Nem-MHC gének jelentősége az immun-mediált reumatológiai betegségekben

Doktori tézisek

Dr. Pazár Borbála

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Poór Gyula egyetemi tanár

Konzulens: Dr. Gergely Péter egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Attila
Dr. Czegle Ibolya

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Réthelyi Miklós
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella
Dr. Géher Pál

Budapest
2009

Bevezetés

Az immun-mediált reumatológiai betegségek (rheumatoid arthritis (RA), juvenilis idiopathias arthritis (JIA), spondylitis ankylopoetica (SPA)) kialakulásának hátterében számos genetikai tényező jelenléte valószínűsíthető. Az immun-mediált kórképek legismertebb genetikai asszociációi a fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex, MHC) egyes genetikai változatai, a különböző humán leukocyta antigén (HLA) allélek. A közelmúltban végzett új genetikai kutatások azonban arra utalnak, hogy bizonyos non-MHC géneknek is nagy jelentőségük van ezen betegségekre való hajlam meghatározásában. Kutatásainkban az alábbi non-MHC gének szerepét vizsgáltuk az immun-mediált reumatológiai betegségek pathogenezisében.

Toll-like receptor gének

A Toll-like receptorok (TLR) a természetes immunrendszer alapvető felismerő struktúrái. Aktivációjuk gyulladásos citokinek, kemokinek, metalloproteázok, 1. típusú interferonok termelődéséhez vezet. Ezen kívül az antigén prezentáló sejteken fokozzák a kostimulációs molekulák megjelenését, így szabályozzák az adaptív immunrendszer működését is. A Mivel a Toll-like receptoroknak két ponton is alapvető szerepe van a normális immunválasz kialakításában (a mikroba kezdeti felismerése, az immunválasz elindítása, és az adaptív immunválasz erősségének szabályozása kostimulációs molekulákon keresztül) feltételezik, hogy TLR expresszió és a jelátvitel megváltozása egy kóros immunválaszhoz, és immun-mediált betegségek kialakulásához vezethet. Funkcionális vizsgálatok bizonyítják a TLR jelátviteli út szerepét az izületi gyulladás kialakulásában. Még nem tisztázott, hogy a TLR útnak a gyulladás kialakításában, vagy a fenntartásában van jelentősebb szerepe, de az eddigi kísérletek azt bizonyítják, hogy a TLR/IL-1 receptor család alapvető fontosságú az arthritis kialakulásában.

Mannóz kötő lektin

A komplement aktiváció három lehetséges útja a klasszikus, az alternatív és a lektin aktivációs út. A lektin aktivációs út fő szereplője a mannózkötő fehérje (mannose binding lectin, MBL),egy akut fázis fehérje, amely a májban szintetizálódik és a természetes immunválaszban játszik szerepet. Az alacsony MBL szint opszonizációs defektust eredményez, ez visszatérő krónikus fertőzésekhez vezet gyermekkorban. Az MBL szérumszintjét az MBL2 génben található mutációk jelenléte határozza meg. Az MBL2 génben 6 SNP-t írtak le, hármat a promoter régióban hármat pedig az 1. exonban. Az MBL szérum koncentrációjára két promoter polimorfizmus és a három exon polimorfizmus van hatással. A mutációk jelenléte alapján különböztetjük meg az MBL2 haplotípusokat, amelyek meghatározzák az MBL szérumszintjét.

Protein Tyrozin Phosphatase, Nonreceptor 22 (PTPN22)

A PTPN22 egy fehérvérsejtekre jellemző intracelluláris foszfatáz, más néven lymphoid foszfatáz (LYP) A PTPN22 génben található egy SNP az 1858-as pozícióban, egy C-T nukleotid csere, amely érett fehérjében egy triptofán-arginin aminosav cserét eredményez. Elsőként inzulin dependens diabetes mellitusban (IDDM) írták le a variáns T allél asszociációját. 2004-ben Anne Begovich írta le a variáns 1858T allél asszociációját rheumatoid arthrtisben. Eredményeik szerint a variáns T allél az átlag fehér populációban 17%-ban van jelen, míg fehér rheumatoid arthritises betegek között 28%-ban. A variáns, triptofán tartalmú fehérje nem képes gátolni a T-sejt aktivációt. A HLA génekben előforduló polimorfizmusok jelentőségének megismerése óta a PTPN22 C-T SNP-je az első olyan genetikai variáció, mely a HLA génekhez hasonlóan számos autoimmun betegséggel szorosan asszociált, így kulcsfontosságú szerepe lehet az autoimmunitás kialakulásában, és az RA újabb kandidáns génjének tekintik.

ARTS1 (Aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding)

Az ARTS1 egy endoplazmatikus retikulum asszociált aminopeptidáz (másik nevén ERAP1). Két ismert funkciója van: részt vész a fehérjekonformáció kialakításában az MHC I. típusú antigénprezentáció során és proinflammatorikus citokinek sejtfelszíni receptorait hasítja el. Az 1000 SPA betegen és 1500 kontroll egyénen végzett Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) SPA teljes genom asszociációs vizsgálatban az 5. kromoszómán két SNP szignifikáns asszociációt mutatott SPA-val (rs27044 és rs30187), mindkét SNP az ARTS1 génben található. Másik 3, szintén az ARTS1 génben található SNP szintén asszociációt mutatott SPA-val (rs17482078, rs10050860, rs2287987). A WTCCC vizsgálat eredményei szerint az ARTS1 génnek jelentősége lehet az SPA pathogeneziseben.

Interleukin 23 receptor (IL23R)

A másik új SPA-val asszociáló gén az IL23 receptor génje (IL23R). Az IL23 receptorát kódolja az IL12 receptor β1 alegységével együtt. Az IL23 az IL12 citokin-család tagja, egy proinflammatorikus citokin. Az IL23 a natív CD4+ T sejtek Th17 sejtekké történő átalakulásában játszik központi szerepet. Egy teljes genom asszociációs vizsgálatban az IL23 receptor polimorfizmusait először gyulladásos bélbetegségekben mutattak ki (inflammatory bowel disease (IBD). Később egy másik független vizsgálatban psoriasisban is kimutatták. A WTCCC SPA teljes genom asszociációs vizsgálatban az IL23 génben 8 SNP asszociált szignifikánsan a betegséggel.

Célkitűzések

A TLR 4 gén két SNP-je, az Asp299Gly és a Thr399Ile több autoimmun betegséggel asszociált. Vizsgálatunkban meghatároztuk a magyar populációban SPA-s és ReA-s betegek körében a TLR 4 ezen két polimorfizmusának előfordulását.

A Toll-like receptor 2 II. intronjában leírtak egy GT ismétlődés szakaszt, amely változatos hosszúsági polimorfizmust mutat. A GT ismétlődések hossza irodalmi adatok szerint asszociált gyulladásos és immun-mediált betegségekkel. Vizsgálatunkban meghatároztuk magyar RA-s, SPA-s és JIA-s betegekben a TLR2 II. intronjában található GT dinukleotid ismétlődések hosszát. A genetikai polimorfizmus funkcionális jelentőségének vizsgálatához a betegekben TLR2 génexpressziót mértünk

Az MBL szérumszintjét az MBL2 génben található mutációk jelenléte határozza meg. Vizsgálatunkban meghatároztuk a MBL2 gén haplotípusait és a MASP2 deficienciát okozó pontmutáció előfordulásának gyakoriságát a magyar JIA betegekben.

Az autoimmun betegségek két genetikai lókusszal mutatnak szoros asszociációt. A 6-os kromoszómán található MHC gének egyes polimorfizmusaival és újabb adatok szerint az 1-és kromoszómán található PTPN22 gén mutációival. Vizsgálatunkban meghatároztuk magyar JIA betegekben a HLA-DRB1 allélok, és a PTPN22 C+1858T SNP előfordulását.

A HLA B27 asszociáció SPA esetében régóta ismert, az SNSA csoport többi betegségében az antigén jelenléte nem ilyen egyértelmű. Vizsgálatunkban Magyarországon elsőként meghatároztuk a HLA B27 pozitivitás előfordulását arthritis psoriaticás betegek körében.
A HLA B27 antigénnek jelenleg 25 szubtípusa ismert, melyek közül a 2702 és a 2705 irodalmi adatok alapján asszociált SPA kialakulásával. Vizsgálatunkban HLA B27 pozitív magyar SPA-s, AP-s és egészséges kontroll egyénekben meghatároztuk a B27 szubtípusok előfordulását, és kapcsolatot kerestünk a genetikai variációk és a klinikai tünetek jelenléte között.

A genom-wide asszociációs vizsgálatoknak köszönhetően számos új, non-MHC gént fedeztek fel a közelmúltban, melyek valószínűleg szerepet játszanak az SPA pathogenezisében. A két legismertebb új gén az IL23R (interleukin 23 receptor) és az ARTS1 (aminopeptidase of TNFR1 shedding) gének. Az IL23R génben kilenc SNP jelenlétét vizsgáltuk: rs11805303, rs10889677, rs1004819, rs2201841, rs11209032, 11209026, rs104889629, rs7517847 és rs7530511. Az ARTS1 génben öt SNP előfordulását határoztuk meg a magyar populációban: rs27044, rs17482078, rs10050860, rs30187 és rs2287987. Az ARTS1 mutációk meghatározása mellett vizsgáltuk az előforduló ARTS1 haplotípusokat, valamint a HLA-B27 pozitivitás és az ARTS1 variánsok jelenlétének esetleges kapcsolatát.

Módszerek

A vizsgálatokban részt vevő betegek az Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet és a Debreceni Egyetem Reumatológiai Tanszékének betegei közül kerültek ki. A genetikai vizsgálatokhoz perifériás vérből nyertünk DNS-t. A Genotípusok meghatározását többféle módszerrel végeztük: restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus, allél-diszkrimináció szekvencia specifikus PCR reakció, automata szekvenálás. A funkcionális paraméterek meghatározásához valós idejű PCR reakciót és ELISA módszert alkalmaztunk.

Eredmények

A TLR4 Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusokra vonatkozóan az allél és genotípus frekvenciák tekintetében nem volt szignifikáns különbség a kontroll csoport, és az SPA-s, vagy a ReA-s betegek között. Az SPA-s betegek között a nem, az életkor a betegség kialakulásakor, perifériás arthritis vagy extraskeletális tünet megjelenése mind független volt a két SNP jelenlététől. Hasonlóan, a ReA-s csoportban sem találtunk összefüggést az SNP-k jelenléte és a nem, az életkor a betegség kialakulásakor, a betegség időtartama, az arthritis típusa (mono-, oligo- vagy polyarthritis), HLA-B27 pozitivitás, vagy megelőző infekció között.

A TLR2 II. intron GT mikroszatellita polimorfizmusai közül a magyar populációban leggyakrabban a 16 ismétlődést tartalmazó allél fordul elő. A gyulladásos reumatológiai betegségekben a hosszabb GT ismétlődést tartalmazó allélok gyakoribbak. A GT ismétlődést tartalmazó szakaszok hosszának megoszlása szignifikánsan RA és SPA esetében különbözik a kontroll populációtól. JIA esetében is gyakrabban fordulnak elő a hosszabb allélok, de a különbség nem szignifikáns. Mind RA-ban, mind SPA-ban a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett a TLR2 mRNS expressziója.

Az MBL2 gén polimorfizmusai közül az exon 1 polimorfizmusok közül a codon 52 és a codon 57 polimorfizmusok szignifikánsan asszociáltak JIA-val. A codon 54 polimorfizmus és a promoter polimorfizmusok esetében az allél és genotípus frekvenciák nem különböztek szignifikánsan a beteg és a kontroll csoportban. JIA betegekben az MBL2 haplotípusok megoszlása szignifikánsan különbözött a kontroll csoport megoszlásától. A betegek között nagyobb számban fordult elő a LYB, LYC és a ritka LYD haplotípus. A JIA betegek között szignifikánsan többen hordoztak alacsony MBL szérumszintet meghatározó MBL2 genotípust. A több alacsony MBL2 genotípust hordozó JIA betegek szérum MBL szintje is szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollokénál. Az MBL szérumszint mind a kontroll, mind a beteg csoportban korrelált a genotípussal. Az egyes JIA alcsoportokban mért átlagos MBL szérumszintek között nem volt szignifikáns különbség. A MASP2 SNP jelenléte független volt az MBL2 gén

mutációk jelenlététől, és az SNP előfordulásában nem volt különbség a beteg és a kontroll csoport között

Magyar JIA betegek körében a HLA DRB1*01, DRB1*08, DRB1*13 allélok szignifikánsan gyakrabban fordultak elő, mint a kontroll csoportban, a HLA DRB1* 03 allél viszont a kontroll csoportban volt gyakoribb. Az ILAR kritériumok szerinti szubcsoportok közül a legerősebb asszociációt a perzisztens oligoartikuláris szubcsoportban figyeltük meg a HLA-DRB1*13 alléllel. A DRB1*08 allél, mely az egész JIA betegcsoportot tekintve is szoros asszociációt mutatott a betegséggel, a perzisztens oligoartikuláris és az RF-negatív poliartikuláris alcsoportokban volt gyakoribb. A DRB1*16 allél az extendált oligoartikuláris csoportra volt jellemző. A DRB1*01 allél pedig az RF pozitív poliartikuláris és az enthesitissel járó alcsoportokkal asszociált szignifikánsan. A juvenilis arthritis psoriatica alcsoportban emelkedett DRB1*15 allél frekvenciát figyeltünk meg. Egyedül a perzisztens oligoartikuláris alcsoportban találtunk genotípus szinten is szignifikáns asszociációt a betegség kialakulásával. A DRB1*08-DRB1*13 genotípust hordozók között nagyobb valószínűséggel alakul ki a JIA ezen altípusa.

Nem találtunk összefüggést a PTPN22 SNP jelenléte és JIA kialakulása között az általunk vizsgált mintában. Az SNP-re vonatkozó allél és genotípus frekvenciák megegyeztek a beteg és a kontroll csoportban. Az ILAR szubcsoportok szerinti csoportosításban sem volt szignifikáns különbség az egyes alcsoportok és a kontroll csoport között az allél és genotípus frekvenciák tekintetében. JIA betegekben elsőként vizsgáltuk a PTPN22 C1858T SNP és a HLA-DRB1 allélok előfordulásának kapcsolatát, eredményeink szerint magyar betegekben a két génben előforduló polimorfizmusok függetlenek egymástól.

A HLA-B27 szuptípusok tekintetében az általunk vizsgált populációban a két leggyakoribb szubtípus a B*2705 és a B*2702 volt. Ez megegyezik a világon előforduló leggyakoribb szubtípusokkal. Vizsgáltuk, hogy van-e szignifikáns különbség a betegekben előforduló két szubtípus és a kontroll személyek ugyanezen két

szubtípusának eloszlása között a beteg és kontrollcsoportok összlétszámához viszonyítva. A B*2702 esetében nem volt kimutatható szignifikáns különbség. A B*2705 szubtípus esetében azonban szignifikánsan eltér a megoszlás a betegek és a kontroll személyek között. Ez tehát azt jelenti, hogy a B*2705 szubtípus jelenléte szignifikánsan összefüggésbe hozható az SPA kialakulásával, és prediszponáló tényezőként fogható fel az általunk vizsgált magyar lakosságban. Klinikai paraméterekkel egyetlen B27 szubtípus sem mutatott összefüggést.

Az ARTS1 rs27044 SNP minor G allélja szignifikánsan gyakrabban fordult elő az SPA-sok között, mint a kontroll csoportban. Az rs17482078, az rs10050860 és az rs2287987 SNP-k esetében a minor allélok (sorrendben: T, T, C) a kontroll csoportban voltak gyakoribbak. Az rs30187 SNP esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az allélgyakoriságok tekintetében a beteg és a kontroll csoport között. A genotípusok megoszlása szignifikánsan különbözött a beteg és a kontroll csoportban a következő négy SNP esetében: rs27044, rs17482078, az rs10050860 és az rs2287987. Az rs17482078, az rs10050860 és az rs2287987 SNP-k esetében a következő genotípusok sorrendben: TT, TT, CC száma háromszor több volt a kontroll csoportban, mint a betegek között. Az rs30187 SNP esetében nem volt különbség a kontroll és a beteg csoport között a genotípusok megoszlása tekintetében sem. Haplotípus analízis során három haplotípust azonosítottunk, melyek SPA-val asszociáltak a magyar populációban. A GCCTT és a GCCCT haplotípusok SPA-ra hajlamosítanak, a CCCTC haplotípus pedig valószínűleg protektív hatású.

Az IL23R rs11805303 SNP mutáns T alléljának jelenléte szignifikánsan gyakoribb SPA-s betegekben, mint kontroll egyénekben. A mutáns allél hordozása 1.6-szorosára növeli az SPA kialakulásának valószínűségét. Az rs1004819 SNP esetében az A allél hordozása több mint 2-szeresére növeli az SPA előfordulásának esélyét. Az rs10889677 SNP tekintetében az AA genotípus jelenléte, az rs2201841 SNP tekintetében pedig a CC genotípus jelenléte növeli több mint 2-szeresére az SPA előfordulásának valószínűségét. A haplotípus analízis során az ATCACAG és az ATCACAA bizonyultak az SPA kialakulásának esélyét fokozó haplotípusoknak a magyar populációban. A GGCATCG

és az AGCACAA haplotípusok pedig protektív hatásúak a betegség kialakulásával szemben, ezek a haplotípusok a kontroll csoportban voltak szignifikánsan gyakoribbak.

Következtetések

1. Elsőként vizsgáltuk a TLR4 Asp299Gly és Thr399Ile SNP-k előfordulását ReA betegeken. A TLR4 polimorfizmusok nem asszociáltak SPA-val és ReA-val a magyar populációban. A Toll-like receptor 4 Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmusai eredményeink szerint nem befolyásolják a betegség kialakulását. A TLR4 útvonal SNSA betegekben leírt funkcionális abnormalitásai valószínűleg nem genetikailag determináltak.

2. RA-ban és SPA-ban a magyar populációban a TLR 2 II. intronjában található GT dinukleotid ismétlődés szakasz szignifikánsan hosszabb az egészséges kontrollokhoz képest. A hosszabb GT szakaszok mindkét betegségben gyakrabban vannak jelen, ez a genetikai változat nem specifikus a betegségre, valószínűleg a krónikus gyulladás fenntartásában játszik szerepet

3. Magyar JIA betegek körében gyakoribb a genetikailag determinált MBL deficiencia. A MASP2 polimorfizmusa és JIA között nem találtunk összefüggést a magyar populációban.

4. Megerősítettük az irodalomból ismert HLA asszociációkat a magyar populációban: Magyarországon a HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*13 allélok asszociáltak JIA-val. A HLA-DRB1*14 allél védőnek bizonyult az RF és ANA pozitivitással szemben, így feltételezzük a DRB1*14 protektív szerepét az autoantitest képződés folyamatában. A PTPN22 C+1858T SNP nem fordult elő gyakrabban az általunk vizsgált JIA csoportban mint a kontroll egyének között. Eredményeinket összevetve japán és finn populáción végzett tanulmányokkal kimondhatjuk, hogy a PTPN22 asszociáció autoimmun betegségekben különböző etnikai csoportokban eltérő. A világon elsőként

vizsgáltuk a két genetikai polimorfizmus együttes előfordulását JIA betegekben, az általunk vizsgált mintában nem volt kapcsolat a két polimorfizmus jelenléte között.

5. Magyarországon elsőként határoztuk meg a HLA-B27 szubtípus gyakoriságot kontroll egyének és SPA betegek esetén. Az általunk vizsgált magyar populáció szubtípus eloszlása megegyezett a kaukázusi rassz eloszlásával. Eredményeink szerint a magyar lakosságban a két leggyakoribb szubtípus megegyezik a világon előforduló leggyakoribb szubtípusokkal (B*2702 ill. B*2705). Magyar HLA-B27 pozitív beteg feltételezett SPA diagnózisa esetén a HLA–B*2705 szubtípus jelenléte tovább erősíti az SPA diagnózisát, illetve ha nem a két előforduló szubtípus (B*2702 vagy B*2705) egyikével rendelkezik a beteg, akkor ezzel kizárható az SPA lehetősége.

6. Elsőként határoztuk meg a magyar populációban az ARTS1 gén 5 SNP (rs27044, rs17482078, rs10050860, rs30187 és rs2287987) előfordulásának gyakoriságát spondylitis ankylopoeticas betegek és egészséges kontroll egyének körében. Megerősítettük a korábban angol és amerikai populáción végzett vizsgálatok eredményeit. A magyar populációban az ARTS1 génben található 5 SNP előfordulása nem különbözik szignifikánsan az angol és az amerikai populációban mért gyakoriságoktól.

7. Elsőként határoztuk meg a magyar populációban az IL23R gén 9 SNP (rs10889677, rs1004819, rs2201841, rs11209032, rs7530511, rs11209026, rs10489629, rs7517847 és rs11805303) előfordulásának gyakoriságát spondylitis ankylopoeticas betegek és egészséges kontroll egyének körében. Megerősítettük a korábban angol és amerikai populáción végzett vizsgálatok eredményeit. Az IL23R polimorfizmusai valószínűleg populációtól függetlenül járulnak hozzá az SPA kialakulásához.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezést megalapozó saját közleménynek

1. **Pazár B**, Gergely P Jr, Nagy ZB, Gombos T, Pozsonyi E, Rajczy K, Balogh Z, Sevcic K, Orbán I, Szodoray P, Poór G. Role of HLA-DRB1 and PTPN22 genes in susceptibility to juvenile idiopathic arthritis in Hungarian patients. Clin Exp Rheumatol. 2008;26:1146-52 **IF: 2.364**
2. Sáfrány E, **Pazár B**, Csöngei V, Járomi L, Polgár N, Sipeky Cs, Horváth IF, Zeher M, Poór G and Melegh B. Variants if the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples. Scand J Immunol. 2009;70:68-74. **IF: 2.186**
3. Gergely P Jr, **Pazár B**, Nagy ZB, Gombos T, Rajczy K, Balogh Z, Orbán I, Sevcic K, Poór G. Structural polymorphisms in the mannose-binding lectin gene are associated with juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol. 2009;36:843-7 **IF: 3.282**
4. Gergely P Jr, Blazsek A, Weiszhár Z, **Pazár B**, Poór G. Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population. Rheumatology (Oxford) 2006;45:1194-6 **IF: 4.052**
5. **Pazár B,** Nagy Zs, Gergely Jr. P, Poór Gy. Toll-like receptorok szerepe a gyulladásos reumatológiai betegségek patogenezisében. Magyar Reumatológia 2007; 48: 219-230

Egyéb saját közlemények

1. **Pazár B**. Spondylodiscitis. Magyar Reumatológia 2006; 47: 235-245
2. **Pazár B**. Mozgásszervi szûrõvizsgálatok jelentõsége, módszerei. Magyar Reumatológia 2004;45:29-53
3. Horváth Zs, Márialigeti Zs, Király M, **Pazár B**. A vallás és a reumás betegségek kapcsolata. Magyar Reumatológia 2003;44: 231-240.