

EGYETEMI DOKTORI /Ph.D./ ÉRTEKEZÉS

**A SJÖGREN-SZINDRÓMA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI
MEGKÖZELÍTÉSE**

DR. URBÁN LÁSZLÓ

TÉMAVEZETŐ: DR. SEMSEI IMRE

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. SZEGEDI GYULA

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum

III. sz. Belgyógyászati Klinika

Molekuláris Biológiai Kutató Laboratórium

Debrecen, 2004

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
I. BEVEZETÉS	3
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
A poliszisztémás autoimmun betegségek és a Sjögren-szindróma	5
Az La autoantigén	11
Az La autoantigén splicing variánsai és a 7-es exon forrópont régiója	12
A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése	16
A t(14;18) kromoszóma transzlokáció jelentősége	19
Az autoimmunitás és az öregedés kapcsolata	21
III. CÉLKITŰZÉSEK	23
IV. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	24
1. Betegismertetések	24
2. Módszerek	24
a. Sejtizolálás	24
b. DNS szeparálás	24
c. Differential display	24
d. Polimeráz láncreakció	26
e. Egyszálú DNS konformációs polimorfizmus (SSCP)	27
f. Szekvenálás	28

V.	EREDMÉNYEK	29
	1. A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése	29
	2. Az La gén 7-es exon forrópont mutációi	31
	3. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kapcsolata a Sjögren-szindrómával	33
	4. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kapcsolata egyes tüdőkarinómákkal	36
	5. Az öregedés szerepe az autoimmunitás etiológiájában	38
	6. A genetikai polimorfizmus kapcsolata az öregedéssel és betegségekkel	39
VI.	MEGBESZÉLÉS	40
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	60
	Magyar nyelvű	60
	Angol nyelvű	61
VII.	IRODALOMJEGYZÉK	62
IX.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79
X.	FÜGGELÉK	80
	1. Rövidítések jegyzéke	80
	2. Előadások jegyzéke	81
	3. Közlemények jegyzéke	83
	4. Közlemények másolatai	85

I. BEVEZETÉS

A poliszisztémás autoimmun betegségek nagy csoportjába több betegség sorolható be, így pl. a szisztémás lupus erythematosus (SLE), a kevert kötőszöveti betegség (MCTD) és a Sjögren-szindróma is (Ss). A Sjögren-szindrómában főként a könny-, nyál-, és egyéb exocrin mirigyek működése károsodott, mind amellet, hogy más szervek működése is zavart szenvedhet. Primer és szekunder formája ismert, utóbbinál a rheumatoid arthritissel (RA), SLE-vel vagy más betegségekkel is társulhat.

Ezen autoimmun betegségek kialakulásában több tényező játszik szerepet, így az immunregulációs zavart előidéző komplex genetikai háttér, továbbá hormonális tényezők, valamint egyéb külső és belső faktorok (exogén, endogén és retrovírusok, UV-sugárzás, kémiai anyagok, gyógyszerek, stb.). Az Ss betegek séruma legtöbbször nukleáris antigének ellen termelődött antitesteket (ANA) tartalmaz. Az ANA-k nagy gyakorisággal a géneexpresszióban különböző funkciókat ellátó fehérjék ellen termelődnek, így pl. a hnRNS feldolgozásában részt vevő fehérje, az RNS polimeráz III transzkripciós faktora, az La/SS-B ellen. Az egyes betegségekre jellemző marker autoantitestek - így az anti-La/SS-B - jelentőségét nem kérdőjelezi meg senki, és mint ilyenek, igen fontos szerepet játszanak a betegség felismerésében, diagnosztikájában, de patológiai jelenségek, történések kialakításában is részt vehetnek.

Disszertációmban azokat az eredményeket írtam le, melyeket az La autoantigén molekuláris biológiai módszerek felhasználásával történt tanulmányozása során kaptunk, hogy tovább tisztázhassuk szerepét a Sjögren-szindróma patomechanizmusában. Emellett megkezdük a Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítésének előkészítését, illetve tanulmányoztuk a t(14;18) kromoszóma transzlokáció jelentőségét a Sjögren-szindróma egyik

fő halálzási okaként jelentkező lymphoproliferatív szindrómákkal kapcsolatban. Végül pedig az öregedéssel fokozottabban jelentkező Sjögren-szindróma etiológiájának összefüggéseit is megvizsgáltuk az öregedés általános folyamataival kapcsolatban, mely további elméleti adalékokkal szolgálhat a betegség etiopatogenezisének felderítéséhez.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A poliszisztémás autoimmun betegségek és a Sjögren-szindróma

A Sjögren-szindróma (Sjögren, 1933; Moutsopoulos és Youinou, 1991; Zeher 1990, Zeher és Szegedi, 1998) olyan több szervrendszert érintő betegség, melyre leginkább a szem- és száj szárazsága hívja fel a figyelmet. Az autoimmun gyulladási folyamat következtében a könny-, nyál-, és egyéb exocrin mirigyek működése károsodik, váladékot termelő képességük csökken. A nyálmirigyek megduzzadnak, fájdalmasak lehetnek. Mindezek mellett non-erosiv polyarthritis, vasculitis, myositis, központi idegrendszeri károsodásra utaló tünetek (Alexander és mtsai, 1981), vese és tüdőelváltozások alakulhatnak ki. A Ss primer és szekunder formáját különítjük el. A primer forma esetén a betegség keratoconjunctivitis sicca, egyéb glanduláris (légzőszervi eltérések, gastrointestinális tünetek, xeroderma és a genitális traktus elváltozásai), és extraglanduláris tünetek (polyarthritis, vasculitis, idegrendszeri eltérések, myositis, pneumonitis, lymphadenopathia, veseelváltozások) együtteséből áll. Szekunder formáról akkor beszélünk, ha a klasszikus sicca komplex egyéb poliszisztémás autoimmun betegséggel (pl. rheumatoid arthritis, systemás lupus erythematosus, stb.) együtt jelenik meg.

A Sjögren-szindróma gyakorisága eléri az 1%-ot, a rheumatoid arthritissel közel azonos gyakorisággal figyelhetjük meg. Elsősorban 40-50 év közötti nőket érint, a nők férfiak aránya 9:1. A menopausa éveiben kialakulására lényegesen nagyobb az esély, de néhány gyermekkori esetről is beszámoltak.

A Ss a poliszisztémás autoimmun betegségek csoportjába tartozó multifaktoriális betegség, melyben a target szövetek pusztulását autoimmun jelenségek idézik elő. Az exocrin mirigyekben és a parenchimás szervekben autoreaktív, cytotoxikus T sejtek

szaporodnak fel, melyek szöveti pusztulást idéznek elő. A CD4 és CD5 pozitív T sejtek és B-sejtek (Zeher és mtsai, 1990) aktiválásával lokálisan immunoglobulinok, autoantitestek, és immunkomplexek termelését idézik elő, melyhez számos citokin részvétele szükséges (Zeher és mtsai, 1997; Ogawa és mtsai, 1995). Bizonyos extraglanduláris tünetek, például a vasculitisek kifejlődésében a két folyamat együttesen figyelhető meg. Az epithel sejteken kialakuló nem megfelelő HLA-DR expresszió (Moutsopoulos és mtsai, 1986; 1991) alapján feltételezhető, hogy antigének prezentálásra képessé válnak. Az exocrin mirigyekben levő fokális lymphocytás infiltráció perzisztálását és fokozását a T sejtek csökkent Fas-ligand és fokozott bcl-2 expressziója segíti elő, mely mechanizmus szerepet játszhat a malignus lymphomák kialakulásában is. Az irodalmi adatok szerint a korban és nemben egyeztetett kontroll csoporthoz képest a malignus lymphomák kialakulása 40-szer gyakoribb a Ss betegekben (Bunin és Talal, 1963; Talal és Bunim, 1964; Kassan és mtsai, 1978; Zeher és mtsai, 1998). A Sjögren-szindrómás + non-Hodgkin lymphomás esetekre jellemző, hogy a lymphoma évekkal követi az autoimmun betegséget, általában az alacsony malignitású B-sejtes formák jelennek meg, melyek 50%-ában a túlélés eléri az 5 évet. A lymphoma képződésében a vírusok (HTLV-1, Herpesvírus 6, EBV, HCV), az o-6-methylguanin mutációja, a B1 sejtek hyperstimulációja, illetve a bcl-2 oncoprotein apoptózis-gátlása valószínűsíthető.

A betegség kialakulásában több tényező szerepét tételezik fel. Bizonyos környezeti behatásokra (vírusok, gyógyszerek, UV sugárzás), illetve sajátos genetikai hajlam esetén a kórkép teljes formájában évek alatt alakul ki. A Ss etiopathogenezisében a herpes (EBV, CMV, Herpesvírus 6) és retrovírusoknak (HIV-1, HTLV-1, human retrovírus 5) tulajdonítanak szerepet, melyek, mint ubiquiter vírusok a nyálmirigy epithelsejtjeiben perzisztálnak és trigger szerepük lehet az autoimmun gyulladási folyamat elindításában. A

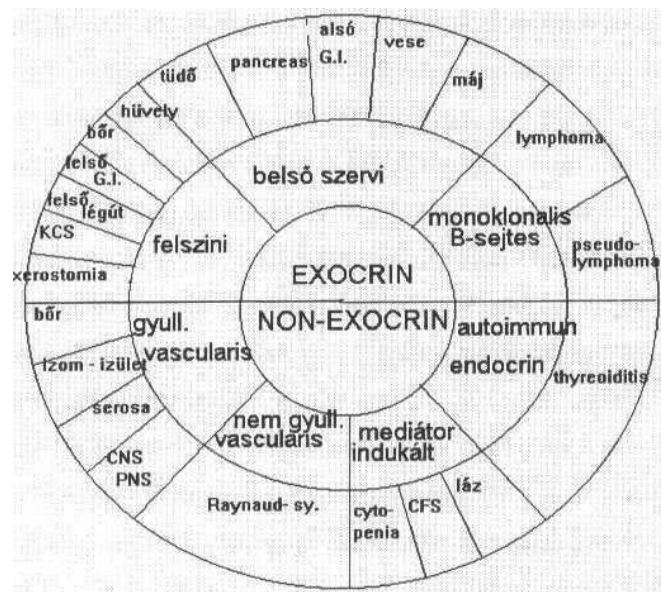
Sjögren-szindrómában az SS-A/Ro és SS-B/La autoantigén ellen figyelhető meg autoantitest képződés (Harley és mtsai, 1986). A Ro és La autoantitest szerepe teljes mértékig még nem bizonyított, de vannak olyan megfigyelések, hogy bizonyos extraglanduláris tünetek (pl. vasculitis) megjelenésével szoros asszociációt mutatnak, így feltételezhető, hogy a szöveti károsodások kialakításában közvetlenül is részt vesznek. Az utóbbi időben elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a Sjögren-szindrómás betegek nyálmirigyében kialakuló acinus-, és ductus epithelsejtek károsodásában nagy jelentőséget tulajdonítanak a sejtek fas-mediált apoptotikus károsodásának is. Korábbi vizsgálatok a nyálmirigy acinusok és ductusok epithel sejteinek pusztulásában az autoimmun gyulladásban résztvevő lymphocyták direkt szerepét is feltételezik. Ezek alapján úgynevezett autoimmun epithelitis alakul ki, melynek eredményeként az epithel sejtek destruálódnak. Hasonló elváltozást a Ss betegek bronchus epithel sejtjein figyeltek meg.

Primer Sjögren-szindrómában régebben a HLA-B8 antigénnel való asszociáció volt ismert, míg az újabb kutatások alapján szoros kapcsolat a DR3 alloantigénnel áll fenn. Ismert az is, hogy a HLA-DQW1 előfordulási gyakorisága igen magas, mely azért jelentős, mert szerepet tulajdonítanak neki a poliklonális B-sejt aktiváció regulációjában. Világossá vált, hogy eltérő a primer és szekunder forma immungenetikai háttere (Moutsopoulos és mtsai, 1975; Manthorpe és mtsai, 1985), hiszen a szekunder formában, ha az Ss rheumatoid arthritissel társul, ez utóbbira jellemző DR4 antigén asszociációja figyelhető meg. Legújabban kimutatták, hogy a nemrég felismert egyik allogén, a DRW52 mindkét Sjögren forma esetén igen gyakran, 80-90%-ban kimutatható. Mivel az immunreaktivitási gének a D lokusz antigénjeihez kötöttek, érdekes az a megfigyelés, hogy egyes HLA antigének jelenléte meghatározhatja a Ss betegek fokozott antitest termelő képességét. Az anti-SS-A ellenanyag pozitívitás a DR2 antigénnel, míg az anti-SS-B ellenanyag termelése a DR3 antigénnel mutat

szoros összefüggést. Kimutatható az is, hogy a HLA-DQ1/DQ2 heterozigótákban az anti-SS-A, anti-SS-B és a reuma faktor igen magas titerben jelenik meg.

Klinikai tünetek és diagnosztikus kritériumok

A primer Sjögren-szindróma klinikai tüneteit exocrin (glanduláris) és non-exocrin vagy extraglandularis csoportba soroljuk (Talal és mtsai, 1987; Zeher és mtsai, 1989). A tüneteket összefoglaló „diagnosztikus kereket” mutatja az alábbi ábra:



A Sjögren-szindróma tüneteinek összefoglalása. GI = gastrointestinális; CNS = központi idegrendszer; PNS = perifériás idegek; CFS = krónikus fáradtság szindróma.

A diagnosztikus kereken feltüntetett tünetek bármilyen variációja előfordulhat, de nem követelménye a diagnosztikus kritériumoknak, hogy valamennyi tünet jelen legyen.

A Sjögren-szindróma megállapításánál használt diagnosztikus tesztek eredményeit kritériumrendszer formájában értékeljük. Több kritériumrendszer létezik (pl. Fox és mtsai, 1986), ma a Vitali és mtsai (1992) által kimunkált a legelfogadottabb. Az alábbi összefoglaló táblázat jól szemlélteti ezeket a kritériumokat és kritériumrendszereket.

	Munkacsoportok			
	Skandináv	Görög	Amerikai	Japán
I. Xerophthalmia igazolt, ha jelen van	kettő a 24-ből	1-4.	2. és 4.	1. 2. 4.
1. Szubjektív panasz	-	+	-	+
2. Kóros Schirmer I (mm/5 perc)	≤10	≤5	<9	≤10
3. Kóros könnyfilm-felszakadási idő (s)	≤10	-	-	-
4. Kóros bengálvörös festés (pontszám)	≤4	≤4	≤4	≤4
II. Xerostomia igazolt, ha jelen van	kettő a 2. 4. 6-ből	1. 6. (7.)	1. 2. 3. 6.	1. 5. (6.)
1. Szubjektív panasz	-	+	+	+
2. Csökkent nem stimulált nyáltermelés (ml/perc)	≥1,5/15	-	≥1,5/15	-
3. Csökkent stimulált parotis nyáltermelés (ml/perc)	-	1/5	1,5/3	-
4. Kóros nyálmirigy-scintigraphia	+	-	+	-
5. Kóros parotis sialogramm	-	-	+	+
6. Kóros nyálmirigyszövetten	+	+	+	+
7. Parotis duzzanat	-	+	-	-
III.				
1. Rheumafaktor-titer vagy			1:160	
2. ANA-titer vagy			1:160	
3. Pozitív anti-SSA, anti-SSB			+	
Biztos Sjögren-szindróma igazolt, ha jelen van	I, II	kettő az I., II/1. 6. 7-ből	I, II, III	I, II

A Sjögren-szindróma diagnosztikus kritériumai.

Terápiás lehetőségek

A szemtünetek kezelésére a műkönyvek, aktív gyulladáshoz tünetekre steroid és nem steroid tartalmú cseppek-, súlyos gyulladáshoz elváltozásoknál lokális Cyclosporin A vagy szisztémás steroid és Cyclosporin A használható. A saját könny elfolyásának megállítására a könnycsatornák elzárását alkalmazzák. A corneán kialakuló fekélyek fedésére terápiás lágy kontaktlencsék kerültek forgalomba, a szaruhártyán keletkező, nem gyógyuló fekélyeknél szaruhártya átültetésre van szükség. A szájszáradás kezelésére műnyál és szájszelé adható, az orális candidiasist céltan kezelni kell. Nagy jelentőségű a fogak konzerválása. Saját tapasztalataink szerint az N-acetyl-cystein kúraszerű alkalmazása javítja a szájszárazságot

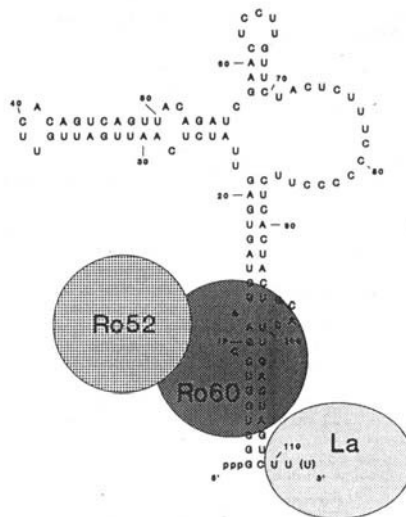
érzetet. Jelenleg kipróbálás alatt áll a kis dózisú, per os alkalmazott természetes interferon alfa, mely az eddigi vizsgálatok alapján szignifikánsan fokozza a stimulált nyálszekréciót, így a xerostomiás tünetek csökkenését eredményezi.

Immunszuppresszív kezelést általában extraglandularis tünetek jelentkezésekor alkalmazunk. Megválasztásánál alapvető jelentőségű, hogy az adott tünet milyen immunológiai mechanizmus alapján jön létre, így T-sejtes folyamatnál a steroid gyulladás gátlók, míg B-sejt mediálta folyamatoknál Cyclophosphamidot használunk.

Saját megfigyelésünk alapján a Sjögren-szindróma prognózisát alapvetően a belső szervi érintettség súlyossága szabja meg. Nagy betegcsoporton elvégzett vizsgálatok alapján megállapíthattuk, hogy a tüdő érintettsége illetve a férfi-nem rossz prognosztikai faktor. Az átlag népességnél gyakrabban kialakuló malignus lymphoma szintén rontja a túlélési esélyeket.

Az La autoantigén

Régóta gyanítják, hogy a Ss kialakulásában az La gén pathofiziológiai szereppel is bírhat a Ro autoantigén mellett, mely a másik autoantigén, amit összefüggésbe hoznak a Sjögren-szindróma és más autoimmun betegségek kialakulásával. Mind az La mind pedig a Ro antigének ribonukleoprotein (RNP) komplexekben asszociálódnak. Az La RNP összetevői az RNS polimeráz III transzkriptumai: 7S, 5S, tRNS, U6 RNS és Y (Ro) RNS-ek valamint az La illetve Ro antigének (Hendrick és mtsai, 1981; Pruijn és mtsai, 1990). Egy La RNP-re mutat példát az 1. ábra.

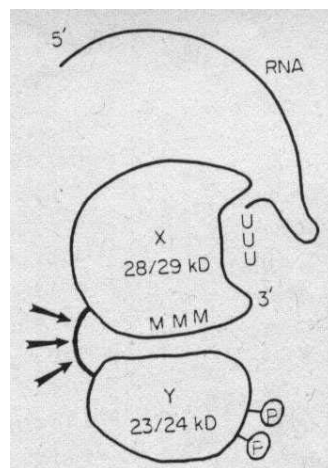


1. ábra. Az La fehérje asszociációja a hY1 RNP-ben. A hY1 (Ro) RNS mellett az La fehérje az 52 kD-os és 60 kD-os Ro proteinnel képez komplexet.

Emellett azonban még számos más asszociációban is megtalálható az La protein, ahogy U1 RNS-sel, vagy egyes vírus RNS-ekkel (pl. EBER; Chan és mtsai, 1989b) is, illetve az endonukleáz VII komplex részeként is azonosították (Bachmann és mtsai, 1983).

Az La fehérje elsősorban a sejtmagban lokalizálódik, de különböző stressz hatások (pl. UV-sugárzás) fokozott sejt felszíni megjelenést eredményezhet (Bachmann és mtsai, 1990a; 1992). A 408 aminosavból összetevődő La fehérje két fő doménből áll (Chan és mtsai,

1989a), melyet egy proteázokra érzékeny 130 aminosavból álló szakasz kapcsol össze (2. ábra).

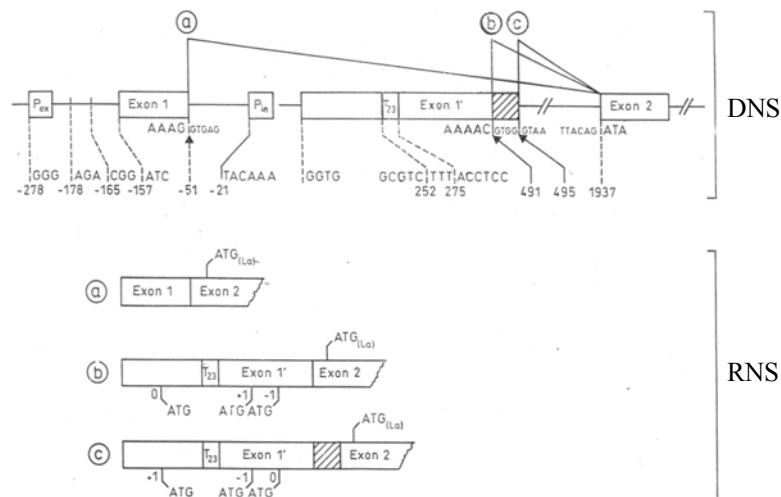


2. ábra. Az La fehérje szerkezeti modellje. A fehérje két fő doménből (X, Y) áll, melyet 130 aminosavból álló, proteázra érzékeny (nyilak) lánc kapcsol össze. A metionin részek az X doménre, a foszforilált aminosav részek az Y doménre jellemzőek. Az X doménen található az oligoU kötőhely, míg az Y-on a magszignál és a dimerizációs szignál.

Az La autoantigén szerepet játszik az RNS polimeráz III által irányított transzkripció terminációjában (Gottlieb és Steitz, 1989) és a termináció belső iniciálásában, legalábbis a poliovírus esetében (Meerovitch és mtsai, 1989). A fehérje transzkripció faktor lévén különböző (főleg RNS és DNS széttekerő) enzimaktivitásokkal is rendelkezik (Bachmann és mtsai, 1990b). Maga az La gén a 2-es kromoszómán helyezkedik el és egy 11 exonból álló, 1,47 kb hosszúságú RNS-t kódol (Chambers és mtsai, 1988).

Az La autoantigén splicing variánsai és a 7-es exon forrópont régiója

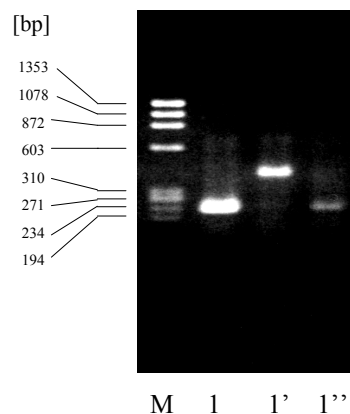
Az La autoantigén mRNS-ét több forrásból is klónozták (Chan és mtsai, 1989b; Semsei és mtsai, 1993), így humán sejtekből is. A Sjögren-szindrómás beteg lymphocytáiból történő klónozást követően megállapították (Tröster és mtsai, 1994), hogy az RNS-nek több splicing variánsa is létezik (3. ábra), s ezeknek 5' végei eltérő szekvenciájúak.



3. ábra. Az La antigén 5' végének szerkezete és a róla képződő 3 különböző mRNA splicing-variáns 5' vége. a = exon 1, b = exon 1' és c = exon 1'' variánsok a fehérje kezdőhelyek ATG-inek bejelölésével, ahol az ATG_(La) a normál kezdőhely.

Az 1 és 1' típusú mRNA-ben az 1-es exon eltérő splicing után alakul ki, míg az 1' és 1'' variáns között csak 4 nukleotid (satírozott rész) különbség van (Grözl és Bachmann, 1997).

Az exon 1' és exon 1 mRNA-ek aránya, illetve az exon 1'' és exon 1'-é is 1:5 körüli (Hilker és mtsai, 1996; Grözl és Bachmann, 1997). A 4. ábra mutat egy példát ezekre az mRNA arányokra.



4. ábra. Az La autoantigén 3 mRNA splicing variánsának mRNA szintjei humán keratinocitákban. 1 = La exon 1 forma; 1' = exon 1' mRNA; 1'' = La exon 1'' mRNA forma; M = Φ X174 DNS marker.

Az 1' típusban a normál ATG kezdőhely előtt több másik ATG is található, mely lehetőséget nyújthat az N-terminálon módosult La fehérje kialakulásához. A módosult fehérje pedig lehetőséget nyújthatna autoimmun reakciók kiváltásához, hiszen olyan epitópok jöhetnek létre, melyeket az immunrendszer idegenként azonosíthat. Azonban mindhárom kezdő ATG-t stop kodon követ, mielőtt még a normál kezdőhelyet elérné a fehérje átírása, s így már nem alakulhat ki módosult fehérje. Ismert azonban az a jelenség, hogy egyes vírusfertőzések hatására az mRNS-eknél keretugrás történhet a leolvasáskor, s ez lehetőséget adhat az extra N-terminális rész átírása mellett a normál fehérje átírására is. Így vagy egy teljesen új fehérje keletkezik, vagy egy N-terminálison módosult La fehérje. In vitro rendszerekben valóban ki is mutatták módosult fehérjék keletkezését, noha csak igen kis mennyiségben.

A kutatások későbbi fázisaiban az mRNS splicing variánsok mellett több pszeudogént is azonosítottak (5. ábra). Kialakulásuk 4-5 millió évvel ezelőttre tehető (Lin és Chan, 1995).



5. ábra. La mRNS-ek és pszeudogének. A 7-es exon oligoA régiójában különböző tagszámú oligoA szakaszokat figyelhetünk meg.

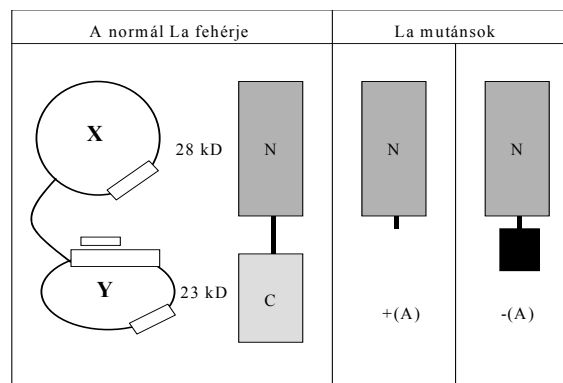
Mindkét fő mRNS típushoz hasonló pszeudogén létezik, s ami feltűnő volt ezekben a génekben, hogy a 7-es exonban található egy forrópont régió (Bachmann és mtsai, 1996), ahol eltérő tagszámú oligoA szekvenciák találhatók a különböző pszeudogéneknél. A későbbi kutatások során egy SLE-ben és egy Sjögren-szindrómában szenvedő betegnél olyan mRNS-eket is sikerült azonosítani, ahol az eredeti oligoA8 szekvenciával ellentétben –A deléció, illetve +A inzerció van (6. ábra).

Így tehát az La gén 7-es exonjában olyan forrópont régiót találtak, melynek mutációja egyéb feltételek megléte nélkül is új epitópok kialakulását eredményezheti (6. ábra), s ezzel autoimmun reakciók kiindulási alapjául szolgálhat.

A

CTGCAGTCTTAACTTTGTTCTCGTGAACCTTAGCCTCTGTACTGTGTGTTGTTTAGGGACGATT
ACTTTGCCAAAAAAAATGAAGAAAGAAAACAAAATAAAGTGGAAGCTAAATTAAGAGCTA
AACAGTAAGTATGTTGAACTAATCACGACATAATTTGAATTC

B



6. ábra. Normál La fehérjék és a pontmutációval keletkező változatok.

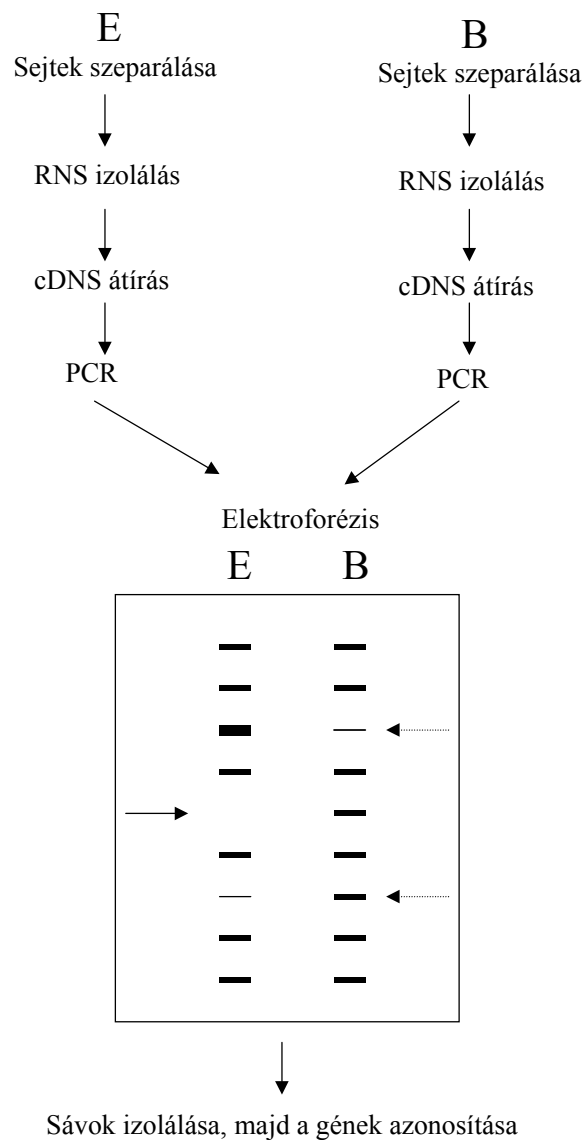
- A. Az La gén 7-es exonja a forrópont oligoA régióval. Az aláhúzás jelöli az exont, annak intron környezetében. A forrópont régiót vastagon írva kiemeltük.
- B. A keletkező fehérjék, ahol a –(A) mutációnál neo-epitóp, míg a +(A) mutációnál kriptogén epitóp keletkezik. A kis fehér téglalappal jelölt helyek a már eddig talált egyéb epitópokat jelölik.

A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése

A betegségetiológiák hagyományos megközelítésénél legtöbbször egy-két gént tanulmányoznak, mely – előzetes megfontolások alapján - legvalószínűbben oki tényezője lehet a betegség kifejlődésének. Ezt a gént (géneket) minden szempontból megpróbálják karakterizálni, változásukat megmérni különböző faktorok hatására, és összefüggésbe próbálják hozni legalább a fennálló betegséggel. A betegség génexpressziós okainak szisztematikus megközelítése a változók és paraméterek nagy száma miatt eddig nem is volt lehetséges. A differential display (DD), vagy különbség kimutatás (Liang és Pardie, 1992) segítségével két RNS populáció összehasonlítható, a minőségi és mennyiségi eltérések regisztrálhatók, majd a résztvevő gének azonosíthatók (7. ábra). A betegekből és az egészségesekből szeparált két sejtpopuláció összehasonlításával meghatározhatjuk azokat a géneket, melyek az egyik esetben expresszálódnak a másikban nem (minőségi eltérés), vagy az egyikben eltérő mértékű a génexpresszió a másikhoz viszonyítva (mennyiségi eltérés).

A reverz transzkriptáz-PCR-en alapuló DD-el már több betegségtípus szisztematikus megközelítését kezdték. Többek között a szisztémás sclerosist (Feghali és Wright, 1999), bőrbetegségeket (Rivas és mtsai, 1997) de tumoros elváltozások patomechanizmusát is tanulmányozták ezzel a módszerrel (Chen és mtsai, 1996), illetve hasonlóan komplex problémákat, mint az öregedést (Goyns és mtsai, 1998) is DD-el próbálták tanulmányozni. Immunológiai betegségeket még főleg modellrendszerben vizsgáltak DD-el (Asling és mtsai, 1995), illetve kofaktorok, mint pl. a Sjögren-szindróma kialakulásában is valószínűleg szerepet játszó UV sugárzás hatását (Voght és mtsai, 1997) tanulmányozták a génexpresszióra nézve ezzel a módszerrel. Jelen munkánkban ismertetjük azt a DD módszert, mellyel a Sjögren-szindróma patomechanizmusát kívánjuk vizsgálni az egészséges és beteg donorok génexpressziós mintázatának tanulmányozásával. Ez a két stacioner állapot közötti különbség

jóval könnyebben értelmezhető, mint a komplex genetikai hálózatok időbeli vizsgálatának eredményei (McAdams és Shapiro, 1995), melyek legtöbbször csak DNS-csip technológiával (DeRisi és mtsai, 1996) közelíthetők meg és csak bonyolult komputer programokkal dolgozhatók fel. Mindamelllett számolnunk kell azzal, hogy a kimutatott különbségek nem feltétlenül primer összetevői a betegségetiológiának.



7. ábra. A differential display (különbség kimutatás) folyamatának sematikus ábrázolása. Az egészséges (E) és beteg (B) sejtek génexpresszió-különbségét oligodT és random primerekkel végrehajtott reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval mutatjuk ki, majd az eltérően

expresszálódó géneket azonosítjuk. A nyilakkal jelölt sávokban különbség mutatkozik az mRNS szintekben, ha az egészséges sejteket a beteg sejtekhez hasonlítjuk (baloldali nyíl = minőségi különbség; jobboldali nyilak = mennyiségi eltérés).

Az itt bemutatott differential display technikával azonosíthatók és utána tanulmányozhatók azok a gének, melyek expresszióbeli eltérést mutatnak az egészséges kontrollokhoz hasonlítva. Ezzel a módszerrel igazolhatjuk az eddigi gén-kandidátusok tanulmányozásának relevanciáját, de újabb gének is a látókörünkbe kerülnek, melyek valamilyen szereppel bírnak a betegség kiváltásában, illetve lefolyásában. A Sjögren-szindróma esetében az La gént tekinthetjük kandidátusnak (Bachmann és mtsai, 1987; Semsei és mtsai, 1993), mely génről és szerepéről az utóbbi időben több munka is megjelent (Bachmann és mtsai, 1990b; Grözl és mtsai, 1997; 1998). Elképzelhetően a 3 La mRNS splicing variáns eltérő expressziója (Grözl és mtsai, 1997b; Tröster és mtsai, 1994), vagy a 7-es exonban jelenlévő pontmutációk (Bachmann és mtsai, 1996) meghatározó szerepűek lehetnek a betegség etiológiájában. A DD eredmények értékelése azonban több újabb gént is világíthat rá, melyek a betegség kiváltásában vagy lefolyása során szerepet játszanak. Más immunológiai betegségek is tanulmányozhatók a DD módszerrel, és igen valószínűleg több olyan gén azonosítható lesz, mely sok immunológiai betegségben közös szereppel bír. Ezek a gének kiszűrhetőek lennének, s csak a fennmaradókból kellene válogatni; a megmaradt gének már valószínűleg a betegség kialakulásakor és nem lefolyása során változtatják expressziójukat.

A sejtek komplex genetikai hálózata (Barkai és Leibler, 1997) eddig – a megfelelő módszerek hiánya miatt - csak lassan és részleteiben volt tanulmányozható. Emellett a génexpresszió szabályozása kontrollálásának elvi alapjait is ki kellett dolgozni (McAdams és Shapiro, 1995; Tavazoie és mtsai, 1999; McAdams és Arkin, 1997). A DNS-csip technológia (Fodor és mtsai, 1993) alkalmas lehet a komplex génexpressziós változások időbeli vizsgálatára: ezer gén egyidejű vizsgálata is lehetségessé válik (Schena és mtsai, 1995), illetve akár a genom

teljes expressziójának a tanulmányozása is (Eisen és mtsai, 1998; DeRisi és mtsai, 1996). Így a komplex biológiai problémák, mint a malignus elváltozások is tanulmányozhatókká váltak (DeRisi és mtsai, 1997; Szállási, 1998). Ha ilyen jellegű dinamikus változások nem is, de egy-egy betegség fennállásakor jelentkező statikus állapot a DD-el is tanulmányozható. A DD technikát ma már oly mértékben továbbfejlesztették (Ayala és mtsai, 1995; Haag és Raman, 1994; Sung és Denman, 1997; Mou és mtsai, 1994) és tökéletesítették (Rotschild és mtsai, 1997; Mohr és mtsai, 1997; Liang és mtsai, 1992; Ikonomov és mtsai, 1996; Sompayrac és mtsai, 1995), hogy biztonsággal, nagy pontossággal és szelektivitással alkalmazható a statikus génexpresszióbeli eltérések megállapítására.

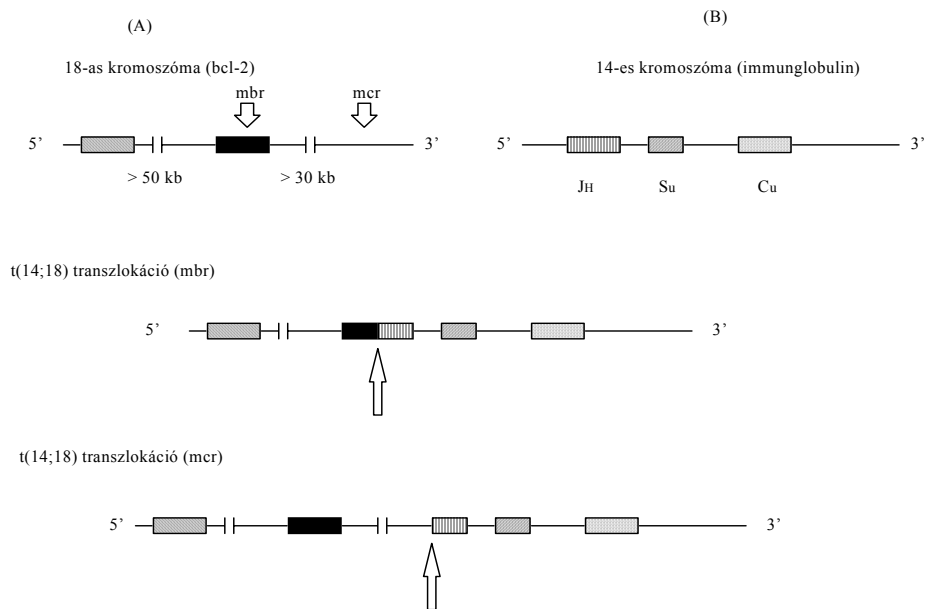
Az itt bemutatott módszerrel megkezdjük a Sjögren-szindróma génexpressziós okainak szisztematikus felderítését. Hasonlóan komplex problémák, mint az öregedést (Linskens és mtsai, 1995; Salehi és mtsai, 1996; Wels és mtsai, 1995; Wu és Lee, 1997) illetve malignus elváltozások (Chen és mtsai, 1999; Liang és mtsai, 1992; Salesiotis és mtsai, 1995; Forestier és mtsai, 1996) okait is ezzel a technikával közelítették meg, s ez a módszer más immunológiai betegségek patomechanizmusának vizsgálatában is célszerűnek tűnik.

A t(14;18) kromoszóma transzlokáció jelentősége

Az Ss betegek fő halálzási okai közé sorolhatók a lymphoproliferatív szindrómák (Kassan és mtsai, 1978), így a B-sejtes lymphomák is, melynek többsége folliculáris lymphoma, s ez a típus t(14;18) kromoszóma transzlokáció jelenlétével jól jellemezhető (Merup és mtsai, 1996; Yunis és mtsai, 1982). Nem tisztázott azonban, hogy a transzlokáció direkt jelenléte milyen szerepet játszhat a Sjögren-szindrómában.

A t(14;18) kromoszóma transzlokációnak több típusa ismert. A két fő típust láthatjuk a

8. ábrán. Emellett még ismert a *vcr* típus is, ez azonban csak igen kis töredékét képezi az összes transzlokációnak (Adachi és mtsai, 1989; 1990).



8. ábra. A (14;18) kromoszóma transzlokáció két fő típusa: *mbr* (fő törési régió), *mcr* (kis törési szakasz).

A transzlokáció során, a 18-as kromoszómán (18q21.3) elhelyezkedő *bcl-2* gén transzlokálódik az immunglobulin lánc (Ig) nehéz-, vagy könnyűláncok génjeinek egyikéhez. A 14-es kromoszómán (14q32.3) lévő immunglobulin lánc gén J_H szegmenséhez transzlokálódik a *bcl-2* gén, mely transzlokáció nem érinti a *bcl-2* fehérje kódoló szakaszát. Az *mbr* régió a 3' nem transzlálódó régiótól mintegy 2,5 kb-ra található, s egy kb. 500 bp-nyi szakaszt ölel fel (Cleary és Sklar, 1985; Cleary és mtsai, 1986). Az *mcr* régió >30 kb-ra található a 3' irányban (Ngan és mtsai, 1989). A transzlokáció nem érinti ugyan a *bcl-2* fehérjekódoló részét, de *bcl-2* gén regulációja az immunglobulin gén enhancer régiójának irányítása alá kerül, s így a gén expressziója viszont megnövekszik (Seto és mtsai, 1988; Seite és mtsai, 1993b). Ez a folyamat az apoptózis gátlásán keresztül (Hockenbery és mtsai, 1990; Nguyen és mtsai, 1996) oki tényező lehet a lymphomák kialakulásában.

Az autoimmunitás és az öregedés kapcsolata

Egyes betegségek összekapcsolódnak az idősebb korrall, ezért elképzelhető, hogy magával az öregedés általános folyamatával is összefüggésben állnak (Semsei, 2000; 2002). Többek között malignus és autoimmun betegségek egyes típusai fokozottabban jelentkeznek a kor előrehaladtával (Beeson, 1987). Az öregedő szervezet egyre fogékonyabb, kiszolgáltatottabb a fertőző betegségekkel szemben és bizonyos öröklődő betegségek is gyakrabban fordulnak elő idősebb korban. Az említett két betegségtípus – fertőző és öröklött – mellett is vannak betegségek melyeknek közös gyökerei lehetnek az öregedés folyamatával és/vagy közvetlenül az öregedési folyamat következményei. A malignus elváltozások egyes típusait már eddig is összefüggésbe hozták az öregedés gyökereivel (Cutler és Semsei, 1989; Semsei és Cutler, 1989; Semsei és mtsai, 1989), és az (auto)immun folyamatok változásai is szoros kapcsolatot mutatnak az öregedési folyamatokkal (Rose, 1994; Hartwig, 1992; Schoenfeld, 1997).

Az emberi szervezetnek különböző védvonalai vannak a külső és belső károsító faktorok hatásainak kivédésére. Különböző szervek, rendszerek és sejtes mechanizmusok veszik fel a küzdelmet a károsító elemekkel, hogy fenntarthassák a szervezet homeosztázisát, adaptációs képességét és az adott információs szintjét. Az egyik legfontosabb védő mechanizmus az immunrendszer, mely egyes környezeti károsító tényezők ellen hat (fertőzések, bizonyos kémiai ágensek, stb.), és egy időben a nem kívánt belső komponenseket is eliminálja, hogy fenntartható legyen a szervezet belső integritása. Az autoimmun reakciók kialakulását főleg az utóbbi faktor okozza, de bizonyos környezeti elemek is befolyásolhatják, mint pl. keresztreaktivitás, mimikri, vagy a külső hatásra megváltozott belső komponensek. Fontos azonban elkülönítenünk az autoimmunitás két ágát, a fizioiógias autoimmunitást és az autoimmun betegségeket. Szükséges ez többek között azért is, mert a kiváltó mechanizmusok folyamatai különböző szabályzási rendszerek befolyásai alatt állnak. Erre utal az is, hogy a

népességnek csak mintegy 3%-a szenved valamilyen autoimmun betegségben (Feltkamp, 1999), míg a normális clearance a teljes populációnál jelen van.

Az autoimmun betegségeket további két kategóriába oszthatjuk: primer és szekunder formák. A szekunder típus csak átmeneti jellegű és normál immunrendszer jellemzi, s csak ritkán a megváltozott antigének. A primer betegségekből viszont rendszerint örökletes tényezők is szerepet játszanak, illetve olyan faktorok is alakítják a betegségek etiológiáját, mint az öregedés. Mindkét típus közös jellemzője, hogy egyéb tényezőkkel együtt - mint az öregedés által kiváltott faktorok és a fiziológiás clearance hatásai - hozzájárulhatnak más betegségek kialakulásához (Semsei és mtsai, 2002).

Az öregedés és az autoimmunitás etiológiájának összefüggései kapcsán azt kívántuk diszkutálni, hogy a Sjögren-szindróma kialakulása milyen oki kapcsolatban állhat magával az általános öregedési folyamatokkal.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi áttekintésben ismertetett eredmények - melyek már elég részletességgel tárták fel az La gént - arra inspiráltak bennünket, hogy a Sjögren-szindrómát molekuláris alapjainak tanulmányozásával közelítsük meg. Ennek megfelelően célkitűzéseink a következők voltak:

1. A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítéséhez kívántunk olyan módszert találni, mely nemcsak egyedi gének tanulmányozása révén tudná a gének és a betegség közötti kapcsolatokat felfedni.

2. Tanulmányozni kívántuk, hogy az La gén 7-es exonjában található-e olyan mutációk, melyek eredményeként autoimmun reakciók kiváltásában szerepet játszó fehérjék keletkezhetnek.

3. Adatokat kívántunk gyűjteni a Sjögren-szindróma egyik fő halálzási okával a lymphoproliferatív szindrómákkal való kapcsolatáról a t(14;18) transzlokáció tekintetében.

4. Mivel a Sjögren-szindróma is az életkor előrehaladtával jelentkezik fokozottabban, az öregedés szerepét kívántuk diszkutálni egyes autoimmun folyamatok etiológiájában.

IV. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

BETEGEK:

A vizsgált primer Sjögren-szindrómában, SLE-ben, RA-ban és MCTD-ben szenvedő betegek a III. sz. Belgyógyászati Klinika gondozottai. A betegek diagnózisát a széles körben elfogadott nemzetközi kritériumrendszer alapján állapították meg a klinika orvosai. Az Ss betegek átlagéletkora a betegség felismerésekor 54,4 év, a betegség átlagos fennállási ideje a vizsgálatok időpontjában 6 év volt. A kontrollként használt lymphocitákat olyan egészséges véradóktól nyertük, akik semmilyen panasszal nem fordultak orvoshoz. A folliculáris lymphomában szenvedő betegeket a Semmelweis Kórház-Rendelőintézet (Miskolc) II. sz. Belgyógyászati és Haematológiai Osztályán kezelik, és a Pécsi Egyetem, Malignus Lymphoma Referencia Centrumával együttműködve diagnosztizáltak.

MÓDSZEREK:

a. **Sejtizolálás:** A különböző forrásokból nyert vérmintákból lymphocytákat szeparáltunk standard ficoll-gradiens módszerrel (Peper és mtsai, 1968).

b. **DNS szeparálása:** A DNS-t a lymphocytákból detergenssel és proteináz K-val történő emésztésével tártuk fel a polimeráz láncreakcióhoz (Kawasaki, 1990).

c. ***Differential display***

Egészséges donorok és Ss betegek izolált lymphocytáiból totál RNS-t izoláltunk Trizol (guanidin-tiocianát-fenol) módszerrel (Semsei és mtsai, 1989). Az RNS tisztasága és

intaktsága igen fontos tényező, amit UV mérés (260/280 és 260/235 nm-es arányok \approx 2) és agaróz elektroforézissel (18S:28S \approx 2:1) ellenőriztünk.

Ezt követően az RNS-t reverz transzkriptázzal cDNS-be írtuk át Superscript polimerázzal, 0,3 μ g DNáz mentes RNS-ből, 42 °C-on, 1 órán keresztül a következő oligodT felhasználásával: T52(AGC)(AGCT), majd a terméket 95 °C-on 5'-ig denaturáltuk.

A következő lépcsőben végrehajtott speciális PCR folyamatban (Urbán és mtsai, 2000) több random primer és oligodT primer (1-1 μ M) felhasználásával a két populáció mRNS-eit felszaporítottuk (1. Táblázat).

1. táblázat. A differential display során alkalmazott random és oligodT primerek

oligodT primerek

DDT1	5'- gCATTATgCTgAgTgATATCT ₁₀ A -3'	(31)
DDT2	5'- gCATTATgCTgAgTgATATCT ₁₀ G -3'	(31)
DDT3	5'- gCATTATgCTgAgTgATATCT ₁₀ C -3'	(31)
DDT4	5'- gCATTATgCTgAgTgATATCT ₁₁ -3'	(31)

random primerek

DDA1	5'- gCATTAACCCTCACTAAATgCTgggTg -3'	(27)
DDA2	5'- gCATTAACCCTCACTAAAgCACCGTCC -3'	(27)
DDA3	5'- gCATTAACCCTCACTAAATgTgggAgC -3'	(27)
DDA4	5'- gCATTAACCCTCACTAAAgTTgCgATC -3'	(27)
DDA5	5'- gCATTAACCCTCACTAAAgACCGCTTg -3'	(27)

A reakciót Amplitaq (Perkin Elmer) és AGSGold (Hybaid) polimerázokkal (1-1 U) végeztük standard (Perkin Elmer) reakció-összetételben, TaqStart (Sigma) antitesteket alkalmazva a hot-start reakcióhoz. A radioaktív jelzéshez ³²P- α -dCTP-t használtunk. A kezdeti denaturációs lépcsőt követően (95 °C, 5') az első két ciklus 40 °C-on (30'') ment végbe, majd azt még 30 ciklus követte: 60 °C, 30''; 72 °C, 30''; 94 °C, 30''. A reakciósort a 72 °C, 10'-es lépcső zárta le (Semsei és mtsai, 2000a).

Ez után az elektroforézis során a két populációból erősített DNS-eket szétválasztottuk és összehasonlítottuk, majd az eltérően expresszálódó DNS-eket azonosítottuk (Semsei és mtsai, 2000a). A szeparáláshoz 4,5 és 6 %-os denaturáló (8 M urea) poliakrilamid gélt használtunk (Genomix szekvenáló gél), a futtatás 3000 V-on 2-3 óráig történt. Az elektroforézissel szétválasztott PCR termékeket a gélszárítást követően autoradiográfiával tettük láthatóvá. A későbbiekben nem használtunk radioaktív jelzést, s ekkor a PCR termékeket ezüst-festéssel (Promega) mutattuk ki.

d. Polimeráz láncreakció (PCR)

Konvencionális PCR. DNS szakaszokat amplifikáltunk az arra a szakaszra jellemző primerpár segítségével, a hagyományos PCR technológia eljárása szerint (Semsei és mtsai, 1998), 25 µl végtérfogatban, Amplitaq polimerázzal, Perkin Elmer 9600 PCR készülékben. A 7-es exon mutációinak kimutatásánál a következő primerpárt alkalmaztuk: 5' primer: ATACTTTTCAAGGACGATTCGTTTGCC; 3' primer: TAACTTTTGTTTTGCTTCTTGCTCCTG. Az amplifikálás az első denaturálási lépcső után 40 ciklusban a következő körülmények között történt: 94 °C, 15"; 65 °C, 15"; 72 °C, 30" (Bessenyei és mtsai, 2000a). Az erősített DNS-t rendszerint agaróz gélen etidium-bromiddal UV fényben mutattuk ki.

Nested-PCR. A PCR erősítés érzékenységének és specifikusságának növelése érdekében az egyszer már felerősített DNS darabból újabb, belső primerek segítségével egy második amplifikációt is végeztünk. A reakciókörülmények a konvencionális PCR-hez hasonlítottak, az alkalmazott primerek függvényében (Takács és mtsai, 1998; 2000a, b; Bessenyei és mtsai, 2000a). A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kimutatása során 1 µg DNS-t 25 µl végtérfogatban Amplitaq (Boehringer) polimerázzal, Perkin Elmer

9600 PCR készülékkel amplifikáltunk. Az erősítés ciklusai: 94 °C, 15"; 55 °C, 30"; 72 °C, 30". Az első 30 ciklust a következő primerekkel végeztük: mbr1: 5'- A A A T C T A T G G T G G T T T G A C C T T T A G A G -3' (a bcl-2 mbr régiójának külső primere), J: 5'- A A C A T G G T C C A G T C C G C C A G G T C -3' (az immunglobulin külső primere). A következő erősítés 30 ciklusát pedig az alábbi primerekkel végeztük: mbr2: 5'- G A G T T G C T T T A C G T G G C C T G T T T C -3' (a belső mbr primer); JCO1: 5'- (AT) (TA) C T (TC) A C C T G A G G A G A C G G T G A C C-3' (az immunglobulin J exonok konszenzus primere) az első reakcióból kivett 0.5 µl mintából. Az erősítés eredményét 3%-os agaróz gélen elektroforézissel, majd az azt követő ethidium-bromidos festéssel tettük láthatóvá UV fényben. A fényképfelvétel Polaroid kamerával vagy CCD kamerás képfeldolgozó rendszerrel készült.

e. **Egyszálú DNS konformációs polimorfizmus (SSCP)**

Az SSCP módszer során a PCR-rel felerősített, denaturált DNS-t elektroforézissel választottuk szét, kontrollált hőmérsékleti körülmények között. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy ugyanolyan hosszúságú DNS darabok is különböző futási sebességet mutassanak – így elkülöníthetők legyenek - amennyiben polimorfizmus, vagy mutációs eltérés van a DNS-ek között (Bessenyei és mtsai, 2000b). A DNS-t 60% formamidban 94 °C-on 5'-ig denaturáltuk. A kontrollált hőmérsékleten végrehajtott poliakrilamid gélelektroforézisnél 6%-os denaturáló (Genomix) gélt (0,8 mm) használtunk. A futtatás 1200V-on 2-3 órán keresztül történt 18 °C-on. A DNS festéséhez „Silver Staining Kit”-et (Promega) használtunk. A standardokhoz olyan plazmidokból erősítettük a 7-es

exont, melyekbe a már szekvenálással igazolt normál és mutáns formák voltak illetve.

A fenti körülmények között a 3 forma a gélen történő futás alapján jól elkülöníthető.

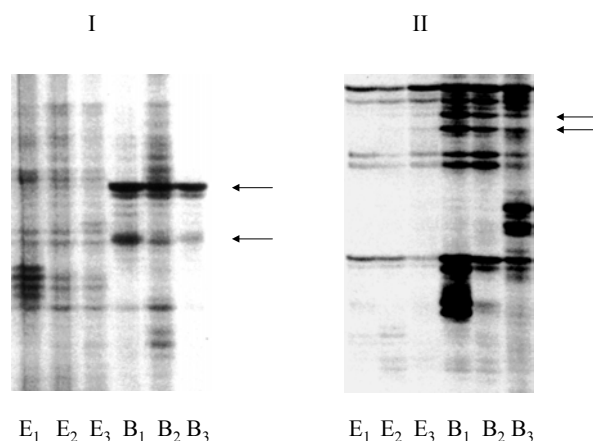
f. Szekvenálás

A PCR terméket alacsony olvadáspontú agarózon izoláltuk és a tisztítást követően vektorba illesztettük. A vektort *E. coli*-ba transzformáltuk, majd a plazmidot izoláltuk. A szekvenálás Sequenase 2.0 segítségével történt. A szekvencia-analízisben a GeneBank adatbázis szolgált segítségünkre.

V. EREDMÉNYEK

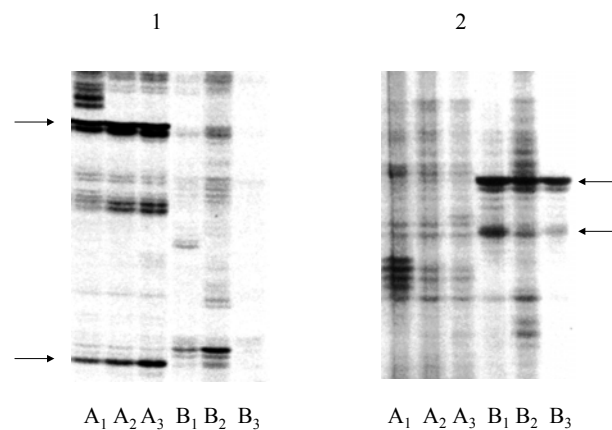
1. A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése

Egy betegség etiológiájának hagyományos megközelítésénél legtöbbször csak egy-két gént tanulmányoznak, mely –előzetes megfontolások alapján – legvalószínűbben oki tényezője lehet a betegség kifejlődésének. Ezt a gént (géneket) minden szempontból megpróbálják karakterizálni, változásait megmérni különböző faktorok hatására, és összefüggésbe próbálják hozni a fennálló betegséggel. A betegség génexpressziós okainak szisztematikus megközelítése a változók és a paraméterek nagy száma miatt eddig nem is volt lehetséges. A differential display – vagy különbség kimutatás – segítségével viszont két RNS populáció összehasonlítható és a minőségi és mennyiségi eltérések kimutathatók, majd a résztvevő gének azonosíthatók. Munkánk arra irányult, hogy ezt a módszert beállítsuk, és a Sjögren-szindróma pathogenezisének kutatására használhassuk.



9. ábra. Példák a különbözőképpen expresszálódó gének kimutatására. Az egészséges (E) és beteg (B) donzorok (1-3) sejteinek génexpresszióbeli különbségei láthatók a nyíllal jelzett helyeken.

Eredményeink azt mutatják, hogy ez a módszer jól használható két populáció –egészséges és beteg – génexpressziós mintázatában jelentkező eltérések megállapítására (9. ábra). A nyíllal jelzett helyeken a betegekben a gének sokkal nagyobb mértékben expresszálódnak, mint az egészségesekben. A 10. ábra 1-es panelje viszont egy olyan esetet mutat, ahol az egészségesek egyes génjeinek szintje magasabb, mint a betegeké.



10. ábra. Eltérően expresszáló gének egészséges és beteg egyedek génexpressziós mintázatában.

Míg az 1-es panelnél az egészségesek egyes génjeinek szintje magasabb, addig a 2-es panel ellenkező esetre mutat példát.

A többi sávzás igen hasonló mindkét esetben, így nem állapíthatunk meg expresszió-eltérést más géneknél ezeken a képeken. A bemutatott képek a teljes gél olyan részletei, ahol eltérést lehet látni. Attól függően, hogy melyik primert illetve primerkombinációt használjuk, más és más lesz a gél mintázata. Az azonosított sávokat kivágjuk a gélből és további amplifikálás után szekvenáljuk. Sok esetben azonban a kivágott sáv több kisebb sáv együttesének mutatkozik, melyből a domináló sávot SSCP elektroforézissel válogathatjuk ki. A szekvenálás vagy ismert gén szekvenciáját adja meg, s akkor a további munka leegyszerűsödik, vagy eddig ismeretlen génről van szó, s ebben az esetben a gén klónozásával, majd karakterizálással (pl. Northern blottal) folytatjuk a vizsgálatokat.

2. Az La gén 7-es exon forrópont mutációi

A szisztematikus megközelítés mellett tovább folytattuk az La gén szerepének tanulmányozását is a Sjögren-szindróma patomechanizmusának tisztázásához.

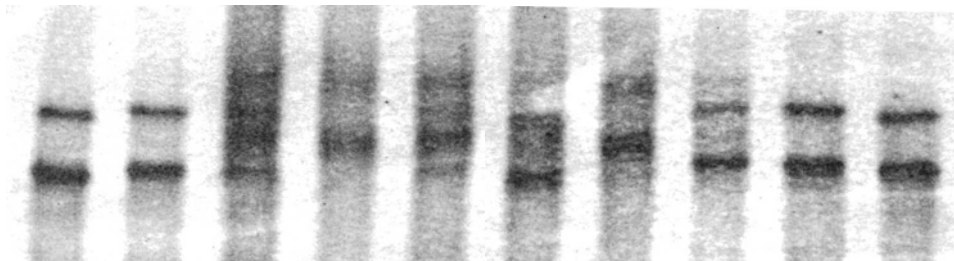
Az La génnek Sjögren-szindrómás beteg lymphocitáiból történt klónozása után felfedett 7-es exon forrópont régióban előzetes kísérletek során egy SLE-s, s egy Ss betegben ki tudtak mutatni pontmutációt. Kísérleteink arra irányultak, hogy az SSCP módszer felhasználásával további olyan betegeket azonosítsunk, akik a mutációt hordozzák. A PCR-SSCP technika segítségével egyszerű elektroforézissel ki lehet mutatni mutációkat, vagy akár polimorfizmust is. A rendelkezésünkre álló plazmidokból az La gén 7-es exonjának forró-pont környezetét amplifikáltuk, és az SSCP körülményeit úgy állítottuk be, hogy mindhárom forma futási sebessége eltérő legyen, így ezeket könnyen azonosítani tudjuk (11. ábra). Ezek a standardok lehetővé teszik, hogy a betegekből erősített DNS-t is azonosítani tudjuk anélkül, hogy külön-külön minden esetben szekvenálni kelljen az erősített génszakaszokat.



11. ábra. Az La gén 7-es exon forrópont régiójának erősítése PCR-SSCP módszer segítségével. A normál formától (8A) eltérő pozícióban lokalizálódik a –A (7A) és +A (9A) mutáció.

Vizsgálatainkba 10 SLE-ben és 3 Sjögren-szindrómában szenvedő beteget vontunk be a 10 egészséges kontroll mellett. A 10 SLE-s esetében nyolcban, míg mindhárom Sjögrenes betegben is mutációt találtunk. A 12. ábra szemlélteti 5 SLE-s és egy Sjögren-szindrómás beteg PCR-SSCP vizsgálatát. A két szélen elhelyezkedő A7 jelzi a –(A) mutáns, míg az A8 a normál forma pozícióját. Az L1 esetben az A8 sávok mellett -mintegy hasonló mennyiségben-

az A9 forma (a +A mutáns) jelenléte is észlelhető, tehát egy kevert sejtpopulációt jelez, ahol a normál gént hordozó sejtek mellett az La gén 7-es exonjának mutánsát expresszáló sejtek is jelen vannak a vérkeringésben. Az L2 esetben már szinte kivétel nélkül a +A mutáns van jelen. Az L3 betegben is többnyire a mutáns sejtek dominálnak, egy kevés normál sejt jelenléte mellett, hasonlóan az L5-höz. Az L4 betegben viszont a –A mutáns van jelen döntő többségében amellet, hogy a +A variáns is megjelenik. Itt az egészségesekre jellemző A8 forma szinte nem is detektálható, ez esetben tehát két különböző mutáció is megjelenik.



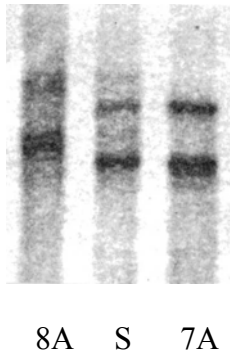
7A 8A L1 L2 L3 L4 L5 Ss 8A 7A

12. ábra. Az SLE-ben és Sjögren-szindrómában szenvedő betegek pontmutációjának kimutatása az La gén 7-es exon forrópont régiójában PCR-SSCP módszer segítségével. 7A és 8A = standardok, L1-L5 = SLE-s betegek, Ss = Sjögren-szindrómás beteg.

A maradék 3 pozitív SLE-s beteg is hasonló képet mutat, mint az itt ismertetett 5, míg 2 esetben csak tisztán a normál populációt lehetett detektálni, hasonlóan a 10 egészséges kontrollhoz, amelyeknél mutációt hordozó sejtek jelenléte nem volt látható.

A Sjögren-szindrómás beteg esetében a döntő mennyiségű normál 8A forma mellett kis mennyiségben, de egyértelműen a 9A mutáns is megjelenik, ahogy azt a másik 2 esetben is tapasztaltuk (a kép nem mutatja).

A mutáció jelenlétét szekvenálással is bizonyítottuk a 13. ábra SLE-ben szenvedő betegek esetében.

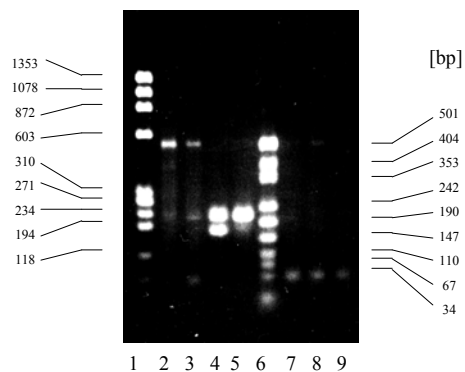


13. ábra. OligoA mutáció kimutatása SSCP-vel egy SLE-s betegben. 8A = normál forma; S = SLE-s beteg; 7A mutáns standard.

Ezzel az eredménnyel tovább nőtt azon betegek száma, akik bizonyíthatóan hordozzák a mutáns RNS formákat.

3. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kapcsolata a Sjögren-szindrómával

Ahhoz, hogy t(14;18) kromoszóma transzlokáció gyakoriságát mérhessük Sjögren-szindrómás betegekben a transzlokáció kimutatására kellett beállítanunk egy alkalmas módszert. A 14. ábra szemlélteti a módszer beállításának eredményét.

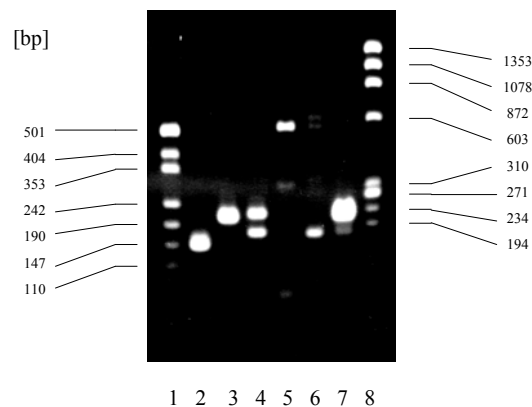


14. ábra. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kimutatása polimeráz láncreakcióval centroblastos-centrocitás folliculáris lymphomában. 1 = Φ X174 DNS marker (SIGMA). 2 = Kontroll perifériás lymphocyt DNS. 3 = Kontroll csontvelő lymphocyt DNS. 4 = A beteg véréből szeparált

perifériás lymphocyt DNS. 5 = A beteg csontvelőjéből szeparált lymphocyt DNS. 6 = pUC18 DNS marker (SIGMA). 7 = 1 hónappal a radiotherapia után a perifériás lymphocyt DNS. 8 = 1 hónappal a radiotherapia után a csontvelő lymphocyt DNS. 9 = Kontroll, DNS nélkül.

A vizsgálatok eredményeként nagy érzékenységgel és szelektivitással sikerült kimutatni az mbr típusú transzlokációt hordozó sejtek jelenlétét folliculáris lymphomás betegek perifériás lymphocytáiban.

A t(14,18) transzlokáció kimutatásának kifejlesztése után a transzlokáció megjelenését nem csak folliculáris lymphomában szenvedő betegekben végeztük el, hanem több más típusú betegség esetén is sikerült kimutatnunk (15. ábra).



15. ábra. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció jelenléte különböző forrásokból szeparált perifériás lymphocytákban. 1 = pUC18 DNS standard; 2 és 3 = Sjögren-szindrómás betegek; 4 = centroblastos-centrocytás folliculáris lymphomás beteg; 5 = negatív kontroll; 6 = Whipple-kóros beteg; 7 = "egészséges" donor; 8 = Φ X174 DNS marker.

A folliculáris lymphomában szenvedő betegek mellett Whipple-kóros beteg és Sjögren-szindrómás betegek perifériás vérének lymphocytáiban is kimutattuk transzlokációt hordozó sejtek jelenlétét, illetve egyes esetekben, egészséges donorokban is. Annak bizonyítására,

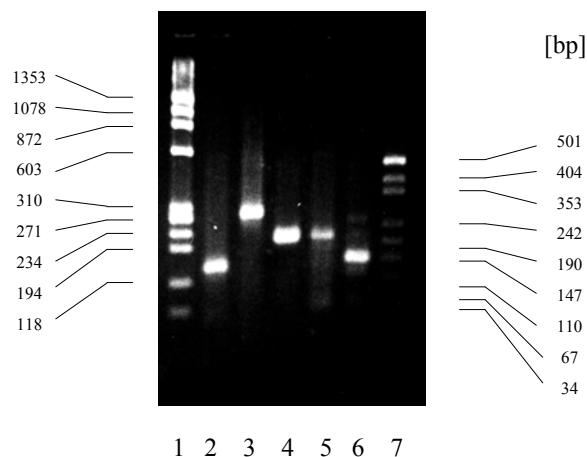
hogy a kimutatott erősítések valóban a t(14;18) transzlokáció jelenlétét jelzik az erősített DNS-t szekvenáltuk, ahogy egy példáját a 16. ábra is szemlélteti:

```

Plazmid      -          BMB          -          Bcl-2
GAATTCGGCTT - GAGTTGCTTTACGTGGCCTGTTTC - AACACAGACCCACCCAG
AGCCCCTCCTGCCCTCCTTCCGC-CGGAGTTACAATTAC-ACTACTACTACTACGG
          -          N          -          J6
TATGGACGTCTGGGGGCAAGGGACCAC- GGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTT -
          -          JCO1
  
```

16. ábra. Az egyik Sjögren-szindrómás beteg (15. ábra, 2. oszlop) lymphocytaiban jelenlévő transzlokáció PCR-erősített DNS-ének szekvenciája. A "plazmid" a szekvenáláshoz alkalmazott plazmid DNS-ből származik míg az BMB és a JCO1 szekvenciák a használt belső primerek, a bcl-2 és immunglobulin géneknek megfelelően. A megszakítástól kezdődik az erősített bcl-2 génszakasz, mely az eredeti nukleotid szekvencia 2997-3060 bázisainak felel meg. A J6 az immunglobulin nehézlánc J6 exonjának egy darabja. A bcl-2 és J6 szekvenciák közötti 15 nukleotid a kapcsoló N régióhoz tartozik, mely transzlokációk esetén a két gén közé épülhet (általában 0-tól néhány 10 bázis hosszúságban).

Az előzetes vizsgálatokat követően megvizsgáltuk a transzlokáció gyakoriságát 100 Sjögren-szindrómás beteg perifériás vérében. Azt találtuk, hogy 5 beteg transzlokáció hordozó volt (17. ábra).



17. ábra. A t(14;18) transzlokáció kimutatása PCR-rel Sjögren-szindrómás betegekben. 5 különböző esetben más és más helyen történtek a törések, ami a felerősített fúziós génszakasz hosszából

is látszik. Φ = Φ X174 DNS marker; 1-5 transzlokáció-hordozó betegek; P = PUC 18 DNS standard.

Így az egészségesekhez viszonyítva – ahol csak 1%-ban lehetett transzlokációt kimutatni, a Sjögren-szindrómásoknál a transzlokáció 5-szörös gyakoriságú volt. Az 5 esetből kettőben csontvelői pozitivitást is ki tudtunk mutatni, s a transzlokáció éveken keresztül is kimutatható volt. Ezekben a betegekben az idő előrehaladtával folliculáris lymphoma megjelenésével lehet majd számolni.

4. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kapcsolata egyes tüdőcarcinómákkal

Korábbi vizsgálatok a nyálmirigy-acinusok és -ductusok epithelsejtjeinek pusztulásában az autoimmun gyulladásban részt vevő lymphociták direkt szerepét is feltételezik. Ezek alapján az úgynevezett autoimmun epithelsejtek destruálódnak. Hasonló elváltozást Sjögren-szindrómás betegek bronchusepithelsejtjein is megfigyeltek. Talán a gyakrabban előforduló tüdőcarcinómák kifejlődésében ezen elváltozások is szerepet játszhatnak. Az irodalom alapján összefüggést kerestünk a bcl-2 expresszió és egyes tüdőcarcinómák között.

Bcl-2 protein expressziót észleltek dohányt rágó betegeknél Indiában. Nemcsak a szájüregi laphám carcinómában szenvedő betegeknél volt észlelhető a bcl-2 expresszió, hanem a szájüregi laesióban szenvedőknél is (Tanuja és m.társai 2002). Munkájuk során 63 szájüregi laphám carcinómában szenvedő beteget és 31 praecancerosus esetet vizsgáltak. Tumor-specifikus, citoplazmatikus bcl-2 túltermelődést észleltek a daganatos betegek 56 %-ában és a szájüregi nyálkahártya fekélyek 43 %-ában. Ugyancsak p53 expressziót észleltek ezeknél a betegeknél. A daganatos betegek 30 %-a p53 + bcl-2 pozitív mintát mutatott.

Vizsgálatokban rámutattak arra, hogy a megváltozott bcl-2 expresszió szerepet játszhat a szájüregi daganatok tumorigenesisében.

A nem kissejtes tüdőrákokban bcl-2 protein jelenlétét monoklonális antitestekkel nagyszámban Francesco Pezzella és munkatársai vizsgálták 1992: Napankangas, 1999). Ők 122 műtött beteget vizsgáltak kik közül 80 beteg laphám carcinomában szenvedett, és 42 adenocarcinomában. Vizsgálatuk során arra próbáltak magyarázatot találni, hogy a bcl-2 expresszió korrelál-e a túléléssel. Laphám carcinomában szenvedő betegeknél 25 %-ban tudtak bcl-2 proteint kimutatni (80 esetből 20) és 12 %-ban adenocarcinomás betegeknél. (42-ből 5). Megfigyelték azt is, hogy a normális hörgőnyálkahártyának csak a bazális sejteiben mutatható ki bcl-2. Azt találták, hogy az 5 éves túlélés magasabb volt azokban az esetekben, akik bcl-2 pozitívak voltak. Az egész vizsgálati csoportra viszonyítva praecarcinomában szenvedő betegeknél ez az arány a következő volt: 42-ből 5 eset. Leírták emellett még, hogy a normális hörgőnyálkahártyának csak a bazális sejteiben mutatható ki bcl-2. Azt találták, hogy az 5 éves túlélés magasabb volt, azokban az esetekben, akik bcl-2 pozitívak voltak. Az egész vizsgálati csoportra viszonyítva ($P < 0,1$) és a laphám carcinomában szenvedő betegeknél ($P < 0,02$). Azt a következtetést vonták le, hogy a bcl-2 proto-onkogén a nem kissejtes tüdőkarinomás betegnél abnormálisan expresszálódik, és ennek prognosztikus fontossága lehet.

Napankangas (1999) nem kissejtes carcinomás betegek apoptózisát vizsgálva megállapította, hogy a normális hörgőnyálkahártya bcl-2 pozitivitása csak a bazális sejtekben figyelhető meg, ugyanakkor más típusú epitheliumban a bcl-2 pozitívitas az egész epithelium vastagságában megfigyelhető. Bcl-2 protein kumulációt nemcsak magában a tumorban észlelt, hanem a nyirokcsomókban is. 18 esetben talált erős immunreaktivitást (Müzes és Igaz, 1997). Vizsgálatai szerint bcl-2 géncsoport expressziója nemcsak a nem kissejtes tüdőrákokban figyelhető meg, hanem a praecancerosus állapotokban is.

5. Az öregedés szerepe az autoimmunitás etiológiájában

A betegségek több típusa – köztük néhány autoimmun betegség, ahogy a Sjögren-szindróma is – kapcsolható az általános öregedési folyamatokkal, hiszen ezek a betegségek egy jól meghatározható idősebb életkor-tartományban jelentkeznek a legfrekvenciáltabban.

A szervezet immunvédekezése egyrészt a külső ágensek ellen irányul, másrészt pedig belső, egyes nem kívánatos változások meggátlását segíti elő. Ezen belül azonban különbséget kell tennünk a normális (fiziológiás) folyamatok és az autoimmun betegségek között, jóllehet mindkettőre hatással vannak az öregedés általános folyamatai. Az autoimmun betegségek etiológiája egyik kulcselemének tűnik a thymus és annak öregkori változásai, bár más sejttípusok, illetve ezek öregedése is jelentős szereppel bírhat. Mind a fiziológiás autoimmunitásnak, mind pedig az autoimmun betegségeknek fontos tényezői a spontán genetikai instabilitás, az öregedés során szerzett genetikai változások, illetve a szervezet információs szintjében bekövetkezett öregedéssel kapcsolt változások együttese. Azonban míg a fiziológiás autoimmunitást többnyire természetes faktorok irányítják, mint az általános öregedés és az apoptózis, addig a primer autoimmun betegségeket viszont főleg az öregedés által felerősített genetikai instabilitás segítheti elő.

A fentieknek megfelelően az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. Az immunrendszerben bekövetkezett változások a szervezet öregedésének csak egy részéért felelősek.
2. A thymus jelentős szerepet játszhat a szervezet teljes immunrendszerének öregedésében.
3. A megemelkedett fiziológiás autoimmunitás többnyire a megnövekedett apoptózis és a korral növekvő sejtpusztulás eredménye.

4. Több autoimmun betegség is lehet olyan genetikai változás eredménye, melyet vagy a genom „fluiditása”, vagy az öregedéssel jelentkező általános változások váltanak ki.

6. A genetikai polimorfizmus kapcsolata az öregedéssel és a betegségekkel

Az egy nukleotidnyi polimorfizmus (SNP) több mint 3 millió bázispárnyi eltérést eredményez két ember genomja között. Ezeket az eltéréseket egyre jobban sikerül feltérképezni, s mind több tény utal arra, hogy ez a variabilitás felelős lehet több ismert biológiai jelenségért. Egyéni nukleotid eltérések bizonyos betegségekre való fogékonyságot eredményezhetnek, azaz egyes nukleotidok gyakrabban fordulnak elő bizonyos betegségben szenvedőknél, mint ugyanabban a pozícióban a populáció egészénél. Ezek az SNP-k sokszor kifejezett változást idéznek elő a sejtekben, pl. megváltozik az illető génhez tartozó enzim aktivitása, máskor viszont hatásuk nem ennyire egyértelmű. Az utóbbi időben több megfigyelés eredménye mutatja, hogy egyes SNP-k megléte a magas életkort megért emberekhez is rendelhető. Ezek az eredmények, ha nem is vezetnek a maximális élettartam kitolásához, rávezethetnek bennünket arra, hogy mely géneknek lehet fokozott szerepük az élethossz alakításában. Ebben a megközelítésben az SNP-eket olyan faktoroknak tekinthetjük, melyek befolyásolhatják az egyén sejtjeinek információs szintjét, s ezért az SNP-eket az öregedési folyamat egyik meghatározójának tekinthetjük. Mivel léteznek bizonyos korfüggő betegségtípusok, a korfüggő és betegségfüggő SNP-k felderítése közelebb vihet bennünket az öregedés és ezen betegségek közös gyökereinek feltárásához is.

VI. MEGBESZÉLÉS

1. A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése

A Sjögren-szindróma patomechanizmusának feltárásához a kandidátus-gén megközelítés mellett kerestük a lehetőséget a probléma szisztematikus megközelítésére. A „differential display” (DD), vagy különbség kimutatás technikája lehetővé teszi a Sjögren-szindrómás beteg totál génexpressziójának összehasonlítását az egészséges kontrolléval. Ebben az esetben tehát nem csak egy kiválasztott gén szerepének tisztázása válik lehetővé, hanem mindazon gének azonosítása, melyek expressziója szignifikánsan megváltozott a Ss-s betegekben. Kísérleteink azt mutatják, hogy a DD alkalmazásával ezek a gének jól azonosíthatóak. Ebben az esetben viszont a nagyobb nehézség a gének azonosításában és szerepük tisztázásában rejlik, mindamelllett, hogy a DNS csip alkalmazása ma már sokkal eredményesebben lesz alkalmazható ezen a területen is. Kevesebb anyag, energia és idő felhasználásával azonosíthatók az eltérően expresszáló gének, s szerepük tisztázása is gyorsabban lesz lehetséges.

Az itt bemutatott példákon láthattuk, milyen egyszerűen felfedhetők expresszióbeli eltérések a kontrollok és a betegekből izolált RNS-ből. Elég sok primert alkalmazva gyakorlatilag minden eltérően expresszáló gén azonosítható. Esetenként több sáv egyazon génhez tartozhat, annak több részletét reprezentálja. A körülmények helyes megválasztásával (polimerázok, primerek, reakciókörülmények, stb.; Haag és Raman, 1994) a kisebb számban átíródó mRNS-ek is megfelelően reprezentálhatók (Ikonomov és Jacob, 1996). Ha több – esetünkben 3-3 - különböző egyedet hasonlítunk össze elkerülhető, hogy az egyedi variációból eredő génexpresszió-eltéréseket a betegségtől függőnek azonosítsuk (Mohr és mtsai, 1997) (a bemutatott részleteknél is láthatjuk, hogy egy-két esetben expresszióbeli

kiugrások egyénektől függőek is lehetnek). A különböző mértékben expresszáladott gének sávjait folyamatosan gyűjtjük a további azonosítás céljából.

A DD módszer publikálása óta (Liang és Pardie, 1992) rengeteg új apró módosítás történt, hogy a technika a különbözőképpen expresszáladó összes gént megbízhatóan ki tudja mutatni (Giumaraes és mtsai, 1995; Mou és mtsai, 1994; Sompayrac és mtsai, 1995). A másik oldalról viszont azt kellett elérni, hogy csak a valóban eltérő génexpressziók jelenjenek meg, hiszen ezzel igen nagy mennyiségű munkát lehet a későbbiekben megtakarítani. A módszer ma már mindkét kritériumnak megfelelően eleget tesz, de még így is igen hosszadalmas és munkaigényes folyamat a gének kimutatása, majd későbbi azonosítása. A mi módszerünk kombinálja az RNS-fingerprinting és DD technikákat (Rotschild és mtsai, 1997), mellyel a fenti követelmények fokozottan kielégíthetőek. Ugyanakkor az összes változó gént azonosítani lehet, mellyel lehetővé válik egyrészt az eddig fontosnak tartott gének szerepének megerősítése, másrészt olyan újak kerülhetnek a látókörünkbe, melyekre eddig nem is gondoltunk, de akár meghatározó szereppel is bírhatnak a betegség etiológiájában.

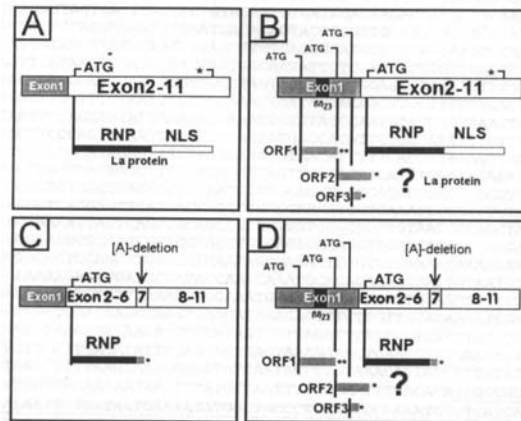
Több kutatási területen alkalmazták már ezt a módszert, mely esetenként eddig ismeretlen gének felfedezéséhez illetve karakterizálásához vezetett. Az egyik ilyen terület az öregedéskutatás (Goyns és mtsai, 1998), ahol a számtalan oki tényező miatt a szisztematikus megközelítés nélkül a feladat szinte megoldhatatlan. Ugyanígy daganatos betegségek kutatásában is sikerrel alkalmazták már a módszert (Chen és mtsai, 1996) vagy szisztémás szklerózis (Feghali és Wright, 1999), illetve az apoptózis folyamatának tanulmányozásához is, de betegségek kiváltó tényezőinek (pl. UV sugárzás; Abst és mtsai, 1997) expressziót befolyásoló hatását is megközelíthetjük DD-el. Nyilvánvalóan nagy szerepet játszhat a DD az embriogenezis és ontogenezis tanulmányozásánál továbbá olyan folyamatoknál, ahol új gének ki-be kapcsolása történik (pl. osztódásnál, sejtciklus változásainál, transzplantációnál, stb.).

Immunológiai folyamatokat is elkezdtek tanulmányozni a DD-el (Ashling és mtsai, 1995), noha még csak modell szinten. A Sjögren-szindróma egyik kofaktorának, az UV sugárzásnak a hatását is vizsgálták DD-el (Voght és mtsai, 1997), de magát a betegséget még nem kezdték el szisztematikusan tanulmányozni. Munkánk elsődleges célja egy olyan adatbázis kidolgozása az eltérően expresszálandó gének felderítésével, melyből később a legfontosabb(ak) azonosíthatók lennének a további tanulmányozás céljából a patomechanizmus végső felderítéséig. Nyilvánvaló, hogy nem csak a betegség kiváltásában és fenntartásában szerepet játszó géneket fogjuk megtalálni, hanem olyanokat is melyek a fontosabb gének működéséből fakadó egyéb változások, de lesznek a betegségtől teljesen független változók is. A matematikai modellezés eszközei és fejlődése (Chen és mtsai, 1999; Eisen és mtsai, 1998; Tamayo és mtsai, 1999) azonban egyre jobban megkönnyítik a kapott adatok értékelését, addig is, míg rendelkezésünkre nem állnak korszerűbb módszerek, mint a például a DNS-csip technológia (Sчена és mtsai, 1995), mellyel a betegségtaniak felderítése nagymértékben felgyorsulhat.

2. Az La gén 7-es exon pontmutációi

A szisztematikus megközelítés mellett folytattuk az La autoantigén tanulmányozását, hiszen ez az antigén igen valószínűen nem csak diagnosztikai jelentőséggel bír, de szerepet játszhat a Sjögren-szindróma patomechanizmusában is. Az La autoantigén 7-es exon forrópont régiójában vizsgáltuk a mutációk jelenlétét. Az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált esetek mintegy 90%-ában (SLE = 80%, SS = 100%) kimutathatók voltak olyan sejtek, melyek mutációt hordoznak, s így alapul szolgálhatnak autoimmun folyamatok beindulásához. Az is látható, hogy az esetek nagy részénél kevert sejtpopuláció található, ahol többnyire az egészséges sejtek jelenléte is észlelhető. A kísérleteinkben azonosított mutációk,

melyek az La gén 7-es exonjának forró pont régiójában található, magyarázatul szolgálhatnak egyes autoimmun reakciók kialakulásához (18. ábra).



18. ábra. Az La fehérjék képződése különböző La mRNS-ekről. **A.** A normál La fehérje. **B.** Lehetséges La fehérjék az alternatív splicinggel keletkező La 1' mRNS-ről. **C.** Az La fehérje keletkezése a 7-es exon mutációja esetén. **D.** Az összes megváltozott La fehérje keletkezése.

A mutációt hordozó sejtek tehát olyan mRNS-t expresszálnak (C panel), melyekről funkcionalitásukban sérült fehérjék íródhatnak át, hiszen ha a C terminális rész eltűnik, megszűnik a fehérje maglokalizációs szignálja (Bachmann és mtsai, 1996; 1997), s ez lehetővé teszi a citoplazmába (ill. más faktorok megléte esetén a sejt felszínre) történő vándorlást (Bachmann és mtsai, 1990b; 1992). A mutáció következtében a fehérje C terminálisán ráadásul kriptogén (+A mutáció) és neo-epitóp (-A mutáció) jöhet létre, mely a fehérjét autoimmun folyamatok beindítására predesztinálhatja. Minden bizonnyal - ahogy az első két esetben is - kimutatható lesz azon autoantitestek jelenléte is a betegek perifériás vérében, melyek a mutáció következtében keletkező epitópokkal reagálnak (Tröster és mtsai, 1995). Az epitóp-„spreading” jelenségének következtében pedig további autoantitestek

megjelenése lesz várható (Chan és mtsai, 1989a; Orth és mtsai, 1998), mely már a fehérje normál részével is reagál, ahogy ez az La antigén esetében is kimutatható.

A kísérleti eredmények jelentősége egyelőre csak becsülhető. Még ha nem is sikerülne teljes egészében visszavezetni az autoimmun reakció kifejlődését a mutációk megjelenésére, egy új diagnosztikai lehetőség is nyílhat a mutációk kimutatásával. A 2 negatív SLE-s beteg közül egyet csak frissen diagnosztizáltak, így lehetséges, hogy még nem jutott abba a stádiumba, mikor a mutáció egyértelműen jelentkezik, esetleg éppen az adott módszer korlátai miatt. A másik eset felhívhatja figyelmünket az autoimmun betegek differenciál-diagnosztikájának fontosságára, a helyes diagnosztikus kritériumrendszer finomításának, illetve az alcsoportoknak a jelentőségére. A negatív esetekben ugyanis más típusú bőrtünetek voltak jelen, mint a pozitív esetekben, noha a megfelelés nem teljesen 100%-os. Szükségünk van tehát a betegségek alcsoportjainak differenciálására (pl. SCLE, DLE), hogy egyértelműen meghatározhassuk, mely eseteket jellemez a mutáció(k) megléte. SLE-ben a betegek állapotát jellemző adatok, mint az autoantitest pozitivitás (Ro-SS/A, La-SS/B, anti DNA, anti SM), vasculitis, antifoszfolipid-szindróma, akut ill. krónikus állapotot leíró pontrendszer, egyéb szervi érintettség (különleges bőrtünetek, vese, idegrendszeri tünetek) közül a szervi érintettség és a bőr fényérzékenysége tűnik szinte teljesen egybevágónak a pozitivitással. Ez is indokolja az alcsoportok további vizsgálatát.

A fényérzékenység esete hangsúlyozhatja egyes faktorok, mint pl. az UV sugárzás hatásának fontosságát. A laboratóriumunkban végzett vizsgálataink azt mutatják, hogy az UV sugárzás befolyásolja többek között az La különböző splicing variánsainak és Ro mRNS-eknek az expresszióját is (Szegedi és mtsai, 1998). Feltételezhető, hogy az expresszió változás mellett a genomban is mutációk léphetnek fel, pontosan olyan régiókban, mint az La gén 7-es exonjának forrópont régiója. Ha ezeket a mutációkat nem javítja ki a sejt „DNS-repair” mechanizmusa, más faktorok megléte mellett elszaporodhatnak a mutációt hordozó sejtek. A

mutációk megjelenése (ill. azok kijavításának hiánya) az egyedi érzékenység mellett a sejtek diszdifferentiálódásának eredménye is lehet (Cutler és Semsei, 1989), mely köztudottan az öregedés előre haladásával párhuzamosan jelentkezik. Nem meglepő tehát, hogy sok autoimmun betegség (ahogy az SLE és a Sjögren-szindróma is) egy meghatározott kor elérésekor jelentkezik egyre nagyobb arányban (Beeson, 1987). Így tehát a daganatos betegségek korral való összefüggése mellett (Cutler, 1982; Semsei és Cutler, 1989) egyre inkább alátámasztást nyer, hogy a sejtek, a szervezet elsodródása a helyesen differentiálódott állapottól hozzájárulhat egyes autoimmun betegségek megjelenéséhez is (Semsei és mtsai, 2000a).

Az itt ismertetett eredményeket csak két autoimmun betegségcsoportban vizsgáltuk, mivel ebben a kettőben volt valószínűsíthető a mutációk megléte. Ugyanakkor a továbbiakban meg kell vizsgálnunk azt is, hogy változik-e időben, - esetleg éppen a betegség akut fázisainak megfelelően - a mutációt hordozó sejtek számaránya, illetve a sejtek mennyisége összefüggésbe hozható-e az adott beteg pillanatnyi állapotával. Ezért az elkövetkezőkben hosszú távú vizsgálatokat is tervezünk, illetve mérni kívánjuk a mutáns sejtek arányát a betegek kezelésének függvényében is. Emellett nem zárható ki az sem, hogy más autoimmun betegség-csoportok, mint az MCTD, rheumatoid arthritis is jellemezhető a mutációk kialakulásával. Ez is a közeljövő kísérleteinek tárgya lesz, mint ahogy a nem differentiált autoimmun szindrómában szenvedő betegeket is be kívánjuk vonni a vizsgálatok körébe. Nagy jelentősége lehet a differentiáldiagnosztikában, ha bebizonyosodik, hogy ezen betegségcsoportba sorolt betegek vizsgálatával könnyebben és hamarabb eldönthető lesz mely autoimmun szindróma kifejlődése várható az idő előre haladtával.

További kísérleteink annak tisztázására irányulnak, hogy a mutáció megjelenése egyértelműen összefüggésbe hozható-e a specifikus antitestek megjelenésével. Mindemellett vizsgálni kívánjuk, hogy in vitro kísérletekben (pl. HaCaT sejteken) az UV sugárzás hatására

keletkeznek-e valóban mutációk az La gén 7-es exonjának forró-pont régiójában. A fenti eredmények és a tervezett kísérletek hozzájárulhatnak néhány autoimmun betegség patomechanizmusának teljesebb megértéséhez is, melyet a Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése is tovább segíti (Semsei és mtsai, 2000a; Urbán és mtsai, 2000).

Az alternatív splicinggel keletkezett mRNS-ekről (B panel) csak keretugrással íródhat át aberráns fehérje, hiszen az La 1' mRNS-szekvenciában stop kodonok találhatók. Ez a keretugrás egyes vírusinfekciók hatására létre is jöhet, s így módosított La fehérje keletkezhet, s ez kiindulási alapul szolgálhat autoimmun reakciók kialakulásához. A 7-es exonban létrejött mutációk hatására azonban (C panel) közvetlenül is alternatív fehérjemolekulák íródhatnak át, melyek a kriptikus és neo-epitópok miatt autoimmun reakciót válthatnak ki a sejtekben. Tőlünk függetlenül és más módszerrel is azonosították a mutációkat hordozó lymphocytákat Sjögren-szindrómás és SLE-ben szenvedő betegekben, egy USA-ban működő laboratóriumban (M. Bachmann személyes közlése).

3. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kapcsolata a Sjögren-szindrómával

Megállapítottuk, hogy a Sjögren-szindrómás betegek halálozásában jelentős tényezőként szereplő lymphoproliferatív szindrómák kialakulásával párhuzamosan, az egyes non-Hodgkin lymphomákra jellemző t(14;18) kromoszóma transzlokációk gyakorisága jelentősen megemelkedett a Ss-s betegekben, az egészségesekhez viszonyítva. A lymphomákat és leukaemiákat gyakran kíséri valamilyen genetikai rendellenesség, gyakran transzlokáció. A follicularis lymphomákra a t(14;18), a Burkitt lymphomákra a t(8;14) (Dalla-Favera és mtsai, 1982), a köpenysejtes lymphomára a t(11;14) transzlokáció (Matolcsy és mtsai, (1994) jelenléte a jellemző stb. A legtöbb esetben egyik oldalon valamelyik onkogén (bcl-1, bcl-2, c-myc, c-abl, c-mos, c-fes stb.) a másik oldalon pedig az immunglobulin gén (a

nehézlánc, vagy a könnyű λ illetve κ lánc) szerepel transzlokációs partnerként. Számos lymphomában/leukaemiában a betegek többségében (85-90%) transzlokációt hordozó sejteket lehet kimutatni, mint ahogy a follicularis lymphománál is. Tanulmányok jelzik, hogy egyes gyulladásszerű folyamatok alatt is detektálhatók transzlokációs sejtek (Limpens és mtsai, 1991; 1995), de egészségesnek látszó donoroknál is pozitívítást lehet megállapítani egyes esetekben (Ji és mtsai, 1995; Liu és mtsai, 1994). Laboratóriumunkban pedig azt mutattuk ki, hogy Whipple-kóros beteg is hordozhat t(14;18) transzlokációs sejteket a perifériában, de a csontvelőben is (Sebők és mtsai, 1997), noha előző munkák csak bcl-2 génátrendeződésről számoltak be de transzlokációról nem (Fest és mtsai, 1996). A lymphoma és egyéb transzlokáció-pozitív esetek között a legfőbb különbség az, hogy csak a lymphomában mutattak ki eddig csontvelői érintettséget, míg a gyulladásszerű folyamatoknál ill. egészséges donorokban csak a perifériás vér lymphocytái voltak pozitívak (Gribben, 1994; Limpens és mtsai, 1995), és az utóbbi esetek csak átmenetileg mutattak pozitívítást, bár az "átmeneti" jelleg esetén akár 5 hónapig is eltartott (Liu és mtsai, 1994).

Viszonylag magas számban fejlődik ki lymphoma a pSs betegeknek (Kassan és mtsai, 1978; Pisa és mtsai, 1991; Talal és Bunim, 1964) ha számukat az egészséges populációhoz hasonlítjuk. A mi méréseinkben 5 %-ban találtunk olyan betegeket, akik transzlokáció-pozitívak voltak, de mindezülig egyiküknek sem volt diagnosztizálható lymphoma. Azonban az a tény, hogy a Sjögren-szindrómás betegeknek mintegy 40-szeres a lymphoma kifejlődés gyakorisága - az egészséges kontrollokhoz viszonyítva - korrelál a relatíve nagy százalékban észlelt transzlokációval (Kassan és mtsai, 1978). Azaz míg - feltételezhetően a normális immunreguláció miatt - a transzlokációt hordozó sejtek eltűnhetnek a perifériás vérből egyes betegségek esetében, ahol csak akut gyulladás lép fel, autoimmun betegségeknél (így a Sjögren-szindrómánál) krónikusan termelődhetnek a transzlokációt hordozó sejtek. Ez a jelenség, vélhetőleg más feltételek egybeesése esetén, hozzájárulhat a lymphoma gyakori

kialakulásához ezeknél a betegeknél. A betegség extraglanduláris tünetei között fedezhetjük fel, ugyanis a perifériás nyirokmirigyek epizodikus megduzzadását és a lép megnövekedését: tehát a lymphadeno- és splenomegalia kialakulása predispositiot jelenthet a malignus lymphomák kialakulására. A Sjögren-szindrómás betegeink perifériás véréből és hosszabb távon esetleg csontvelőjéből a t(14;18) kromoszóma transzlokáció korai kimutatást ill. észlelést a fentiek figyelembevételével azért tartjuk nagy jelentőségűnek, mert teljes haematologiai, ill. oncologiai diagnosztikus repertoárunkat idejében bevethetjük a betegséghez társuló malignus lymphoma korai felismerése, korrektebb stádium beosztása, ezáltal eredményesebb kezelése érdekében. Az egyes betegben, - akinek csontvelői lymphocitáiban is kimutatható volt PCR-rel a transzlokáció - rövidebb-hosszabb idő múlva igen valószínűen follicularis lymphoma alakulhat ki (Semsei és mtsai, 2002b). Itt jelentkezik a PCR technika igen nagy előnye, hiszen a lymphoma korai diagnózisa megnövelheti a kezelés eredményességét. A lymphoma a hosszan tartó lappangó periódus után alakul ki, - amikor még csak a perifériás vér lymphocitái hordozzák a transzlokációt - a transzlokációt hordozó sejtek csontvelőbe történő beszűrődésével. A transzlokáció megjelenésének mechanizmusa feltételezhetően más, mint a már kialakult folliculáris lymphománál, ahol a csontvelői beszűrődés egyik hónapról a másikra is újra kialakul. A pSs betegeknél az állandóan megismétlődő gyulladós folyamatok kiváltotta transzlokáció sűrű megjelenése oka lehet - más faktorok megléte mellett - a lymphomás megbetegedés kialakulásának. Feltűnő azonban, hogy a bcl-2 pozitív betegcsoportban nem fordult elő nyálmirigy duzzanat, - ami a malignus lymphoma jelentkezésére predispositiot jelentő klinikai tünet - annak ellenére, hogy a teljes vizsgált betegcsoportban a nyálmirigy duzzanat gyakorisága elérte a 25%-ot. Ez a megfigyelés is alátámasztja, hogy a pSs betegek esetén a csontvelői sejtekben is megfigyelhető bcl-2 pozitivitás a malignus lymphoma olyan korai szakaszának markere, amikor a betegség még jellegzetes klinikai tünetekben nem nyilvánul meg. Mindenképp

fontosnak tartjuk ezen betegek folyamatos klinikai és laboratóriumi követését, ami szükséges is az eredmények további klinikai értékeléséhez.

A follicularis lymphomában a t(14;18) kromoszóma transzlokáció megváltoztatja a bcl-2 onkogén expresszióját (Nguyen és mtsai, 1996; Seite és mtsai, 1993b; Seto és mtsai, 1988). Mai tudásunk szerint ez a mennyiségi változás a bcl-2 onkogén esetében (Seto és mtsai, 1988) a sejt metabolizmusára erősen kihat, amely a normális apoptotikus folyamatok (Marchetti és mtsai, 1996) zavarához vezet (Hockenbery és mtsai, 1990), igen valószínűen a mitokondrium transzmembrán potenciáljának stabilizálása, fenntartása révén (Marchetti és mtsai, 1996). Legújabb kutatások szerint azonban minőségi eltérés is lehetséges (Matolcsy és mtsai, 1996), pl. pontmutációkat fedeztek fel DLL-nél (ami aminosav kicserélődéshez vezetett a bcl-2 génben), vagy folliculáris lymphománál a bcl-2-ben deléciókat mutattak ki éppen abban a régióban, ahol a gén transzkripciójának iniciálása történik (Seite és mtsai, 1993a). A Bcl-2 túlexpresszálása mono- és poliklonális lymphoproliferáció kifejlődésének esélyét hordozza magában, melyhez hozzájárulhatnak a fas génben bekövetkezett változások is (Rieux-Laucat és mtsai, 1995), amikor szintén megváltozik a sejt képessége a normális metabolikus folyamatok biztosításában. Ezek a történések együttesen végül autoimmun és/vagy lymphoproliferatív szindrómák kifejlődéséhez vezethetnek (Moutsopoulos és mtsai, 1975). Mindezen változások szerepet játszhatnak a lymphomák patomechanizmusában, melynek tisztázása további erőfeszítéseket igényel.

4. A t(14;18) kromoszóma transzlokáció kapcsolata egyes tüdőkarcinómákkal

A Sjögren-szindrómában t(14;18) kromoszóma-transzlokáció (bcl-2 gén transzlokáció) eredményeképpen többszörösére nőhet a malignus lymphomák előfordulásának gyakorisága. Feltehetően ezen gén felelős a Sjögren-szindrómában előforduló autoimmun epithelitis

kialakulásáért és a fibrotizáló mechanizmus indukciójáért is. A bcl-2 fehérje túltermelődés és a nem kissejtes tüdődaganatok közötti összefüggés is nyilvánvaló. Nemcsak a nem kissejtes tüdőkarzinomákban de a praecancerosus állapotokban is kimutatható bcl-2 protein pozitivitás. Izgalmas feladat lenne a bcl-2 transzlokáció (t(14;18)) vizsgálata, tüdőkarzinomában szenvedő betegeknél, illetve műtéten és és/vagy citosztatikus kezeléssel átesett betegeknél a transzlokáció után-követése.

Az apoptotikus folyamatban három alapvető fázist lehet elkülöníteni: indukciós fázis, effektor fázis, degradációs fázis (Fésűs, 1996; Kroemer és Martinez, 1994; Lakos és Szegedi, 1998). Az effektor fázisban az első biokémiai változás – megelőzve a sejtmag DNS-tartalmának endogén endonukleázokkal történő hasítását – a mitokondriumok belső membránpotenciáljának leesése, amely a respirációs lánc működőképtelenségét, az energiatermelés felborulását idézi elő (Susin és mtsai, 1996). A bcl-2 családba tartozó proteinek a külső mitokondriális és a mag membránban helyezkednek el (Kopper és Mihalik, 1990). Kimutatták, hogy a bcl-2 protein megakadályozza egy apoptózist indukáló faktor felszabadulását a mitokondriumokból. Az apoptózis irányába való elköteleződés a mitokondrium illetve a kaszpáz rendszer tagjai közötti együttműködés folyamán alakul ki (Yang és Korsmayer, 1996).

A bcl-2 –höz hasonló apoptózist gátló, vagy azt elősegítő géntermékek általában a bcl-2-vel alkotnak heterodimert. Apoptózist gátlók: bcl-2, bcl-X_L. Mcl-1, A1, LMW5-HL (virális eredetű), BHRF1 (virális eredetű). Apoptózist elősegítők: bax, bcl-X_s, bak, bad, bik, (Fésűs, 1996; Susin és mtsai, 1996). A sejthalált gátló és azt elősegítő molekulák, amelyek homo-, vagy heterodimereket képezhetnek- relatív aránya határozza meg a sejthalál iránti érzékenységet (Fésűs, 1996; Yang és Korsmayer, 1996). Az apoptózist kiváltó jel (pl. növekedési faktor/túlélési faktor megvonása) után az aktuális bcl-2/bax arány dönt(het)i el a sejt sorsát. Valószínű, hogy a bax szintézisét a vad p53 stimulálja, a bax promóter régiójában

p53 kötési helyek vannak (Yang és Korsmayer, 1996). A bad lehetővé teszi, hogy minél több bax-bax homodimer képződhessen azáltal, hogy a bax-ot felszabadítja a bcl-2/bax, vagy bcl-X_L/ bax heterodimerekből, ennél fogva a sejtthál egyik legfontosabb elősegítője (Fésűs, 1996).

5. Az öregedés szerepe az autoimmunitás etiológiájában

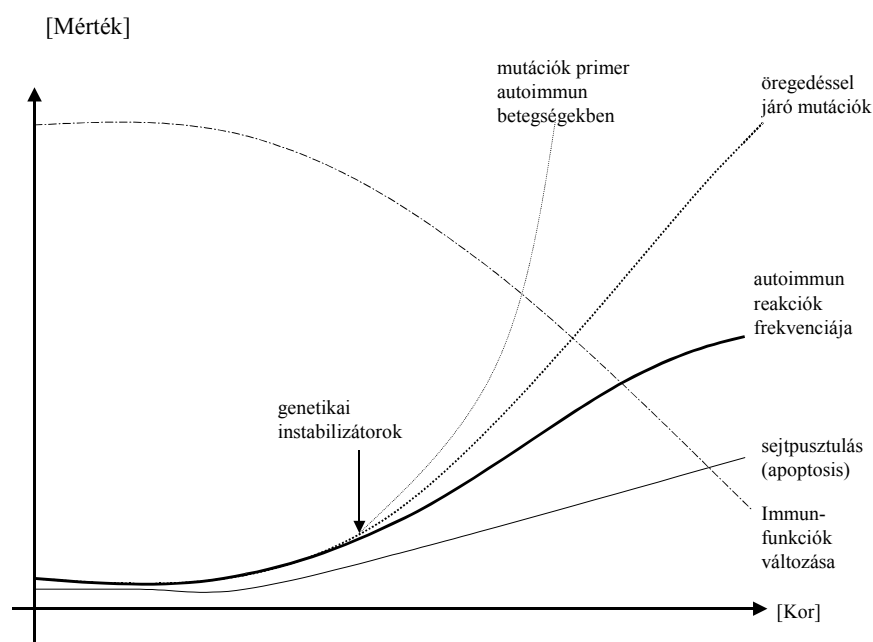
A Sjögren-szindróma etiológiájában feltételezhetően szerepet játszó számos tényező mellett (pl. vírus infekció, hormonhatás, UV-sugárzás, stb.) az öregedés általános folyamatai is közrejátszhatnak a betegség kialakulásában, hiszen egyes betegségek összekapcsolódnak az idősebb korrallal, ezért elképzelhető, hogy magával az öregedés általános folyamatával is összefüggésben állnak (Semsei, 2000; 2002). Számos cikket jelentettek már meg az öregedésnek az immunrendszerre gyakorolt hatásáról (pl.: Cinader és mtsai, 1994; Parham, 1997). Az öregedés általános folyamatai következtében a szervezet minden része változik az idővel, melyet a különböző szervek, sejtrendszerek és sejtek funkcióinak általános csökkenéseként észlelünk. Az immunrendszer sejtjei is hasonló változáson mennek át, mint a szervezet más sejt típusai és ez az immunfolyamatok általános változásában ölt testet. Bizonyos káros tényezők hatásai azonban akkumulálódhatnak a növekvő korrallal (mint a genom mutációi is), de vannak olyan folyamatok is melyek fokozódnak a növekvő korrallal (mint pl. a csontritkulás).

Az öregedő thymus (Mariotti és mtsai, 1995) szerepét jelentősnek tartják az immunsejtek differenciációjának és szelekciójának korfüggő változásában. Számos kutató úgy véli, hogy a thymus involúciója és az ezzel párhuzamosan történő változások a szabályozásban, például a T sejtekre vonatkozóan, meghatározóak lehetnek (Rose, 1994). A klonális egyensúly megbomlása eredményeként csökken a szervezetnek a külső faktorok

elleni védekező képessége, de ugyanakkor növekvő reakciót vált ki a saját komponensek ellenében. Tehát nem csak a memóriasejteknek a naiv sejtekhez viszonyított aránya változik az öregedéssel, de növekszik az autospecifikus T sejtek aránya is. Az antitest repertoárban bekövetkezett változások miatt a cirkuláló antitest szint szintén megemelkedik, mely megnövekedett autoimmunitást vonhat maga után. A T sejt arányok változása a B sejteket is befolyásolja, így az aktivált B sejtek számának növekedését is észleljük, s többek között megemelkedik az autoreaktív B sejtek száma is (Ben-Yehuda és mtsai, 1994). Ezzel párhuzamosan azonban nem változik az IgM reaktivitás, míg az IgG válasz növekszik a kor előrehaladtával (Marchalonis és mtsai, 1993).

Az immunrendszernek az egész szervezet öregedésében betöltött jelentős szerepének felismerése vezetett számos immun-öregedési hipotézis megalkotásához (pl. Walford, 1983), ahol az egész szervezet öregedéséért az immunrendszerben bekövetkezett változásokat tették felelőssé. Az immunrendszer öregedése kétségtelenül igen fontos tényező a szervezet szempontjából, azonban az öregedési folyamatok egészén belül annak csak egy részét teszik ki.

Az általános immunfunkciók – hasonlóan az egész szervezetben bekövetkezett változásokhoz – csökkenő tendenciát mutatnak az öregedéssel (19. ábra).



19. ábra. Néhány funkció, öregedéssel történő változásának tendenciái.

Emellett az általános tendencia mellett vannak olyan folyamatok is, melyek nem követik az általános trendet, ahogy ez az autoimmun reakciók esetében is történik. A immunrendszer működésében bekövetkezett általános romlást mutatja a szervezet külső ágensekkel (vírusok, bakteriális fertőzések, stb.) szemben mutatott reakciójának csökkenése is, valószínűleg a szervezet általánosan csökkenő funkcióinak következményeként (változások a génextpresszióban, fehérjeszintézisben, az intracelluláris környezetben, stb.) (Semsei, 2000; 2002). Az autoimmun reakciók azonban növekednek, s ezzel párhuzamosan a szervezet más folyamataiban is bekövetkezik emelkedés, növekedés. Itt most csak kettőt említünk: a gének mutációit és az apoptózist. A megnövekedett apoptózis (Higami és mtsai, 1997; Liu és mtsai, 2000) miatt, - melyet az öregedés által kiváltott nem programozott sejthalál növekedése is erősít – megemelkedik az eltávolítandó sejtkomponensek tömege, mely elvezethet a fizioiógias autoimmun reakciók emelkedéséhez. Ez jól manifesztálódhat az antitest titer emelkedésében (mint pl. a nukleáris antitestek esetében; Xavier és mtsai, 1995), és ezeket a reakciókat számos fertőzőes folyamat is erősítheti (Jassel és mtsai, 1999). Ezen tendenciák

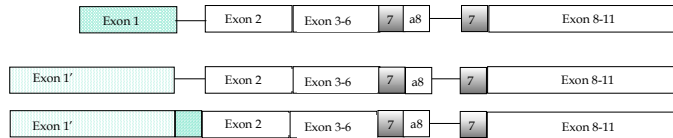
mellett az öregedéssel jelentkező genetikai mutációk számának emelkedése további trigger faktorként jelenhet meg az antitest titer növekedésére: ebben az esetben azonban az antitest repertoár is változik. Mindezek a változások azonban nem feltétlenül vezetnek autoimmun betegségek megjelenéséhez.

Számos példa mutatja, hogy öröklődő autoimmun betegségeket genetikai tényezők is kiválthatnak (Peterson és mtsai, 1998). Így az öregedés által provokált genetikai változások (Strehler, 1986) is fontos szerepet játszhatnak a triggerelő faktorokra (mint pl. külső környezeti tényezők, ahogy az UV sugárzás is; belső faktorok, mint a szabad gyökök és a genom „fluid” karaktere) való tekintet nélkül is. A következő példa azt mutatja be, hogyan játszhat szerepet egy genetikai mutáció egy autoimmun betegség kialakulásában.

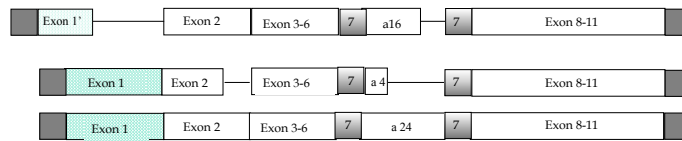
Már régóta sejtik, hogy az autoantitestek nem csak diagnosztikai szereppel bírnak, de szerepet játszhatnak autoimmun betegségek patomechanizmusában is. Az La autoantigénről is azt gondolják, hogy bizonyos autoimmun betegségek – mint a Sjögren-szindróma, szisztémás lupus erythematosus (SLE), stb.- etiológiájában részt vehet. Az La autoantigént mára már meglehetősen jól karakterizálták (Bachmann és mtsai, 1990b; Tröster és mtsai, 1994; Grözl és Bachmann, 1997) és úgy tűnik, hogy az La gén különböző mRNS splicing variánsait (4/a. ábra) különböző faktorok szabályozzák (Grözl és mtsai, 1998), melyek az általános és a specifikus reakciókhoz kapcsolódnak. Az La gén 3 pszeudogénjét is izolálták, ami azért fontos, mert rámutatott az mRNS-ek 7-es exonjában jelenlévő oligoA forró pont régió jelentőségére. Bebizonyították (Bachmann és mtsai, 1996; 1997), hogy Sjögren-szindrómában és SLE-ben szenvedő betegek perifériás vérének lymphocitái valóban hordoznak mutációt ebben a régióban (20/a ábra).

A

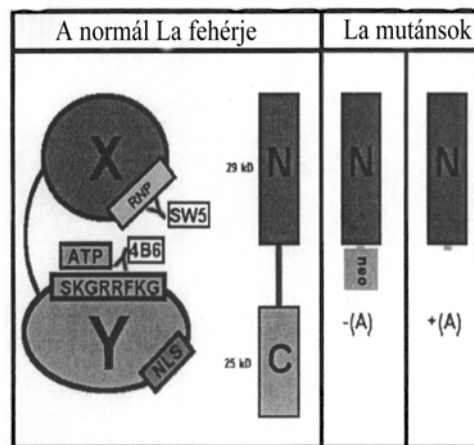
mRNS



Pseudogének



B



20. ábra. Az La autoantigén genetikai variációi. A. Három különböző mRNS splicing variáns létezik egy oligo(A8) szekvenciával a 7-es exonban. A három pszeudogénben ez az oligo(A) szekvencia különböző tagszámú. B. A transzlálódó La fehérjék, normál és $-A$ valamint $+A$ mutációkkal az oligo(A) szekvenciában.

Ezen mutációk következményeit szemlélteti a 20/b. ábra, az átíródó La fehérjék vonatkozásában. Mind a $-A$, mind pedig a $+A$ mutáció olyan, a C terminálnál csonkolt La fehérje keletkezéséhez vezet, melyek a mag. És dimerizációs szignált is elveszítették. A $+A$ mutáció esetében kriptikus epitóp keletkezik, míg a $-A$ mutációnál neoepitóp alakul ki a

mutációk következményeként. Így tehát mindkét variáns autoimmun reakciók kiváltását eredményezheti (Urbán és mtsai, 2002).

Az öröklött genetikai problémákhoz hasonlóan, az öregedéssel megváltozott genetikai apparátus is autoimmun reakciók kiváltását eredményezheti. Az idő előrehaladásával mind több és több korral kialakult változás alakítja a genomot és ezek a változások, például olyan funkcionális változásokkal is járhatnak, mint az La autoantigén megjelenése. Talán nem ez az egyetlen speciális eset, mely az immunrendszer egy elemének jelentős változását vonja maga után. További vizsgálatok igazolhatják, hogy ez a jelenség talán sokkal általánosabb, mint azt eddig gondoltuk (Semsei és mtsai, 2002).

6. A genetikai polimorfizmus kapcsolata az öregedéssel és a betegségekkel

A különböző élőlények genetikai felépítése más és más, a DNS hossza és nukleotid elrendeződése függ az adott élőlény fajtától, komplexitásától: minél közelebbi rokonságban vannak a fajok, annál hasonlóbb ez a genetikai elrendeződés. Az emlősök közötti hasonlóság igen nagy, az ember és a főemlősök genetikai állománya mintegy 98%-ban hasonlít egymáshoz. Két ember DNS-e sem egyezik meg azonban, mert ha csak az egy nukleotidnyi polimorfizmust (SNP: az angol single nucleotide polymorphism rövidítése) tekintjük is, több mint 3 millió nukleotidnyi eltérést találunk két egyén DNS-ében, még azonos populáción belül is (Shastri, 2002). Ez az eltérés még csak nem is nukleotidok inzericiójából, deléciójából, vagy egyéb eltéréséből áll (duplikációk, stb.), csupán az adott helyen az egyik nukleotid helyett egy másik áll (pl. G helyett T, vagy A helyett C, stb.). Mégis ez a legjelentősebb mértékű genetikai eltérések egyike (Vignal és mtsai, 2002).

Az SNP-k elhelyezkedésük szerint kerülhetnek gént kódoló szakaszon kívül, ahol vagy van valamilyen hatásuk (pl. egy gén promóter régiójában, ahol a gén szabályzását befolyásolhatja) vagy nincs. A génen belüli SNP-knek is hasonló lehet a hatása, hiszen ha a nukleotidnyi eltérés következtében nem változik meg az aminosav sorrend (szinonim változások), akkor hatása nem jelentkezik fehérjeszinten; vannak azonban olyan SNP-k is, melyek már a fehérjék aminosav sorrendjében is jelentkeznek (nem szinonim SNP-k). Ezek az eltérések azután kihathatnak a fehérje működésére is, vagy elenyésző hatást váltanak ki (pl. konformációs változást), mely nem befolyásolja az adott fehérje – adott esetben enzim aktivitását – működését, vagy ismerünk olyan aminosav változásokat is, melyek jelentősen befolyásolják, illetve esetenként teljes egészében eltörlik az adott fehérje funkcióját.

Az emberi genom teljes feltérképezését követően most már arra lehet koncentrálni, hogy az ember-ember közötti különbségeket megtaláljuk (Altshuler és mtsai, 2000; Cargill és mtsai, 1999). Történtek is már ilyen jellegű vizsgálatok, feltérképezték az SNP-ket: a teljes kromoszómán belül (Mullikin és mtsai, 2000), a genom egy részében (Haga és mtsai, 2002), vagy egy betegség komplex (Emahazion és mtsai, 2001), vagy egyedi gén vizsgálata során. A teljes körű, szisztematikus SNP-felderítés azonban legalább akkora feladatot ró majd a kutatókra, mint magának az emberi genomnak a feltárása. Tökéletesednek azonban a vizsgálati módszerek (Breen, 2002; Holden, 2002; Tsucihashi és Dracopoli, 2002), az automatizálással és az egyéb gyakorlati és elméleti problémák megoldásával felgyorsulhat majd ez a folyamat (Aerts és mtsai, 2002; Hagmann, 1999; Heil és mtsai, 2002; Jordan és mtsai, 2002; Le-Hellard és mtsai, 2002; Lio és mtsai, 2003).

A genetikai variabilitás ismerete számos probléma megoldásában lehet segítségünkre. Az SNP-k ismeretében nyomon követhetünk evolúciós változásokat, a természetes szelekció alakulását (Akey és mtsai, 2002; Schmidt és mtsai, 2000), hiszen a legtöbb változás a magas rekombinációjú régiókban lelhető fel (Lercher és Hurst, 2002). Így a fajok közötti, illetve egy

fajon belüli evolúciós változások is nyomon követhetők (Schmidt és mtsai, 2000). Másik igen fontos szerepe az SNP-nek a farmakológiában lehet. Ismert jelenség, hogy az egyének különbözőképpen reagálnak gyógyszerekre, vagy más környezeti behatásokra (Bell és mtsai, 2002; Mrash és mtsai, 2002). Vannak, akik igen hevesen reagálnak egyes anyagokra (az USA-ban pl. évente mintegy 100 ezren halnak meg anaphylaxiás reakciók miatt, (Pirmohamed és Park, 2001)), de segítségünkre lehet a metabolizáló gének SNP-inek ismerete a gyógyszerek hatásmechanizmusának megismerésében is.

Az SNP-k egyik legismertebb kérdésköre a betegségre való fogékonyság (szuszceptibilitás). Sok publikáció bizonyítja, hogy egyes nukleotid polimorfizmusok összefüggésbe hozhatók a betegségek kialakulásával, hiszen egyes embercsoportokra jellemző SNP-k esetén a betegség gyakorisága szignifikánsan nagyobb lehet, ha a betegségben nem szenvedő csoport DNS szekvenciájával hasonlítjuk össze. Csak néhányat megemlítve: komplex betegségek, mint az Alzheimer kór (Emahazion és mtsai, 2001), vagy a sarlósejtes anaemia (Waterfall és Cobb, 2001), hyperlipidémia (Osawa és mtsai, 2001), skizofrénia (Li és mtsai, 2000), különböző daganatok, stb.

Igen fontos lehet az SNP-k ismerete az öregedés problémakörének tanulmányozása során is, hiszen a hosszú életű emberek génjeinek összehasonlítása a rövidebb életűekkel választ adhat arra a kérdésre, hogy mely gének, s azoknak mely változatai játszhatnak fontos szerepet a hosszú élet kialakításában. Már vizsgáltak is modellrendszereket (Schmidt és mtsai, 2000), s tanulmányozták, pl. a DNS-javító gének SNP-inek jelentőségét is (Ruttan és Glickman, 2002), hiszen a DNS-hibák kijavítása az öregedés egyik kardinális kérdése lehet.

Az irodalomban fellelhető eredmények azt mutatják, hogy az öregedést részben meghatározó (Semsei, 2000; 2004) genetikai állomány eltéréseiként jelentkező SNP-k befolyásolhatják az elérhető maximális életkort. Ha tehát nem szűkítjük le az öregedés okainak kutatását egyetlen okra (Semsei, 2002; 2003a), akkor a maximálisan elérhető életkort

meghatározó tényezők közé sorolhatjuk a genetikai állomány variabilitását is (Semsei, 2003b). Hasznos lesz tehát az SNP-k korfüggésének kutatása, hiszen ha nem is találjuk meg az öregedés okait az SNP-kben, meghatározhatjuk, hogy mely gének SNP-inek van kifejezett jelentősége a hosszú életkor elérésében. Elképzelhető, hogy sok esetben a magas életkorhoz kötött SNP-k negatív korrelációt mutatnak egyes betegségre való fogékonysággal, mint amit az IL-10 esetében is láthatunk. Az azonban, hogy egyes SNP-k -nyilvánvalóan sok más SNP, illetve egyéb tényező megléte mellett – fokozottan hozzájárulhatnak a betegségek kialakulásához, magát az elérhető maximális életkort negatívan fogják befolyásolni, amint a betegség manifesztálódik (Semsei, 2003c). Érdemes lesz tehát a továbbiakban összehasonlító vizsgálatokat végezni az SNP-knél, hogyan befolyásolják a sikeres öregedést, illetve egyidejűleg a betegség szuszceptibilitást.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Magyar nyelvű összefoglaló

A poliszisztémás autoimmun betegségek közé tartozó Sjögren-szindrómában főleg az exocrin mirigyek károsodnak, de más szervek működése is zavart szenvedhet. A betegség kialakulásában az immunregulációs zavart előidéző komplex genetikai háttér, hormonális tényezők valamint más külső és belső faktorok mellett marker autoantitestek - így az La autoantigén - fontos szerepet játszik a betegség felismerésében, de az etiopathogenezisben is részt vehet.

Az autoimmun folyamatok közvetlen elindítói lehetnek az La mRNS splicing variánsai, de a 7-es exon forrópont régiójának mutációi közvetlenül is szerepet játszhatnak ebben a folyamatban, a megváltozott La fehérjék átíródása révén. Munkánkban Sjögren-szindrómában (és szisztémás lupus erythematosusban) szenvedő betegek lymphocytaiban mutattunk ki mutációt a fenti régióban, PCR-SSCP technika segítségével. Emellett differential display alkalmazásával elkezdtük a Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítését. Ezt követően megállapítottuk, hogy a Sjögren-szindróma egyik fő halálozási okaként szereplő lymphoproliferatív szindrómák egyikét jellemző t(14;18) kromoszóma transzlokáció gyakorisága ötszörös az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, ami alátámasztja a magasabb halálozási arányt. Mivel a Sjögren-szindróma az életkor előrehaladásával jelentkezik fokozottabban, az öregedés szerepét is diszkutáltuk egyes autoimmun folyamatok etiológiájában. Emellett az öregedés és egyes betegségek kialakulását vizsgáltuk a genetikai polimorfizmus kapcsolatával is. Munkánk eredményei elősegíthetik a Sjögren-szindróma etiológiájának jobb megértését.

2. Angol nyelvű összefoglaló

SUMMARY

Sjögren's syndrome (Ss), which belongs to the polysystemic autoimmune diseases, is characterized mainly by the destruction of exocrine glands but other organs could be damaged as well. Besides the complex genetic background, hormonal factors and other external and internal factors - that result in the disorders of immune regulation in Ss - the La autoantigen plays not only a diagnostic role but it may participate in the pathogenesis of the disease as well.

Certain La mRNA splicing variants could be indirect triggering factors of the autoimmune process; however the mutations in the hot-spot region of the La exon 7 may be directly involved in this process as it is directly translated into mutant proteins. We detected mutations in lymphocytes of Sjögren's patients (as well as in patients of systemic lupus erythematosus) in this region using PCR-SSCP method. Besides we started to approach Sjögren's syndrome systematically by differential display. Moreover, we established that the frequency of t(14;18) chromosome translocation in Sjögren's patients is 5 times higher than in healthy donors. This fact explains the higher mortality rate which is caused by lymphoproliferative disorders, one of the main causes of death of Ss patients. Since the appearance of Sjögren's syndrome is experienced mainly at late ages we discussed the role of aging in the etiology of autoimmune diseases as well. Moreover, the linkage between aging, diseases and single nucleotide polymorphisms were also reviewed. Results of this study could contribute to the better understanding of the pathomechanism of Sjögren's syndrome.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

- Abst HF, Breuhahn K, Michel G, et al. (1997): Analysis of UV-modulated gene expression in human keratinocytes by mRNA differential display polymerase chain reaction. *Photochem Photobiol* 66: 363-367.
- Adachi M, Cossman J, Longo D, et al. (1989): Variant translocation of the bcl-2 gene to immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2771-2774.
- Adachi M, Tefferi A, Greipp PR, et al. (1990): Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 171: 559-564.
- Aerts J, Wetzels Y, Cohen N, Aerssens J. (2002): Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs. *Hum Genet* 20: 163-173.
- Akey JM, Zhang G, Zhang K, et al. (2002): Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genom Res* 12: 1805-1814.
- Altshuler D, Pollara VJ, Cowies CR, et al. (2000): An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature* 407: 513-516.
- Asling B, Dushay MS, Hultmark D. (1995): Identification of early genes in the *Drosophyla* immune response by PCR-based differential display: The attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Ins Biochem Mol Biol* 25: 511-518.
- Ayala M, Balint RF, Fernández-de-Cossío ME, et al. (1995): New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechn* 18: 841-859.
- Bachmann M, Zahn RK, Müller WEG. (1983): Purification and properties of a novel pyrimidine-specific endoribonuclease termed endoribonuclease VII from calf thymus that is modulated by polyadenylate. *J Biol Chem* 258: 7033-7040.

- Bachmann M, Mayet WJ, Schröder HC, et al. (1987): Identification of the Ro and La antigens in the endoribonuclease VII-ribonucleoprotein complex. *Biochem J* 243: 189-194.
- Bachmann, M, Chang, SH, Slor H, et al. (1990a): Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after UV irradiation of human keratynocytes. *Exp Cell Res* 191: 171-180.
- Bachmann, M, Pfeifer K, Schröder HC, et al. (1990b): Characterization of the autoantigen La/SS-B as a nucleic acid dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* 60:85-93.
- Bachmann M, Althoff H, Tröster H, et al. (1992): Translocation of the nuclear autoantigen La to the cell surface of herpes simplex virus type I infected cells. *Autoimmunity* 12: 37-45.
- Bachmann M, Tröster H, Bartsch H, et al. (1996): A frame shift mutation in a hot spot region of the nuclear antigen La(SS-B). *J Autoimmun* 9: 747-756.
- Bachmann M, Grölz D, Bartsch H, et al. (1997): Analysis of expression of an alternative La (SS-B) cDNA and localization of the encoded N- and C-terminal peptides. *Biochim Biophys Acta* 356: 53-63.
- Barkai N, Leibler S. (1997): Robustness in simple biochemical networks. *Nature* 387: 913-917.
- Beeson PB. (1987): Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Amer J Med* 96:457-62.
- Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, et al. (2002): SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenetics and drug discovery. *Biotechnol S*: 70-72.
- Ben-Yehuda A, Szabo P, Weksler ME. (1994): Age-associated changes in the B-cell repertoire: effect of age on RAG-1 gene expression in murine bone marrow. *Immunol Lett* 40: 287-289.

- Bessenyei B, Urbán L, Takács I, és mtsai (2000a): A t(14;18) transzlokáció jelenlétének kimutatása és diagnosztikus jelentősége a follicularis lymphoma minimális reziduális betegségében. *Orv. Hetil.* 141: 1715-1719.
- Bessenyei B, Kiss E, Zeher M, Urbán L, és mtsai (2000b): Az La autoantigén 7-es exonjában található pontmutációk: Szerepük egyes autoimmun betegségek patomechanizmusában. *Magy Belorv Arch* 53: 271-276.
- Breen G. (2002): Novel and alternate SNP and genetic technologies. *Psychiatr Genet* 12: 83-88.
- Bunim JJ, Talal N. (1963): The association of malignant lymphoma with Sjögren's syndrome. *Trans Assoc Amer Phys* 76: 45.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al.(1999): Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 2: 231-238.
- Chambers JC, Kenan D, Martin BJ, Keene JD. (1988): Genomic structure and amino acid sequence domains of human La autoantigen. *J Biol Chem* 263: 18043-18051.
- Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. (1989a): Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucl Acids Res* 6: 2233-2244.
- Chan EKL, Sullivan KF, Fox RI, et al. (1989b): Sjögren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. *J Autoimmun* 2: 321-327.
- Chen SL, Maroulakou IG, Green JE, et al. (1996): Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers. *Oncogene* 12: 741-51.
- Chen T, He HL, Church GM. (1999): Modeling gene expressions with differential equations. *Pac Symp Biocomp* 4: 29-40.
- Cinader B, Globerson A, Rose NR, et al. (1994): Special Issue Ageing Papers. *Immunol Lett* 40: 213-289.

- Cleary ML, Sklar J. (1985): Nucleotide sequence of the t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7439-7443.
- Cleary ML, Smith SD, Sklar J. (1986): Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47: 19-28.
- Cutler RG. (1982): The dysdifferentiative hypothesis of mammalian aging and longevity. In: E. Jacobini et al. (eds.) *The Aging Brain*, Raven Press, New York, pp 1-18.
- Cutler RG, Semsei I. (1989): Development, cancer and aging: Possible common mechanisms of action and regulation. *J Gerontol Biol Sci* 44: B25-34.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, et al. (1982): human c-myc onc is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7824-7827.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO. (1996): Use of cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 14: 457-460.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680-686.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868.
- Emahazion T, Feuk L, Jobs M, et al. (2001): SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex diseases analysis. *Trends Genet* 17: 403-413.
- Feghali CA, Wright TM. (1999): Identification of multiple, differentially expressed messenger RNAs in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arthr Rheumatol* 42: 1451-1457.

- Feltkamp TEW. (1999): The mystery of autoimmune diseases. In: Schoenfeld Y. (ed). The decade of autoimmunity. Amsterdam, Elsevier; p. 1-5.
- Fest T, Pron B, Lefranc M-P, et al. (1996): Detection of clonal bcl2 gene rearrangement in tissues from a patient with Whipple disease. *Ann Intern Med* 124: 738-740.
- Fésús L. (1996): Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett* 328: 1-5.
- Fodor SPA, Rava RP, Huang XC, et al. (1993): Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364: 555-556.
- Forestier M, Reichen J, Solioz M. (1996): Application of mRNA differential display to liver cirrhosis: reduced fetuin expression in biliary cirrhosis in the rat. *Biochem Biophys Res Comm* 225: 377-83.
- Fox I, Robinson CA, Curd JG, et al. (1986): Sjögren's syndrome. Proposed criteria for classification. *Arth Rheum* 29: 577.
- Giumaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, et al. (1995): Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucl Acid Res* 23: 1823-1833.
- Gottlieb E, Steitz JA. (1989): The RNA binding protein La influences both accuracy and the efficiency of RNS polymerase III transcription in vivo. *EMBO J* 8: 841-850.
- Goyns MH, Charlton MA, Dunford J.E, et al. (1998): Differential display analysis of gene expression indicates that age-related changes are restricted to a small cohort of genes. *Mech Ageing Dev* 101: 73-90.
- Gribben JG, Neuberg D, Barber M, et al. (1994): Detection of lymphoma residual cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapses than detection in bone marrow. *Blood* 83: 3800-3807.
- Grölz D, Bachmann M. (1997): The nuclear autoantigen La/SS-associated antigen B: one gene, three functional mRNAs. *Biochem J* 323: 151-158.

- Grölz D, Laubinger J, Wilmer F, et al. (1997): Transfection analysis of expression of mRNA isoforms encoding the nuclear autoantigen La/S-B. *J Biol Chem* 272: 12076-12082.
- Grölz D, Tröster H, Semsei I, et al. (1998): Analysis of expression of the gene coding for the nuclear autoantigen La/SS-B using reporter gene construct. *Biochim Biophys Acta* 1396: 278-293.
- Haag E, Raman V. (1994): Effects of primer choice and source of Taq DNA polymerase on the banding patterns of differential display RT-PCR. *Biotechnol* 17: 226-228.
- Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, et al. (2002): Gene-based SNP discovery as a part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190 562 genetic variations in the human genome. *Single Nucleotide Polymorphism. J Hum Genet* 47: 605-610.
- Hagmann M. (1999): Human genome. A good SNP is hard to find. *Science* 285: 21-22.
- Harley JB. (1986): Anti-Ro/SSA and anti-LA/SSB in patients with Sjögren's syndrome. *Arth Rheum* 29: 196.
- Hartwig M. (1992): On age-related autoimmunity. *Autoimmunity* 11: 289-90.
- Heil J, Glanowski S, Scott J, et al. (2002): An automated computer system to support ultra high throughput SNP genotyping. *Pac Symp Biocomput* 30-40.
- Hendrick JP, Wolin S, Rinke J, et al. (1981): Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins. Further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* 12: 1138-1149.
- Higami Y, Shimokawa I, Tomita M, et al. (1997): Aging accelerates but life-long dietary restriction suppresses apoptosis-related Fas expression on hepatocytes. *Am J Pathol* 151: 659-663.
- Hilker M, Tröster H, Grölz D, et al. (1996): The autoantigen La/SS-B: Analysis of expression of alternatively spliced La mRNAs isoforms. *Cell Tiss Res* 284: 383-389.

- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336.
- Holden AL. (2002): The SNP consortium: summary of a private consortium effort to develop an applied map of the human genome. *Biotechnol S*: 22-23, 26-29.
- Ikonomov OC, Jacob MH. (1996): differential display protocol with selected primers that preferentially isolate mRNAs of moderate- to low-abundance in a microscopic system. *Biotechnol* 20: 1030-1042.
- Jassel SV, Ardill JE, Fillmore D, et al. (1999): The rise in circulating gastrin with age is due to increases in gastric autoimmunity and *Helicobacter pylori* infection. *Q J Med* 92: 373-377.
- Ji W, Qu GZ, Ye P, et al. (1995): Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res* 55: 2876-2882.
- Jordan B, Charest A, Dowd JF, et al. (2002): Blumenstiel JP, Yeh RF, Osman A, Housman DE, Landers JE: Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2942-2947.
- Kassan SS, Thomas T, Moutsopoulos HM. (1978): Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med* 89:888-91.
- Kawasaki ES. (1990): Amplification of RNA; In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds): PCR protocol. New York, Acad Press, pp. 21-28.
- Kopper L, Mihalik R. (1990): A sejt halála és a daganat keletkezése. *Orv Hetil* 140: 1283-1289.
- Kroemer G, Martinez C. (1994): Pharmacological inhibition of programmed lymphocyte death. *Immunol Today* 15: 235-242.

- Lakos G, Szegedi Gy. (1998): Az apoptózis fiziológiás és patológiás körülmények között. LAM 8: 246-253.
- Le-Hellard S, Ballereau SJ, Visscher PM. (2002): SNP genotyping on pooled DNAs: Comparison of genotyping technologies and a semi-automated method for data storage and analysis. Nucleic Acid Res 30: 74-81.
- Lercher MJ, Hurst LD. (2002): SNP variability and mutation rate are higher in regions of high recombination. Trend Genet 18: 337-340.
- Li T, Ball D, Zhao J, et al. (2000): Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. Mol Psychiatry 5: 77-84.
- Liang P, Pardee AB. (1992): Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.
- Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, et al. (1992): Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res 52: 6966-8.
- Limpens J, De Jong D, Van Krieken JHJM, et al. (1991): Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. Oncogene 6: 2271-2275.
- Limpens J, Stad R, Vos C. et al. (1995): Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. Blood 85: 2528-36.
- Linskens MH, Feng J, Andrews WH, et al. (1995): Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. Nucl Acids Res 23: 3244-3251.
- Lin Y, Chan SH. (1995): Cloning and characterization of two processed p53 pseudogenes from the rat genome. Gene 156: 183-189.

- Lio D, Pes GM, Carru C, et al (2003): Association between the HLA-DR alleles and longevity: a study in Sardinian population. *Exp Gerontol* 38: 313-318.
- Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, et al. (2000): Increased apoptosis in heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res* 45: 729-735.
- Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, et al. (1994): BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8910-8914.
- Manthorpe R, Morling N, Platz P, et al. (1985): HLAD frequencies in Sjögren's syndrome: differences between primary and secondary forms. *Scand J Rheumatol* 10: 124-128.
- Marchalonis JJ, Kaymaz H, Schluter SF, et al. (1993): Human antibodies to a synthetic putative t cell receptor beta-chain idiotype: expression in autoimmunity and aging. *Exp Clin Immunogenet* 10: 1-15.
- Marchetti P, Hirsch T, Zamzani N. (1996): Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157: 4831-4836.
- Mariotti S, Francheschi C, Cossarizza A, et al. (1995): The aging thyroid. *Endocrine Rev* 16: 686-715.
- Matolcsy A, Inghirami G, Knowles M. (1994): Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma). *Blood* 83: 1363-1372.
- Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, et al. (1996): Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 88: 3937-3944.
- McAdams HH, Arkin A. (1997): Stochastic mechanisms in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 814-819.
- McAdams HH, Shapiro S. (1995): Circuit simulation of genetic networks. *Science* 269: 650-656.

- Meerovitch K, Peleettier J, Sonenberg NJ. (1989): A cellular protein that binds to the 5'-non-coding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes Develop* 3:1026-1034.
- Merup M, Spasokoukotskaja T, Einhotn S, et al. (1996): Bcl-2 rearrangements with breakpoints in both vcr and mbr in non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Brit J Haematol* 92: 647-652.
- Mohr S, Cullen P, Schmidt R, et al. (1997): Avoidance of false positives in PCR-based mRNA differential display during investigation of nonstandardized tissues or cells. *Clin Chem* 43: 182-184
- Mou L, Miller H, Li J, et al. (1994): Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Comm* 199, 564-569.
- Moutsopoulos HM, Mann DL, Johnson A, et al. (1975): Genetic differences between primary and secondary sicca syndrome. *New Engl J Med* 301: 761-764.
- Moutsopoulos HM, Hooks JJ, Chan CC, et al. (1986): HLA-Dr expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 45: 677-681.
- Moutsopoulos HM, Youinou P. (1991): New developments in Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 3: 815-22.
- Mrash S, Kwok P, McLeod HL. (2002): SNP databases and pharmacogenetics: great start, but a long way to go. *Hum Genet* 20: 174-179.
- Mullikin JC, Hunt SE, Cole CG, et al. (2000): An SNP map of human chromosome 22. *Nature* 407: 516-520.
- Müzes Gy, Igaz P. (1997): Az apoptózis az immunfolyamatok regulációjában és az autoimmun betegségek pathogenezisében. *Orv Hetil* 138: 1315-1320.
- Napankangas U. (1999): Apoptosis in non-small cell carcinoma and preinvasive bronchial lesions of the lung. Academic dissertation, Dept. Pathol., Univ. Oulu.

- Ngan B-Y, Nourse J, Cleary ML. (1989): Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 73: 1759-62.
- Nguyen PL, Harris NL, Ritz J, et al. (1996): Expression of CD95 antigen and bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Amer J Pathol* 148: 847-853.
- Osawa H, Ochi M, Nishiyama T, et al. (2001): A systemic search for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the insulin receptor gene: association of an SNP with hyperlipidemia in Japanese type 2 diabetic subjects. *Clin Genet* 60: 479-481.
- Ogawa N, Dang H, Lazaridis K, et al. (1995): Analysis of transforming growth factor and other cytokines in autoimmune exocrinopathy (Sjögren's syndrome). *J. Interf Cytok Res* 15: 759-763.
- Orth T, Mayet WJ, Deister H, et al. (1998): Analysis of epitope spreading over an eleven-year period in a patient with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 27: 461-4.
- Parham P. (1997): Aging and the immune system. *Immunol Rev* 160: 5-184.
- Peper RJ, Tina WZ, Mickelson MM. (1968): Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *J Lab Clin Med* 72: 842-848.
- Peterson P, Nagamine K, Scott H, et al. (1998): APECED: a monogenic autoimmune disease providing new clues to self-tolerance. *Immunol Today* 19: 384-386.
- Pezzella F, Turley H, Kuzu I, et al. (1993): Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *329*: 690-694.
- Pirmohamed M, Park BK. (2001): Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol Sci* 22: 298-305.
- Pisa EK, Pisa P, Kang HI, et al. (1991): High frequency of t(14;18) translocation in salivary gland lymphomas from Sjögren's syndrome patients. *J Exp Med* 174: 1245-1250.

- Pruijn GJM, Slobbe RL, vanVenrooij WJ. (1990): Structure and function of La and Ro RNPs. Mol Biol Rep 14: 43-48.
- Rieux-Laucat F, Deist P, Le F, et al. (1995): Mutations in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science 268: 1347-1349.
- Rivas MV, Jarris E.D, Morisaki S, et al. (1997): Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique. J Invest Dermatol 108: 188-194.
- Rose NR. (1994): Thymus function, ageing and autoimmunity. Immunol Lett 40: 225-230.
- Rothschild CB, Brewer CS, Bowden DW. (1997): DD/AP-PCR: combination of differential display and arbitrarily primed PCR of oligo(dT) cDNA. Anal Biochem 245: 48-54.
- Ruttan CC, Glickman BW. (2002): Coding variants in human double-strand break DNA repair genes. Mutat Res 509: 175-200.
- Salehi M, Hodgkins MA, Merry BJ, et al. (1996): Age-related changes in gene expression in the rat brain revealed by differential display. Experientia 52: 888-891.
- Salesiotis AN, Wang CK, Wang CD, et al. (1995): Identification of novel genes from stomach cancer cell lines by differential display. Cancer Lett 91: 47-54.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. Science 270: 467-470.
- Schmidt PS, Duvernell DD, Eanes WP (2000): Adaptive evolution of a candidate gene for aging in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA 97: 10861-10865.
- Schoenfeld Y. (1997): Ageing, autoantigen specific T cells, involution of the thymus, autoimmunity and autoimmune diseases. Autoimmunity 8: 251-256.
- Sebők P, Takács I, Szabó G. és mtsai (1997): A t(14;18) kromoszóma transzlokáció jelenléte különböző típusú betegségekben. Orv Hetil 52: 3301-3306.

- Seite P, Leroux D, Hillion J, et al. (1993a): Molecular analysis of a variant 18;22 translocation in a case of lymphocytic leukemia. *Gen Chromos Cancer* 6: 39-44.
- Seite P, Hillion, J, d'Agay M.F, et al. (1993b): Bcl-e gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases. *Leukemia* 7: 410-417.
- Semsei I. (2000): On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* 117: 93-108.
- Semsei I. (2002): Az öregedés betegsége. *Magy Belorv Arch* 55: 3-13.
- Semsei I. (2003a): A hosszú élet génje. *InterPress Magazin június*: 16-19.
- Semsei I. (2003b): Nők férfiak: ki a nyertes? *Versenyfutás az évekért. InterPress Magazin augusztus*: 26-28.
- Semsei I. (2003c): Az örök élet kutatása. Készen állunk-e a fiatalság vizének felfedezésére? *MOTESZ Magazin* 2: 24-25.
- Semsei I. (2004): Néhány gondolat az öregedés biológiájáról. *Magy Tud beküldve*.
- Semsei I, Cutler RG. (1989): Cancer and Aging: Possible common mechanisms of oxyradicals in destabilizing proper gene regulation. In: L. Robert and G. Hofecker (eds.) *The Theoretical Bases of Aging Research*, Facultas Verlag, Wien, pp 110-114.
- Semsei I, Ma S, Cutler RG. (1989): Tissue and age specific expression of the proto-oncogene myc family throughout the life span of the C57BL/6J mouse strain. *Oncogene* 4: 465-471.
- Semsei I, Tröster H, Bartsch H, et al. (1993): Isolation of rat cDNA clones coding for the autoantigen SS-B/La: Detection of species specific variations. *GENE* 126: 265-268.
- Semsei I, Zeher M, Takács I, Urbán L, és mtsai. (1998): A t(14;18) kromoszóma transzlokáció előfordulása Sjögren-szindrómás betegek lymphocitáiban. *Magy Belorv Arch* 51: 249-254.
- Semsei I, Bessenyei B, Urbán L, és mtsai. (2000a): A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése. *Magy Belorv Arch* 53: 131-135.

- Semsei I, Zeher M, Takács I, Urbán L, et al. (2000b): High frequency of t(14;18) translocation in the Sjögren's syndrome. *Arthr Rheumatol* 43: 951-952.
- Semsei I, Zeher M, Bakó Gy. (2002): Az öregedés szerepe az autoimmunitás etiológiájában. *Magy Immunol* beküldve.
- Seto M, Jaeger U, Hockett RD, et al. (1988): Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J* 7: 123-131.
- Shastry BS. (2002): SNP alleles in human diseases and evolution. *J Hum Genet* 47: 561-566.
- Sjögren H. (1933): Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis Sicca (Keratitis Filiformis bei Hypojunktion der Tranenrösen). *Acta Ophthalmol* 11: 1-8.
- Sompayrac L, Jane S, Burn TC, et al. (1995): Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucl Acid Res* 23: 4738-4739.
- Strehler BL. (1986): Genetic instability as the primary cause of human aging. *Exp Gerontol* 21: 283-319.
- Sung YJ, Denman RB. (1997): Use of two reverse transcriptases eliminates false-positive results in differential display. *Biotechn* 23: 462-468.
- Susin SA, Zanzani N, Castedod N, et al. (1996): Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184: 1131-1141.
- Szallasi Z. (1998): Gene expression patterns and cancer. *Nature Biotech* 16: 1292-1293.
- Szegedi A, Hunyadi J, Sebők P, és mtsa (1998): Az UV sugárzás hatása az La és Ro antigén-mRNS-ek expressziójára humán keratinocitákban: kapcsolata autoimmun betegségekkel. *Börgy Venerol Szemle* 74: 107-111.
- Takács I, Urbán L, Radványi G, és mtsai. (1998): A bcl-2 és Ig nehézlánc gének fúziójának kimutatása PCR-rel follicularis lymphomában: irradiációs és citosztatikus kezelések nyomon követése. *Magy Belorv Arch* 51: 133-137.

- Takács I, Zeher M, Szabó G, et al. (2000a): Diagnostic value of the detection of t(14;18) chromosome translocation in malignant hematological and immunopathological diseases using polymerase chain reaction. *Acta Med Okay* 54: 185-192.
- Takács I, Zeher M, Urbán L, et al. (2000b): Frequency and evaluation of t(14;18) chromosome translocation in Sjögren's syndrome. *Ann Hematol* 79: 444-448.
- Talal N, Bunim JJ. (1964): The development of the malignant lymphoma in the courses of Sjögren's syndrome. *Amer J Med* 36: 529- 532.
- Talal N, Moutsopoulos HM, Kassan SS. (1987): Sjögren's syndrome. *Clinical and Immunological Aspects*. Berlin: Springer Verlag.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, et al. (1999): Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: Methods and applications to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2907-2912.
- Tanuja T, Sagar P, Vikram S, et al (2002) Expression of BCL-2 and BAX in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. *Pathol.Oncol,Res.*2:109-114.
- Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, et al. (1999): Systematic determination of genetic network architecture. *Nature Genet* 22: 281-285.
- Tsuchihashi Z, Dracopoli NC. (2002): Progress in high throughput SNP genotyping technologies. *Pharmacogenet J* 2: 103-110.
- Tröster H, Metzger T, Semsei I, et al. (1994): One gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a library of a patient with primary Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 180: 2059-2067.
- Tröster H, Bartsch H, Klein RR, et al. (1995): Activation of a murine autoreactive B-cell by immunization with human recombinant autoantigen La/SS-B: Characterization of the epitope. *J Autoimmun* 8: 825-42.

- Urbán L, Bessenyei B, Zeher M, és mtsai. (2000): A differential display az immunológiai betegségek patomechanizmusának tanulmányozásában. *Allerg Klin Immunol* 3: 7-11.
- Urbán L, Bessenyei B, Márka M, Semsei I. (2002): On the role of aging in the etiology of autoimmunity. *Gerontology* 48: 179-184.
- Vignal A, Milan D, SanChristobal M, Eggen A. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34: 275- 305.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. (2002): European Study Group on Classification Criteria for Sjogren's Syndrome Classification criteria for Sjogren's syndrome: A revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61: 554-558.
- Vogt TMM, Welsh J, Tolz W, et al. (1997): RNA fingerprinting displays UVB-specific disruption of transcriptional control in human melanocytes. *Cancer Res* 57: 3554-3561.
- Walford RL. (1983): *Maximum Life Span*. New York: Norton.
- Waterfall CM, Cobb BD. (2001): Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. *Nucl Acid Res* 29: E119.
- Wels J, Rampino M, McClelland M, et al. (1995): Nucleic acid fingerprinting by PCR-based method: application to problems in aging and mutagenesis. *Mutat Res* 1338: 215-229.
- Wu HC, Lee EH. (1997): Identification of a rat brain gene associated with aging by PCR differential display method. *J Mol Neurosci* 8: 13-8.
- Xavier RM, Yamauchi Y, Nakamura M, et al. (1995): Antinuclear antibodies in healthy aging people: a prospective study. *Mech Ageing Dev* 78: 145-154.
- Yang E, Korsmayer SJ. (1996): Molecular thanaptosis: A discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 88: 386-401.
- Yunis JJ, Oken MM, Kaplan M, et al. (1982): Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. *N Eng J Med* 307: 1231-1235.

- Zeher, M. (1990): Sjögren-szindróma. In: Klinikai immunológia II. Szegedi, Gy., Gergely, P., Sipka, S., Szemere, P. (szerk.) Medicina, Budapest, pp.261-269.
- Zeher M, Szegedi Gy. (1998): On the Sjögren's syndrome. Orvosk 83: 55-58.
- Zeher M, Szekanecz Z, Csontos Gy, et al. (1989): Investigation of clinical-immunological features of the Sjögren's syndrome. Magy Belorv Arch 42: 31-35.
- Zeher M, Surányi P, Szegedi Gy. (1990): CD5 positivity on peripheral B lymphocytes in patients with Sjögren's syndrome. Allergol Immunopathol 18: 75.
- Zeher M, Olajos Á, Gergely L, et al. (1997): Dynamics of cytokine receptor expression in Sjögren's syndrome. In: Kishimoto T, Miyasaka M, Mason D et al. (eds.) London, Garland Press.
- Zeher M, Demeter J, Szegedi Gy. (1998): Non-Hodgkin lymphoma előfordulása primer Sjögren-szindrómában. Magy Belorv Arch 51: 243-245.

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Szegedi Gyula** akadémikus úrnak és **Dr. Semsei Imre** tanár úrnak, amiért lehetővé tették, hogy munkám elkészülhessen, és ahhoz szakmai és emberi támogatást adtak.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Zeher Margit** asszonynak, aki értékes tanácsaival állt rendelkezésemre, illetve a III. Belgyógyászati Klinika valamennyi dolgozójának, különösen Bessenyei Beátának és Deák Györgynének a laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért.

X. FÜGGELÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANA	nukleáris antigén elleni antitest
DD	differential display (külömbőség kimutatás)
DLE	discoid lupus erythematosus
MCTD	kevert kötőszöveti betegség
mtsai	munkatársai
PCR	polimeráz láncreakció
RA	rheumatoid arthritis
RNP	ribonukleoprotein
SLE	szisztémás lupus erythematosus
Ss	Sjögren-szindróma
SCLE	subcut cutan lupus erythematosus
SSCP	egyszálú konformációs polimorfizmus

X. FÜGGELÉK

2. ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

1. Takács I, Meleg Gy, Fodor B, Berkes E, Urbán L, Radványi G, Meleg B, Sipka S, Semsei I, Szegedi Gy. (1997): A polimeráz láncreakció (PCR) jelentősége a haematologiai és autoimmun kórképek diagnosztikájában és nyomon követésében. Semmelweis Kórház tudományos ülése, Miskolc. Február 27.
2. Takács I, Urbán L, Radványi G, Sebők P, Bessenyei B, Molnár I, Szegedi Gy, Semsei I. (1998): A bcl-2 és Ig nehézlánc gének fúziójának kimutatása polimeráz láncreakciós módszerrel, follicularis lymphomában. Magyar Belgyógyászati Társaság Észak-Kelet-magyarországi tudományos ülése. Miskolc, október 15-17.
3. Semsei I, Zeher M, Takács I, Urbán L, Szegedi Gy. (1999): Frequency and evaluation of t(14;18) translocation in Sjögren's syndrome. 2nd International Congress on Autoimmunity. Tel Aviv, March 7-12.
4. Semsei I, Bessenyei B, Zeher M, Kiss E, Urbán L, Szegedi Gy. (2000): Az La autoantigén mutációinak szerepe egyes autoimmun betegségek patomechanizmusában. MAKIT XXVIII. Kongresszusa. Balatonfüred, május 17-19.
5. Semsei I, Bessenyei B, Zeher M, Kiss E, Urbán L, Szegedi Gy. (2000): Possible role of the mutations of La (SS-B) autoantigen in the patomechanism of certain autoimmune diseases. Annual European Congress of Rheumatology. Nice, June 21-24.
6. Semsei I, Bessenyei B, Zeher M, Kiss E, Urbán L, Szegedi Gy. (2000): Mutations of La (SS-B) autoantigen: correlation with certain autoimmune diseases. XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Sydney, October 15-20.
7. Bessenyei B, Márka M, Urbán L, Bakó Gy, Semsei I. (2001): Az AIRE gén az APECED diagnosztikájában. Magyar Humán-genetikusok Konferenciája. Debrecen, június 8-9.
8. Bessenyei B, Márka M, Urbán L, Zeher M, Szegedi Gy, Semsei I. (2002): Mutations in the hotspot region of exon 7 of La (SS-B) autoantigen: Appearance in certain autoimmune diseases. VIIIth International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kanazawa, május 16-18.
9. Urbán L., Márka M, Bessenyei B, Zemer M, Semsei I. (2003): Molecular biology approach of Sjögren's syndrome. 35th Annual Scientific Meeting of the Hungarian Medical Association of America. Sarasota, október 27-29.
10. Urbán L. (2004): A Sjögren-szindróma és a malignus lymphomák kapcsolata. Országos Gyógyintézeti Központ. Budapest, január 9.
11. Urbán L. (2004): Az autoimmun betegségek hatása az endothel károsodásra és a hypertónia. Edelőny, február 9.

12. Urbán L. (2004): Az autoimmun betegségek és a hipertónia összefüggései. Edelény, február 12.
13. Urbán L. (2004): A BCL-2 onkogén kapcsolata egyes tüdőcarcinómákkal. Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Tüdőgyógyászati Tanszék. Szeged, március 12.
14. Márka M, Bessenyei B, Urbán L, Zeher M, Semsei I. (2004): Genetic polymorphisms: Aging and diseases. 2nd International Conference on Functional Genomics of Ageing. Crete, április 28 – május 1.

X. FÜGGELÉK

1. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Takács I, Urbán L, Radványi G, Sebők P, Bessenyei B, Szegedi Gy, Semsei I. (1998): A bcl-2 és Ig nehézlánc gének fúziójának kimutatása PCR-rel follicularis lymphomában: irradiációs és citosztatikus kezelések nyomon követése. *Magy. Belorv. Arch.* **51**: 133-137.
2. Semsei I, Zeher M, Takács I, Urbán L, Sebők P, Szegedi Gy. (1998): A t(14;18) kromoszóma transzlokáció előfordulása Sjögren-szindrómás betegek lymphocytaiban. *Magy. Belorv. Arch.* **51**: 249-254.
3. Semsei I, Zeher M, Takács I, Urbán L, Szegedi Gy, Bachmann M. (2000): High frequency of t(14;18) translocation in the Sjögren's syndrome. *Arthr. Rheumatol.* **43**: 951-952.
Impakt faktor: 7,38
4. Semsei I, Bessenyei B, Urbán L, Takács I, Zeher M, Szegedi Gy. (2000): A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése. *Magy. Belorv. Arch.* **53**: 131-135
5. Urbán L, Bessenyei B, Zeher M, Takács I, Szegedi Gy, Semsei I. (2000): A differential display az immunológiai betegségek pathomechanizmusának tanulmányozásában. *Allerg. Klin. Immunol.* **3**: 7-11.
6. Takács I, Zeher M, Urbán L, Bachmann M, Szegedi Gy, Semsei, I. (2000): Frequency and evaluation of t(14;18) chromosome translocation in Sjögren's syndrome. *Ann. Hematol.* **79**: 444-448.
Impakt faktor: 1,42
7. Bessenyei B, Urbán L, Takács I, Zeher M, Szegedi Gy, Semsei I. (2000): A t(14;18) transzlokáció jelenlétének kimutatása és diagnosztikus jelentősége a follicularis lymphoma minimális reziduális betegségében. *Orv. Hetil.* **141**: 1715-1719.
8. Takács I, Zeher M, Szabó G, Radványi G, Sebők P, Urbán L, Matolcsy A, Szegedi Gy, Semsei I. (2000): Diagnostic value of the detection of t(14;18) chromosome translocation in malignant hematological and immunopathological diseases using polymerase chain reaction. *Acta Med. Okay.* **54**: 185-192.
Impakt faktor: 0,5
9. Bessenyei B, Kiss E, Zeher M, Urbán L, Szegedi Gy, Semsei I. (2000): Az La autoantigén 7-es exonjában található pontmutációk: Szerepük egyes autoimmun betegségek patomechanizmusában. *Magy. Belorv. Arch.* **53**: 271-276.
10. Urbán L, Bessenyei B, Márka M, Semsei I. (2001): On the role of aging in the etiology of autoimmunity. *Gerontology*, **48**: 179-184.

Impakt faktor: 1,45

11. **Urbán** L, Márka M, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. (2004): A t(14;18) kromoszóma transzlokáció és a bcl-2 gén Sjögren-szindrómában: kapcsolat egyes tüdő-karcinómákkal. *Med. Thorac.* **LVII**: 1-3.
12. Márka M, Bessenyei B, **Urbán** L, Zeher M, Dr. Semsei I. (2004): A genetikai polimorfizmus kapcsolata az öregedéssel és a betegségekkel. *Magy. Beolov. Arch.* **57**: 59-67 (nyomdában).
13. Bessenyei B, Márka M, **Urbán** L. Zeher M, Semsei I. (2004): Single nucleotide polymorphisms: Aging and diseases. *Biogerontology*, közlésre elfogadva.
Impakt faktor: 2,3

Összes impakt faktor: 13,05

X. FÜGGELÉK

4. A KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI