

dc_5_10

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÓJA

A MOLEKULÁRIS GENETIKA SZEREPE A SCLEROSIS
MULTIPLEX PATOGENEZISÉNEK FELTÁRÁSÁBAN

DR. KÁLMÁN BERNADETT

2010.

I. A TANULMÁNY CÉLKITŰZÉSEI

A sclerosis multiplex (SM) patogenezisének a genetika eszközeivel történő további feltárásával a betegség gyógyításának és megelőzésének új lehetőségeit kívánom elérni. A tanulmányban feltételezem, hogy 1) a gyulladásos és neurodegenerációs folyamatokat szabályozó molekulák genetikai variánsai az SM hajlam kialakulását befolyásolják; 2) CC kemokin ligandok (CCL) központi szerepet játszanak a gyulladás szabályozásában; és 3) mitochondriális molekulák és mechanizmusok fontos résztvevői a gyulladás-okozta neurodegenerációnak. A tanulmány fő célja ezért az, hogy meghatározza a gyulladást szabályozó CCL molekulák SM-ben szerepet játszó variánsait, és azonosítsa a gyulladás-okozta neurodegenerációs folyamatokban részt vevő mitochondriális géneket és mechanizmusokat.

E célok megvalósítása érdekében, a következő feladatokat tűztem magam elé:

1. Jelölt gének kutatása "linkage" elemzés által meghatározott szuszceptibilitás lókuszekben. Mivel a "linkage" mint módszer *a priori* mentes előre megfontolt feltételezésektől, a "linkage" által meghatározott szuszceptibilitás lókuszekből való jelölt gén választás kevésbé van kitéve szelekciós tévedésnek, mint egy kizárólag funkcionális megfontolásokon alapuló jelölt gén választás (még ha a gének funkciója irányadó is a CCL molekulák gyulladásos jelöltként és a Complex I molekula neurodegenerációs jelöltként történő választásában).
2. A "linkage"-nél célravezetőbb új módszerek használata "complex trait" típusú problémák tanulmányozására. A "linkage" módszere nagyon hatékonyan bizonyult egyedi gének azonosításában Mendeli öröklődésű, és szuszceptibilitás lókuszek azonosításában "complex trait" típusú betegségekben. Ezutóbbiakban azonban a "linkage" mint módszer nem képes a kiterjedt szuszceptibilitás lókuszek további, egyedi génekre való leszűkítésére. Ezért én egy "linkage disequilibrium" (LD)-ra épülő módszert dolgoztam ki jelölt gének további azonosítására az SM lókuszekben, a "Human Genome" és a "HapMap" projektekből nyert információk alkalmazásával.

3. Az SM-mel asszociációt mutató gének expressziójának és funkciójának meghatározása. A jelölt gének differenciált expressziója és funkcionális aktivitása plakkokban, normálisnak tűnő fehérállományban (NTFÁ) és normálisnak tűnő szürkeállományban (NTSZÁ), tovább támogatja a géntermék szerepét a patológia kialakulásában.

4. A korábbi elméletek továbbfejlesztése új molekuláris mechanizmusok felvázolásával. A két jelölt géncsoport (CCL és Complex I) és termékeik tanulmányozásából nyert eredményeim egy olyan új koncepció létrehozásához vezethetnek, mely molekuláris szinten kapcsolja össze az immun gyulladási és neurodegenerációs folyamatokat SM-ben.

5. Új terápiás célpontok azonosítása. A patológiás folyamatok itt tanulmányozott "upstream" elemei, melyek kismolekulájú gyulladási mediátorokat (CCL) foglalnak magukba, és "downstream" elemei, melyek mitochondriális molekulákat és mechanizmusokat képviselnek, egyaránt az SM gyógyításának egyénileg befolyásolható új célpontjaivá válhatnak.

II. A KÍSÉRLETEKBEN ALKALMAZOTT BETEGANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

II-1 A CC ligandok szerepe gyulladási demielinizációban

II-1a Genetikai tanulmány a 17q11 CCL régióban: 1. fázis – LD térképezés.

Betegek és családjaik: 1085 személy 257 SM-es családból vett részt a DNS vizsgálatokban.

"Single nucleotide polymorphis" (SNP) genotipizálás: A DNS minták genotipizálására 31 SNP-t választottam a 17q11 kromoszóma egy 1.85 MB terjedelmű, 14 CCL gént kódoló régiójából, és a TaqMan módszert alkalmaztuk egy ABI7900HT készüléken.

Az SNP allélok és haplotípusok átadódásának elemzése a családokban: A "pedigree disequilibrium test" (PDT), TRANSMIT 2.5 verzió és Idmax (GOLD csomag) programokat használtuk.

A PDT meghatározza, hogy egy márkert lókuszt és egy feltételezett betegség lókuszt egymással "linkage"-ben vagy "linkage disequilibriumban" vannak-e. Ha egy allél több mint 50%-ban adódik át egészséges

szülőktől beteg leszármazottukba, ez az allél a betegséggel asszociációban állhat.

A TRANSMIT program haplotípusok átadódását vizsgálja egészséges szülőktől beteg leszármazottukba asszociáció megállapítása céljából.

A Ldmax program márkert allél párok között becsüli az LD maximális valószínűségét.

II-1b Genetikai tanulmány a 17q11 CCL régióban: 2. fázis – LD térképezés.

Betegek és családjaik: 1369 személy 361 SM-es családból vett részt a DNS vizsgálatokban.

SNP genotipizálás: Ebben a fázisban <8 kb átlagos inter-márker léptékkel, CCL és nem-CCL géneket egyaránt átfogó, 261 SNP-t teszteltünk, a fentivel azonos 1.85 MB 17q11 régióból. A genotípusok meghatározására a Sequenom MassArray™ Systemát alkalmaztuk, mely az extendált primerek MALDI-TOF tömeg detekcióján alapul.

Az allélok és haplotípusok átadódásának elemzése a családokban: A PDT, TRANSMIT, és Ldmax programok mellett, a hasonló elveken alapuló “family based” és a “haplotype based association test” (FBAT, HBAT) módszereit használtuk, hogy a potenciális populációs keveredésből adódható problémákat kiküszöböljük.

II-1c Genetikai tanulmány a 17q11 CCL régióban: 3. fázis – Az SM-mel asszociációban álló CCL3 haplotípus szequenálása.

Betegek: Olyan 17 beteg és 8 nem érintett családtag DNS-ét szequenáltuk, akik az SM-mel asszociáló CCL3 génre lokalizált haplotípust hordozták. Ezt követően 361 SM-es családból 1369 személy DNS-ét genotipizáltuk a szequenálással feltárt 17 új SNP-re.

Szequenálás: A CCL3 gén területére eső, SM-mel mindkét LD térképezés fázisban asszociációt mutató haplotípust és annak 5' és 3' környező régióját szequenáltuk egy ABI PRISM 3700 DNS Szequenáló készüléken.

Genotipizálás: hasonlóan a II-1b-ben leírtakhoz.

Elemzés: Az SNP allélok és haplotípusok transzmissziós eltorzulását a családokban PDT és TRANSMIT programokkal teszteltük.

II-1d A CCL molekulák expressziója SM-es agyakban.

Fagyasztott post mortem agyminták: SM-es betegektől összetartozó NTFÁ, NTSZÁ és plakk mintákat, és balesetben elhalt (normál) vagy más neurológiai kontrolloktól fehér (FÁ) és szürke állományt (SZÁ) tartalmazó mintákat gyűjtöttünk mRNS vizsgálatokra.

RNS kivonása agyszövetekből, cDNS szintézis és "real time PCR": Kit-ek alkalmazásával izoláltuk az RNS-t és szintetizáltuk a cDNS-t. Majd specifikus primerek és a LightCycler-FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I Kit használatával meghatároztuk a CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13 és CCL15 mRNS molekulák mennyiségét a β -actin mRNS-hez viszonyítva egy Roche Light Cycler System 2.0 készüléken.

Az elemzés módszerei: A "Wilcoxon Signed Rank" Teszt alkalmazásával teszteltük az mRNS értékek különbségeit betegek plakk, NTFÁ és NTSZÁ, és kontrollok FÁ és SZÁ régióiban.

II-2 Mitochondriális molekulák és mechanizmusok gyulladás-okozta neurodegenerációban

II-2a MtDNS variánsok és haplotípusok SM-ben, PON-ben és NMO-ban

Betegek és kontrollok: SM-ben, prominens opticus neuritisben (PON) és neuromyelitis opticában (NMO) szenvedő betegek és megfelelő kontrollok DNS-ét tanulmányoztuk vér és agymintákban.

Mitochondriális (mt)DNS mutációk és polimorfizmusok szűrése: A mtDNS PCR amplifikációjával és a fragmentek restrikciós endonukleáz elemzésével elsődleges és másodlagos Leber-féle Hereditaer Opticus Neuropathia (LHON) típusú mutációkat kerestünk SM-es és PON-es betegek csoportjaiban.

A teljes mtDNS szekvenálása: A teljes mtDNS molekulát átfedő szegmensekben PCR-rel amplifikáltuk, majd a fragmenteket szekvenáltuk 3 SM-es és 3 NMO-s betegben.

Nagy feloldó képességű restrikciós polimorfizmus és haplotípus elemzés: Ezt az átfogó szűrő módszert, mely a teljes mtDNS szequencia 25%-ról ad információt, a mtDNS polimorfizmusok és haplotípusok összehasonlítására használtuk SM-es betegek és kontrollok csoportjaiban.

Az elemzés módszerei: A χ^2 tesztet és a Fisher exakt tesztet alkalmaztuk az LHON mutációk frekvenciájának összehasonlítására a beteg-kontroll csoport tanulmányokban. A teljes mtDNS szequenciákat a Cambridge szequenciával (<http://www.mitomap.org/>) hasonlítottuk össze SM-ben és NMO-ban. A MEGA program módosított verzióját használtuk az SM-es betegek és kontrollok mtDNS polimorfizmusainak haplotípus és "bootstrap" analízisében.

II-2b Complex I variánsok és haplotípusok asszociációja SM-mel

Betegek és családok: 863 személy 182 SM-es családból vett részt a DNS vizsgálatokban.

SNP genotipizálás: A II-1a-ban leírt módon, 54 SNP-t vizsgáltunk a Complex I 20 nukleáris (n)DNS által meghatározott génjében, és 11 SNP-t szűrtünk a mtDNS-ben (ez utóbbiak, két előzőleg általam azonosított, SM-mel asszociálódó, K* és J*-nek nevezett haplotípusban sorakoznak fel).

Az adatelemzés módszerei: Az nukleáris allélok és haplotípusok transzmissziós eltorzulását a PDT és TRANSMIT programok használatával vizsgáltuk. Az LD megoszlást az ldmax program segítségével becsültük (mint II-1a-ban). A Fisher exakt tesztet alkalmaztuk a mtDNS haplotípusok elemzésében.

II-2c A mtDNS oxidációs károsodása és szomatikus deléciója, a mitochondriális enzimek aktivitása és az apoptózist szabályozó molekulák expressziója SM-es plakkokban.

Fagyasztott agyminták: II-1d-ben leirtakhoz hasonlóan, SM-es betegektől plakk, NTFÁ és NTSZÁ mintákat, valamint kontrolloktól FÁ és SZÁ mintákat vizsgáltunk az alábbi kísérletekben.

A mtDNS oxidációs károsodásának becslése Southern-blot analízissel: Az endonukleáz III és a formamidopirimidin DNS glükoziláz enzimek egyláncú

töréseket hoznak létre oxidált pirimidin és purin nukleotidáknál. Az endonukleázokkal való kezelést követően, a fenti agyregiókból származó DNS mintákat bázikus gélelectroforézissel szétválasztottuk, átblottoltuk egy nylon membránra és hibridizáltuk jelölt mtDNS próbákkal. A 16.5 kb (törésektől mentes, linearizált) mtDNS-t denzitometriásan mértük az autoradiogramon, és a törési frekvenciát $s = -\ln P_0$ alapján becsültük, ahol s a törések számát jelzi fragmentekként, és P_0 a törésektől mentes fragmentek frakciója, amit az endonukleázzal kezelt és nem-kezelt mtDNS denzitometriás értékének hányadosa ad.

Az oxidációs károsodás immunohisztokémiai detekciója: Plakkot és NTFÁ-t tartalmazó fagyasztott metszeken egy anti - 8-OH-dG monoklonális antitestet használtunk.

A mitochondriális enzim komplexek aktivitásának mérése: Standard enzim esszéket használtunk a Complex I – Complex V és citrát szintetáz meghatározására fagyasztott agyakból származó homogenizált plakk-NTFÁ mintapárokban.

A mtDNS szomatikus delécióinak becslése: Fagyasztott metszeteket készítettünk SM-es NTSZÁ, NTFÁ és plakk régiókból, és kontroll FÁ és SZÁ régiókból. Citokróm oxidáz (COX) / szukcinát dehidrogenáz (SDH) festést végeztünk a metszeten. A COX+ és COX- neuronokat és glia sejteket izoláltuk egy Lézer Mikrodisszekciós Mikroszkóp használatával és a DNS-t kivontuk a sejtekből. "Real-time PCR" alkalmazásával meghatároztuk az ND4 és ND1 régiók sokszorosított másolatainak számát, és kiszámítottuk az 1-ND4/ND1 mutatót a mtDNS deléció százalékos becslésére (deléció nélkül az ND4/ND1 = 1; deléció esetén az ND4/ND1 <1, mivel a deléció rendszerint az ND4 régiót érinti, de az ND1 régiót nem érinti).

A glutation szintetáz (GSHS), szuperoxid dizmutáz (SOD-1), Bak, Bcl-2, Bcl-X_L és β₂-mikroglobulin mRNS expressziójának meghatározása "real time PCR" módszerrel: a II-1d-ben leirtakhoz hasonlóan végeztük specifikus primerekkel. *Az elemzés módszerei:* A "Wilcoxon signed rank" tesztet alkalmaztuk az oxidációs károsodás, a mitochondriális enzim aktivitás, az mtDNS szomatikus

deléciójának és az mRNA expressziójának egyéni belüli összehasonlítására összetartozó SM-es NTFÁ, NTSZÁ és plakk mintákban, illetve kontroll FÁ és SZÁ mintákban. A Student t-tesztet alkalmaztuk beteg és kontroll csoportok közötti eredmények összehasonlítására.

III. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

III-1 A CC kemokinek szerepe gyulladáshoz demielinizációban

Míg az immun aktiváció elsődleges oka egyelőre ismeretlen SM-ben, a CCL molekuláknak az agyi gyulladáshoz kialakulásában és fenntartásában betöltött szerepét számos kísérletes bizonyíték támogatja experimentális autoimmun encephalomyelitisben (EAE). Ugyan a CCL molekulák szerepe SM-ben is kétségtelen, az adatok kevésbé egyértelműek. Három teljes "genome scan" adatainak meta-analízise a legmagasabb "non-parametricus lod score"-t a 17q11 régióban jelezte SM-es családokban. Ez a régió többek között két CCL gén csoportot kódol. Acélból hogy tovább szűkítsük ezt a kiterjedt szuszceptibilitás lókuszt a 17q11-ben, és hogy körülhatárolt gyulladáshoz szabályozókat azonosítsunk, SNP allél és haplotípus elemzéseket végeztünk európai eredetű, észak-amerikai SM-es családokban. Míg a többszörös összehasonlítás miatt végzett korrekció után egyik márkert allél sem mutatott direkt asszociációt a betegséggel, a haplotípusok transzmissziós torzulása a CCL2, CCL11-CCL8-CCL13 és CCL3 génekben, és valószínűleg a CCL15 génben, asszociációra utalt a tanulmány első fázisában. Ez az elemzés leszűkítette a korábban jelzett 10 MB szuszceptibilitás lókuszt 0.7-37 KB kromoszómális szegmentekre, és specifikus CCL gén régiókat azonosított, melyek az SM hajlam kialakításához hozzájárulhatnak.

A vizsgálat második fázisában, etnikailag hasonló családok egy új csoportjában végeztünk nagy feloldó képességű SNP szűrést, mely megerősítette az SM-mel asszociálódó haplotípusok jelenlétét a CCL2-CCL7, CCL15 és CCL3 génekben, és emellett szokatlanul kiterjedt LD blokkok létezésére utalt a 17q11 régióban. Egy három-SNP-márkert által meghatározott és a CCL3 gén területére eső, SM-

mel mindkét LD-elemzési fázisban asszociációt mutató haplotípust szequenáltunk az 5' és 3' régióival együttesen azokban a betegekben és kontrollokbán, akik ezt a haplotípust hordozták. Patogén mutációt nem találtunk, azonban 17 variációt (a három, haplotípust meghatározó SNP-t is beleértve) azonosítottunk ebben a régióban. Ezt a 17 SNP-t azután genotipizáltuk és az allélok / haplotípusok transzmisszióját elemeztük 361 SM-es családban. Ez az elemzés megerősítette az SNP 277-278 haplotípus T-A allél kombinációjának legerősebb asszociációját SM-mel a CCL3 gén területén. A genetikai vizsgálattal összhangban, az mRNS expressziós vizsgálatok SM-es agyakban szintén megerősítették, hogy a CCL2, CCL7 és CCL8 molekuláknak is szerepe van a plakkok kialakulásában. A CCL2, CCL7, CCL15 és CCL3 jelölt génként való azonosítása a 17q11 régióban, valamint a CCL2, CCL7 és CCL8 patológiával összefüggő expressziós szabályozása SM-es agyakban, az EAE-ben és SM-ben szerzett korábbi megfigyeléseket nagymértékben fejleszti tovább, és kismolekulájú kompetitív CCL / CCR antagonisták egyéni genetikai adatokon alapuló tervezését és terápiás alkalmazását vetíti előre.

III-2. Mitochondriális molekulák és mechanizmusok gyulladás-okozta neurodegenerációban

A gyulladással járó neurodegenerációs mechanizmusok jobb megértése céljából, a tanulmány második részében mitochondrialis jelölt gének és molekulák szerepét vizsgáltuk a léziók kialakulásában. Először részleteiben elemeztük a mtDNS-t SM-ben, PON-ben és NMO-ban, hogy az SM és LHON között megfigyelt asszociáció mögött egy lehetséges közös mitochondriális genetikai háttér kérdését tisztázzuk. A szűrővizsgálatok nem találtak elsődleges LHON mutációkat tipikus SM-es és PON-es beteganyagainkban. A mtDNS molekulák teljes szequenálása azt bizonyította, hogy mind SM, PON és NMO kialakulhat bármifajta patogén hatású mtDNS mutáció nélkül. Azonban ismételtén a másodlagos LHON mutációk gyakoribb előfordulását találtuk SM-es betegekben a kontrollokkal összehasonlítva.

Az ezt követő nagy feloldó képességű polimorfizmus és haplotípus elemzések megerősítették, hogy bizonyos mtDNS haplotípusok (itt K* és J*-ként nevezett), melyeket a +10,394/Ddel / +14,798Ddel restrikciós polimorfizmusok és másodlagos LHON mutációk jelenléte határoz meg, asszociációt mutatnak SM-mel észak-amerikai fehérekben. Mivel a látóideg atrófiát okozó elsődleges LHON mutációk döntően a J* haplotípusban jelentkeznek, az SM és LHON közös családi és egyéni előfordulása a két betegség hasonló mitochondriális genetikai hátterével (J* haplotípus) állhat összefüggésben.

Mivel valamennyi LHON mutáció a Complex I molekula mtDNS által kódolt szubunitjaiban van, és mivel a Complex I molekula számos nDNS által kódolt génje a korábbi SM "linkage" tanulmányok által megjelölt szuszceptibilitás lókuszekben, vagy azok közelében helyezkedik el, a Complex I további vizsgálatának végzését határoztuk el, mely nDNS és mtDNS SNP variánsok elemzését jelentette európai eredetű észak-amerikai SM-es családokban. (A Complex I molekula 45 szubunitból áll. Ebből 7 szubunitot a mtDNS kódol, és 38 szubunitot különböző kromoszómákon található nDNS régió kódol). Ebből a tanulmányból megtudtuk, hogy SNP variánsok és haplotípusok a Complex I NDUFS5, NDUFS7 és NDUF7 nDNS által kódolt génjeiben asszociációt mutatnak SM-mel, és kölcsönhatás lehetséges a nDNS-ben és a mtDNS-ben előforduló, betegséggel asszociálódó variánsok között protein szinten.

A Complex I SM-ben betöltött szerepének további vizsgálata céljából, gyulladással összefüggő biokémiai és molekuláris kórfolyamatokat elemeztünk. A biokémiai, hisztológiai és molekuláris módszerek bizonyították a mtDNS oxidációs károsodásának megnövekedését másodlagos szomatikus mtDNS deléciók kialakulása nélkül, de a Complex I enzim aktivitásának csökkenésével és az apoptózis regulációban résztvevő molekulák abnormális expressziójával krónikus gyulladással plakkokban, nem patológiás saját agyrégiókkal összehasonlítva. Mivel nem detektáltunk oxidációs károsodással összefüggésben a Complex I génjeit érintő szomatikus mtDNS deléciókat vagy

gén másolat szám és mRNS (nem publikált megfigyelés) csökkenést, arra a következtetésre jutottunk, hogy a Complex I aktivitás csökkenése valószínűleg a gyulladás-okozta oxidációs stressznek az enzimre gyakorolt direkt hatásával állhat kapcsolatban a plakkokban. A fenti jelenségek térbeli és időbeli közös megjelenéséből arra következtünk, hogy a gyulladás mint “upstream” folyamat beindít egy “downstream” folyamatot ami magába foglalja a mitochondriális makromolekulák oxidációs károsodását, a Complex I aktivitás csökkenését, és a pro- és anti-apoptotikus molekulák megváltoztatott expresszióját, amik által hozzájárul a neurodegenerative folyamatok kialakulásához SM-ben. Mivel a genetikai variánsok nem okoznak jelen módszerekkel mérhető különbségeket a Complex I aktivitásában normális körülmények között, adataink alapján felvetjük, hogy az örökölt (SM-mel asszociálódó) variánsok az enzim komplexet hajlamossá tehetik gyulladással és oxidációs stressz - okozta strukturális és funkcionális módosulásokra, és ezáltal meghatározhatják az egyéni szöveti reakció természetét gyulladással kapcsolatos folyamatokban.

A ma elérhető gyógyszerek hatástalansága az SM progresszív formáiban aláhúzza a gyulladással kapcsolatos kialakuló neurodegenerációs folyamatok további feltárásának jelentőségét. Az oligodendrociták pusztulása és a prekursorokból való korlátozott regenerációja felelős a demielinizáció irreverzibilis voltáért. A rokkantság előrehaladásának azonban bizonyítottan legfontosabb oka a neuroaxonalis pusztulás, mely a betegség kezdetétől fogva halad előre. Én egy alapvetően új hipotézist dolgoztam ki, mely az SM-ben tapasztalt neurodegenerációt először a kutatás történetében egy szerzett mitochondriális károsodáson keresztül kapcsolja össze a gyulladással, és az immunológiai eredetű citotoxicitást egy mitochondriális mechanizmusú sejt pusztulással egészíti ki. A szöveti reakció gyulladással szemben nagyfokú egyéni különbségeket mutat, mely a mitochondriális energia metabolizmusban és a sejtfenntartás folyamatában kulcs szerepet játszó molekuláknak örökölt genetikai variációival állhat többek között összefüggésben. Egyedülállóan átfogó mitochondriális és Complex I genetikai vizsgálataink számos ilyen márkert

azonosítottak. A mitochondriális mechanizmusok feltárása és ezen genetikai márkerek azonosítása SM-ben lehetőséget nyit egy olyan korai neuroprotektive stratégia kifejlesztéséhez, mely figyelembe veszi a betegség lefolyását meghatározó molekuláris variációk egyéni különbségeit és a „personalized medicine” kialakítását segíti.

IV. A SZERZŐ ÉRTEKEZÉSÉVEL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓI (az értekezésben nem idézettek zárójelben)

1. B. Kalman, F.D. Lublin, H. Alder: Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 1995;1:32-36.
2. B. Kalman, F.D. Lublin, H. Alder: Characterization of the mitochondrial DNA in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1996;140:75-89.
3. B. Kalman, H. Alder, U. Bosch, F.D. Lublin, D. Chatterjee: The evolutionary relationship among Caucasian MS patients and controls. *Multiple Sclerosis* 1996;1:288-295.
4. B. Kalman, F.D. Lublin, H. Alder: Impairment of the central and peripheral myelin in mitochondrial diseases. *Multiple Sclerosis* 1997;2:267-278.
5. B. Kalman, J.L. Rodriguez-Valdez, U. Bosch, F.D. Lublin: Screening for Leber hereditary optic neuropathy associated mitochondrial DNA mutations in patients with prominent optic neuritis. *Multiple Sclerosis* 1997;2:279-282.
6. B. Kalman, S. Li, D. Chatterjee, J. O'Connor, M.R. Voehl, M.D. Brown, H. Alder: Large scale screening of the mitochondrial DNA reveals no pathogenic or polymorphic mutations but a haplotype associated with multiple sclerosis in Caucasians. *Acta Neurol Scand* 1999;99:16-25.
7. O. Vladimirova, J. O'Connor, A. Cahill, H. Alder, B. Kalman: Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Multiple Sclerosis* 1998;4:413-418.
8. B. Kalman and H. Alder: Is the mitochondrial DNA involved in determining susceptibility to multiple sclerosis? *Acta Neurol Scand* 1998;98:232-237.
9. O. Vladimirova, F. Lu, L. Shawver, B. Kalman: The activation of protein kinase C induces higher production of reactive oxygen species by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis than in controls. *Inflammation Research* 1999;48:412-416.
10. Kalman B and Lublin FD: Genetics of multiple sclerosis. *Dossier: Multiple Sclerosis. Biomedicine and Pharmacotherapy* 1999;53:358-370.
11. Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, Kalman B. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000;177:95-103.
12. B. Kalman and F.D. Lublin: Spectrum and classification of inflammatory demyelinating diseases of the CNS. *Curr Neurol Neurosci Reports* 2001;1:249-256.
- (13). S. Hansrote, M. Selak, S. Croul, B. Kalman, R.J. Schwartzman: External ophthalmoplegia with severe multiorgan involvement associated with the A3243G mtDNA mutation. *J Neurol Sci* 2002;197:63-67.
14. B. Kalman and R.N. Mandler: Studies on mitochondrial (mt)DNA in Devic's disease reveal no pathogenic mutations but polymorphisms also found in association with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2002;51:661-662.
15. B. Kalman, R.H. Albert, T.P. Leist: Genetics of multiple sclerosis: Determinants of autoimmunity and neurodegeneration. *Autoimmunity*. 2002;35:225-234.
16. B. Kalman, T.P. Leist: A mitochondrial component of neurodegeneration in multiple sclerosis. *NeuroMolecular Medicine*. 2003;3:147-157.
17. T. Vyshkina, T.P. Leist, Y.Y. Shugart, B. Kalman: CD45 (PTPRC) as a candidate gene in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2004;10:614-617.
18. I. Banisor, B. Kalman: Bcl-2 and its homologues in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2004;10:176-181.
19. D.A. Dymnt, A.D. Sadovnick, Willer C.J., Armstrong H., Z.M. Cader, S. Wiltshire, B. Kalman, N. Risch, G. Ebers: An extended genome scan in 442 Canadian multiple sclerosis affected sibships: a report from the Canadian Collaborative Study Group. *Human Molecular Genetics* 2004;13:1005-1015.

- (20). Kalman B, Leist TP: Familial multiple sclerosis and other inherited diseases of the white matter. *The Neurologist*. 2004;10:201-215.
21. T. Vyshkina, Y. Yao Shugart, G. Birnbaum, T.P. Leist, B. Kalman: Association of haplotypes in the β -chemokine locus with multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet* 2005;13:240-247.
22. T. Vyshkina, I. Banisor, Y. Yao Shugart, T.P. Leist, B. Kalman: Genetic variants of Complex I in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2005;228:55-64.
23. I. Banisor, T.P. Leist, B. Kalman: Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J Neuroinflammation* 2005;7:2. epub
24. T. Vyshkina, B. Kalman: Haplotypes within genes of β -chemokines are associated with multiple sclerosis: a second phase study. *Human Genetics* 2005;118:67-75.
25. B. Kalman: Role of Mitochondria in MS. In: *Current Neurology and Neuroscience Report*. Section: Demyelinating Disorders. Invited paper. 2006;6:244-252.
26. T. Vyshkina, B. Kalman: Analyses of a MS-associated haplotype encompassing the CCL3 gene. *J Neuroimmunol* 2006;176:216-218.
27. B. Kalman, K. Laitinen, S. Komoly: The involvement of mitochondria in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2007;188 (1-2):1-12.
28. A. Blokhin, T. Vyshkina, S. Komoly, B. Kalman: Lack of mitochondrial DNA deletions in lesion of multiple sclerosis. *NeuroMolecular Medicine*. 2008;10:187-94.
29. A. Blokhin, T. Vyshkina, S. Komoly, B. Kalman: Variations in mitochondrial DNA copy numbers in MS brains. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008;35:283-287
30. T. Vyshkina, A. Sylvester, S. Sadiq, E. Bonita, A. Perl, B. Kalman: CCL genes in multiple sclerosis and lupus erythematosus. *J Neuroimmunol* 2008;200:145-152.
31. T. Vyshkina, B. Kalman: Autoantibodies and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Lab Invest* 2008;88:796-807.
32. T. Vyshkina, A. Sylvester, S. Sadiq, E. Bonilla, J.A. Canter, A. Perl, B. Kalman: Association of Common Mitochondrial DNA Variants with Multiple Sclerosis and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Immunol* 2008;129:31-35.
33. B. Kalman and E. Vitale: Chromosomal structural variations in neurological disorders. *The Neurologist* 2009;15(5):245-53.
- (34) Könyvfejezet: B. Kalman, D. Chatterjee, F. Lu, H. Alder: Mitochondrial DNA variants in multiple sclerosis. In: *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical and Therapeutic Aspects in Human Health and Diseases*. Eds. Joe Marwah, Raj K. Chopra, Manuchair Ebadi Prominent Press, 2001;351-366.
35. Könyv: Kalman B and Brannagan TH III (Eds): *Neuroimmunology in Clinical Practice*. Blackwell, 2007.