

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék
és
Általános Orvostudományi Kar
Neurológiai Klinika

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Kemokinek szerepe sclerosis multiplexben: A CCR5 Δ 32 vizsgálata

Molnár Kinga
Biológia BSc III. évfolyam



Témavezetők: Dr. habil. Bencsik Krisztina M.D., Ph.D.

Török Nóra, MSc

Belső konzulens: Dr. Fekete Éva Ph.D, DSc

2014

TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	- 3 -
1.1.	Történeti áttekintés	- 3 -
1.2.	Kórformák	- 4 -
	I. Relapszáló-remittáló SM (RRSM)	- 4 -
	II. Primer progresszív SM (PPSM)	- 4 -
	III. Szekunder progresszív SM (SPSM)	- 5 -
	IV. Relapszáló-progresszív SM (RPSM)	- 5 -
	V. Klinikailag izolált szindróma (CIS)	- 5 -
1.3.	Tünetek – az ezerarcú kór	- 6 -
1.4.	Plakkok	- 8 -
1.5.	Az SM, mint autoimmun betegség	- 8 -
1.6.	Kemokinek szerepe az SM-ben	- 12 -
II.	CÉLKITŰZÉS	- 15 -
III.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	- 15 -
3.1.	Biobank	- 15 -
3.2.	DNS preparálás	- 15 -
3.3.	Allél diszkriminációs vizsgálat	- 16 -
3.4.	Statisztikai elemzés	- 18 -
IV.	EREDMÉNYEK	- 18 -
4.1.	Genotípus és allél gyakoriság megoszlások, a delécio befolyása az EDDS pontszámra és betegségkezdetre	- 18 -
4.2.	Környezeti tényezők befolyása a betegségre	- 21 -
V.	MEGBESZÉLÉS	- 21 -
5.1.	Eredmények megvitatása	- 21 -
5.2.	Összegzés	- 22 -
VI.	KÖVETKEZTETÉSEK	- 23 -
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	- 24 -
VIII.	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	- 25 -
IX.	TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	- 26 -
X.	IRODALOMJEGYZÉK	- 27 -

I. BEVEZETÉS

1.1. Történeti áttekintés

A sclerosis multiplex (SM) fiatal felnőttkorban kezdődő, a központi idegrendszer (KIR) demielinizációjával és axonális károsodásával járó autoimmun gyulladásos megbetegedés. A legkorábbi feljegyzések Augustus Frederic d'Esté, III. György angol király hatodik fiától származnak, aki részletesen írt naplójában a haláláig tartó, ámde ismeretlen betegségéről. A tünetei 28 éves korában jelentek meg, kezdetben átmeneti látásromlást panaszolt, majd heteken keresztül tartó gyengeségről számolt be, lábai zsibbadtak, kezei ügyetlenné váltak. Évekkel később vizelési zavarok kínozták, lábai megbénultak, majd 1844-ben tolószékbe kényszerült, élete utolsó éveit már ágyhoz kötve töltötte. Augustus halálát követően 20 évvel Dr. Jean Martin Charcot francia neurológus és anatómiai patológus professzor megalkotta a sclerosis multiplex elnevezést és arról szerzett ismereteit dokumentálta [1-3].

Az SM etiológiája és oki terápiája napjainkban még nem tisztázott. A kutatások eredményeként azonban az ismert, hogy számos komplex jelleg, köztük környezeti és genetikai komponensek is hozzájárulnak a betegség kialakulásához. Földrajzi eloszlása jellegzetes mintázatot mutat, a sarkvidékek felé gyakorisága nő. Prevalenciája Ázsiában 5/100.000, Európában a 45. szélességi foknál 60-100/100.000, a skandináv országokban 120-180/100.000, míg a Szegeden folyó legfrissebb kutatások szerint a Csongrád megyei lakosság körében ez 83/100.000 mutatóval bír [4]. Vizsgálatok szerint a kaukázusi rasszhoz tartozó emberek betegednek meg leggyakrabban SM-ben, ugyanakkor sokkal ritkábban alakul ki a fehérekkel azonos területen élő feketék, maorik és romák között. Becslések szerint a világon mintegy 2,5 millió SM beteget regisztráltak, és ma már azt is tényként kezelik, hogy a nőknél kétszer olyan gyakran fordul elő, mint a férfiaknál. Az esetek többségében 10-15 év kórlefolyást követően visszafordíthatatlan mozgáskorlátozottsághoz vezet.

1.2. Kórformák

Az SM lefolyása egyénenként változó, nincs két egyforma tünetekkel rendelkező beteg. Ennek ellenére a lefolyása, a tünetek gyakorisága és mintázata alapján 5 kórformát különíthetünk el. A betegek 85%-a intermittáló kórformában szenved (relapszáló-remittáló, szekunder progresszív vagy relapszáló progresszív) míg a 15%-ukra a primer progresszív forma jellemző.

I. Relapszáló-remittáló SM (RRSM)

A leggyakrabban jelentkező kórforma, az újonnan diagnosztizált páciensek 65-80%-a ebbe a csoportba tartozik. Az első tünetek 20-40 éves kor között jelentkeznek, a betegek 0,5%-ánál gyermekkorban, további 0,5%-uknál pedig 50 év felett. Az első évek során többségüknél akut vagy szubakut kezdetű, kiszámíthatatlan rosszabbodások, más néven relapszusok jelentkeznek, melyek 24 óránál tovább tartanak. Ezt követően napok, legfeljebb 1-2 hét után a tünetek spontán javulnak, megszűnhetnek, hónapokig, akár évekig is fennálló remissziós állapot következhet. Két relapszus között eltelt idő betegenként változik, de ezen időszak alatt a tünetek nem fokozódnak.

A relapszusok alatt egy vagy több egyidejűleg jelentkező, jellegzetes tünet észlelhető, amik lehetnek szenzoros tünetek, optikus neuritis, piramis léziós tünetek, amik végtagi gyengeségben, sphincter rendellenességben manifesztálódhatnak, valamint agytörzsi tünetek, mint például diplopia (kettős látás), továbbá cerebelláris tünetek. Megerőltető fizikai tevékenység során, illetve bármilyen testhőmérséklet emelkedéssel járó tényező (láz, szauna) hatására látási zavarok léphetnek fel. Ezt nevezzük Uhthoff-fenomennek [5].

II. Primer progresszív SM (PPSM)

A betegek 15%-ánál a betegség kezdetétől progrediáló neurológiai zavarok, tipikusan spasztikus paraparesis alakul ki, mely egyre inkább fokozódik. A folyamatos rosszabbodás egy idő után szünetelhet, más esetben hónapokig vagy akár évekig is tartós maradhat, de javulás nem figyelhető meg. Ebben a kórformában a progressziót lassító terápia nem áll rendelkezésre. Az első tünetek 40 éves kor felett jelentkeznek és a nőket ugyanolyan arányban érinti, mint a férfiakat.

III. Szekunder progresszív SM (SPSM)

A relapszáló-remittáló kórformájú betegeknél az évek során egyre inkább felhalmozódnak a maradványtünetek és visszafordíthatatlan rokkantság alakul ki. Hozzávetőlegesen minden második vagy harmadik RRSM betegre hasonló sors vár, amikor a relapszusok gyakorisága csökken, progresszív neurológiai rendellenességek kerülnek előtérbe, melyek állandósulnak.

IV. Relapszáló-progresszív SM (RPSM)

A legritkább forma, a betegek alig 5%-a tartozik ide. A diagnózis felállítását követően progresszív lefolyás figyelhető meg, de előfordulhatnak akut relapszusok is, melyek után a kezdeti állapot nem áll helyre.

V. Klinikailag izolált szindróma (CIS)

A CIS az SM első klinikai manifesztációja, az első tünet megjelenése. Ha a klinikai tünet térben és időben disszeminál, akkor McDonald szerinti klinikailag definitív SM igazolódik [6].

1.3. Tünetek – az ezerarcú kór

Attól függően, hogy a gyulladásos góc az idegrendszer mely területét érinti, a tünetek nagyon különbözőek lehetnek, így teljes bizonyossággal nem állítható, hogy valamely klinikai, laboratóriumi, MRI eltérés kizárólag az SM-re lenne jellemző. Mindazonáltal a korai felismerés és immunmoduláns kezelés módosíthatja, sőt javíthatja is az SM kórlefolását.

A klinikai tünetekért a KIR-ben kialakult plakkok tehetők felelőssé, ahol gyulladásos jelenségek, demielinizáció és axonkárosodás mutatható ki, melyek az axonok ingerületvezetési zavarához vezetnek.

A fokális neurológiai tünetek megjelenése előtt a betegek gyakorta panaszkodnak kóros fáradékonyságról (fatigue) mely az esetek 20%-ban az SM első tünete. Jó progresszióra vall, ha a beteg nő és az első tünete 20-40 év között jelentkező optikus neuritis vagy érzészavar. Ezzel ellentétben rosszabb kórlefolást jelent, ha férfiaknál 16 éves kor előtt megjelennek a korai fázisban rögzült cerebelláris és piramis léziós tünetek. A kezdeti leggyakoribb tünetek az érzészavarok, nystagmus (kóros szemmozgás), élénk sajátreflexek, paraesthesia (kóros érzékelés), járászavar, neuritis reticulobulbaris (látóideggyulladás), lábgyengeség, spasztcitás (merevség), vertigo (szédülés) és vizeletürítési zavar.

A későbbi kórlefolás során a korai időszakban tapasztalt zsibbadást, hangyamászás-érzést felváltja az érzéscsökkenés vagy a dysesthesia. Utóbbira jellemző, hogy az inger által várhatóan okozott érzés más, gyakran kellemetlen jellegűvé, tartósan fájdalmassá válik. Ez számos esetben fokozódhat éjszaka, hőmérséklet változáskor, fizikai igénybevétel során, továbbá a betegek gyakran számolnak be arról, hogy az időjárás változást is nehezebben viselik. Rohamszerűen fellépő, neuralgiform, olykor elviselhetetlenségig fokozódó fájdalmat okoz a trigeminus neuralgia (arcidegzsába), mely az V. agyideg (nervus trigeminus) három ágának valamelyikén jelentkezik. Az abnormális fizikai terhelés vagy éppen az inaktivitás krónikus hátfájáshoz, lumbágóhoz vezethet, illetve kifejlődhet discus hernia (porckorongsér) vagy osteoporosis (csontritkulás).

A motoros tünetek közül kiemelendő a spasztcitás. A végtagok antigravitációs izmaiban fokozott tónus van jelen, mely akár a törzs izmaira is kiterjedhet, fájdalmas izomgörcsöket okozva. Az izomgyengeség szinte minden betegnél előfordul, korán jelentkezhet a járásbizonytalanság, ami állás- és járásképtelenségig fokozódhat. Tipikus tünetegyüttes az ún. Charcot-triász, elemei a nystagmus, a skandáló beszéd és az intenciós tremor. Utóbbinál az akaratlagos mozgások alkalmával egy fokozott amplitúdójú remegés alakul ki, ezáltal a mozdulatok pontatlanná válnak.

Agytörzsi sérülésre utal a myokymia, a mimikai izmok hullámszerű, rendszertelen megfeszülése. A bulbáris tünetek és a hallásvesztés ritka, nyelészavar a betegség késői fázisában nyilvánul meg. Sok esetben rendszeressé válnak olyan tünetek, mint a távolság becslés zavara, a dysmetria, ezen felül a vertigo, az émelygés, hányás, izzadás és vérnyomásesés.

Az ataxia (cerebelláris vagy spinális károsodásból fakadó mozgászavar), paraesthesia (fonákérzés), pruritus (viszketés), tónusos izomgörcsök rövid ideig tartó, hirtelen fellépő rohamszerű tünetek. A betegeknél sokszor előfordulnak az autonóm, vizeletürítési, vizelettartási, esetlegesen vizeletindítási, székelési és szexuális működészavarok.

A hétköznapiakra leginkább kiható tünetek a fatigue, a stressz, a depresszió, szorongás és a szuicid veszélyeztetettség. Kognitív tünetek bármely stádiumban előfordulhatnak, sérül a térbeli tájékozódás, a verbális kifejezőképesség és a gondolat átviteli sebesség. A prefrontális régióban elhelyezkedő krónikus plakkk móriát (indokolatlanul derűs magatartást) eredményezhet.

A klinikai vizsgálatok során a betegek funkcionális állapotának kvantitatív jellemzésére és dokumentálására az ún. Kurtzke-féle EDSS skálát (Expanded Disability Status Scale) használják. Ez egy olyan eszköz, amely segítségével a neurológus az SM-re leginkább jellemző 8 funkciót (motoros rendszer, kisagyi-, agytörzsi működés, hólyag- és sphincter működés, szenzoros, pszichés rendszer, spaszticitás) a tünetek súlyossága alapján 0-tól 10-ig terjedő skálán összegez [7].

1.4. Plakkok

A betegség nevét a KIR-ben elhelyezkedő glia hegekről kapta [1]. Elsődleges elváltozás a demielinizáció, amihez másodlagosan az asztrociták proliferációja társul, és ezek következményeként jön létre maga a sclerosis. A demielinizált területeken kialakuló plakkok jellegzetessége a vér-agy gát (VAG) zavar, a perivascularis mononukleáris sejtes infiltráció és a primer demielinizáció.

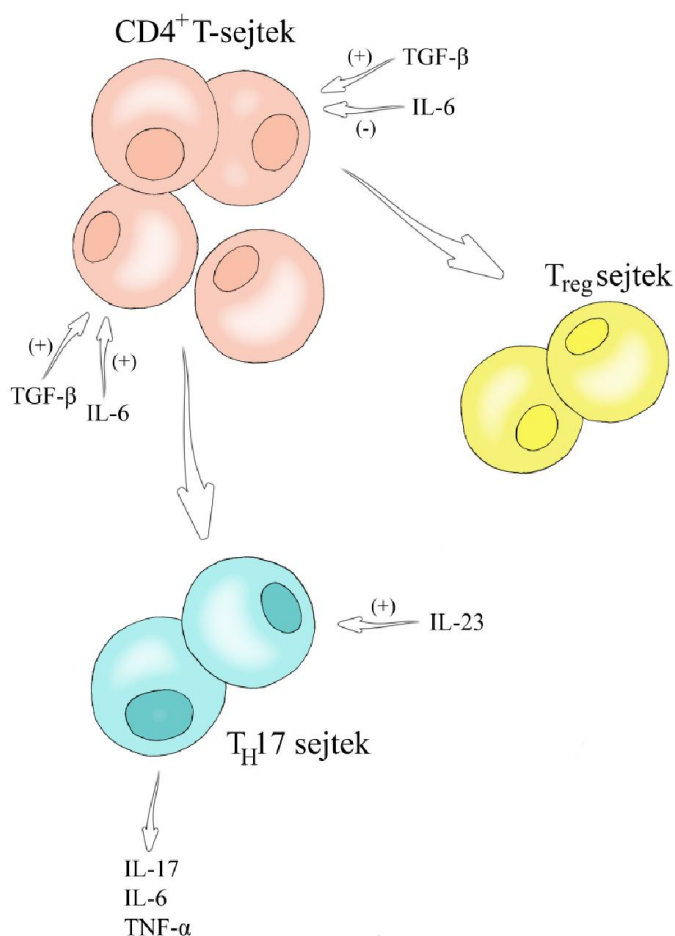
Aktivitásuk alapján 3 féle plakk típust különíthetünk el. A krónikus plakkok szürkés árnyalatúak, keményebb tapintásúak az akut plakkokhoz képest, amik jellegzetesen rózsaszínesek. Az aktív remielinizációs plakkokat más néven árnyéklakkoknak nevezzük [8]. Általában a plakkokra körkörös forma jellemző, míg mások ujszerű nyúlványokkal vagyis Dawson ujjakkal rendelkeznek. Hegek a KIR-ben bárhol kialakulhatnak, azonban leggyakrabban a kamrák körüli fehérállomány, illetve a tractus és nervus opticus területén lokalizálódnak.

1.5. Az SM, mint autoimmun betegség

Jelenleg az SM közvetlen kiváltó oka ismeretlen, ugyanis komplex klinikai, immunológiai, immunogenetikai és neuropatológiai heterogenitást mutat [9]. Vizsgálatok során kapcsolatba hozták a betegséget endogén retrovírusokkal [10], Chlamydia pneumoniae baktériummal [11], a humán herpeszvírus 6-al (HHV-6) [12] és az Epstein-Barr vírussal (EBV) [13, 14], melyek megléte hajlamosíthat az SM kialakulására. Az elégtelen mennyiségű D-vitamin és a dohányzás bizonyítottan magasabb kockázatot jelentenek a betegségre nézve [15]. Genetikai vizsgálatok alátámasztották, hogy a 6-os kromoszóma p21-es lókuszan kódolt humán leukocita antigén (HLA) bizonyítottan szerepet játszik az SM-ben. A DR2 és DR4 HLA haplotípusok szintén magasabb kockázattal járnak [16].

Az immunrendszert két típusra oszthatjuk, veleszületett és szerzett vagy adaptív immunrendszerre. Az adaptív immunválasz során célzott válasz alakul ki, mivel az antigén prezentáló sejtek (APC) által bemutatott antigének hatására specifikus T-limfociták képződnek klonális szelekcióval. Az APC-k csoportját alkotják a dendritikus sejtek, a makrofágok és a B-sejtek, a KIR-ben pedig a mikroglia [17]. A specifikus antigén peptid formájában kötődik az APC-k felszínén lévő fő hisztokompatibilitási komplex molekulájához (MHC II), mely lehetővé teszi a kapcsolatot a CD4⁺ T-limfocita T-sejt receptorával. A naiv T-sejt aktivációhoz és a kostimuláló molekulákkal történő kapcsolathoz szükség van helper T-

sejtekre (T_H). A T_H sejtek T_H1 , T_H2 és T_H17 alosztályokra bonthatók. A T_H1 $CD4^+$ T-sejtek proinflammatorikus (interferon gamma – $IFN-\gamma$, interleukin-2 – $IL-2$), míg a T_H2 $CD4^+$ T-sejtek antiinflammatorikus citokineket termelnek ($IL-4$, $IL-10$). A transzformáló növekedési faktor β ($TGF\beta$) stimulálja a $CD4^+$ T-sejtet, hogy regulátoros T-sejtté (T_{reg}) alakuljon, míg az $IL-6$ gátolja ezt a folyamatot. Ha a $TGF\beta$ és az $IL-6$ együttesen jelen van, akkor a $CD4^+$ sejt T_H17 sejtté alakul, melyet az $IL-23$ fokoz. A T_H17 sejt $IL-17$ -et, tumor nekrozis faktor α -t ($TNF-\alpha$) és $IL-6$ -ot termel, utóbbi pozitív feedback-el serkenti a T_H17 sejtté való transzformációt [18] (**1. ábra**).



1. ábra: Citokinek hatása a $CD4^+$ T-sejtek differenciációjára

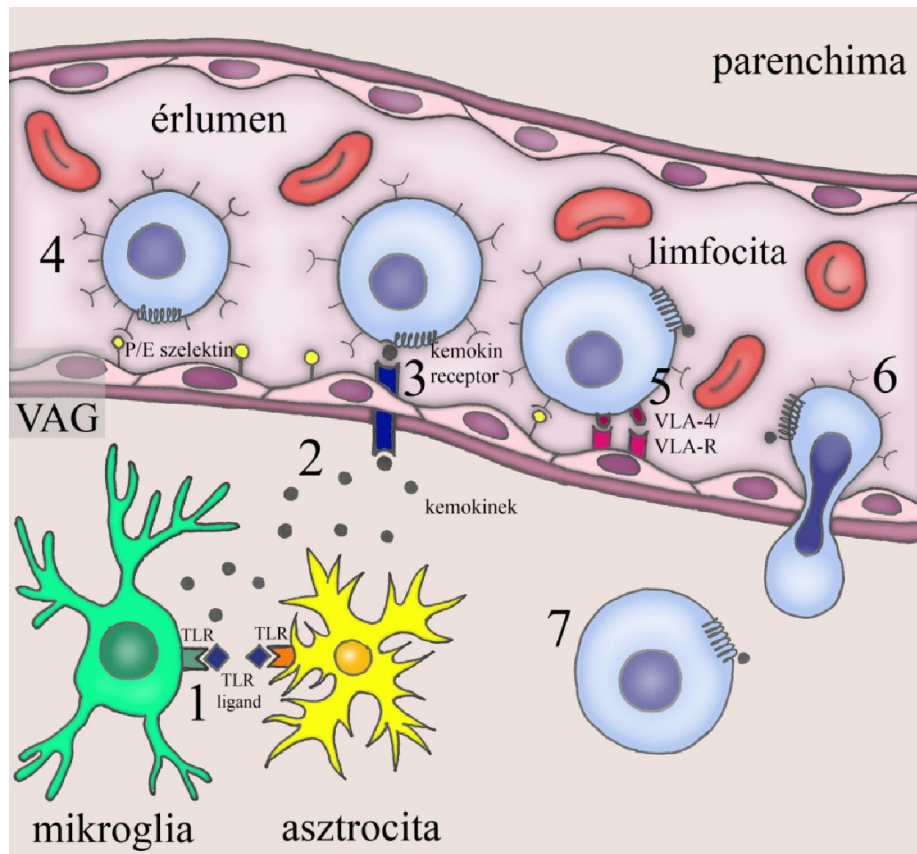
IL: interleukin, TGF: transzformáló növekedési faktor, T_H : segítő T-sejt, TNF : tumor nekrozis faktor, T_{reg} : regulátoros T-sejt

Ezzel ellentétben a veleszületett immunválasz során patogén asszociált molekuláris mintázat (pathogen associated molecular pattern, PAMP) hatására aktiválódnak a specifikus receptorok, főként a Toll-like receptorok (TLR) [19]. A ligand-receptor kapcsolat hatására citokinek termelődnek, például $IL-23$, mely stimulálja az adaptív immunválaszt. Bakteriális

proteinekkal, ún. szuperantigénekkal is lehetséges a TLR aktiváció, valamint T- és B-sejt aktivációt szintén előidéznek.

Az SM immunopatogenezisében a KIR területén kialakuló perivascularis mononukleáris sejt infiltrációk, az abnormálisan magas számú immunglobulin és az oligoklonális sávok gyakori jelenléte a cerebrospinális folyadékban egytől-egyig bizonyítja, hogy autoimmun betegségről van szó. Az aktív léziók szélein csoportosuló immunglobulinok, komplementek és immunglobulin-kötő fagociták további bizonyítékokul szolgálnak erre. Az IL-17 nagy számban van jelen az SM léziókban, a perifériás vérben és a liquorban, míg IL-8-al együtt felelős a gerincvelői léziókért [20].

Állatkísérletekkel kimutatták, hogy kísérletes allergiás encephalomyelitis (EAE) váltható ki, ha központi idegrendszeri fehérjékkal immunizálnak. Ekkor az SM-hez hasonló relapszusok és remissziók alakulnak ki. Vizsgálatok során olyan fehérjéket találtak, melyek számos encephalitogén epitópot tartalmaznak. Ezek a fehérjék a mielinhüvely alkotó elemei, a mielin-bázikus protein (MBP), a proteolipid protein (PLP) és a mielin-oligodendrocita glikoprotein (MOG). A demielinizáció kiváltásához azonban egyedül az autoagresszív T-sejtek megléte nem elegendő. A plakkokban lévő perivascularis beszűrődésekben limfocitákat ($CD4^+$ T-sejt, $CD8^+$ T-sejt, B-sejt), makrofágokat és citokineket találhatunk. Immunsejt populációt érintő vizsgálatok feltárták, hogy SM betegeknél abnormális T-sejt populáció korlátozott számú T-sejt receptorral, csökkent számú keringő T_{reg} -ek [21] és módosult natural killer (NK) sejtek vannak jelen [22]. Az aktív léziókban nagyszámú inflammatorikus sejtet és szolubilis immunfaktort azonosítottak [23].



2. ábra: Limfociták bejutása a KIR-be

(John W. Rose és Noel G. Carlson nyomán módosítva)

VAG: vér-agy gát, TLR: Toll-like receptor, VLA-4: very late antigen 4, VLA-R: VLA-receptor

Bejutás lépései: 1. Toll-like receptor aktiváció 2. Kemokinek termelődésének fokozódása és transzportja az aktivált endothelen át 3. Kemokinek és kemokin receptorok interakciója 4. Limfociták kötődése az endothel sejtekhez P és E szelektinén keresztül 5. VLA-4 adhézíós molekulák kapcsolódása az endothelialis receptorokhoz 6. Limfocita migrációja a KIR parenchimájába 7. Kemokinek általi további migráció

A VAG-ot endothel sejtek alkotják, amelyek között lévő szoros kapcsolatok (tight junction-ök) korlátozzák a molekulák szabad áramlását. A VAG zavara korán bekövetkezik a léziók képződésekor. Az aktivált mikroglia által termelt IL-1 β proinflammatorikus citokin elsősorban a lézióknál fejeződik ki és hozzájárul a VAG megnövekedett permeabilitásához. Hatására az asztrociták vascularis endothelialis növekedési faktor A-t (VEGF-A) termelnek, mely ugyancsak a VAG átteresztőképességét fokozza [24]. A VAG felbomlása után immunsejtek áramlanak a KIR-be. Állatkísérletekkel bizonyították, hogy ehhez adhézíós molekulákra (pl.: VLA-4) és kemokinekre van szükség [25] (2. ábra).

1.6. Kemokinek szerepe az SM-ben

Az idegrendszerben a citokinek és a kemokinek neuromodulációs feladatot látnak el, idegi fejlődést, neuroinflammációt és szinaptikus ingerületátvitelt szabályoznak [26]. A kemokinek nevüket a funkciójuk után, mint kemotaktikus citokinek kapták. Kis molekulatömegű proteinekről van szó (8-14 kDa), melyek G-protein kapcsolt kemokin receptorhoz való kötődéssel serkentik a leukociták vándorlását a gyulladás helyére, továbbá felelősek a sejtadhézióért, fagocitózisért, citokin szekrécióért, sejt aktivációért, sejtsztódásért, sejt túlélésért, sejthalálért, apoptózisért és angiogeneziséért. Az N-terminális végükön lévő konzervált cisztein oldallánc pozíciójától függően 4 alosztályra oszthatók, melyek a CC-, CXC-, CX3C- és C-kemokinek. Az SM kísérletes modelljében, az EAE-ben kimutatták a CCL2, CCL5 és CXCL10 receptor ligandok jelenlétét a léziókban [27]. A CCL2-CCR2 kombináció szerepét bizonyították a relapszusok során [28]. SM betegek liquorját vizsgálva kiderült, hogy nagy mennyiségben tartalmaz CCL5-öt (RANTES), mely a CCR5 receptor ligandja, CXCL10-et és aktivált T-sejteket, melyek képesek migrálni a KIR-be [25]. Ezek a kutatások rámutattak arra, hogy bizonyos kemokinek és receptoraik lehetővé teszik a leukociták vándorlását a KIR-be és hogy a β -kemokin receptorok fontos szerepet játszanak az SM pathogenezisében [29-31].

Míg több kemokin receptorról bebizonyosodott, hogy *in vitro* a humán immundeficiencia vírus (HIV) koreceptoraként szolgálnak, addig egyedül a CC kemokin receptor 5 (CCR5) és a CXCR4 működött *in vivo*. A CCR5 vizsgálatok megállapították, hogy a HIV vírus sejtbe jutásában és replikációjában betöltött szerepe döntő fontosságú, viszont a receptor génjében 32 bázispáros deléció (CCR5- Δ 32) homozigóta formában hordozók rezisztensek a vírussal szemben [32-34]. A CCR5- Δ 32-re heterozigótáknál lassan alakul ki a fertőzés annak köszönhetően, hogy a sejt felszínen kevesebb CCR5 receptort expresszálnak. A CCL5-CCR5 interakció számos szignalizációs kaszkádot indít el a sejtben, például felelős az adenilát-cikláz gátlásáért, serkenti a Ca^{2+} ion felszabadulását, a mitogén aktivált protein kinázokat (MAPK) és c-Jun N-terminális kinázt (JNK) aktivál.

A humán CCR5 gén egy 352 aminosavból álló proteint kódol, melynek molekulatömege 40.600 Da és rendelkezik egy potenciális glikozilációs hellyel az N-terminálison. A gén lókusza a 3. kromoszóma rövid karjának 21-es régiójába esik [33]. A receptor aminosav analízise során leírták, hogy szerkezete magas homológiát mutat a rodopsinnal [35-38]. A CCR5 számos kemokint képes kötni, ligandjai közé tartozik a CCL3,

CCL4, CCL5 és CCL8 [39]. A KIR-ben az asztrociták, neuronok és mikroglia plazmamembránjában foglal helyet a receptor.

Receptor polimorfizmusokat számtalan különféle populációban tanulmányoztak. A CCR5- Δ 32 homozigóta formában frameshift-et (vagy kereteltolódást), továbbá a fehérje idő előtti terminációját idézi elő.

A szakirodalomban számos ellentmondó eredmény látott napvilágot a CCR5- Δ 32 SM-ben betöltött szerepéről (**1. táblázat**). Német kutatók vizsgálatai alapján a CCR5 receptort expresszáló mikroglia és makrofágok iniciálják a remielinizáció folyamatát [40]. Kantor és munkatársai szerint a CCR5 gén deléciója egy kedvező prognosztikai faktor [41]. Dániában végzett kutatások azt mutatták, hogy a CCR5- Δ 32 szerepet játszik az SM súlyosságának befolyásolásában, mivel csökkenti a gyulladás mértékét és a szövetelhalást [42]. Magyarországon élő oláh romáknál magasabb számban figyelték meg a deléciót, mint a magyar átlag populációban [43], az pedig közismert, hogy a romák kevésbé érintettek a betegség kapcsán. Lisa F. Barcellos és munkatársai eredményei azt mutatták, hogy a deléciót hordozó betegeknél a betegség kezdete 3 évvel későbbre tehető, mint a vad alléllal rendelkező betegeknél [44].

Ezekkel ellentétben, született olyan eredmény is, ahol a CCR5- Δ 32 korai halállal társult [45] vagy éppenséggel genetikai rizikófaktorként írták le [31]. Szicíliai populációban szignifikáns kapcsolatot találtak a deléció és a betegség súlyossága között [46], míg iráni populációban a Δ 32 szignifikánsan gyakrabban volt jelen SM betegeknél, mint egészséges kontroll személyeknél [47].

Ausztrál kutatók nem találtak kapcsolatot a deléció és a betegség között, nem jelent rizikó faktort a megléte és protektív tulajdonsága sincs [48]. Nem lényeges eleme az SM kifejeződésének, melyet az is bizonyít, hogy más kemokin receptorok helyettesítik, ha hiányzik [48]. Horvát és szlovén populáció vizsgálata során azt az eredményt kapták, hogy a deléció nem befolyásolja a fogékonyságot, a betegség kezdetét és a progresszióját sem [49], mint ahogy iráni populációban történt vizsgálat során sem [50]. Gwan Gyn Song és Young Ho Lee metaanalízis vizsgálata alapján Európában nem találtak kapcsolatot az SM és a CCR5- Δ 32 allél polimorfizmus között kontroll és beteg csoportoknál [51].

Ország	Klinikai változó	Eredmény	Referencia
Irán	SM kialakulása	Hajlamosító tényező	[47]
Brazília	Betegségkezdet, EDSS	Prognosztikai biomarker	[52]
Dánia	EDSS	Nincs összefüggés	[53]
Spanyolország	Etiológia és pathogenitás	Protektív szerep	[54]
Horvátország, Szlovénia	Betegségkezdet	Nincs összefüggés	[49]
USA	Betegségkezdet, EDSS	Nincs összefüggés	[55]
Észak-Írország	Betegségkezdet, fogékonyság	Nincs összefüggés	[56]
Finnország	Fogékonyság	Nincs összefüggés	[57]
Izrael	EDSS	Prognosztikai biomarker	[41]
Németország	Fogékonyság	Nincs összefüggés	[58]
USA	Betegségkezdet	Kb. 3 évvel később alakul ki a betegség a deléciót hordozó betegeknél	[44]
Dánia	Fogékonyság	Alacsonyabb kockázat	[59]
Szicília	Kórlefolyás	A deléció meglétekor lassabb kórlefolyás	[46]
Németország	Pathogenezis	Remielinizáció iniciálása	[40]
Dánia	Kórlefolyás	Protektív szerep	[42]
USA	Fogékonyság	Korai halál	[45]
Finnország	Fogékonyság	Rizikó faktor	[31]
Ausztrália	Fogékonyság	Nincs összefüggés	[48]
Irán	Fogékonyság, betegségkezdet	Nincs összefüggés	[50]
Európa	Fogékonyság	Nincs összefüggés	[51]

1. táblázat: CCR5Δ32 szerepe különböző populációkban (Rosalia D' Angelo, Mult Scler Int., 2011. nyomán módosítva)

II. CÉLKITŰZÉS

Az SM etiológiájában nem tisztázott az immunsejtek KIR-be való bejutásának mechanizmusa. Az irodalomban korábban felvetett CCR5 receptor szerepe kérdéses, ezért csoportunk azt tűzte ki célul, hogy megvizsgálja a CCR5 Δ 32 allél szerepét az SM vonatkozásában nagy beteg és kontroll mintaszámon.

Ennek elérése érdekében betegek és egészséges kontroll személyek DNS mintáin Taqman próbás allél diszkriminációt végeztünk. Az eredményeket adatbázisban rögzítettük majd statisztikailag elemeztük.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Biobank

A vizsgálatokhoz betegektől és egészséges személyektől (kontroll) vérmintát gyűjtöttünk, amiket -80°C-os ultra mélyhűtőben tároltunk. Jelenleg 428 darab SM beteg minta és 830 darab kontroll minta áll rendelkezésünkre. Az adatok egyszerű nyomon követése érdekében létrehoztunk egy adatbázist. Ebben a biobankban minden fontos adat rögzítésre került: TAJ szám, születési idő, életkor, testsúly, testtömegindex (BMI), alkoholfogyasztási-, illetve dohányzási szokások, korábbi műtétek és a családokban előforduló betegségek. Minden szükséges engedélyt megkaptunk a biobank nyilvántartásához az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálattól (ÁNTSZ) (Hiv. sz.: IF 702-19/2012), a Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottságtól (Biobank-adat és mintagyűjtés iktatószám:135/2008) valamint a genetikai vizsgálatokhoz az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságától (Ügyiratszám: 35764/2012/EKU (466/PI/12)).

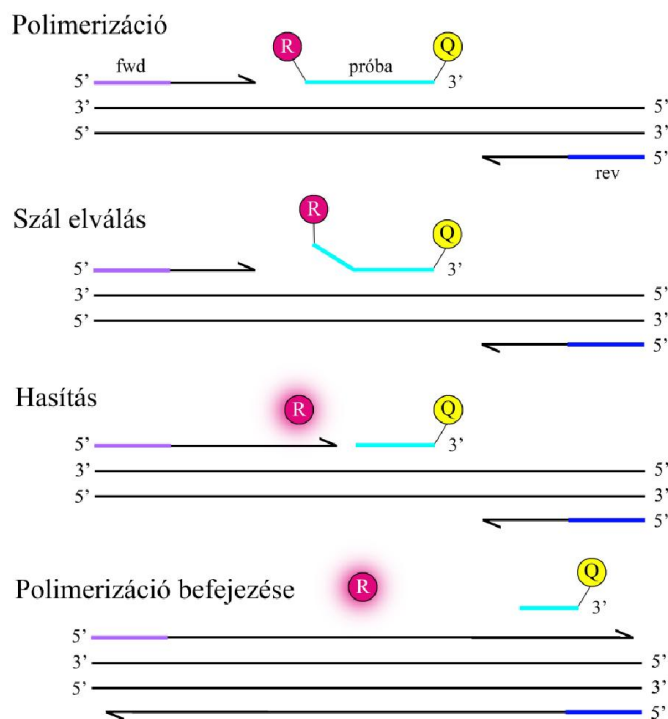
3.2. DNS preparálás

A vérvételt követően etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó vérvételi csőben érkeznek hozzánk a vérminták. A vizsgálatokhoz fehérvérsejtekből nyertük ki a DNS-t a Müller-féle kisózási metodika segítségével. A preparálás első lépéseként magas fruktóz tartalmú vörösvértest lízis pufferrel a sejteket feloldottuk, majd többszörös tisztítási lépésben megszabadultunk a polimeráz láncreakció (PCR) hatékonyságát csökkentő hem csoporttól és

a vér alakos elemeitől. Ezután enzimatis úton, proteináz K-val eltávolítottuk a fehérjéket, köztük a DNS-t bontó nukleázokat, nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) pedig a membránlipideket roncsoltuk. Az enzimés emésztés over night, 37°C-os termosztátban zajlott le. Ezt követően telített NaCl oldattal az emésztett fehérjéket kicsaptuk, majd az így kapott felülúszóban lévő DNS-t előhűtött izopropanollal precipitáltuk. Etanolos mosást alkalmaztunk a tisztított DNS-en, majd Tris-EDTA (TE) pufferben visszaoldottuk és -20 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.3. Allél diszkriminációs vizsgálat

Kísérleteinkhez Taqman próbás vizsgálati módszert alkalmaztunk, mely esetében a PCR reakció során két eltérő jelölésű próbát használtunk a deléciós, illetve a vad típusú allél elkülönítéséhez. A reakció során a régióra specifikusan megtervezett primerek közötti DNS szakasz sokszorozódik fel. Ehhez a szakaszhoz specifikusan bekötnek az eltérő fluoreszcens festékkel jelölt hidrolizációs próbák. A reakció során a polimeráz enzim elemészt a próbát, így a riporter fluoreszcens festék (Fam és Hex) eltávolodik az eddigiekben fluoreszcenciáját gátló quencher-től ezáltal a real-time PCR-el detektálható az emissziója (**3.-4. ábra**).



3. ábra: Taqman próba működési elve

fwd: forward primer, rev: reverse primer, R: riporter, Q: quencher

GCTGCCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCT
 ATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGG
 TACCTGGCTGTTCGTCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTTTGG
 GGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCTCTCCCAGGA
 ATCATCTTTACCAGATCTCAAA**AAGAAGGTCTTCATTACACC**TGCAG**CTCTCATT**
TCCATACA**GTCAGTATCAATTCTGGAAG****GAATTTCAGACA****TTAAAGATAG**TCATC
 TTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTTGTCATGGTCATCTGCTACTCG**GGAATCCTAAA**
AACTCTGCTTCGGTGTCGAAATGAGAAGAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTAT
 CTTACCATCATGATTGTTTATTTTCTCTTCTGGGCTCCCTACAACATTGTCCTTCT
 CCTGAACACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAACAGG
 TTGGACCAAGCTATGCAGGTGACAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCA
 ACCCATCATCTATGCCTTTGTCTGGGGAGAAGTTCAGAACTACCTCTTA

Forward primer: 5'- AAG AAG GTC TCC ATT ACA CC -3'

Reverse primer: 5'- AGC AGA GTT TTT AGG ATT CC -3'

Vad próba: 5'-Fam-CAT ACA GTC AGT ATC AAT TCT GGA A-BHQ-1-3'

Mutáns próba: 5'-Hex-CTC TCA TTT TCC ATA CAT TAA AGA TAG-BHQ-1-3'

4. ábra: Tervezett primerek és próbák szekvenciája

A PCR termociklus az alábbi módon épült fel: denaturáció 95°C-on 10 másodpercig, annealing és extenzió 59°C-on 50 másodpercig, végül plate read (a gép detektálja a fluoreszcencia mértékét) 49 cikluson át, egy 3 perces 95°C-on át zajló elődenaturációt követően. A PCR mix összeállításához 7,4 µl nukleáz mentes vízhez hozzáadtunk 10 µl PCR Bio Master Mixet, mely tartalmazta a reakcióhoz szükséges polimeráz enzimet, továbbá biztosította a megfelelő pH-t és ion koncentrációt. 10µM töménységű forward és reverse primerekből egyaránt 0,6 µl-t adtunk az elegyhez, majd a 10 µM-os fluoreszcens vad, illetve mutáns próbákból 0,2 µl-t. Végül 1 µl templát DNS-t alkalmazva 20 µl végtérfogatú reakcióelegyet kaptunk. Az amplifikációhoz BioRad CFX-96 Thermo Cycler Real-Time PCR-t használtunk.

A PCR után az eredményeket BioRad CFX Manager 1.6 verziójú programmal értékeltük ki az allél diszkrimináció fülön belül RFU értékek alapján.

3.4. Statisztikai elemzés

A PCR kiértékelése után a kapott értékeket adatbázisban rögzítettük, majd statisztikai elemzés alá vetettük. Az elemzéshez az SPSS 20.0 verziójú programot használtuk. A genotípus és az allél eloszlás összevetéséhez Khí-négyzet próbát, két csoport összehasonlításához T-próbát, ha több, mint 2 csoportot vetettünk össze, akkor variancia analízist alkalmaztunk és két mintás variancia analízist használtunk, ha több, mint 2 csoportosítási kritériumról volt szó. A genotípus gyakoriságok megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak, mind a beteg, mind a kontroll csoportban egyaránt, a statisztikai szignifikanciát pedig a $p < 0,05$ jelentette.

IV. EREDMÉNYEK

4.1. Genotípus és allél gyakoriság megoszlások, a deléció befolyása az EDDS pontszámra és betegségkezdetre

Vizsgálatunk során 428 darab SM beteg és 831 darab egészséges kontroll mintával dolgoztunk. Mind a beteg és mind a kontroll csoport korban ($p=0,414$) és nemben ($p=0,942$) egymáshoz illeszkedett, a két csoport nem különbözött szignifikánsan egymástól ($p > 0,05$) (**2. táblázat**). A betegek átlag életkora $43,74 \pm 11,974$ év, míg a kontroll személyeknél $44,34 \pm 13,202$ év volt. Valamennyi SM beteg esetében a McDonald-féle kritériumok teljesültek, tehát klinikailag definiált RR és SP kórformájú páciensek vettek részt a tanulmányban, méghozzá 377 RR és 51 SP beteg. Az RR kórformában szenvedő betegek átlag életkora $42,56 \pm 11,70$ volt, míg az SP kórforma esetében ez $52,49 \pm 10,35$ évre tehető. A minták Csongrád megye és Észak-Bácska (Szerbia) területéről származtak.

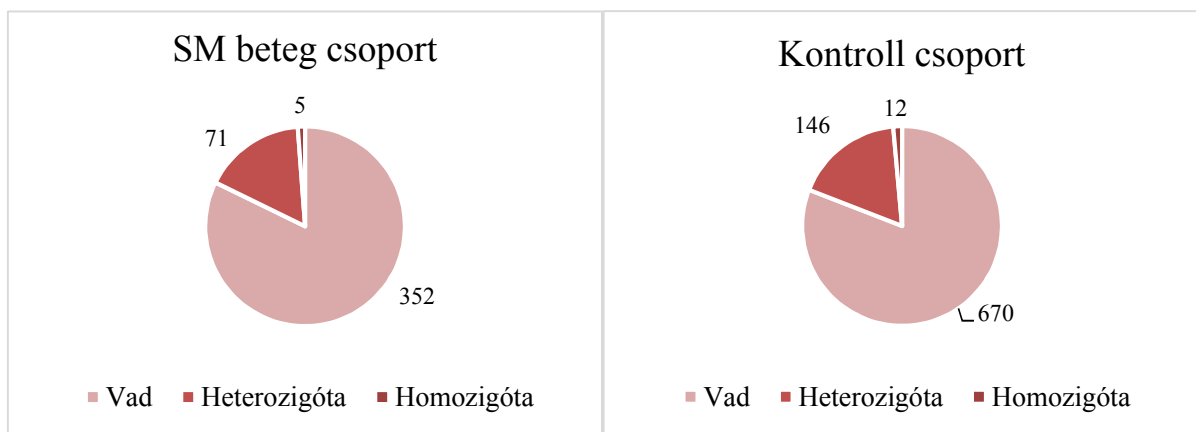
Több szempont alapján is vizsgálat alá vetettük a csoportokat. Elemeztük az adatokat genotípus és allél gyakoriság szempontjából, továbbá vizsgáltuk minkét allél hatását a betegségkezdetre és az EDSS-re.

3 darab kontroll minta esetében az alléldiszkriminációs vizsgálat protokollja alapján nem állt rendelkezésre elegendő mennyiségű DNS minta, 1 mintánál pedig nem volt információ az egyén nemét illetően.

	Nem	n	Kor Átlag $\pm$ SD	Betegségkezdet Átlag $\pm$ SD	EDDS Átlag $\pm$ SD
SM beteg	Férfi	106	41,67 $\pm$ 12,916	30,61 $\pm$ 10,101	2,580 $\pm$ 1,9544
	Nő	322	44,42 $\pm$ 11,587	32,68 $\pm$ 9,662	2,536 $\pm$ 1,920
	Összesen	428	43,74 $\pm$ 11,974	32,17 $\pm$ 9,802	
Egészséges kontroll	Nem	n	Kor Átlag $\pm$ SD		
	Férfi	204	37,90 $\pm$ 10,898		
	Nő	626	46,44 $\pm$ 13,216		
	Összesen	830	44,34 $\pm$ 13,202		

2. táblázat: Demográfiai adatok

Az SM beteg csoportban 352 vad típusú, 71 heterozigóta és 5 homozigóta volt a CCR5- Δ 32-re nézve. Itt a deléciós allél gyakorisága 9,46 % volt. Ezzel szemben a kontroll csoportban 670 vad típusú, 146 heterozigóta és 12 homozigóta volt. A minor allél gyakoriság 10,26% volt. **(5. ábra)**

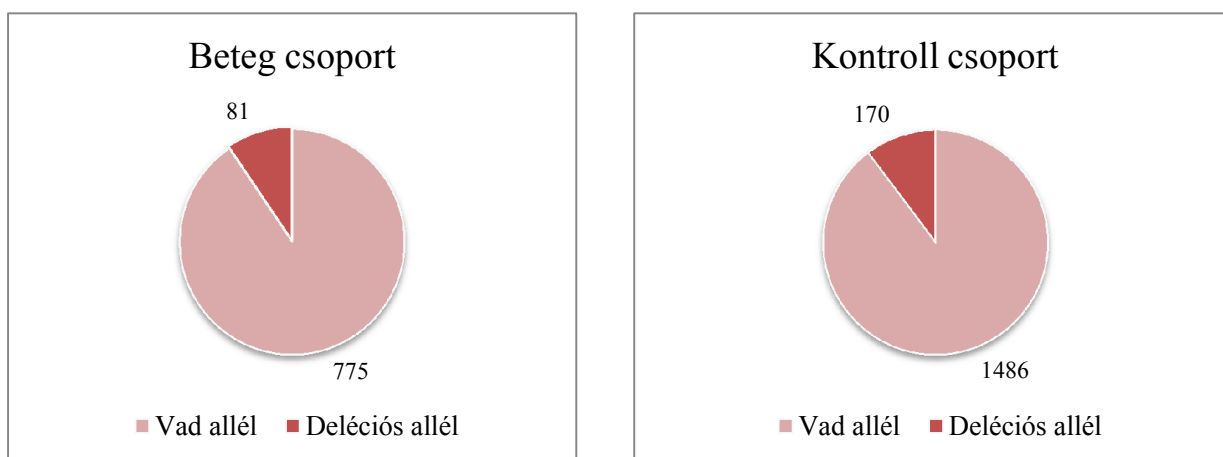


5. ábra: Genotípus eloszlás beteg és kontroll csoportban

Nem találtunk szignifikáns eltérést sem a genotípus ($p=0,568$ vad/vad szemben a vad/ Δ 32 és Δ 32/ Δ 32 tekintetében), sem az allél frekvenciában ($p=0,525$) a két csoport között **(6. ábra)**. Ezen adatok tekintetében kijelenthető, hogy a deléció megléte nem jelent rizikó faktort a betegségre nézve, továbbá protektív hatása sincs. A beteg és kontroll csoport genotípus gyakoriságai a 3. táblázatban, az allél gyakoriságok a 4. táblázatban szerepelnek.

	vad/vad	vad/ Δ 32	Δ 32/ Δ 32	p érték
Beteg csoport:	352	71	5	0,568
Kontroll csoport:	670	146	12	

3. táblázat: Genotípus gyakoriságok



6. ábra: Allél gyakoriságok

	vad allél	Δ 32 allél
Beteg csoport	775	81
Kontroll csoport	1486	170

4. táblázat: Allél gyakoriságok

Több szakirodalomban megjelent közleménnyel ellentétben nem detektáltunk szignifikáns eltérést az rs333 polimorfizmus és az EDSS pontszám között ($F=0,282$; $p=0,755$), továbbá a betegségkezdetre sem volt hatással a genotípus megoszlás ($F=0,416$; $p=0,660$). Nem befolyásolta az EDSS pontszámot a deléciós és a vad allél sem (vad allél: $F=0,032$; $p=0,858$; Δ 32 allél: $F=0,564$; $p=0,453$) és a betegségkezdetre sem voltak hatással (vad allél: $F=0,010$, $p=0,921$; Δ 32 allél: $F=0,821$, $p=0,365$).

4.2. Környezeti tényezők befolyása a betegségre

Figyelembe vettük a különböző környezeti hatások lehetséges befolyásoló hatását, így az alkoholfogyasztási- és dohányzási szokásokkal és a testtömeg-index-el (body mass index, BMI) együttesen vizsgáltuk a két allél hatását a betegségkezdetre és az EDSS-re. A dohányzást [60] és a fiatal kori elhízást [61] rizikó faktorként írták le az SM kórlefolrásában. A csoportokban szereplőket az alkoholt „nem fogyaszt” és az „alkalmanként vagy rendszeresen fogyasztó”, a „nem dohányzik”, „alkalmanként” vagy „rendszeresen” dohányzó és a BMI érték szerint „sovány”, „normális testsúlyú”, „túlsúlyos” és „elhízott” kategóriákba soroltuk. Megvizsgáltuk a deléció és az alkoholfogyasztás, a dohányzási szokások és a testtömeg-index kollektív hatását az EDSS és a betegségkezdet vonatkozásában, de nem detektáltunk szignifikáns eltérést, sem a vad, sem a deléciós allél tekintetében (5. táblázat).

	alkoholfogyasztás		dohányzás		BMI	
deléciós allél	EDSS	betegségkezdet	EDSS	betegségkezdet	EDSS	betegségkezdet
	0,509	0,287	0,237	0,252	0,824	0,481
vad allél	EDSS	betegségkezdet	EDSS	betegségkezdet	EDSS	betegségkezdet
	-	-	0,154	0,752	0,723	0,142

5. táblázat: Környezeti hatások befolyása a betegségre

V. MEGBESZÉLÉS

5.1. Eredmények megvitatása

Genetikai faktorok vitathatatlanul hozzájárulnak a sclerosis multiplex kialakulásához. Az SM betegek több mint 20%-ánál egy másik családtag is veszélyeztetett lehet. Különböző populációban végzett ikerkutatások bizonyították, hogy a betegek ikertestvéreinél gyakrabban jelenik meg a kór, a monoizigotikus ikrek esetében 30% körüli esélyre tehető a betegség megjelenése, ami egy újabb bizonyíték a genetikai tényezők befolyásoló erejére [62, 63].

A legerősebb genetikai faktor, mely befolyással bír az SM-re való fogékonyságra, az MHC szuperlókuszban helyet foglaló HLA-DR2 gén [64]. Ez az a gén, amely szerepét közel

minden populációban kimutatták [65]. A HLA vagy más néven MHC molekulák fontos szerepet játszanak az antigén kötésben és prezentációban, továbbá ezáltal a T-sejt aktivációban, így az autoagresszív T-sejt populáció létrejöttében is.

Az utóbbi időben bebizonyosodott, hogy különböző neurodegeneratív betegségek pathomechanizmusában esszenciális szerepet töltenek be a különböző citokinek, ezen belül a kemokinek. A T_H sejtek kemokin receptorokat expresszálnak a sejtfelszínükön, mellyel lehetővé teszik a CD4⁺ sejtek és monociták infiltrációját a KIR-be, ezzel elősegítve az új léziók kialakulását [66]. A kemokin receptorok expresszióját proinflammatorikus citokinek regulálják [67].

A szakirodalomban számos, egymásnak ellentmondó közlemény jelent meg a CCR5 SM-ben betöltött szerepéről. Trebst és munkatársai által végzett vizsgálatban arra a megállapításra jutottak, hogy a CCR5 receptor pozitív mikroglia és makrofágok elősegítik a remielinizációt [40]. Radhika Gade-Andavolu kísérletei alapján viszont arra következtettek, a delécia megléte korai halállal társul SM betegeknél [45].

Annak tudatában, hogy az SM kialakulásában bizonyítottan szerepet játszik a genetika, emellett sikerült már meghatározó genetikai faktorokat azonosítani, illetve a kemokinek vitathatatlanul fontos modulátorok a KIR gyulladásával járó megbetegedésekben, csoportunk arra az elhatározásra jutott, hogy az irodalmi ellentmondások felderítésére nagy mintaszámon, magyar és szerb populációban, amelyen korábban nem történt hasonló kutatás vizsgáljuk meg a CCR5 delécia szerepét az SM vonatkozásában. Eredményeink azt mutatták, hogy nincs szignifikáns különbség a beteg és kontroll csoport között genotípus és allél gyakoriságban, valamint sem a vad, sem a deléciós allél nem befolyásolja a betegségkezdetet vagy az EDSS pontszámot. Környezeti hatások, mint a dohányzás, alkoholfogyasztás és a testtömeg-index együttes hatása az egyik, illetve a másik alléllal sem eredményezett szignifikáns különbséget a betegségkezdet és az EDSS befolyásolása kapcsán.

5.2. Összegzés

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk azt, hogy a CCR5 32 bázispáros delécioja nem jelent kockázati tényezőt az SM kialakulására, nem nevezhető biomarkernek, melynek meglétéből prediktálható lenne a betegség esetleges későbbi megjelenése. Ezen kívül protektív szerepe sincs, mivel sem az EDSS pontszámra, sem a betegségkezdetre nincs hatással, illetve nem fordul elő magasabb számban a kontroll csoportban sem.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

A kemokin receptorok és a hozzájuk kötődő kemokinek interakciója serkenti az aktivált T-sejtek gyulladás helyére történő migrációját. Az SM állatkísérletes modelljében nagy mennyiségű CCR5 receptor ligand CCL5-öt (RANTES) detektáltak a léziók területén, továbbá a betegek liquorjában magas szintet mutattak ki aktivált T-sejtek jelenléte mellett. Tehát ebből feltételezhető, hogy a CCR5 valamilyen kapcsolatban áll az SM-mel, felelős lehet a leukociták KIR-be történő migrációjáért.

Munkánk során - mely arra irányult, hogy a CC-kemokin receptor 5 génjében bekövetkező 32 bázisbáros deléció szerepét felderítsük sclerosis multiplexben – a szakirodalomban közölt tanulmányok közül a 2. legnagyobb konroll mintaszámon – allél diszkriminációs vizsgálatot végeztünk. A kapott eredmények fényében kijelenthető az, hogy a leukociták agyba történő vándorlásában nem esszenciális a CCR5 receptor megléte, és amennyiben a deléció következtében hiányzik a receptor, valószínűleg más kemokin receptorok helyettesíteni tudják a szerepét. Az SM pathomechanizmusában továbbra is kérdéses, hogy melyik az a fő receptor, mely lehetővé teszi az immunsejtek KIR-be való bejutását. Mindazonáltal a jövőbeli kutatásokban fontos ezen mechanizmus felderítése a hatásos terápia kidolgozásához.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A sclerosis multiplex (SM) egy krónikus, progresszív neurodegeneratív megbetegedés, mely a neuronok vezetőképességének megváltozásával jár. Szokatlanul nagy klinikai, patológiai heterogenitást mutat, ebből kifolyólag a pontos pathomechanizmusa sem ismert.

Autoimmun betegség lévén az SM-ben meghatározó funkciót látnak el a citokinek. A mielinhüvelyt károsító autoagresszív T-sejtek kemokinekkel kommunikálnak egymással, ezen molekulák felelősek a leukociták gyulladás helyére történő irányításáért. A vér-agy gát (VAG) sérülése során a mononukleáris sejtek bejutnak a központi idegrendszer területére. Az agyi neuronok és a mikroglia sejtfelszínükön CC-kemokin receptor 5-öt (CCR5) expresszálnak, másrésről ligandja, a CCL5 nagy mennyiségben felszabadul a betegek cerebrospinális folyadékában és a léziók környékén [25]. Receptor polimorfizmusait számos országban vizsgálták, a CCR5 génjében bekövetkező 32 bázispáros deléción betegségben betöltött szerepéről azonban változatos eredményű közlemények jelentek meg. Néhány publikáció mint lehetséges rizikó faktor említi [45], míg más források protektív faktorként írnak róla [46], illetve születtek olyan eredmények is, ahol nem találtak összefüggést a deléción és a betegség között [49].

Vizsgálataink során 428 SM beteg és 831 egészséges kontroll személy DNS mintáin Taqman próbás allél diszkriminációs tesztet végeztünk. Eredményeinket az SPSS 20.0 program segítségével statisztikai elemzés alá vetettük.

Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a genotípus és allél gyakoriságokban a beteg és a kontroll csoport között, továbbá a deléción megléte nem befolyásolta az EDSS pontszámot vagy a betegségkezdetet. Környezeti tényezők, mint a dohányzás, alkoholfogyasztás és a testtömeg-index kombinált vizsgálatban a deléciós és a vad alléllal nem befolyásolta a betegség kezdetét vagy az EDSS pontszámot.

Az eredmények tükrében kijelenthető, hogy a CCR5 Δ 32 nem játszik szerepet az SM pathomechanizmusában, sem rizikó faktorként, sem protektív tényezőként nem jellemezhető.

VIII. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vécsei László akadémikusnak, hogy az SZTE ÁOK Neurológiai Klinikáján helyet biztosított számomra a szakmai tapasztalatszerzéshez, és Dr. Bencsik Krisztina egyetemi docensnek, hogy lehetőséget kaptam arra, hogy részt vegyek az aktuálisan folyó kísérletekben és hogy munkám során hasznos instrukciókkal látott el.

Továbbá nagyon nagy köszönettel tartozom Török Nóra PhD hallgatónak, aki segítségével és odaadásával megtanított a különböző metodikák használatára, átadta a tapasztalati tudását és támogatott a TDK dolgozatom megírásában.

Nem utolsó sorban köszönet illeti belső konzulensemét, Prof. Dr. Fekete Évát, aki segítőkészségével irányította diákkörös munkám.

IX. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Molnár Kinga a dolgozatomban leírt munkafolyamatok közül:

- a DNS vérből való preparálását,
- az allél diszkriminációs vizsgálatokat
- és azok kiértékelését a BioRad CFX Manager 1.6 verziójú programmal végeztem el.

.....
Molnár Kinga

Szeged, 2014. június 10.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Charcot , J.M., Histologie de la sclérose en plaques. Gaz. Hop. (Paris), 1968. 41: p. 554-555.
2. Charcot , J.M., Comptes rendus des séances et mémoires lus à la société de Biologie. 1868.
3. Charcot , J.M., Lectures on the diseases of the nervous system. The New Sydenham Society. London, United Kingdom., 1877: p. 157–222.
4. V. Zsíros, Z.F.-N., J.Füvesi, Zg.T. Kincses, Éva Langane, L. Vécsei, K. Bencsik, Prevalence of Multiple Sclerosis in Csongrád county, Hungary. Acta Neurologica Scandinavica, in press 2013. dec.16.
5. Wingerchuk, D.M., C.F. Lucchinetti, and J.H. Noseworthy, Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. Lab Invest, 2001. 81(3): p. 263-81.
6. Multiple Sclerosis: National Clinical Guideline for Diagnosis and Management in Primary and Secondary Care. 2004.
7. Kurtzke, J.F., Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology, 1983. 33(11): p. 1444-52.
8. Halfpenny, C., T. Benn, and N. Scolding, Cell transplantation, myelin repair, and multiple sclerosis. Lancet Neurol, 2002. 1(1): p. 31-40.
9. Markovic-Plese, S. and H.F. McFarland, Immunopathogenesis of the multiple sclerosis lesion. Curr Neurol Neurosci Rep, 2001. 1(3): p. 257-62.
10. Antony, J.M., et al., Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? Biochim Biophys Acta, 2011. 1812(2): p. 162-76.
11. Moses, H., Jr. and S. Sriram, An infectious basis for multiple sclerosis: perspectives on the role of Chlamydia pneumoniae and other agents. BioDrugs, 2001. 15(3): p. 199-206.
12. Greenlee, J.E. and J.W. Rose, Controversies in neurological infectious diseases. Semin Neurol, 2000. 20(3): p. 375-86.
13. Alotaibi, S., et al., Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. JAMA, 2004. 291(15): p. 1875-9.
14. Levin, L.I., et al., Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. JAMA, 2003. 289(12): p. 1533-6.
15. Kantarci, O. and D. Wingerchuk, Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. Curr Opin Neurol, 2006. 19(3): p. 248-54.

16. Barcellos, L.F., et al., HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet*, 2003. 72(3): p. 710-6.
17. Yong, Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Continuum Lifelong Learning Neurol*, 2004. 10(6): p. 11-27.
18. Jiang, H. and L. Chess, Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*, 2006. 354(11): p. 1166-76.
19. West, A.P., A.A. Koblansky, and S. Ghosh, Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. 22: p. 409-37.
20. Ishizu, T., et al., Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optospinal multiple sclerosis. *Brain*, 2005. 128(Pt 5): p. 988-1002.
21. Viglietta, V., et al., Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 2004. 199(7): p. 971-9.
22. Takahashi, K., et al., The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 2004. 127(Pt 9): p. 1917-27.
23. Lucchinetti, C., et al., Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 2000. 47(6): p. 707-17.
24. Argaw, A.T., et al., IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol*, 2006. 177(8): p. 5574-84.
25. Ubogu, E.E., M.B. Cossoy, and R.M. Ransohoff, The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(1): p. 48-55.
26. Ramesh, G., A.G. MacLean, and M.T. Philipp, Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm*, 2013. 2013: p. 480739.
27. Rottman, J.B., et al., Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *Eur J Immunol*, 2000. 30(8): p. 2372-7.
28. Kennedy, K.J., et al., Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol*, 1998. 92(1-2): p. 98-108.
29. Sorensen, T.L., et al., Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, 1999. 103(6): p. 807-15.

30. Simpson, J., et al., Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol*, 2000. 108(1-2): p. 192-200.
31. Pulkkinen, K., et al., Increase in CCR5 Delta32/Delta32 genotype in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 2004. 109(5): p. 342-7.
32. Libert, F., et al., The *deltacr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet*, 1998. 7(3): p. 399-406.
33. Liu, R., et al., Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996. 86(3): p. 367-77.
34. Samson, M., et al., Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996. 382(6593): p. 722-5.
35. Dragic, T., et al., A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(10): p. 5639-44.
36. Govaerts, C., et al., Activation of CCR5 by chemokines involves an aromatic cluster between transmembrane helices 2 and 3. *J Biol Chem*, 2003. 278(3): p. 1892-903.
37. Paterlini, M.G., Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity. *Biophys J*, 2002. 83(6): p. 3012-31.
38. Oppermann, M., Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*, 2004. 16(11): p. 1201-10.
39. Onuffer, J.J. and R. Horuk, Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol Sci*, 2002. 23(10): p. 459-67.
40. Trebst, C., et al., CCR5 expression on macrophages/microglia is associated with early remyelination in multiple sclerosis lesions. *Mult Scler*, 2008. 14(6): p. 728-33.
41. Kantor, R., M. Bakhanashvili, and A. Achiron, A mutated CCR5 gene may have favorable prognostic implications in MS. *Neurology*, 2003. 61(2): p. 238-40.
42. Schreiber, K., et al., Disease severity in Danish multiple sclerosis patients evaluated by MRI and three genetic markers (HLA-DRB1*1501, CCR5 deletion mutation, apolipoprotein E). *Mult Scler*, 2002. 8(4): p. 295-8.
43. Juhasz, E., et al., The Consequence of a Founder Effect: CCR5-32, CCR2-64I and SDF1-3'A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 2012. 18(2): p. 177-82.

44. Barcellos, L.F., et al., CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group. Immunogenetics, 2000. 51(4-5): p. 281-8.
45. Gade-Andavolu, R., et al., Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. Genet Med, 2004. 6(3): p. 126-31.
46. D'Angelo, R., et al., CCR5Delta32 Polymorphism Associated with a Slower Rate Disease Progression in a Cohort of RR-MS Sicilian Patients. Mult Scler Int, 2011. 2011: p. 153282.
47. Shahbazi, M., et al., CCR5-delta 32 allele is associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Iranian population. Cell Mol Neurobiol, 2009. 29(8): p. 1205-9.
48. Bennetts, B.H., et al., The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis. Hum Immunol, 1997. 58(1): p. 52-9.
49. Ristic, S., et al., No association of CCR5delta32 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients. Mult Scler, 2006. 12(3): p. 360-2.
50. Arababadi, K.M., et al., No Association Between CCR5-Δ32 Mutation and Multiple Sclerosis in Patients of Southeastern Iran. LabMedicine, 2009. 41(1).
51. Song, G.G. and Y.H. Lee, A Meta-analysis of the relation between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and multiple sclerosis susceptibility. Immunol Invest, 2013.
52. Poser, C.M., et al., New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann Neurol, 1983. 13(3): p. 227-31.
53. Sellebjerg, F., et al., Chemokine receptor CCR5 in interferon-treated multiple sclerosis. Acta Neurol Scand, 2007. 115(6): p. 413-8.
54. Otaegui, D., et al., Influence of CCR5-Delta32 genotype in Spanish population with multiple sclerosis. Neurogenetics, 2007. 8(3): p. 201-5.
55. Kantarci, O.H., et al., CCR5Delta32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 2005. 169(1-2): p. 137-43.
56. Silversides, J.A., et al., Influence of CCR5 delta32 polymorphism on multiple sclerosis susceptibility and disease course. Mult Scler, 2004. 10(2): p. 149-52.
57. Luomala, M., et al., Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. Acta Neurol Scand, 2003. 108(6): p. 396-400.

58. Haase, C.G., S. Schmidt, and P.M. Faustmann, Frequencies of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism and the delta 32 mutation of the chemokine receptor-5 in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett*, 2002. 330(3): p. 293-5.
59. Sellebjerg, F., et al., CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2000. 102(1): p. 98-106.
60. Sharafutdinova, L.R., et al., [Smoking as a risk factor of development and progression of multiple sclerosis (a review and experimental data)]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2013. 113(10 Pt 2): p. 18-22.
61. Munger, K.L., et al., Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult Scler*, 2013. 19(10): p. 1323-9.
62. Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis. *Lancet*, 2002. 359(9313): p. 1221-31.
63. Ebers, G.C., Genetics and multiple sclerosis: an overview. *Ann Neurol*, 1994. 36 Suppl: p. S12-4.
64. Oksenberg, J.R., et al., Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol*, 2001. 113(2): p. 171-84.
65. Oksenberg, J.R. and L.F. Barcellos, Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes Immun*, 2005. 6(5): p. 375-87.
66. Eikelenboom, M.J., et al., Chemokine receptor expression on T cells is related to new lesion development in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2002. 133(1-2): p. 225-32.
67. Lane, B.R., et al., TNF-alpha inhibits HIV-1 replication in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression. *J Immunol*, 1999. 163(7): p. 3653-61.