, Roskilde, Denmark) fedtünk humán vagy egér porc PG-vel (0,1  $\mu$ g protein/lyuk,), majd a szabadon maradt kötőhelyeket PBS-ben (pH 7,4) oldott 1%-os zsírmentes tejjel blokkoltuk. Növekvő szérumban hígításokat alkalmaztunk és meghatároztuk mind a teljes anti-PG antitestek mennyiségét, mind a PG-specifikus antitestek egyes izotípusainak koncentrációját peroxidáz-konjugált kecske anti-egér IgG-vel (Accurate, Wetbury, NY, USA), vagy patkány anti-egér IgG1 és IgG2a szekunder antitestekkel (Zymed, San Francisco, CA, USA). A szérumban antitest koncentrációkat a megfelelő egér IgG izotípus standardokhoz (Zymed, San Francisco, CA, USA) vagy tisztított egér IgG-hez (Sigma-Aldrich) viszonyítva határoztuk meg (81,82).

### **3.3. Genomikus markerek**

A szülői BALB/c és DBA/2 törzsek között kimutatható egyszerű szekvencia hosszúság polimorfizmusok (SSLP) vizsgálatához a markereket az egér genom adatbázisból választottuk ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)), vagy alternatívaként olyan primereket használtunk melyek ismert, általában rövid, < 100 bázispárnyi (bp) ismétlődő

szakaszokat (tandem repeat) szegélyeztek az egér genomban. A PCR fragmentumok hosszkülönbsége a BALB/c és DBA/2 allélek esetében >3% volt. A törzsek közötti polimorfizmusokat 3,5%-os, nagy felbontású Aquapore agaróz gélen vizsgáltuk (National Diagnostics), ethidium bromid festés és UV fény segítségével. Mind a 20 egér kromoszóma (kivéve az Y kromoszómát) lefedésre került, összesen 224 polimorfikus markerrel, átlagosan 6.2 centimorgan (cM) (10.8 megabázispár [Mbp]) távolságokban.

### **3.4. Genomszűrés és statisztikai analízis**

DNS izolálás történt az egér vesékből proteináz kálium- és nátrium-lauril-szulfát használatával (79, 84). A DNS genotipizálása SSLP markerekkel (MWG Biotech), hagyományos PCR-al és gél elektroforézissel történt a korábban közöltek szerint (79,84). A kiindulási kapcsoltsági térkép Map Manager QTX program segítségével készült a Kosambi „térkép” funkció használatával (85). A markerek sorrendje további igazításra került a „ripple” parancs segítségével, majd megerősítést nyert az oligonukleotid primerek fizikai pozícióinak megfelelően a National Center for Biotechnology Information (NCBI) egér genom könyvtárában ([www.ensembl.org/Mus\\_musculus/](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/)) és a Celera Discovery System genom adatbázisában ([www.celeradiscoverysystem.com](http://www.celeradiscoverysystem.com)). Az egyszeri markerhatást marker regresszióval becsültük meg a Map Manager QTX segítségével. A genomikus markerekkel  $\chi^2 > 10$ -nél ( $p < 0,01$ ) erősebb asszociációt mutató tulajdonságok esetében mind az egyszerű, mind a komplex intervallum térképezést elvégeztük az egész genomon, a Windows QTL Cartographer segítségével (86). A „valószínűségi arány statisztika” (likelihood ratio statistic, LRS) kísérlet specifikus, empirikus küszöbértékét minden tulajdonság esetében permutációs teszttel határoztuk meg ( $n = 2000$ ) a Churcill és Doerge szerinti algoritmus szerint (87), melyet a Map

Manager QTX és a Windows QTL Cartographer is alkalmaz (85,86). A genom szintű kapcsoltság kifejezetten szignifikáns ( $\alpha < 0,001$ ) és szignifikáns ( $\alpha < 0,05$ ) szintjeit alkalmaztuk (39). Szuggesztív kapcsoltsági szintként a  $p < 0,05$  kromoszóma szintű szignifikancia szintet alkalmaztuk ( $\alpha < 0,63$ ), mely megfelel egy fals pozitív QTL-nek (quantitative trait locus; „funkció kapcsolt lókusz”) a teljes genomot tekintve (39).

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

## 4. Eredmények

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

Porc PG-nal történő szisztémás immunizálást követően a BALB/c egerekben átlagosan 61,5%-os incidenciával alakul ki spondylitis (3. táblázat és 1. ábra). Ugyanezen immunizálási protokollt használva a DBA/2 egerek lényegesen kisebb fogékonyságot mutatnak (4%) és legfeljebb csak enyhe IVD károsodás jeleit láthatjuk. Összehasonlítva a BALB/c egerekkel, pl. ankylosis egyáltalán nem volt észlelhető DBA/2 egerekben (37).

A fő immunológiai paraméterek lemérésre kerültek a szülői törzsek esetében és korrelációt kerestünk a betegségre való fogékonysággal (3. táblázat). A DBA/2 törzsben csaknem háromszor magasabb immunoglobulin-G1 (IgG1) szérumszinteket mértünk összehasonlítva a BALB/c egerekkel (17,8 illetve 6,5 mg/ml). Az IgG1 volt a fő izotípus mindkét törzsben. Az IgG2a izotípus szérumszintjei fordított megoszlást mutattak a törzsek között: BALB/c esetében volt háromszoros szint mérhető. Az IgG1/IgG2a arány alapján mindkét törzs T helper 2 (Th2) túlsúlyú immunválaszt mutatott, de a PG-vel immunizált DBA/2 egerekben ez a Th2 válasz lényegesen erősebb volt. A törzsek között hisztológiai értékeléssel talált különbségek jól korreláltak a proinflammatorikus citokinek emelkedett koncentrációival, elsősorban a BALB/c egerek IL-1 és IL-6 szérumszintjeivel. Mindemellett az IL-4 és TNF $\alpha$  szintek hasonlóak voltak a két törzs esetében.

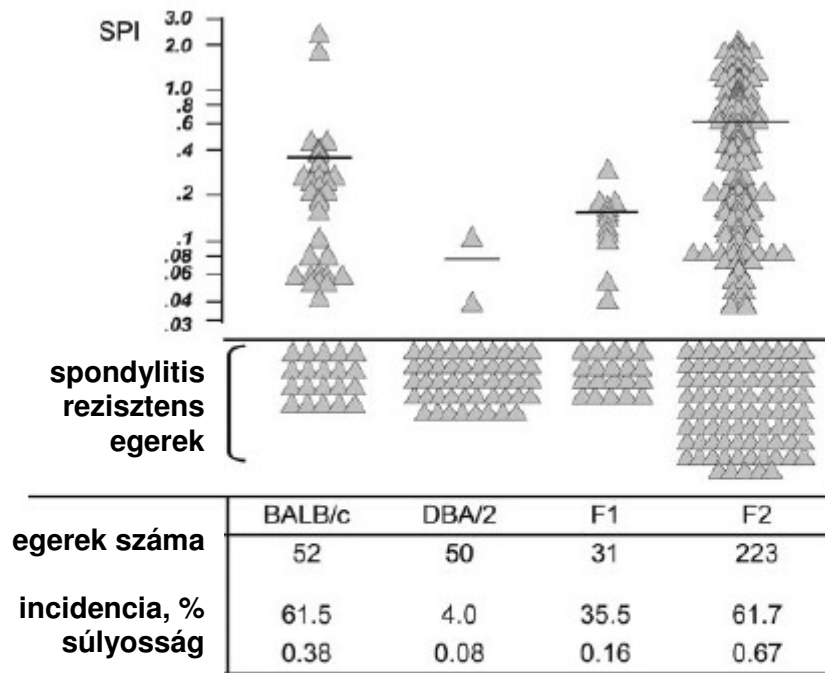
A BALB/c egerek antigén (PG) stimulált limfocitái szignifikánsan magasabb IFN- $\gamma$  és IL-4 termelést mutattak, mint a DBA/2 limfociták és az IFN- $\gamma$ /IL-4 arány 2,2x magasabb volt a BALB/c egerekben (5,1), mint a DBA/2 állatok esetében (2,3). Ez a megfigyelés azt is jelenti, hogy a PG indukált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

szignifikánsan erőteljesebb Th1 irányú „shift”-et mutatnak, szemben a látszólag rezisztens DBA/2 törzssel.

**3.táblázat** A klinikai és immunológiai paraméterek összehasonlítása a BALB/c és DBA/2 szülői törzsek között a szisztémás PG immunizálás során

Klinikai jellemzők	egység	BALB/c	DBA/2	p érték
PGIS incidencia	%	61.5	4.0	0,0000****
SPI	arb	0.364±0.196	0.016± 0.012	0.0071**
SPI <sub>LS</sub>	arb	0.429±0.067	0.220± 0.057	0.0120*
PG specifikus citokin termelés in vitro				
IL-4	pg/ml	756.0±104.8	228.4± 46.3	0.0002***
IFN- $\gamma$	pg/ml	3891.5±726.7	524.8± 224.0	0.0003***
TNF- $\alpha$	Pg/ml	256.2±40.0	230.0± 54.9	0.7045
Szérum citokinek				
IL-1 $\beta$	pg/ml	1290±250.7	681.3±217.0	0.0489*
IL-4	pg/ml	9.0±0.7	10.4±3.2	0.6650
IL-6	pg/ml	57.8±12.1	30.1±11.9	0.0130*
TNF- $\alpha$	pg/ml	1585.0±345.1	1278.0±783.2	0.7257
Antitestek				
Auto-IgG1	$\mu$ g/ml	66.0±13.6	289.4±71.9	0.0127*
Auto-IgG2a	$\mu$ g/ml	6.3±1.0	5.6±2.3	0.7919
Hetero-IgG1	mg/ml	6.1±1.1	17.4±3.4	0.0086**
Hetero IgG2a	$\mu$ g/ml	326.0±71.8	100.3±40.6	0.0100**

Átlagértékek  $\pm$  SEM (standard error mean); Kétmintás t próbát használtunk a két csoport átlagértékeinek összehasonlításánál az immunológiai jellemzők esetében. A Mann-Whitney U tesztet alkalmaztuk a BALB/c és DBA/2 csoportok közötti különbségek vizsgálatára a klinikai jellegzetességek esetében. A spondylitis index értékek (SPI és SPI<sub>LS</sub>) viszonyítási értéként (arbitrary units; arb) vannak feltüntetve. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillag jelöli: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0003$ ; \*\*\*\* $p < 8,7 \times 10^{-10}$ . A klinikai és immunológiai paraméterek részletes leírását lásd az „Anyag és módszer” fejezetben.



*1.ábra* Az SPI a szülői BALB/c és DBA/2 törzsekben, valamint F1 és F2 hibridjeikben (az y tengely értékei logaritmikus skálán vannak feltüntetve). Minden háromszög egy állatot reprezentál. A vízszintes vonal alatti szimbólumok (SPI = 0) jelentik a spondylitis rezisztens állatokat, melyek nem mutattak szövettani eltérést. A súlyosságot átlag SPI értéként adtuk meg az érintett állatoknál, ezt vízszintes vonal jelzi minden állatcsoportnál.

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

A spondylitis incidenciája a BALB/c és DBA/2 törzs F1 hibridjeiben 35,5 % volt, mely kb. a szülői törzsek közötti középértéknek felel meg, bár a betegség súlyossága viszonylag alacsony értéket mutatott (SPI 0,16) (1. ábra). Az F2 hibrid egerek spondylitis incidenciája, váratlanul csaknem megegyező értéket mutatott, a fogékony BALB/c szülői

törzsével, míg a súlyossági score érték csaknem kétszer magasabb volt, mint a BALB/c egerek esetében (1. ábra).

Mivel az F1 generáció egyedei genetikailag homogének, csak a környezeti faktorok tehetők valószínűleg felelőssé a tulajdonságok varianciájáért. Ezzel szemben az F2 hibrid egerek genetikailag heterogének, így esetükben mind genetikai, mind környezeti faktorok hatása feltételezhető. Ennek megfelelően a spondylitis és az immunológiai paraméterek korrelációja az F1 és F2 generációk esetében különböző forrásból kell, hogy származzon. Az egyik legjobb példa erre a SPI, mely igen szoros korrelációt mutat az  $SPI_{LS}$  értékkel az F1 generációt tekintve ( $r_s = 0,97$ ), de ez a korreláció jelentősen gyengébb volt az F2 hibrid egerek esetében ( $r_s = 0,54$ ), mert a gének heterozigóta kombinációja különbözőképpen befolyásolta az SPI és  $SPI_{LS}$  értékeket a (BALB/c x DBA/2) F2 generációban (4. táblázat).

**4. táblázat** Klinikai és immunológiai jellegzetességek korrelációi a BALB/c x DBA2 törzsek keresztezéséből származó genetikailag homogén F1 és szegregáló F2 hibrid populációkban, PG immunizálás során

<b>Spondylitis index</b>	SPI				
SPI <sub>LS</sub>	<b>0.97/0.54</b>				
<b>PG specifikus citokin termelés in vitro</b>	SPI	IL-2	Proliferáció	IFN- $\gamma$	IL-4
TNF- $\alpha$	(0.27)/ <b>-0.13</b>	na/ <b>0.16</b>	na/ <b>0.49</b>	(0.07)/ <b>0.47</b>	<b>0.54/0.65</b>
IL-4	(0.17)/ <b>-0.14</b>	na/ <b>0.21</b>	na/ <b>0.45</b>	(0.20)/ <b>0.41</b>	
IFN- $\gamma$	(0.02)/ <b>-0.14</b>	na/ <b>0.37</b>	na/ <b>0.56</b>		
Proliferation	na/ <b>-0.15</b>	na/ <b>0.24</b>			
IL-2	na/(0.04)				
<b>Szérum citokinek</b>	SPI	TNF- $\alpha$	IL-1	IL-4	IL-6
SAA	na/ <b>0.28</b>	na/(0.04)	na/(0.04)	na/(0.14)	nd/ <b>0.74</b>
IL-6	(-0.08)/ <b>0.43</b>	(0.18)/(0.05)	(0.26)/(-0.00)	(0.14)/(-0.02)	
IL-4	(0.25)/(-0.03)	<b>0.36/0.17</b>	<b>0.40/0.24</b>		
IL-1	(0.06)/(0.03)	<b>0.79/0.84</b>			
TNF- $\alpha$	(-0.12)/(0.09)				
<b>Szérum antitestek</b>	SPI	Auto-IgG1	Auto-IgG2a	Hetero-IgG1	
Hetero-IgG2a	<b>0.49/0.17</b>	<b>0.37/0.26</b>	<b>0.50/0.50</b>	(0.35)/ <b>0.27</b>	
Hetero-IgG1	(0.35)/ <b>0.18</b>	<b>0.87/0.59</b>	(0.05)/ <b>0.16</b>		
Auto-IgG2a	(0.09)/(0.09)	(0.28)/ <b>0.18</b>			
Auto-IgG1	<b>0.37/0.23</b>				

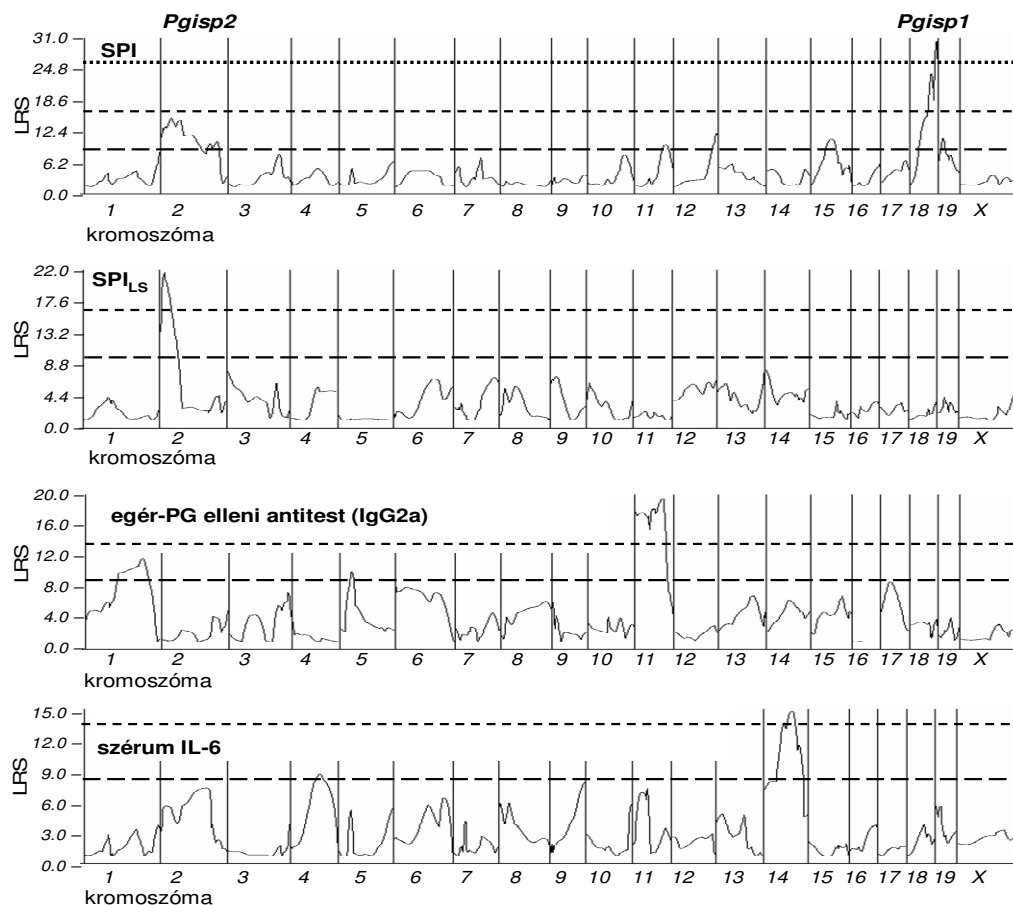
*Spearman féle korrelációs koefficiens ( $r_s$ ) az F1 és F2 hibridekben (F1/F2). A nem szignifikáns korrelációk zárójelben találhatóak, míg a szignifikáns korrelációk ( $p < 0.05$ ) félkövérrel vannak feltüntetve. A klinikai és immunológiai jellemzők közti kereszt korrelációk értékei az F1 ( $n=31$ ) és F2 ( $n=223$ ) populációkon alapulnak. (na= nincs adat. Az immunológiai jellemzők leírásához lásd a 3.táblázatot, ill. az „Anyag és módszer” fejezetet)*

A spondylitisszel az F1 és F2 hibrid populációkban valószínűleg összefüggést mutató, legfontosabb immunológiai paraméterek jellemzéséhez meghatároztuk a Spearman féle korrelációs koefficiens  $(r_s)$  (4. táblázat). A PGIS legerősebb pozitív korrelációit a szérumban amyloid-A akut fázis protein (SAA) koncentrációk és IL-6 értékek esetében találtuk ( $r_s = 0,28$  és  $0,43$ ) (4. táblázat), mely egybe vág a SAA és IL-6 értékek közötti még erősebb korrelációval ( $r_s = 0,74$ ). A spondylitis pozitív korrelációt mutatott az antitest (Ab) termeléssel (mind az IgG1, mind az IgG2a izotípusra nézve) az F2 hibrid populációban. Meglepő módon a spondylitis negatív korrelációt mutatott viszont minden lemerített T sejt válasz tekintetében (T sejt proliferáció, IFN- $\gamma$ , IL-4 és TNF- $\alpha$  termelés), de csak az F2 egerek esetében (4. táblázat). Nem találtunk korrelációt a spondylitis és az antigén specifikus T sejt válaszok (ill. az antitestek szérumszintjei) között a homozigóta F1 hibrid egerekben (4. táblázat). Ezzel szemben, ezen korrelációk erősnek mutatkoztak a genetikailag elkülönülő F2 populációban, mely azt sugallja, hogy a spondylitist immunválasszal kapcsolatos gének és/vagy allélkombinációk irányítják ebben az állatmodellben. Összefoglalva, az emelkedett IL-6, SAA szérumszintek és antitest titerek, a PG stimulált T sejtek csökkent IFN- $\gamma$ , IL-4 és TNF- $\alpha$  termelésével együtt tekinthetők a spondylitis legerősebb előjeleinek, a PGIS-re fogékony és rezisztens egereknek ebben az MHC azonos keresztezésében.

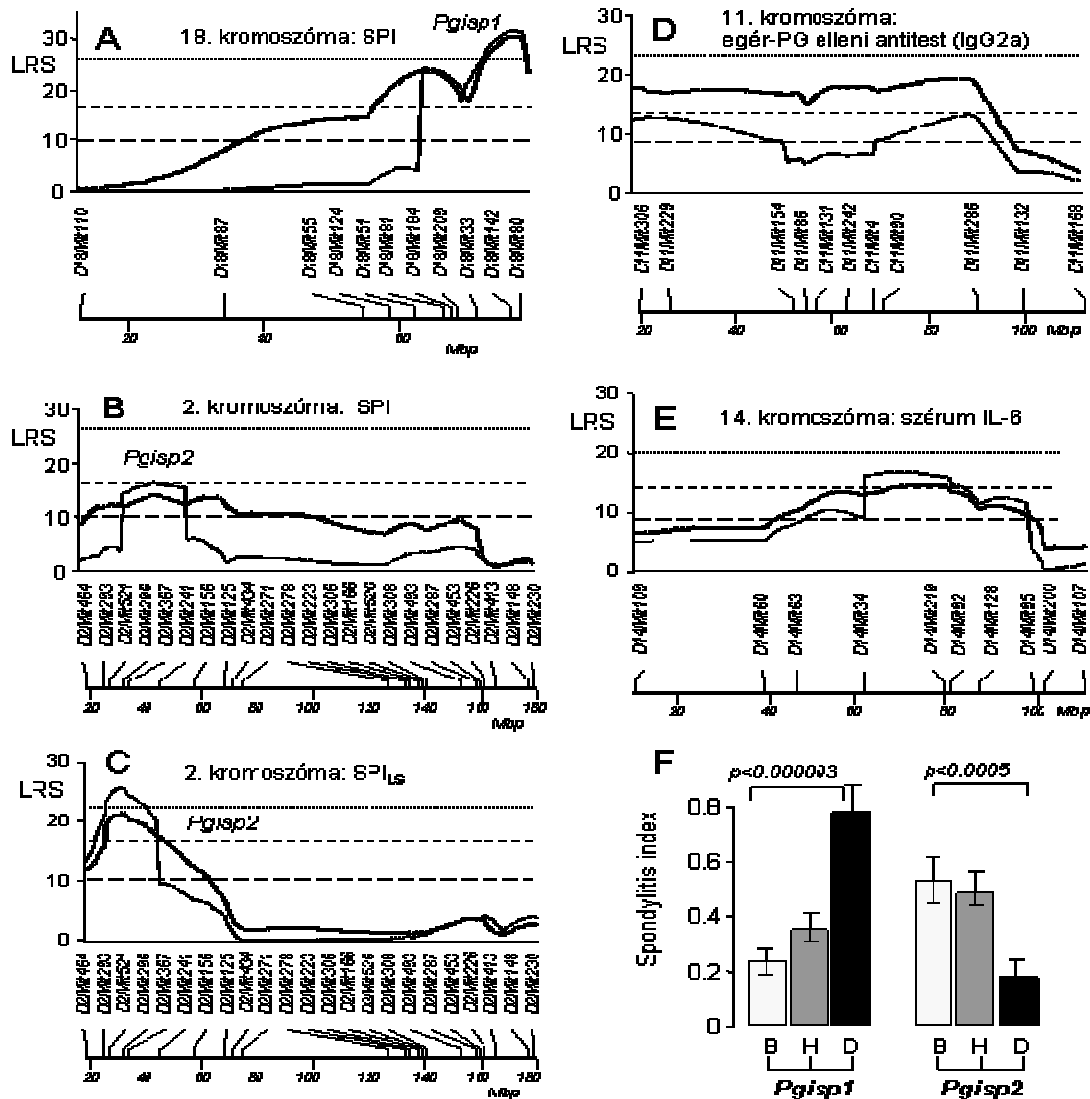
### **4.3. A spondylitis kapcsoltóság (linkage) analízise a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridekben**

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

A spondylitist „irányító” legfőbb genetikai lókuszt a 18. kromoszóma telomerikus részén lehetett azonosítani (Pgis1). Az LRS érték elérte a 31-et, mely meghaladja a Lander és Kruglyak szerinti magasan szignifikáns határértéket (39) és empirikusan meghatározott magasan szignifikáns küszöbértéket eredményezett ( $\alpha < 0,001$ ) (3A. ábra). Az összetett intervallum térképezés (Windows QTL Cartographer, standard 6. modell, 5 kontrollált marker 10 cM-os ablakon belül) megerősítette a D18Mit51 és D18Mit142 markerek QTL csúcspozícióját (3A. ábra).



**2. ábra** A spondylitist jellemző klinikai és immunológiai paraméterek genomszintű intervallum térképezése a BALB/c x DBA/2 hibrid populációban. A valószínűségi arány (likelihood ratio statistics, LRS) küszöbértékek 2000 genomszintű permutációval lettek meghatározva:  $\alpha < 0,63$  – suggesztív kapcsoltsági szint (hosszú szaggatott vonal);  $\alpha < 0,05$  – szignifikáns kapcsoltsági szint (rövid szaggatott vonal);  $\alpha < 0,001$  – magasan szignifikáns kapcsoltsági szint (pontozott vonal). A kromoszómák sorszáma az ábrák alján van jelölve.



**3. ábra** Egyszerű és összetett intervallum térképezés minden genom-szintű szignifikáns QTL-re ( $\alpha < 0.05$ ), mely a 2. ábrán látható volt. A LRS küszöbértékek: szuggesztív (hosszú szaggatott vonal); szignifikáns (rövid szaggatott vonal); magasan szignifikáns (pontozott vonal). Az összetett intervallum térképezés (vastag folytonos vonal) megerősíti és lekeskenyíti az egyszerű intervallum térképezés (vékony folytonos vonal) által megadott QTL pozíciót. A 2. és 18. kromoszómán található a két fő „spondylitis” QTL (A-C). A 11. kromoszómán található egy lokusz, mely az egér-PG elleni IgG2a termelést irányítja (D), míg a 14. kromoszómán egy szérum IL-6-ot kontrolláló lokusz található (E). Az ábra F része a spondylitis asszociációját mutatja, a QTL „csúcsmarker” genotípusaival. Genotípusok: B: BALB/c homozigóta; D: DBA/2 homozigóta; H: heterozigóta. A BALB/c és DBA/2 homozigóta egerek SPI különbségeinek Student féle *t* értékei fel vannak tüntetve. A 2. kromoszóma domináns spondylitis fogékonysági *Pgis2* alléje a BALB/c törzsből származik, míg a recesszív spondylitis fogékonysági allél a 18. kromoszóma *Pgis1* lokuszán belül, a DBA/2 törzsből ered.

A második fő spondylitis QTL-t a 2. kromoszómán azonosítottuk (Pgis2). Ez a lókuszt azonban meglehetősen bizonytalanul meghatározható volt az egyszerű intervallum térképezés használatával, és csaknem a kromoszóma egyharmadát elfoglalta (3B. ábra). Összetett intervallum térképezés használatával, az ezen QTL-nek megfelelő csúcsot (LRS 16,9 ;  $\alpha < 0,05$ ) a D2Mit241 marker mellett találtuk (3B. ábra). Az egyes kromoszómák spondylitis fogékonyságra kifejtett együttes hatásának kiszámolásánál az látszott, hogy a 2. és 18. kromoszóma közösen a teljes SPI jelleg variancia 40,5%-át kontrollálja az F2 populációban (2. ábra).

Egy kiegészítő spondylitis fenotípus index ( $SPI_{LS}$ ) került bevezetésre ebben a vizsgálatban. Ez egy bináris index, mely 1-es értéket jelent a „késői kezdetű” spondylitist mutató egerekben, és szoros korrelációt mutat az alacsony PGIS súlyossággal (ld. metodikák). A SPI és  $SPI_{LS}$  közötti szoros korreláció ellenére, ezen két klinikai jelleg genetikai alapja különbözőnek tűnik. Például a 18. kromoszómán nincs  $SPI_{LS}$  QTL, amíg a késői/enyhe spondylitist kontrolláló fő QTL-t a Pgis2 lókusssal azonos pozícióban találtuk (2. ábra, 3C. ábra). Mindamelllett a Pgis2 lókuszt kiemelkedőbb és keskenyebb volt a  $SPI_{LS}$ -re nézve, mint a SPI-re. A Pgis2 egymagában a teljes  $SPI_{LS}$  jelleg variancia 28,7 %-ához járult hozzá az F2 populációban (2. ábra). A Pgis2 csúcsértéke a D2Mit296 marker mellett volt (LRS 21,1 ;  $\alpha < 0,05$ , egyszerű intervallum térképezés), és ezt a pozíciót megerősítette az összetett intervallum térképezés is (LRS 25,9 ;  $\alpha < 0,001$ ) (3C. ábra).

Mivel a spondylitis az F2 hibrid egerekben szignifikáns korrelációt mutatott bizonyos immunológiai fenotípusokkal (T és B sejt válaszok, szérumban citokinek), elvégeztük a kapcsoltsági vizsgálatot a közbeeső immunológiai jellegzetességekre

vonatkozóan is. Az IgG2a izotípusú autoantitestek szérumban koncentrációját számos különböző QTL látszott kontrollálni (2. ábra). Két fő, egymáshoz közeli lokuszt találtunk a 11. egér kromoszómán (LRS 17,1 és 19,4 ;  $\alpha < 0,001$ ), és két gyengébb QTL látszott az 1. és 5. kromoszómákon (LRS 11,8 és 10,8 ;  $\alpha < 0,63$ ) (2. ábra, 3D. ábra). Az IL-6 proinflammatorikus citokin szérumban koncentráció egyetlen QTL-el mutatott összefüggést, mely a 14. kromoszóma centrális részén helyezkedett el (LRS 11,9;  $\alpha < 0,05$ ) és az összetett intervallum térképezés megerősítette a csúcspozíciót (2. ábra, 3E. ábra).

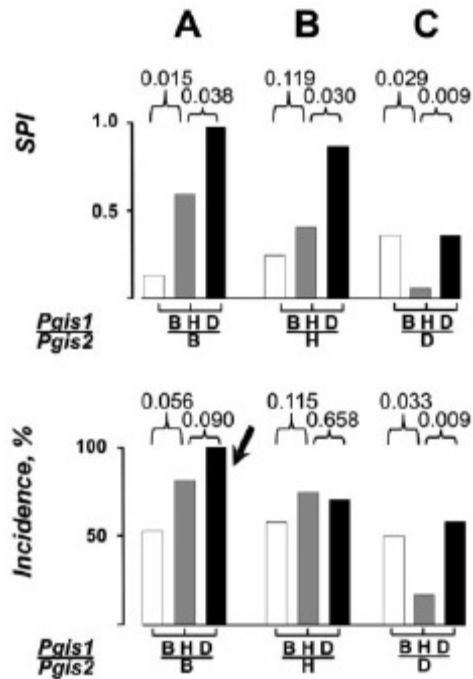
#### **4.4. A 2. és 18. kromoszómán lévő két fő klinikai QTL kölcsönhatásai**

Annak ellenére, hogy mind a BALB/c, mind a DBA/2 törzsek hordoznak spondylitis fogékonysági géneket, ezen egerek nagyon különbözően válaszoltak a PG immunizálásra. A betegséget kontrolláló allélek forrásának megtalálásához az F2 populációban, melyek jöhettek a BALB/c és a DBA/2 törzsből egyaránt, kiszámoltuk az átlagos SPI értékeket külön a BALB/c homozigóta ( $P_{gis}^B$ ), DBA/2 homozigóta ( $P_{gis}^D$ ), és BALB/c-DBA/2 heterozigóta egerekben ( $P_{gis}^H$ ) mindkét QTL-re (3F. ábra). Váratlanul azt találtuk, hogy a  $P_{gis1}$  allélra nézve DBA/2 homozigóta F2 egerek ( $P_{gis}^D$ ) esetében szignifikánsan magasabb incidenciájú és súlyosságú spondylitis fejlődik ki, összehasonlítva a BALB/c homozigóta állatokkal ( $P_{gis}^B$  vs.  $P_{gis}^D$ ,  $p < 0,000003$ ), amely azt sugallta, hogy a fő betegség fogékonysági allél a rezisztens DBA/2 törzsből származik. A másik QTL, a  $P_{gis2}$  a 2. kromoszómán, „normál” fenotípus-genotípus kapcsolatot mutatott, és az ezen régióra nézve BALB/c homozigóta egerek szignifikánsan fogékonyabbak voltak spondylitisre, mint a DBA/2 homozigóta F2 állatok ( $P_{gis}^B$  vs.  $P_{gis}^D$ ,  $p < 0,0005$ ). Ez azt mutatja, hogy ezen betegség allél a spondylitisre fogékony

BALB/c törzsből származik. Mind a Pgis1, mind a Pgis2 QTL-re nézve a BALB/c allélek dominánsak voltak a DBA/2 alléllal szemben, minthogy a BALB/c-DBA/2 heterozigóta egerek ugyanolyan magas SPI értéket mutattak, mint a BALB/c homozigóta állatok (3F. ábra).

Mindezeknek megfelelően, az F2 hibrid egerekben a legmagassabb spondylitisre való fogékonyság a DBA/2 homozigóták esetében volt megfigyelhető (Pgis1<sup>D</sup>), mely ellentmondani látszik a szülői DBA/2 egerek látszólagos rezisztenciájának, akiknél ugyanaz a Pgis1 lókuszt genotípusa (1. ábra). Minthogy csak két fő, spondylitist kontrolláló lókuszt találtunk a BALB/c x DBA/2 keresztezés során, a Pgis1<sup>D</sup> allél szülői DBA/2 törzsből való némaságának megmagyarázásához megvizsgáltuk ezen lókusztok egymásra kifejtett hatását. Az SPI érték és betegség incidenciát kiszámolva a Pgis1 és Pgis2 lókusztok kooperációját alapul vevő hipotézisen alapult. A fenotípusokra jellemző átlagértékek külön-külön a 9 allélkombináció mindegyikére kiszámolásra kerültek (4. ábra). Amikor a Pgis1 genotípusok klinikai jellemzőkre kifejtett hatását a Pgis2 lókusztól függetlenül értékeltük, a Pgis1<sup>D</sup> homozigóta egerek bizonyultak legfogékonyabbnak a spondylitisre, a Pgis1<sup>B</sup> homozigótáknak volt a legkisebb a fogékonyságuk, és a Pgis1<sup>H</sup> heterozigóta állatok fogékonysága a kettő között volt (3F. ábra). Meglepő módon, az egyes Pgis1 allélek közötti kapcsolat kritikus módon függőnek bizonyult a Pgis2 lókuszt genetikai összetételétől. Úgy tűnt, hogy a Pgis2-nek legalább egy másolata BALB/c eredetű kellett, hogy legyen (Pgis2<sup>B</sup>) a Pgis1<sup>D</sup> allél magas penetranciájához és spondylitis-megengedő géneként való működéséhez (4. ábra). Ennek megfelelően a Pgis1<sup>D</sup> allélt hordozó egerek voltak a legsúlyosabb spondylitist mutatók (átlag SPI = 0,96), a Pgis1<sup>B</sup> alléllal rendelkezők pedig a legkevésbé érintettek (SPI = 0,13) (4A. ábra). A

Pgis1<sup>D</sup> és Pgis1<sup>B</sup> alléleket hordozó egerek közötti fenotípusos különbségek azonban elhalványultak tiszta Pgis2<sup>D</sup> genetikai háttér esetén (4C. ábra). Következésképpen a spondylitist megengedő Pgis1<sup>D</sup> allél számára szükséges a Pgis2<sup>B</sup> allél, a jellemzők teljes penetranciájához és a fenotípusos hatás kifejtéséhez. A „legrosszindulatúbb” Pgis1<sup>D</sup> - Pgis2<sup>B</sup> allélkombinációt hordozó F2 hibrid egerek (4. ábra, fekete nyíllal jelzett oszlop) mutatták a legsúlyosabb spondylitist és a betegség 100%-os incidenciáját, ami szintén megerősíti mindkét lókuszt együttes fontosságát a betegség kifejlődésében.



		Pgis1			
		B	H	D	
Pgis2	B	Mean SPI	0.13	0.58	0.96
		SEM	0.06	0.13	0.15
		n	16	27	15
	H	Mean SPI	0.24	0.40	0.86
		SEM	0.07	0.07	0.14
		n	26	57	27
	D	Mean SPI	0.36	0.06	0.36
		SEM	0.20	0.03	0.18
		n	13	29	13

**4. ábra** A *Pgis1* lókuszt spondylitisre kifejtett hatása a *Pgis2* lókuszt allél összetételétől függ. Az oszlopok felett a Mann-Whitney U teszt p értékei a spondylitis súlyosság (SPI) és incidencia (%) különbségeit jelzik, a különböző *Pgis1* és *Pgis2* allélkombinációt hordozó egerek között. A genotípus leírás megegyezik a 3. ábrával. A táblázat az átlag SPI (mean SPI), SEM (standard error mean) értékeket és az egerek számát mutatja mind a 9 allélkombinációra nézve. Minden F2 hibrid egér bekerült az értékelésbe szelekció nélkül. A fekete nyíl a teljes, 100% spondylitis fogékonyságot kontrolláló allélkombinációt mutatja. Figyelmet érdemel, hogy nincs különbség a spondylitis súlyosságban és incidenciában a *Pgis1*<sup>D</sup> és *Pgis1*<sup>B</sup> allélt hordozó egerek között *Pgis2*<sup>D</sup> háttér esetén (C oszlop), de a különbség egyértelmű a *Pgis2*<sup>B</sup> és *Pgis2*<sup>H</sup> háttér esetében (A és B oszlop).

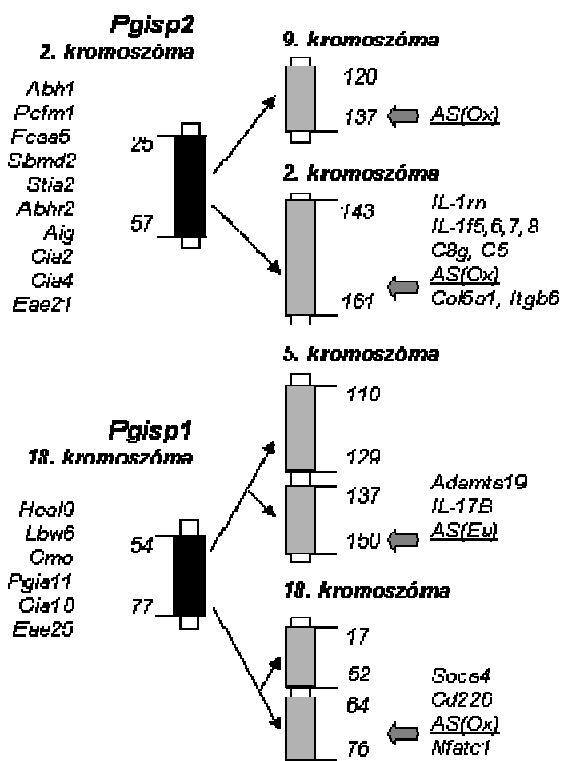
## 5. Megbeszélés, új eredmények

Vizsgálatunkban elsőként mutattuk be az egér spondylitisre való fogékonyság genetikai lókuszaiknak keresésére irányuló teljes genomszűrés eredményeit. Meghatároztuk a fenotípusos variancia genetikai alapjait egy komplex fenotípus tekintetében, mely természetes genetikai variációk révén alakult ki, mesterséges módosítás, pl. géndeficiencia helyett. Annak ellenére, hogy számos spondylarthropathia egérmodellt hoztak létre és tanulmányoztak korábban, a betegségre való fogékonyság genetikai alapja nem ismert, eltekintve a HLA-B27 és néhány egyéb gén patogenezisben betöltött szerepétől (88-91, 92, 93).

Korábbi munkánk során bemutattuk, hogy különböző szülői törzsek és genetikai keresztezésük spondylitisre való fogékonysága, bizonyos H-2 permisszív haplotípusokkal mutat összefüggést, mely az MHC vezető szerepére utal egér arthritisben és spondylitisben (37). Jelen vizsgálatunk legfőbb célja a nem-MHC gének megtalálása volt. Mindössze 2 fő genetikai lókuszt találtunk, mely a spondylitist „irányítja” a BALB/c x DBA/2 keresztezés esetén: a Pgis1 betegség-kontrolláló allélt, mely a DBA/2 törzsből származik (bár a gén néma maradt ebben a törzsből), valamint a Pgis2 allélt, mely a BALB/c törzsből származik. Nyilvánvalóan ezen két lókuszt együttes hatásai eredményezték a magas betegség incidenciát a BALB/c x DBA/2 F1 hibridekben (35,5%), és a még nagyobb fogékonyságot az F2 hibrid egerekben (61,7%-os incidenciát), amikor a két gén spondylitist elősegítő két allélje kiegészítette egymást. Hasonlóképpen a betegség súlyosság, ami csak az SPI-re pozitív értéket adó egereknél volt definiálva, még magasabb volt az F2 hibridekben, mint a BALB/c ősökben (1. ábra), két permisszív gén kumulatív hatásának köszönhetően ebben a populációban.

A spondylitisre fogékony és rezisztens egerek között az immun-funkcióval összefüggő jellemzők tekintetében (T és B sejt válaszok és szérumban lévő citokinek) látott különbségek, valamint a Pgis1 és Pgis2 lokuszokon belüli SPI-kapcsolt gének ismert kölcsönhatás mintázata ellenére a vizsgálat jelenlegi stádiumában nem lehetséges a spondylitishez hozzájáruló, elsődleges okozati géneket azonosítani ezen lokuszokon belül. A betegség-kontrolláló lokuszok genomikus térképeinek összehasonlítása humán betegekben és egerekben, mint azt az 5. ábra mutatja, és a szintenikus térképezés segíthet a kandidáns gének azonosításában a jövőbeli vizsgálatok során.

## Egér --- Humán



**5. ábra** Az egér spondylitis lókuszek átfedést mutatnak különböző egér és humán autoimmun betegségeket kontrolláló kromoszóma régiókkal. A fekete függőleges oszlopok az egér spondylitisszel kapcsolt kromoszóma szegmentumokat mutatják. A számok a pontos QTL lokalizációt jelzik (a kromoszóma centromertől való távolság; millió bázispár). Az egér QTL-ek bal oldalon láthatók dőlt betűvel. Abh: bronchiális túlérzékenység; Pcfm: perioszteális körfogat és femurhossz; Fcaa: femorális keresztmetszeti terület; Sbmd: gerinc csont ásványi anyag sűrűség; Stia: szérum transzfer indukált arthritis; Aig: autoimmun gastritis; Cia: kollagén-indukált arthritis QTL 2 és 4; Eae: experimentális allergiás encephalomyelitis; Heal: sebgyógyulás; Lbw: egér lupus; Cmo: krónikus multifokális osteomyelitis; Pgia11: PG-indukált arthritis QTL 11. A génkandidátok között vannak ezen lókuszekon belül a következők: IL-1rn: IL-1R antagonist inhibitor; IL-1f5, IL-1f6, IL-1f7, IL-1f8: IL-1 család tagjai (IL-5, 6, 7, és 8); C8g: komplement komponens 8γ; C5: hemolitikus komplement 5; Adamts19: az ADAMTS családba tartozó metalloproteináz 19; IL17b: IL-17 β-lánc; Cd74: MHC-II asszociált invariáns lánc; Csf1r: makrofág CSF 1 receptor; és Nfatc1: NF 1 az aktivált T sejtekben. A humán kromoszóma régiókat szürke oszlopok mutatják a jobb oldalon. Az egér Pgisp1 lókuszek homológ a humán 5. és 18. kromoszóma egyes lókuszaival; a Pgisp2 lókuszek megfelel a humán 2. és 9. kromoszómák bizonyos szakaszainak. A bázispár pozíciókat a humán kromoszóma régiók jobb oldalán láthatjuk. A szürke nyilak azonosított humán SPA lókuszeket mutatnak: AS(Ox): az oxfordi családtanulmány során talált lókuszek; AS(Eu): európai családtanulmányból származó lókuszek.

A BALB/c x DBA/2 keresztezés esetében a fő SPI lókuszt az egér 18. kromoszómájának telomerikus régiójában találtuk (2. ábra és 3A. ábra). A Pgis1 lókuszt a D18Mit55 és D18Mit80-as markerek határolják és 54 Mbp-tól foglal el egy régiót a kromoszóma telomerig. A Pgis1 lókuszt átfedést mutat számos egér QTL-el az autoimmun betegségek tekintetében, mint pl. az egér lupus (Lbw6), PG-, és kollagén indukált arthritis (Pgia11 és Cia18), experimentális allergiás encephalomyelitis (Eae25), sebgyógyulás (Heal9), és krónikus multifokális osteomyelitis (Cmo) (5. ábra).

Az egér Pgis1 lókuszt (54-81 Mbp) homológ a humán 5. kromoszóma hosszú karjának szegmentumaival (110-129 Mbp és 137-150 Mbp) és a 18. kromoszóma szegmentumaival (17-52 Mbp és 64-76 Mbp) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)). Ezen humán kromoszóma szegmentumok két SPA lókuszt tartalmaznak, egyiket (18q) oxfordi családvizsgálat során találták (AS(Ox)) (34). Az AS(Eu) lókuszt pedig európai családtanulmányból származó, az 5. kromoszóma hosszú karján (26) (5. ábra). A kandidáns gének listája a lókuszon belül magában foglalja a következőket: metalloproteináz Adamts 19, IL (IL-17b), MHC-II asszociált invariáns lánc (Cd74), makrofág CSF1 receptor (Csf1r) és mások. A régió szintén tartalmazza az Nfatc1 gént, mely az aktivált T sejtek calcineurin dependens NF1-ét kódolja. Ez a gén regulálja az IL-2 és IL-4 gén transzkripcióját, a differenciálódást, proliferációt és aktiváció indukált sejthalált a T limfocitákban (<http://harvester.embl.de/harvester/>). Minthogy szignifikáns korrelációt találtunk a SPI és T sejt válaszok között, ez a gén a Pgis1 lókuszon belül kézenfekvő kandidánsnak tűnik, mint elsődleges okozati faktor.

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

Az egyszerű intervallum térképezés kissé eltérő pozíciókat mutatott az SPI és SPI<sub>LS</sub> vonatkozásában, az egér 2. kromoszómán (3B és 3C. ábra). Ennek ellenére fenntartjuk a hipotézist, hogy ezen régió belül egyetlen gén/lókuszt kontrollálja a betegségre való fogékonyságot, a következő megfontolások alapján. Először is, az öröklődés módja az SPI és SPI<sub>LS</sub> „csúcsmarkerek” esetében azonos, és a BALB/c allél domináns hatását mutatja. Másodszor, az összetett intervallum térképezés során nem sikerült két lókuszt szétválasztanunk a Pgis2-t, a markerek számának változtatásával. Harmadszor, a SPI és az SPI<sub>LS</sub> klinikai jellemzők szoros korrelációt mutattak a BALB/c x DBA/2 keresztezés F1 és F2 generációjában is.

Az egér Pgis2 lókuszt (26,4-57 Mbp) számos „autoimmun” lókuszt magában foglal, mely pl. összefüggést mutat az antigén-indukált fokozott bronchialis válaszkésztséggel (Abhr1 és Abhr2), az experimentális autoimmun gastritisszel (Aig), kollagén indukálta arthritisszel (Cia2 és Cia4), a szérum transzfer indukálta arthritisszel (Stia2), és experimentális allergiás encephalomyelitisszel (Eae21) (5. ábra). Érdekes módon a Pgis2 szintén átfed olyan QTL-ekkel, melyek kontrollálják a csontváz anatómiai fejlődését, mint pl. a femoralis keresztmetszeti terület (Fcsa5) és a periostealis körfogat és femurhossz (Pcfm1) QTL.

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

lévő is, SPA QTL-eket tartalmaz, melyeket brit családvizsgálatok azonosítottak (24,33,34,48) (5. ábra).

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

A gén kandidánsok közé tartozik a lókuszon belül a komplement  $8\gamma$  komponense (C8  $\gamma$ ) és az IL-1 géncsoport, nevezetesen az IL-1R antagonistá és az IL-1 család öt tagja. Ez utóbbi géncsoportot tartják a legfőbb gén kandidánsnak SPA-ban, a 2. humán kromoszómán, az oxfordi tanulmány szerint (48). A kezdeti genomszűrést és a 2. kromoszómával való kapcsoltságot (33,34,94) megállapítását követően, az oxfordi csoport szignifikáns asszociációt talált egyes génpolimorfizmusok és IL-1 kapcsolt haplotípusok között (48). Saját vizsgálatunkban maga az IL-1 nem mutatott semmilyen szignifikáns kapcsoltságot, valószínűleg mert az IL-1 szérumkoncentrációk nem különböztek szignifikánsan a BALB/c és DBA/2 egerek között (3. táblázat). Bármely génkandidáns, mely a Pgis2 lókusztelomerikus vége és az IL-1 géncsoport között helyezkedik el, valószínűleg szintén funkcionálisan kapcsoltságot mutat a spondylitis fenotípussal.

A legismertebb gén, melyről azt tartják, hogy alapvető szerepe van az ankylosis kialakulásában egerekben, az Ank gén. A 15. kromoszómán bekövetkező spontán mutáció(ka)t, melyek progresszív ankylosishoz vezetnek, 1981-ben (92) és 1988-ban írták le (95,96). Később a mutációt az Ank génen belülre lokalizálta a térképezés (97). Jelenleg úgy gondolják, hogy ezen gén mutációja felelős az ún. craniometaphysealis displasiáért (98) és a kristály lerakódásos arthropathiáért (emberben Mendeli

öröklődésű). Genomszűrésünk során mindössze egyetlen szuggesztív QTL-t találtunk az egér 15. kromoszómán, melyen az Ank gén helyezkedik el (2. ábra). Azonban ez a lókuszt kapcsoltatott a PGIA-szel korábbi tanulmányainkban (99,100), mely azt sugallja, hogy a 15. kromoszóma részben talán szerepet játszik a spondylitis kialakulásában ebben az egérmódelben.

A 2. és 18. kromoszómán lévő két fő SPI lókuszon és a 15. kromoszómán lévő szuggesztív lókuszon kívül négy további lókuszt mutatott valószínű kapcsoltatott (2. ábra). QTL-eket találtunk a 11., 12. és 19. kromoszómákon (LRS érték sorrendben 11,0; 12,5; 12,1). A 12. kromoszóma telomerikus részén talált szuggesztív szintű spondylitis QTL tartalmazza az Ig H lánc géncsoportot ([\\_www.ensembl.org/Mus\\_musculus/\\_](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/)). Ezt a lókuszt, mely a PGIA-t, vagy az IgG2a szérumban koncentrációt, vagy mindkettőt kontrollálja, a laboratóriumunkban létrehozott számos keresztezett egércsoportban megtaláltuk, bár szignifikáns kapcsoltatási szintet csak a C3H x C57BL/6 keresztezés esetén ért el ez a QTL (101).

A fő IgG2a és IL-6 QTL-ek nem estek sem a Pgis1, sem a Pgis2 régióba belülről a 2. és 18. kromoszómán. Azonban átfedés van a spondylitis és az immunológiai QTL-ek között, ha a szuggesztív kapcsoltatási határértéket vesszük figyelembe. A 11. kromoszóma telomerikus része egy szuggesztív spondylitis fogékonysági lókuszt hordoz, mely egybe esik az IgG2a-ra vonatkozó legnagyobb csúccsal (2. ábra). Ezen túlmenően korábbi vizsgálataink két arthritist kontrolláló QTL-t mutattak a 11. kromoszómán (Pgia7 és Pgia8 (99-101), melyek ugyanazon régiókat foglalják el, mint az újonnan felfedezett IgG2a QTL-ek ebben a keresztezésben. A 14. kromoszóma pedig a Pgia29 arthritis lókuszt hordozza, mely az IL-6 QTL-el mutat közös pozíciót.

Mind a T, mind a B sejtek egér arthritis és spondylitis indukcióban betöltött központi szerepét megmutatták korábbi adoptív betegség transzferes kísérleteink (102). A donor limfociták T helper és T szuppresszor sejtekre specifikus antitestekkel való depléciója, hasonlóan a B sejtek depléciójához, megakadályozta a sikeres betegség transzfert. Sem anti-PG antitestek, sem önmagukban a PG-specifikus B sejtek nem tudták átvinni a betegséget, hanem a T és B sejt alpopulációk közötti kooperáció volt szükséges (102-104). A szülői BALB/c egerek PG immunizálás mellett kétszer több IL-6-ot termeltek, mint a DBA/2 egerek (57,8 pg/ml vs 30,1 pg/ml,  $p < 0.013$ ); az IgG2a Ig szérum koncentráció háromszor magasabb volt, míg az IgG1 koncentráció háromszor alacsonyabb volt a BALB/c egerek esetében, összevetve a DBA/2-vel (3. táblázat). A betegség súlyosság és Th2 mediált antigén specifikus Ig szintek közötti korrelációk a BALB/c x DBA/2 F2 hibrid egerekben is szignifikánsak voltak. A spondylitissal a legerősebb korrelációt az IL-6 és az IgG1 antitest izotípus esetében találtuk: az SPI vs IL-6 korrelációs koefficiens ( $r_s$ ) 0,43, az SPI vs IgG1 0,23 volt. A PG stimulált limfociták általi Th1 asszociált in vitro IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  termelés negatív korrelációt mutatott a spondylitissal az F2 hibrid egerekben. Ez alátámasztotta a Th2 típusú válasz vezető szerepét a betegség patogenezisében. Ennek megfelelően azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az erőteljes genetikai predispozíció a Th2 válasz irányában, és az arthritisre és spondylitisre való fogékonyság hasonló a szülői törzsekben és a genetikailag kevert F2 hibrid egerekben. Az F2 populáció hasonló patológiát mutat, mint azt a szülői BALB/c törzsben láttuk.

A klinikai és immunológiai jellegzetességek QTL-jeinek együttes lokalizációja, mint azt a 11. és 12. kromoszómák esetében láttuk, hatékony megközelítésnek látszik a

spondylitis fogékonysági gének effektív feltérképezéséhez és ezen lókuszek szerepének jobb megértéséhez, ezáltal a spondylitis mechanizmusának megvilágításához.

## 6. Összefoglalás

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

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

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

## 7. Summary

The HLA-B27 antigen has been accounted for 20-50% of the total genetic risk for ankylosing spondylitis (AS). However, susceptibility to AS cannot be fully explained by associations with the major histocompatibility complex (MHC). Recent studies including linkage analyses as well as candidate gene and, most recently, genome-wide association studies indicate significant associations of the interleukin-1 gene cluster, interleukin-23 receptor and ARTS1 genes, as well as other possible loci with AS.

In our experimental model autoimmune spondylitis was induced in BALB/c mice and their MHC-matched (BALB/c x DBA/2) F1 and F2 hybrids by systemic immunization with cartilage/intervertebral disk proteoglycan (PG). As in human ankylosing spondylitis, the MHC was the major permissive genetic locus in murine PG-induced spondylitis (PGIS). Two major non-MHC chromosome loci with highly significant linkage were found on chromosomes 2 (*Pgis2*) and 18 (*Pgis1*) accounting for 40% of the entire F2 trait variance. The dominant spondylitis-susceptibility allele for *Pgis2* locus is derived from the BALB/c strain, whereas the *Pgis1* recessive allele was present in the disease-resistant DBA/2 strain. The *Pgis1* locus significantly affected the disease-controlling *Pgis2* locus, inducing as high incidence of spondylitis in F2 hybrids as was found in the spondylitis-susceptible parent BALB/c strain. Additional disease-controlling loci with suggestive linkage were mapped to the chromosomes 12, 15, and 19. Severity of spondylitis in F2 mice positively correlated with serum levels of amyloid A, IL-6, and Pg-specific Abs, and showed negative correlation with Ag-induced T cell proliferation, IFN- $\gamma$ , IL-4, and TNF- $\alpha$  production. A major locus controlling serum IL-6 was found on chromosome 14 near osteoclast differentiation factor *Tnfsf11*. Locus on chromosome 11 near the *Stat3* and *Stat5* genes controlled serum level of the IgG2a isotype. The two major genetic loci *Pgis1* and *Pgis2* of murine spondylitis were homologous to chromosome regions in human genome, which control ankylosing

spondylitis in human patients. Thus, this animal model of experimentally induced spondylitis might facilitate the identification of spondylitis-susceptibility genes in humans.

## 8. Irodalomjegyzék

1. van der Linden SM, van der Heijde D, Maksymowych WP. Ankylosing spondylitis. In: Kelley's Textbook of Rheumatology, 8th edition (Firestein GS, Budd RC, Harris ED jr, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS, eds), Volume II, Chapter 70, Saunders-Elsevier, Philadelphia, 2008; 1169-90.
2. Brionez TF, Reveille JD. The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:384-91.
3. Breban M, Miceli-Richard C, Zinovieva E, et al. The genetics of spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine* 2006;73:355-62.
4. Brown MA. Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2008;47:132-37.
5. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Berthelot JM, et al. The familial form of spondylarthropathy: a clinical study of 115 multiplex families. *Arthritis Rheum* 2000;43:1356-65.
6. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, D'Agostino MA, et al. Phenotypic diversity is not determined by independent genetic factors in familial spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2001;45:478-84.
7. van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, et al. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum* 1984;27:361-8.
8. Järvinen P. Occurrence of ankylosing spondylitis in a nationwide series of twins. *Arthritis Rheum* 1995;38:381-3.
9. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997;40:1823-8.
10. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, et al. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann Rheum Dis* 1996;55:268-70.
11. Reveille JD. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:601-9.
12. Gran JT, Husby G, Hordvik M, et al. Prevalence of ankylosing spondylitis in males and females in a young middle-aged population of Tromsø, northern Norway. *Ann Rheum Dis* 1985;44:359-67.
13. Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998;41:58-67.
14. Khan MA. Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med* 2002;136:896-907.
15. Ebringer A, Wilson C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol* 2000;49:305-11.
16. Ebringer RW, Cawdell DR, Cowling P, Ebringer A. Sequential studies in ankylosing spondylitis. Association of *Klebsiella pneumoniae* with active disease. *Ann Rheum Dis* 1978;37:146-51.
17. Hermann E, Sucké B, Droste U, Zum Büschenfelde K-HM. *Klebsiella pneumoniae*-reactive T cells in blood and synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995;38:1277-82.

18. Carter KW, Pluzhnikov A, Timms AE, et al. Combined analysis of three whole genome linkage scans for ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2007;48:763-71.
19. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-83.
20. Wellcome Trust Case Control Consortium and The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium. A genome-wide scan of 14,000 non-synonymous coding SNPs in 5,500 individuals. *Nat Genet* 2007;39:1329-36.
21. Amor B, Feldmann JL, Delbarre F, et al. HLA antigen W27- a genetic link between ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome? *N Engl J Med* 1974;290:572.
22. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 1973;1:904-7.
23. van der Linden, Khan MA. The risk of ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a reappraisal. *J Rheumatol* 1984;11:727-8.
24. Laval SH, Timms A, Edwards S, et al. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2001;68:918-26.
25. Miceli-Richard C, Zouali H, Said-Nahal R, et al. Significant linkage to spondylarthropathy on 9q31-34. *Hum Mol Genet* 2004;13:1641-8.
26. Zhang G, Luo J, Bruckel J, et al. Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004;50:2246-54.
27. Breban M, Hacquard-Bouder C, Falgarone G. Animal models of HLA-B27-associated diseases. *Curr Mol Med* 2004;4:21-40.
28. Hildebrand WH, Turnquist HR, Prilliman KR, et al. HLA class I polymorphism has a dual impact on ligand binding and chaperone interaction. *Hum Immunol* 2002;63:248-55.
29. Lopez-Larrea C, Mijiyawa M, Gonzalez S, et al. Association of ankylosing spondylitis with HLA-B\*1403 in a West African population. *Arthritis Rheum* 2002;46:2968-71.
30. Breban M, Said-Nahal R, Hugot JP, et al. Familial and genetic aspects of spondylarthropathy. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:575-94.
31. Colbert RA. The immunobiology of HLA-B27: variations on a theme. *Curr Mol Med* 2004;4:21-30.
32. Kuon W, Kuhne M, Busch DH, et al. Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondyloarthropathy. *J Immunol* 2004;173:4859-66.
33. Brown MA, Pile KD, Kennedy GL, et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998;41:588-95.
34. Brown MA, Brophy S, Bradbury L, et al. Identification of major loci controlling clinical manifestations of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2234-9.
35. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta_2m$ : an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990;63:1099-112.

36. Krug HE, Wietgreffe MM, Ytterberg ST, et al. Murine progressive ankylosis is not immunologically mediated. *J Rheumatol* 1997;24:115-22.
37. Szabo Z, Szanto S, Vegvari A, et al. Genetic control of experimental spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2005;52:2452-60.
38. Vegvari A, Szabo Z, Szanto S, et al. Two major interacting chromosome loci control disease susceptibility in murine model of spondyloarthropathy. *J Immunol* 2005;175:2475-83.
39. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995;11:241-7.
40. Martin TM, Zhang G, Luo J, et al. A locus on chromosome 9p predisposes to a specific disease manifestation, acute anterior uveitis in ankylosing spondylitis, a genetically complex, multisystem, inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 2005;52:269-74.
41. Hamersma J, Cardon LR, Bradbury L, et al. Is disease severity in ankylosing spondylitis genetically determined? *Arthritis Rheum* 2001;44:1396-400.
42. Brown MA. Nonmajor-histocompatibility-complex genetics of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:611-21.
43. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, et al. The role of IL1 and IL1-Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* 2006;74:371-403.
44. Szekanecz Z, Koch AE. Cytokines. In: Kelley's Textbook of Rheumatology, 6th Edition (Ruddy S, Harris jr. ED, Sledge CB, Budd RC, Sergent JS, eds), Chapter II.20., W.B. Saunders, Philadelphia, 2001;275-90.
45. McGarry F, Neilly J, Anderson N, et al. A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2001; 40:1359-64.
46. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, et al. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2002;41:1419-23.
47. Li J, Ge Z, Akey JM, et al. Lack of linkage of IL1RN genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004;50:3047-8.
48. Timms AE, Crane AM, Sims AM, et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet* 2004;75:587-95.
49. Maksymowych WP, Rahman P, Reeve JP, et al. Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum* 2006;54:974-85.
50. Wu Z, Gu JR. A meta-analysis on interleukin-1 gene cluster polymorphism and genetic susceptibility for ankylosing spondylitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87:433-7.
51. Maksymowych WP, reeve JP, Reveille JD, et al. High-throughput single-nucleotide polymorphism analysis of the ILRN locus in patients with ankylosing spondylitis by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Arthritis Rheum* 2003;48:2011-8.
52. Chou CT, Timms AE, Wei JCC, et al. Replication of association of IL1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Taiwanese Chinese. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1106-9.

53. Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J, et al. Prospective meta-analysis of IL-1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1305-9.
54. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
55. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, et al. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007;132:1657-64.
56. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007;80:273-90.
57. Faragó B, Magyari L, Safrany E, et al. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:248-50.
58. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218-22.
59. Rahman P, Inman GD, Gladman DD, et al. Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1020-5.
60. Rueda B, Orozco G, Raya E, et al. The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1451-4.
61. Cui X, Rouhani F, Hawari F, et al. An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 2003;278:28677-85.
62. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, et al. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase: aminopeptidase regulator of TNF receptor type I shedding. *J Immunol* 2003;171:6814-9.
63. Hammer GE, Kanaseki T, Shastri N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* 2007;26:397-406.
64. Firat E, Saveanu L, Aichele P, et al. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* 2007;178:2241-8.
65. Brown MA, Edwards S, Hoyle E, et al. Polymorphisms of the CYP2D6 gene increase susceptibility to ankylosing spondylitis. *Hum Mol Genet* 2000;9:1563-6.
66. Jaakkola E, Crane AM, Laiho K, et al. The effect of transforming growth factor  $\beta$ 1 gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2004;43:32-8.
67. Tsui HW, Inman RD, Paterson AD, et al. ANKH variants associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R513-R525.
68. Snelgrove T, Lim S, Greenwood C, et al. Association of toll-like receptor 4 variants and ankylosing spondylitis: a case-control study. *J Rheumatol* 2007;34:368-70.
69. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis: no evidence for the involvement of transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms. *Ann Rheum Dis* 2005;64:616-9.
70. Timms AE, Zhang Y, Bradbury L, et al. Investigation on the role of ANKH in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2898-2902.

71. Gergely P, Blazsek A, Weiszhar Z, et al. Lack of genetic association of the toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondyloarthropathies in a Hungarian population. *Rheumatology* 2006;45:1194-6.
72. Adam R, Sturrock RD, Gracie JA. TLR4 mutations (Asp299Gly and Thr399Ile) are not associated with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1099-101.
73. Kaluza W, Leirisalo-Repo M, Marker-Hermann E, et al. IL10.G microsatellites mark promoter haplotypes associated with protection against the development of reactive arthritis in Finnish patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:1209-14.
74. Goedecke V, Crane AM, Jaakkola E, et al. Interleukin 10 polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 2003;4:74-6.
75. van der Paardt M, Crusius JBA, de Koning MHMT, et al. CARD15 gene mutations are not associated with ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 2003;4:77-8.
76. Ferreiros-Vidal I, Amarelo J, Barros F, et al. Lack of association of ankylosing spondylitis with the most common NOD2 susceptibility alleles to Crohn's disease. *J Rheumatol* 2003;30:102-4.
77. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987;30:201-12.
78. 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;30:306-18.
79. Adarichev VA, Valdez JC, Bárdos T, et al. Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci. *J Immunol* 2003;170:2283-92.
80. Pizcueta P, Luscinskas FW. Monoclonal antibody blockade of L-selectin inhibits mononuclear leukocyte recruitment to inflammatory sites in vivo. *Am J Pathol* 1994;145:461-9.
81. Hanyecz, A., S. E. Berlo, S. Szanto, C. P. M. Broeren, K. Mikecz, and T. T. Glant. 2004. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype. *Arthritis Rheum.* 50: 1665–1676.
82. Glant, T. T., and K. Mikecz. 2004. Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis. *Methods Mol. Med.* 102: 313–338.
83. Bardos, T., Z. Szabo, M. Czipri, C. Vermes, M. Tunyogi-Csapo, and K. Mikecz. 2005. Longitudinal study of an autoimmune murine model for ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 64: 981–987.
84. Adarichev, V. A., T. Bárdos, S. Christodoulou, M. T. Phillips, K. Mikecz, and T. T. Glant. 2002. Major histocompatibility complex controls susceptibility and dominant inheritance, but not the severity of the disease in mouse models of rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 54: 184–192.
85. Manly, K. F., R. H. Cudmore, Jr., and J. M. Meer. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm. Genome* 12: 930–932.
86. Basten, C. J., B. S. Weir, and Z.-B. Zeng. 1994. Zmap-a QTL cartographer. In 5th

- World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Organizing Committee. C. Smith, J. S. Gavora, B. Benkel, J. Chesnais, W. Fairfull, J. P. Gibson, B. W. Kennedy, and E. B. Burnside, eds. Ontario, Canada, pp. 65–66.
87. Churchill, G. A., and R. W. Doerge. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963–971.
  88. Nickerson, C. L., H. S. Luthra, S. Savarirayan, and C. S. David. 1990. Susceptibility of HLA-B27 transgenic mice to *Yersinia enterocolitica* infection. *Hum Immunol.* 28: 382–396.
  89. Nickerson, C. L., H. S. Luthra, and C. S. David. 1990. Role of enterobacteria and HLA-B-27 in spondyloarthropathies: studies with transgenic mice. *Ann. Rheum. Dis.* 49: 426–433.
  90. Crew, M. D., R. B. Effros, R. L. Walford, E. Zeller, H. Cheroutre, and E. Brahn. 1998. Transgenic mice expressing a truncated *Peromyscus leucopus* TNF- $\alpha$  gene manifest an arthritis resembling ankylosing spondylitis. *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 219–225.
  91. Zhang, Y. 2003. Animal models of inflammatory spinal and sacroiliac joint diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 29: 631–645.
  92. Sweet, H. O., and M. C. Green. 1981. Progressive ankylosis: a new skeletal mutation in the mouse. *J. Heredity* 72: 87–93.
  93. Ho, A. M., M. D. Johnson, and D. M. Kingsley. 2000. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289: 265–270.
  94. Shepard, N., and N. Mitchell. 1977. The localization of articular cartilage proteoglycan by electron microscopy. *Anat. Rec.* 187: 463–476.
  95. Mahowald, M. L., H. Krug, and J. Taurog. 1988. Progressive ankylosis in mice: an animal model of spondylarthropathy. I. Clinical and radiographic findings. *Arthritis Rheum.* 31: 1390–1399.
  96. Sampson, H. W. 1988. Spondyloarthropathy in progressive ankylosis (ank/ank) mice: morphological features. *Spine* 13: 645–649.
  97. Ho, A. M., M. D. Johnson, and D. M. Kingsley. 2000. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289: 265–270.
  98. Reichenberger, E., V. Tiziani, S. Watanabe, L. Park, Y. Ueki, C. Santanna, S. T. Baur, R. Shiang, D. K. Grange, P. Beighton, et al. 2001. Autosomal dominant craniometaphyseal dysplasia is caused by mutations in the transmembrane protein ANK. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1321–1326.
  99. Otto, J. M., G. Cs-Szabo', J. Gallagher, S. Velins, K. Mikecz, E. I. Buza's, J. T. Enders, Y. Li, B. R. Olsen, and T. T. Glant. 1999. Identification of multiple loci linked to inflammation and autoantibody production by a genome scan of a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42: 2524–2531.
  100. Adarichev, V. A., A. B. Nesterovitch, T. Bárdos, D. Bieszcza, R. Chandrasekaran, C. Vermes, K. Mikecz, A. Finnegan, and T. T. Glant. 2003. Sex effect on clinical and immunological quantitative trait loci in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48: 1708–1720.
  101. Otto, J. M., R. Chandrasekaran, C. Vermes, K. Mikecz, A. Finnegan, S. E. Rickert, J. T. Enders, and T. T. Glant. 2000. A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 165: 5278–5286.

102. Mikecz, K., T. T. Glant, E. Buza's, and A. R. Poole. 1990. Proteoglycan-induced polyarthritis and spondylitis adoptively transferred to naive (nonimmunized) BALB/c mice. *Arthritis Rheum.* 33: 866–876.
103. Mikecz, K., and T. T. Glant. 1994. Migration and homing of lymphocytes to lymphoid and synovial tissues in proteoglycan-induced murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 37: 1395–1403.
104. Bárdos, T., K. Mikecz, A. Finnegan, J. Zhang, and T. T. Glant. 2002. T and B cell recovery in arthritis adoptively transferred to SCID mice: Antigen-specific activation is required for restoration of autopathogenic CD4<sup>+</sup> Th1 cells in a syngeneic system. *J. Immunol.* 168: 6013–6021.

## 9. Saját közlemények

### 9.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

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

Összes: IF 8.14

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

1. Szabo, Z., Szanto, S., **Vegvari, A.**, Szekanecz, Z., Mikecz, K., Glant, T.T.: Genetic control of experimental spondylarthropathy. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52(8): 2452-2460. (IF: 7.41)
2. Glant TT, Szabó Z, **Végyári A**, Szántó S, Mikecz K. A TSG-6/Tnfr1 gyulladásgátló hatása arthritisben. *Magyar Reumatológia*, 2005, 46: 5-13. (IF 0)
3. Glant TT, Szántó S, **Vegvari A**, Szabo Z, Kis-Toth K, Mikecz K, Adarichev VA. Two loci on chromosome 15 control experimentally induced arthritis through the differential regulation of IL-6 and lymphocyte proliferation. *J Immunol*. 2008 Jul 15;181(2):1307-14. (IF 6.29)
4. Adarichev VA, **Vegvari A**, Szabo Z, Kis-Toth K, Mikecz K, Glant TT. Congenic strains displaying similar clinical phenotype of arthritis represent different immunologic models of inflammation. *Genes Immun*. 2008 Oct;9(7):591-601. (IF 4.53)
5. Kapitány A., Szabó Z., Lakos G., Aleksza M., **Végyári A.**, Soós L., Karányi Z., Sipka S., Szegedi G., Szekanecz Z.: Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J (IMAJ)*, 10: 32-36, 2008. (IF 0,58)
6. Szekanecz Z., Soós L., Szabó Z., Fekete A., Kapitány A., **Végyári, A.**, Sipka, S., Szűcs G., Szántó S., Lakos, G.: Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol*, 34: 26-31, 2008. (IF 2.07)

7. Besenyei T, **Végyári A**, Szabó Z, Szekanecz Z.: Az endothelsejtek, leukocita migráció, chemokinek és angiogenezis jelentősége gyulladásoos reumatológiai kórképekben. *Magy Immunol*, 2008/1-2: 4-21, 2008. **(IF 0)**
8. Szántó S., Aleksza M., Mihály E., Lakos G., Szabó Z., **Végyári A.**, Sipka S., Szekanecz Z.: Intracytoplasmic cytokine expression and T cell subset distribution in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2008 Nov 1 [Epub ahead of print] **(IF 3.15)**
9. Szekanecz, Z., Aleksza, M., Antal-Szalmás, P., Soltész, P., Veres, K., Szántó, S., Szabó, Z., **Végyári, A.**, Szamosi, S., Lakos, G., Sipka, S., Szegedi, G., Varga, J., Szűcs G. Combined plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment in systemic sclerosis for 12 months: follow-up of immunopathological and clinical effects. *Clin Rheumatol*, 2008 Dec 6 [Epub ahead of print] **(IF 1.64)**
10. Kerekes G, Soltész P, Dér H, Veres K, Szabó Z, **Végyári A**, Shoenfeld Y, Szekanecz Z.: Effects of biologics on vascular function and atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*, in press. **(IF 1.73)**
11. Kerekes G, Soltész P, Dér H, Veres K, Szabó Z, **Végyári A**, Szegedi G, Shoenfeld Y, Szekanecz Z. Effects of rituximab treatment on endothelial dysfunction, carotid atherosclerosis and lipid porofile in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2009 March 25 [Epub] **(IF 1.64)**

**IF: 29.05**

**Összes IF: 37.19**

## **10. Tárgyszavak:**

spondylitis ankylopoetica; proteoglikán indukálta spondylitis; fogékonysági gének; kapcsoltság analízis; HLA-B27 kapcsoltság; genomszűrés

**Keywords:** ankylosing spondylitis; proteoglycan induced spondylitis; susceptibility genes; linkage analysis; HLA-B27 association; genome scan

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönetemet fejezem ki Dr. Szekanecz Zoltán professzor úrnak és Dr. Glant Tibor professzor úrnak, akik kutatómunkámat irányították, a témaválasztásban és a munka gyakorlati megvalósításában nélkülözhetetlenül fontos segítséget nyújtottak.

Köszönetet mondok minden kollégámnak és barátomnak, hogy tanácsaikkal, támogatásukkal munkám elkészültéhez hozzájárultak.

Köszönet családomnak a támogatásáért és buzdításáért, mely lehetővé tette e munka elkészítését.