

**PhD értekezés**

**TERMÉSZETES ANTITESTEK EPITÓP TÉRKÉPEZÉSE**

**Dr. Czömpöly Tamás**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**

Témavezető: Prof. Dr. Németh Péter

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar, Immunológiai és  
Biotechnológiai Intézet

**P é c s**

**2006**

## Összefoglalás

Az evolúciós szempontból ősbibb, veleszületett immunitás nem klonális eloszlású, működése során polispecifikus felismerő molekulákat használ. A később megjelent, adaptív felismerő rendszer klonális eloszlású, nagyfokú variabilitást mutató antigén receptorokat expresszáló sejteket használ. A természetes antitesteket (nAb) termelő B-1 B sejteket a veleszületett és az adaptív immunitás közti evolúciós átmenetnek tartjuk. A nAb-ok olyan immunglobulinok, amelyek az antigénnel való találkozás nélkül is termelődnek. A nAb-ok képesek idegen célmolekulák felismerésére és így részt vehetnek az immunológiai védekezés első vonalában egy fertőzés során. Az egészséges emberek és szisztémás autoimmun betegségben szenvedők szérumában egyaránt jelen lévő természetes autoantitestek (nAAb) evolúciós szempontból konzervált saját struktúrákat ismernek fel. Endoszimbiotikus evolúciós eredetük miatt a mitokondriumba kompartmentalizálódott fehérjék egy érdekes átmenetet képeznek a prokarióta idegentől (nem-saját) a nélkülözhetetlen (saját) molekulák felé.

A jelen munka azokat a vizsgálatainkat foglalja össze, melynek során kimutattuk a citrát szintáz (CS) felismerő nAAb-ok jelenlétét. Megvizsgáltuk a „veleszületett-szerű” (*innate like*) és az „autoreaktív” nAb-ok által felismert epitópok lehetséges átfedéseit, valamint tanulmányoztuk a fiziológiás autoreaktivitás változásait patológiás autoimmun állapotokban.

Az epitóp térképezés elvégzéséhez beállítottunk egy filamentózus bakteriofág alapú random peptid könyvtár technikát. A metodika optimalizálásához modellként (a hepatitis B vírus X antigénjét és az egér CD45 molekulát felismerő) monoklonális ellenanyagokat használtunk. A keringő autoantitestek további térképezéséhez létrehoztunk egy lambda fág alapú CS antigén fragmens könyvtárat. Párhuzamos módszerként szintetikus, átfedő dekapeptidekből kialakított, immunszerológiai tesztrendszert alkalmaztunk.

IgM izotípusú nAAb-okat tudtunk kimutatni a mitokondriális belső membrán CS enzim - átfedő szintetikus peptidek és fág felszínen megjelenített könyvtárak használatával, egészséges egyének és szisztémás autoimmun (SLE-s) betegek szérumaival végzett - epitóp térképezése során. Eredményeink szerint - miközben nincs a CS molekulának kizárólag az egészséges egyének vagy az SLE-s betegek által felismert kitüntetett része - az epitópok finom mintázata eltérő a két vizsgált csoportban. Megvizsgáltuk a keresztreaktív epitópokat a humán CS-on, a bakteriális CS-on, valamint különböző standard autoantigéneken. A humán és a bakteriális CS között három keresztreaktív epitópot találtunk, valamint azonosítottunk egy keresztreaktív antigén determinánst a nukleoszóma antigéneken.

Az anti-CS nAAb-ok - a nAb hálózatban való részvételük miatt - szerepet játszhatnak a „veleszületett-szerű” védekezési mechanizmusokban, és egyúttal felismerhetik egy szisztémás autoimmun betegség cél antigénjét (a nukleoszóma antigént). Tehát a felismerésre kerülő epitópok szintjén egy lehetséges új kapcsolat áll fenn a humorális immunrendszer veleszületett-szerű része valamint az adaptív-autoimmun része között. Hipotézisünk szerint a nAbok egyes képviselői antigén felismerő tulajdonságaikat tekintve a veleszületett immunitás nem klonális eloszlást mutató mintázatfelismerő receptorait idézik. Ezzel funkcionális kapcsolatot teremtenek az immunrendszer evolúciós szempontból ősbibb és a törzsfajlás során később megjelent kompartmentjei között, a védekező mechanizmusok fejlődésének folyamatos jellegét sugallva.

## Bevezetés

A környezetben található mikroorganizmusok a külső és belső epitheliális felszíneken keresztül folyamatosan kapcsolatba kerülnek az emberi szervezettel. Az evolúció során minden többsejtű élőlény kifejlesztett olyan védekező mechanizmusokat, amelyek képesek ezen patogének eliminálására anélkül, hogy károsítanák a saját struktúrákat. Következésképp a saját és nem-saját közti különbségtétel kulcsfontosságú az immunológiai funkciók irányításában, amely funkciók különböző felismerő rendszereken alapulva működnek: ezek a veleszületett és az adaptív felismerő rendszer. Ez a két rendszer számos fontos funkcióban eltér egymástól, továbbá együttműködésük nélkülözhetetlen az immunológiai védekezés megfelelő működéséhez. Az evolúciós szempontból régebbi veleszületett és az újabban kialakult adaptív rendszereket összekötő hídként a közelmúltban leírásra került az immunológiai folyamatok egy harmadik csoportja is a természetes immunrendszer.

A veleszületett immunitás a patogének elleni védekezés első vonalában játszik szerepet. Korai evolúciós megjelenésére minden többsejtű élőlényben, beleértve a növényeket, gerincteleneket és gerinceseket, való jelenléte utal. A veleszületett immunitás evolúciós szempontból ősi receptorokat használ. Ezeknek a nem-klonális eloszlású receptoroknak a patogénekhez társuló molekulák széles körét kell felismerniük a saját-struktúrák károsítása nélkül. A patogénekhez társuló molekuláris mintázatok (PAMP) a mikrobiális metabolizmus konzervált termékei és nélkülözhetetlenek a mikroba túléléséhez. Az ezen PAMP-okat felismerő receptorokat mintázatfelismerő receptoroknak (PRR) nevezzük. A PRR-ek három funkcionális csoportját különítjük el: endocitózisra képes receptorok, úgymint a C-típusú lektinek, szekretált fehérjék mint pl. a mannóz kötő lektin, valamint harmadik csoportként a Toll-like receptorokat (TLR).

A PAMP-ok több PRR célmolekulái között is szerepelnek. A PRR-ek olyan, az első vonal béli védekezés helyeire stratégiaileg lokalizált, sejteken expresszálódnak mint a felszíni hám, a lép marginális zónája, valamint antigén prezentáló sejteken (APC), úgymint a makrofágok és a dendritikus sejtek.

Fontos itt megjegyezni, hogy a TLR család tagjai által felismert ligandok széles köre magában foglalja a glikoproteineket, ami az adaptív felismerő rendszer felé mutat. Így a TLR család lehetséges, hogy egy fontos mérföldkövet jelent az adaptív immunitásra jellemző felismerő rendszer felé.

A PAMP-ok felismerése által okozott egyik legfontosabb esemény a CD80 (B7.1) és a CD86 (B7.2) kostimulációs molekulák sejt felszíni expressziójának fokozódása az APC-k felszínén, ami a T-dependens adaptív immunválaszok elindításához szükséges. Ezért a veleszületett immunitás mellett, hogy közvetlen első vonal béli védekező mechanizmusokat aktivál, jelentősen hozzájárul az adaptív válaszhoz is.

Az antigén specifikus immunológiai védekezésre elkötelezett sejtek (T és B sejtek) számára megfelelő mikrokörnyezetet biztosító specializált nyirokszerveket (csontvelő, thymus, lép, nyirokcsomók, a száraz és nedves testfelszíneken található szervezett nyirokszövetek) tartalmazó adaptív immunrendszer az evolúció során később jelent meg. Az adaptív immunitás a gerincesekben a felismerő molekulák gyakorlatilag végtelen készletét hozza létre: a T és B-sejt receptorokat, ez a repertoár lehetővé teszi az egyes egyedek adaptációját a patogének általi kihívásokhoz.

Az adaptív immunitásban rendelkezésre álló nagyszámú antigén receptorral járó előny, a saját-struktúrák potenciálisan káros felismerésének kockázatával jár együtt, ami autoimmunitáshoz vezethet. Ezért gondosan szervezett szelekciós mechanizmusok működnek a potenciálisan hasznos klónok kiválasztására és az autoreaktív klónok eliminálására vagy inaktiválására.

Mivel a veleszületett felismerő rendszer tökéletesen különbözteti meg a saját és a nem-saját struktúrákat, a veleszületett immunitás részvétele az adaptív válaszok aktiválásában alapvető fontosságú a perifériás tolerancia fenntartásában.

## **Természetes immunrendszer**

A közelmúltban leírásra került egy jól körülhatárolt immunológiai mechanizmus a veleszületett és az adaptív immunrendszer között. A limfociták jellemző fenotípusú és specializált funkciójú meghatározott csoportjai - T és B sejtek egyaránt – részt vesznek ebben a rendszerben. A B1 B sejtek és a  $\gamma\delta$ T sejtek intenzív kutatás tárgyát képezik egérben és emberben egyaránt. Ezek a sejt alcsoportok közös fenotípusos sajátosságokat mutatnak valamint rendelkeznek a veleszületett és az adaptív rendszerekre jellemző tulajdonságokkal, ami egy átmeneti állapotra utal az immunrendszer evolúciója során. A  $\gamma\delta$ T és a B1 B sejtek antigén felismerésének funkcionális jellemzői (valamint a B1 B sejtek által termelt immunglobulinok) közelebb állnak a mintázat felismerő receptorok tulajdonságaihoz, mint a klasszikus adaptív típusú immunológiai felismeréshez, a felismerő receptorok azonban klasszikus T és B-sejt receptorok.

### **B1 B sejtek**

A perifériás naiv B sejt készlet három különböző alcsoportra osztható: érett folliculáris B sejtek, marginális zóna B sejtek és B1 B sejtek. A folliculáris B sejtek a T-dependens centrum germinativum válaszokban vesznek részt, míg a marginális zóna B sejtek, speciális anatómiai elhelyezkedésük miatt, a véráram útján érkező patogénekre válaszolnak T-independens módon. Mivel a marginális zóna B sejtek nagy mennyiségben expresszálják a CD80 és CD86 kostimulációs molekulákat, prezentálhatják a véráram útján érkező antigéneket a T sejtek számára, így részt vehetnek a T-dependens válaszokban is. Továbbá a folliculusok irányába antigén transzportáló sejtnek is működhetnek.

Eredetileg a B1 B sejteket azok CD5 expressziója, egy korábban T sejt specifikusnak tartott glikoprotein marker, alapján különítették el a B2 sejtektől. Később egy CD5<sup>-</sup> B1 B csoport is azonosításra került, amit B1b B sejteknek nevezünk. A két B1 B sejt alcsoport funkciójáról és fejlődési igényeiről kevés adat áll rendelkezésre, azonban, úgy tűnik, hogy a BCR/CD19 komplex alapvető fontosságú a B1a és a B1b sejtek közti fejlődési döntésekben. A sejt felszíni fenotípus mellett a B1 B sejtek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, ami megkülönbözteti őket a konvencionális B2 sejtektől. A B1 B sejtek egy önmegújításra képes populációt jelentenek, nagy számban található meg a peritoneális és a pleurális üregekben, miközben gyakorlatilag hiányoznak a perifériás nyirokcsomókból és alacsony számban található meg a lépben. In vitro hosszú életűek, forból észterekkel proliferációra bírhatók, a BCR keresztképzésével aktiválhatók. A B1 B sejtek immunglobulin repertoárja korlátozott a felhasznált immunglobulin gének számában, a J-proximális V gének átrendeződése dominál és jelentősen kevesebb N inzerciót tartalmaz mint a B2 sejté.

A B1a sejtek funkciói magukban foglalják az immunválasz korai szakaszában való részvételt és legfontosabban a természetes antitestek termelését, amit az is alátámaszt, hogy a besugározott egérbe adoptív transzferrel átvitt B1 sejtek visszaállítják a normális IgM szintet. Ezek az adatok valamint a B1 B sejtek által termelt természetes antitestek tulajdonságai arra utalnak, hogy a B1 B sejtek egy evolúciós átmenetet képviselnek a veleszületett és az adaptív immunitás között.

### **Természetes antitestek és természetes autoantitestek**

A természetes antitestek (nAb) főként IgM izotípusú immunglobulinok, amelyeket a B1 B sejtek termelnek az antigénnel való immunizálás nélkül. Ezek az antitestek felismerhetnek genetikailag konzervált patogén szekvenciákat és így részt vehetnek a fertőzések során bekövetkező védekezés első vonalában. Ezzel szemben az egészségesek és szisztémás autoimmun betegségben szenvedők szérumában egyaránt megtalálható természetes autoantitestek (nAAb) az evolúció során konzervált saját struktúrákat ismernek fel. A nAAB-ok többsége IgM vagy IgG izotípusú, polireaktív és széles tartományú affinitást mutat a felismert epitópokhoz. A nAAB-ok számára számos funkciót javasoltak: részt vehetnek az immunológiai repertoárok szelekciójában, szerepet játszhatnak az elsődleges immunválasz felgyorsításában, elősegíthetik az apoptotikus sejtek eltakarítását, gyulladás gátló hatásuk lehet, valamint hozzájárulhatnak az immunrendszer egyensúlyának fenntartásához. A nAb-ok

megkülönböztetése a nAAb-októl kissé mesterkéltnek tűnhet, mivel a természetes antitestek termelésének háttérében álló B1 immunoglobulin gén készlet korlátozottsága valamint a nagy számú felismert antigén miatt, valószínű, hogy jelen vannak saját nem-saját keresztreakciót mutató specificitások.

### **Mitokondriális belső membrán enzimek**

Az élő sejt alapvető összetevői úgymint a citoszkeleton, metabolikus organellek, transzporterek, a transzkripció és a transláció molekuláris összetevői stb. genetikailag konzerváltak. Az ezen struktúrákkal szembeni immunológiai tolerancia fenntartása alapvető funkcionális feladata az immunrendszer mindhárom részének. A mitokondrium nélkülözhetetlen az eukarióta sejt működéséhez. A mitokondriális fehérjéket befolyásoló genetikai elváltozások, amennyiben a mutáció egyáltalán összeegyeztethető az élettel, súlyos következményekkel járnak. Endoszimbiotikus evolúciós eredetük miatt a mitokondriumba kompartmentalizálódott fehérjék egy érdekes átmenetet képeznek a prokarióta idegentől a nélkülözhetetlen saját molekulák felé. Ez ideig korlátozott azon a nAAb-ok által felismert humán antigéneken végezett epitóp térképezésre irányuló vizsgálatok száma. Különösen kevés adat ismert a veleszületett és a saját struktúrákkal reagáló nAb-ok által felismert epitópok közti lehetséges átfedésekről.

A mitokondriális összetevők szerkezeti és funkcionális konzerváltsága kijelölt antigénné teszi azokat a veleszületett és az adaptív immunválaszok közti evolúciós kapcsolatok részletes vizsgálatára. A primer biliáris cirrhosis kivételével nem ismert klasszikusan a mitokondriumot célzó autoimmun betegség, ami jól megalapozott toleranciára utal a veleszületett és az adaptív szinten egyaránt. A belső membrán enzimek, különösen a citrát kör enzimek (közülük is a citrát szintáz (CS)) megfelelő modellt jelentenek immunoreaktivitásuk vizsgálatára, mivel a sejtek fiziológias körforgása során folyamatos kapcsolatba kerülnek a veleszületett és az adaptív komponensekkel egyaránt. Ezen molekulák immunológiai felismerése és a velük szembeni immunoreaktivitás kevésbé tanulmányozott, valamint jórészt ismeretlen a fiziológias autoreaktivitás változása patológias autoimmun állapotokban.

### **Az értekezés célkitűzései**

1. A bakteriofág felszínen megjelenített random peptid könyvtár technika beállítása keringő ellenanyagok epitóp térképezésére.
2. nAAb-ok kimutatása egészséges egyének valamint szisztémás autoimmun betegségben szenvedő betegek szérumából.
3. Az anti-CS nAAb-ok affinitás tisztítása után különböző mitokondriális belső membrán enzimekkel, bakteriális CS-al, valamint ismert autoantigénekkal mutatott keresztreaktivitásuk vizsgálata.
4. Lambda fág felszínen megjelenített CS antigén fragmens könyvtár létrehozása.
5. Az anti-CS nAAb-ok által felismert epitópok összehasonlítása egészséges egyéneken és szisztémás autoimmun betegségben (SLE) szenvedő betegekben.

## Módszerek

### Betegek és kontroll szérumok

Ebben a munkában egészséges egyének szérum mintái: 63 magyar véradó a pécsi Baranya Megyei Vértranszfúziós Állomástól; 51 brit véradó és 176 finn véradó standardizált mintái (Prof. Füst György és Dr. Prohászka Zoltán, SOTE III. Belgyógyászat, által rendelkezésünkre bocsátva); 44 egészséges újszülött a pécsi Gyermekgyógyászati Klinikáról; valamint szisztémás autoimmun betegek mintái: 326 klinikailag jól dokumentált szisztémás lupus erythematosus-ban (SLE), rheumatoid arthritis-ben, differenciálatlan kötőszöveti betegségben, polymyositisben/dermatomyositisben, szisztémás szklerózisban, Raynaud szindrómában és Sjögren szindrómában szenvedő beteg a pécsi Immunológiai és Reumatológiai Klinikáról, kerültek felhasználásra a Pécsi Tudományegyetem OEC Etikai Bizottságának engedélyével.

### Mitokondriális enzim specifikus autoantitestek detektálása ELISA-val

96-lyukú mikrotiter lemezeket sertés szívből származó citrát szintázal (CS, EC 2.3.3.1), malát dehidrogenázal (MDH; EC 1.1.1.37) és piruvát dehidrogenázal (PDH; EC 1.2.4.1) érzékenyítettünk 0.1M karbonát pufferben. A nem-specifikus kötőhelyek 0.5% zselatinnal való telítése után mosó pufferben 1:100 hígításban triplikátumban inkubáltuk a szérummintákat 1 órán át. Végül HRPO-konjugált anti-humán-IgA, vagy -IgG, vagy -IgM specifikus másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a lemezeket 1 órán át. A reakciót o-feniléndiaminnal hívtuk elő és 492 nm-en mértük le. A küszöbértékeket minden vizsgált csoport esetében a mért OD492 adatokból számítottuk. Az átlagot 2SD-vel meghaladó OD-vel rendelkező szérumokat tekintettük pozitívnak. Minden mérést az általunk korábban kifejlesztett monoklonális anti-CS antitesttel standardizáltunk (klón 4H3E5).

### Szérumok affinitás tisztítása CS-on

A sertés szívből származó CS-t cianogén-bromid aktivált sepharose 4B-hez kötöttük. 30 egészséges és 14 autoimmun beteg 15 ml szérumát háromszor engedték át a CS-sepharose gyantán. Mosás után az antitesteket pH 2.5 glicib-HCL-el eluáltuk, a frakciókat 1 M TRIS-el neutralizáltuk, majd indirekt ELISA-val teszteltük CS reaktivitásukat HRPO-konjugált anti-humán-IgA, vagy -IgG, vagy -IgM specifikus másodlagos ellenanyagokat használva.

### A CS-on affinitás tisztított szérumok keresztreaktivitásának vizsgálata

A más mitokondriális enzimekkel való keresztreaktivitást indirekt ELISA-val vizsgáltuk sertés szívből származó MDH-t és PDH-t használva antigénként.

Az E.coli CS-al való reaktivitást túhegyre szintetizált dekapeptidekkel vizsgáltuk a korábban leírtak szerint.

A különböző autoimmun betegségekben szerepet játszó autoantigének felismerését kvantitatív mérésekre kifejlesztett indirekt ELISA rendszerekkel vizsgáltuk a következő antigéneken: kettős szálú DNS, nukleoszóma, Cenp-B, MPO, PR3, alfa-fodrin, gyomor parietális sejt, intrinsic faktor, Asca, gliadin, szöveti transzglutamináz, kardiolipin,  $\beta$ 2-glikoprotein-1, foszfamidil szerin, prothrombin, Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70, Jo-1, CCP, thyreoglobulin, glomeruláris bazálmembrán.

### Immuncitokémia

Az SLE-s betegekből affinitás tisztított anti-CS szérumokkal Hep-2 sejteken végzetünk immuncitokémiát. A lemezeket PBS-ben 1:100 hígított szérumokkal inkubáltuk 30 percig. 3x5 perc mosás után PBS-ben 1:100 hígított nyúl anti-humán IgM másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a lemezeket 30 percig. Mosás után a kötődött antitesteket egy kecske anti-nyúl FITC konjugátummal tettük láthatóvá.

### **A random peptid könyvtár szelekciója**

A pVIII M13 köpenyfehérje N-terminálisához fuzionált kilenc aminosavas random peptideket megjelenítő filamentózus fág könyvtárat korábban hozták létre. A technika beállítására először két, a hepatitis B vírus X antigénje (HBX) és az egér CD45 molekula ellen kifejlesztett (IBL-8 mAb), mAb-al végeztük a szelekciót. Az SLE-s betegekben affinitás tisztított anti-CS szérumokkal a biopanning technikát használva végeztük a szelekciót. Mikrotiter lemezeket érzékenyítettünk a mAb-okkal vagy az affinitás tisztított anti-CS szérumokkal (40 µg/ml az első és 4 µg/ml a második és harmadik dúsítási ciklusban). Mosás és blokkolás után  $10^{10}$  fágot adtunk a rendszerhez és 2 órán át inkubáltuk. Mosás után a kötődött fágokat eluáltuk, majd neutralizálás után 10 ml E.coli XL1-Blue kultúrát fertőztünk velük és ampicillin tartalmú LB agar lemezekre vittük fel a baktériumokat. A következő nap a telepeket lekapartuk a lemezről és 10 ml LB médiumban reszuszpendáltuk azokat, majd  $10^{11}$  M13KO7 helper faggal felülfertőztük a kultúrát. Éjjel át taró 37 °C-on való inkubáció után a fágokat kicsapással tisztítottuk. A dúsítást minden szelekciós lépés után fág pool-okon elvégzett indirekt ELISA-val követtük. A harmadik dúsítási ciklus után véletlenszerűen kiválasztott klónokat vettünk fel és indirekt ELISA-val teszteltük a szelektáló szérummal mutatatott reaktivitásukat. Az ELISA eredmények alapján 40 klónt választottunk ki DNS szekvenálásra.

### **A rekombináns átfedő HBX fragmentumok előállítása**

A HBX gén három átfedő szakaszát PCR-el amplifikáltuk BamHI és EcoRI restrikciós helyeket tartalmazó primereket használva. A fragmenseket a pGEX-6P-1 expressziós vektorba klónoztuk. Minden konstrukciót szekvenálással ellenőrizünk. A fúziós fehérjét E.coli DH5-alfában expresszáltuk, majd egy glutatation S-transzferáz (GST)-glutacion affinitás oszlopot módosításokkal használva megtisztítottuk a rekombináns fehérjét.

### **Áramlási citometria**

A feltételezett IBL-8 epitópot hordozó fágok gátló hatását kicsapással tisztított fágokkal vizsgáltuk. A fágokat ( $10^{11}$ /ml) 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 µg/ml tisztított mAb-al 100 µl végtérfogatban, majd a fág-mAb keveréket 50 µl nyirokcsomó sejtuszpenzióhoz ( $5 \times 10^6$  sejt/ml) adtuk. 20 perces jégen való inkubáció után, a sejteket mostuk, majd phykoerithrin konjugált kecske anti-patkány IgG ellenanyaggal inkubáltuk őket. A reakciót ismételt mosással állítottuk le, a sejteket fixáltuk, majd áramlási citométerrel analizáltuk. A következő kontrollokat alkalmaztuk: CD45RA/B220 mAb az IBL-8 mAb helyett, és M13 fágok az IBL-8 epitópot expresszáló fágok helyett.

### **A CS antigén fragmens könyvtár létrehozása**

Egy egészséges véradó perifériás véréből tisztított  $3 \times 10^6$  mononukleáris sejtől RNS-t izoláltunk. 5 µg totál RNS-el reverz transzkripciót végeztünk Superscript II RT enzimet használva. A teljes hosszú humán mitokondriális citrát szintáz kódoló cDNS-t a következő primerekkel amplifikáltuk: 5'-ATGGCTTACTTACTGC GGC-3' és 5'-TTACCCTGACTTAGAGTCCAC-3'. A PCR reakció 100 µl végtérfogatban a következőket tartalmazta: 300mM mindegyik dNTP-ből, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 µM mindegyik primerből, 5 µl cDNS és 5 unit ProofStart DNS polimeráz; az amplifikációt a következő profillal végeztük: 95 C 5min, majd 35 ciklus: 95 C 1min, 51 C 30s, 72 C 2min, végső extenzió: 72 C 10 min. A PCR terméket 1.5%-os agaróz gélen választottuk el, majd megtisztítottuk. A-addíció után T/A vektorba klónoztuk. Az inzertet szekvenálással ellenőriztük.

A könyvtár létrehozását a lambdaD-bio fág display vektor (Dr. Alessandra Luzzago által rendelkezésünkre bocsátva; Instituto di Ricerche di Biologia Molecolare, Olaszország ) felhasználásával a végeztük. Az inzerteket SpeI és NotI helyeket tartalmazó random primerek valamint templátként a fent említett plazmidból BamHI és EcoRI emésztéssel kivágott CS cDNS felhasználásával állítottuk elő. Tisztítás és méret szelekció után az inzerteket SpeI és NotI enzimekkel emésztettük.

Húsz ligációs reakciót állítottunk össze, amelyek mindegyike 1 µg SpeI/NotI emésztett lambdaD-bio DNS-t, 25 ng SpeI/NotI emésztett inzertet és 30U T4 DNS ligázt tartalmazott 5µl végtérfogóban, majd 48 órán át 4C –on inkubáltuk. A ligációs reakciót ezután fenol-kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, majd lambda fág részecskébe csomagoltuk. A lambda fágokat log fázisú E.coli BB4 fertőzésével és LB agar lemezekre való felvitelével amplifikáltuk. A plakkok kialakulása után a fágokat eluáltuk, kicsapással koncentráltuk, és proteáz gátlókat tartalmazó pufferben reszuszpendáltuk.

### **A CS antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója**

Az affinitás tisztított anti-CS szérumokkal vagy az anti-CS mAb 4H3E5-el mikrotiter lemezeket érzékenyítettünk 10 µg/ml koncentrációban. Blokkolás után  $10^{10}$  fággal inkubáltuk a lemezeket 2 órán át. A lyukakat ötször mostuk, majd a kötődött fágokat, E.coli BB4 sejteknek a lyukakban történő megfertőzésével, visszanyertük. A fertőzött baktériumokat LB agar lemezekre vittük fel, majd a fágokat a fent ismertetett módon eluáltuk és koncentráltuk. Az affinitás szelekciót még egyszer megismételtük, majd egyedi klónokat választottunk ki DNS szekvenálásra.

## **Eredmények és megbeszélésük**

### **A bakteriofág felszínen megjelenített random peptid könyvtár technika beállítása**

A bakteriofág felszínen megjelenített random peptid könyvtár technika beállításához, a könyvtár szelekcióját kezdetben két monoklonális ellenanyagunkkal (mAb) végeztük, amelyeket az egér CD45 molekulával valamint a hepatitis B vírus X antigénjével szemben állítottunk elő. A CD45, egy transzmembrán foszfortirozin foszfatáz, egyike a leukociták által legnagyobb mennyiségben expresszált glikoproteineknek. A molekula N-terminális közeli exonjainak alternatív splicingja és változó expressziója eltérő, erősen glikozilált, extracelluláris izoformák megjelenéséhez vezet a különböző érési állapotú és különböző funkcionális tulajdonságokkal rendelkező sejteken. Célunk a C exonnal szembeni új patkány mAb-unk (IBL-8) epitópjának térképezése volt, valamint az IBL-8 felhasználásával a CD45RC izoforma expressziós mintázatának meghatározása érett és éretlen egér B sejteken. A 20 szekvenált klón között, két kismértékben eltérő nonapeptideket expresszáló csoportot azonosítottunk. A klónok ezen két csoportja aminosav sorrendjének a CD45 molekula primer szekvenciájával való összevetése a 136-144. aminosavban (ADTAFPVDT) jelöli meg az IBL-8 által felismert epitópot. Ez a szekvencia az egér CD45 molekula C exonjában található. A cA3 és a cB6 fágokkal, mint a két csoport jellegzetes képviselőivel, való előinkubáció teljes mértékben meggátolta a natív antigén IBL-8 általi felismerését.

Kutatási és diagnosztikai felhasználásra több mAb-ot fejlesztettünk ki a hepatitis B vírus X antigénje (HBX) ellen. A hepatitis B vírus (HBV) fontos etiológiai tényező a krónikus hepatitis, a cirrhosis és a hepatocelluláris karcinóma kialakulásában. A HBV genom legkisebb olvasási kerete, az X, egy 154 aminosav hosszúságú, 17 kDA-os, erősen hidrofób és számos diszulfid kötést tartalmazó fehérjét kódol. A HBX egy olyan multifunkcionális szabályozó fehérje, amely szabályozza a transzkripciót, a genotoxikus stresszre adott sejtválaszokat, a protein degradációt, valamint hatással van a jelátviteli utakra, azonban a HBX precíz funkciója nem teljesen ismert. Az immunizáláshoz valamint az azt követő teszteléshez glutatation S-transzferázhoz (GST) fuzionált rekombináns HBX fehérjét használtunk. Az újonnan előállított mAb-ok finom epitóp specificitását nem ismertük. A további alkalmazásokhoz azonban fontos volt megismernünk az ezen antitestek epitóp specificitására vonatkozó információkat.

Immunoblot és ELISA vizsgálatok alapján tíz klónt választottunk ki DNS szekvenálásra. Ezen klónok aminosav sorrendjének összevetése alapján az LPxxLH konszenzus szekvenciát kaptuk. Ez a szekvencia megtalálható a HBX primer szekvenciájában (88-93. aminosav).



A random peptid könyvtárral kapott eredmény megerősítésére, létrehoztunk három, a HBX 77-142. aminosavait átfogó, átfedő GST fúziós peptidet. Az anti-HBX mAb kizárólag a 77-116. aminosavaknak megfelelő peptidet ismerte fel. A 96-135. aminosavakat valamint a 116-142. aminosavakat tartalmazó szakaszok nem mutattak reaktivitást. A rekombináns HBX szakaszok összevetése alapján kizárólag a 77-95. aminosavig terjedő szekvencia tartalmazhatja az anti-HBX mAb által kötött epitópot. Ez a számítás alátámasztja a random peptid könyvtár szelekciójával kapott eredményt.

Összefoglalva, egy filamentózus bakteriofág felszínén megjelenített random peptid könyvtárat használtunk két mAb-unk epitóptérképezésére. A technika jó megközelítésnek bizonyult mind egy sejtfelszíni molekula (CD45) mind pedig egy speciális fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkező fehérje lineáris epitópjainak térképezésére.

### **Anti-mitokondriális, enzim specifikus ellenanyagok egészséges egyénekben és szisztémás autoimmun betegekben**

ELISA technika használatával, egészséges egyének és szisztémás autoimmun betegek szérumban egyaránt kimutattuk a CS-t, MDH-t és PDC-t felismerő antitestek jelenlétét. Izotípus specifikus ELISA alapján az IgM izotípusú enzim specifikus antitestek gyakrabban vannak jelen az összes vizsgált alcsoportban, mint az IgG vagy IgA izotípusúak. Az egészséges egyének alcsoportjai között nem találtunk különbséget; azonban az anti-CS és anti-MDH antitestek előfordulási gyakorisága jelentősen magasabb volt az autoimmun betegekben, mint az egészséges kontrollokban.

Vizsgálatainkat a CS specifikus IgM izotípusú autoantitestekkel folytattuk, mivel ez a csoport mutatta a legjellegzetesebb mintázatú eloszlást. Egy 5 éves periódus alatt minimálisan 3 ismételt mintagyűjtéssel követtük az anti-CS IgM autoantitestek titerét 53, brit és magyar véradók közül kiválasztott, egészséges egyénben. Eredményeink szerint az egyedi szérumok CS reaktivitása állandó maradt ez alatt az időszak alatt.

Eredményeink, miszerint ezen antitestek nagy része IgM izotípusú, már újszülöttekben is jelen van, valamint szérumban hosszú távú állandósága felnőttekben, arra utalnak, hogy ezek az ellenanyagok a korai posztnatális élet során kialakuló nAAb repertoár részei.

### **A CS reaktív szérumok affinitás tisztítása és keresztreaktivitásuk vizsgálata**

A nem-specifikus kötődések zavaró hatásának kiküszöbölésére, a további kísérletekhez affinitás kromatográfiával anti-CS antitesteket tisztítottunk 44 humán szérumból (30 egészséges és 14 autoimmun beteg: 9 SLE-s, 3 szisztémás szklerózis és 2 rheumatoid arthritis-es). Az affinitástisztítás csak azokban az esetekben járt sikerrel, amikor az aktuális szérumban kimagaslóan nagy anti-CS reaktivitást mutatott ( $OD_{492} > 1.5$ ). Az ilyen szérumokból eluált anti-CS antitestek kizárólag IgM izotípusúak voltak.

Az affinitás tisztított anti-CS antitestek más mitokondriális enzimekkel (MDH és PDC) való keresztreaktivitását indirekt ELISA-val vizsgáltuk. Az affinitás tisztított anti-CS antitestek ezek közül egyik antigént sem ismerték fel. Mivel korábbi vizsgálatok azt sugallták, hogy a természetes antitestek fontos szerepet játszanak a humorális immunválasz veleszületett immunitás szerű részében, megvizsgáltuk a lehetséges átfedéseket a nAAb-ok által felismert epitópokban az emlős és a bakteriális CS-on. A mitokondrium prokarióta eredete miatt, a CS egy vonzó célmolekula a saját-reaktív nAAb-ok azon képességének vizsgálatára, hogy epitópokat ismerjenek fel ugyanazon molekula nem-saját megfelelőjén. Ehhez az emlős CS-on affinitás tisztított szérumokat használtunk az E.coli CS-on való epitóptérképezésre, átfedő szintetikus peptid technikát használva. Mindössze három keresztreaktív szekvenciát találtunk: 124-133. aminosav: FRRDHPMAV (azonosság a humán CS-al: 40%, hasonlóság: 60%); 174-183. aminosav: MCYKYSIGQP (azonosság a humán CS-al: 30%, hasonlóság: 40%); valamint 351-360. aminosav: YFIEKKLYPN (azonosság a humán CS-al: 40%, hasonlóság: 60%). A három felismert szekvencia csak korlátozott homológiát mutat a humán CS-al, jóllehet a megfelelő pozíciókban jelen vannak esetleges horgonyzó funkcióval bíró aminosavak. Ezek az aminosavak vagy pozitív vagy poláros oldalláncokat tartalmaznak, ami összhangban van a nAAb-ok epitópjainak preferált aminosav összetételéről korábban

megjelent munkákkal. A háromdimenziós modell szerint a három peptid a molekula felszínén helyezkedik el. Továbbá a peptidek közül kettő (124-133. és 174-183.), jöllehet 50 aminosav választja el őket a primer szekvenciában, a natív fehérje szerkezeti modelljén szoros közelségben található, ami arra utal, hogy ezek ugyanannak az antigenitásért felelős régióknak felelnek meg.

Az affinitás tisztított anti-CS szérumok, különböző autoimmun betegségekben szerepet játszó autoantigénekkal való keresztreaktivitásának vizsgálatára, indirekt ELISA vizsgálatokat végeztünk kereskedelmi forgalomban kapható autoantitest kimutató rendszerekkel (a vizsgált antigének felsorolását lásd a módszerekben). Két SLE-s betegből affinitás tisztított anti-CS szérum felismerte a nukleoszóma antigént. A nukleoszóma készítményben lévő CS szennyezés lehetőségének kizárására, a 4H3E5 anti-CS mAb-unkat használtuk ugyanabban az ELISA rendszerben. Eredményeink megerősítésére kompetíciós ELISA vizsgálatokat végeztünk, kompetítorként sertés szívből tisztított CS-t használva.

További megerősítést keresve megvizsgáltuk újabb 46 SLE-s beteg szérumát CS és nukleoszóma reaktivásra, majd elvégeztük a CS affinitástisztítást a 11 kettős pozitív (magas CS és nukleoszóma reaktivitás) beteg szérumából. Az összes említett 11 CS affinitás tisztított szérum felismerte a nukleoszóma antigént, amely reaktivitás gátolható volt a CS-al végzett kompetícióval. Ezen túlmenően fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk Hep-2 sejteken. A CS affinitás tisztított SLE-s szérumok közül mindegyik alacsony-közepes festési erősséget eredményezett a magban – a nukleólusok konzekvensen negatívak voltak -, ami megfelel a nukleoszómák felismerésének. Továbbá közepes-magas intenzitású festődést találtunk a citoplazmában, ami megfelel a CS felismerésének. Eredményeink alapján keresztreaktivitás áll fenn az SLE-s betegekből származó anti-CS antitestek és a nukleoszóma antigén között.

### **A CS antigén fragmens könyvtár létrehozása**

A peptidek bakteriofág felszíni megjelenítése egy széles körben, változatos alkalmazásokra használt technika. A legáltalánosabban használt rendszerek valamely filamentózus fág köpenyfehérjéhez való fúzió alapulnak. Ezen fágok életciklusa azonban korlátozza a megjeleníthető peptidek méretét, ezért a fág felszínén megjelenített CS antigén fragmens könyvtár létrehozásához a lambda fágokat választottuk.

A könyvtár megközelítőleg  $10^7$  inzertet hordozó klónt tartalmaz. Először a 4H3E5 mAb-al elvégzett affinitás szelekcióval teszteltük a könyvtárat. A második affinitás szelekció után 30 klónt választottunk ki DNS szekvenálásra. Ezek között ismétlődően 4 szekvenciát találtunk. Ezeket a szekvenciákat a humán CS 7-65. aminosavig terjedő szakaszának feleltethetjük meg, mAb-unk minimális epitópját pedig a 31-59. aminosavakra korlátozhatjuk.

### **A CS antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója CS-on tisztított szérumokkal**

Miután megmutattuk a fág felszínén megjelenített CS antigén fragmens könyvtárunk epitóp térképezésben való használhatóságát, továbbmentünk az affinitás tisztított anti-CS szérumok epitóp térképezésére. Két ciklus affinitás szelekció után, minden szelektáló szérumnak megfelelően 20 klónt választottunk ki DNS szekvenálásra. Az anti-CS mAb-unkkal végzett szelekcióval ellentétben ezek a klónok rövid szekvenciákat hordoznak, amik szintén megfeleltethetőek a humán CS-nak. Ezek a rövid szekvenciák a humán CS szekvencia teljes hossza mentén helyezkednek el, és úgy tűnik, hogy a két szérum csoport gyakorlatilag a molekula azonos régióit ismeri fel. A fág felszínén megjelenített antigén fragmensekkel kapott eredményeink alapján, miközben nincs a CS molekulának kizárólag az egészséges egyének vagy az SLE-s betegek által felismert kitüntetett része, az epitópok finom mintázata eltérő a két vizsgált csoportban.

### **A random peptid könyvtár szelekciója CS-on tisztított szérumokkal**

Az SLE-s betegek CS affinitás tisztított szérumainak meglepő nukleoszóma keresztreaktivitását nem lehetett egyértelműen megmagyarázni sem a szintetikus peptidekkel, sem pedig a fág felszínén megjelenített antigén fragmensekkel végzett epitóp térképezés eredményeivel. Ezért elvégeztük egy kilenc aminosavas random peptid könyvtár szelekcióját

két SLE-s betegből CS affinitás tisztított szérummal. Ebben a rendszerben a random peptidek nagy kópiaszámban kerülnek megjelenítésre, megkönnyítve az esetleges alacsony affinitású interakciók azonosítását. A 40 szekvenált klón hasonló peptideket hordoz, amelyek részleges homológiát mutatnak a humán CS-al. Izoláltunk egy fág klónt (YAAPSHQSH fág#5), amely a humán CS 145-150. aminosavának megfelelő peptidet hordoz, majd kompetíciós ELISA-t végeztünk vele mind a CS-al mind pedig a nukleoszómával. Eredményeink szerint a fág#5 gátolta az SLE-s betegekben de nem az egészséges egyénekből CS affinitás tisztított szérumok CS reaktivitását. A nukleoszóma reaktivitás blokkolásának vizsgálatakor a fág#5 hatékonyan blokkolta az SLE-s betegek CS affinitás tisztított szérumainak reaktivitását. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CS-nukleoszóma keresztreaktivitást legalábbis részben olyan antitestek okozzák, amelyek a fág#5 által utánzott CS epitópot (145-150. aminosav) ismerik fel. A humán CS-on azonosított keresztreaktív epitóp (145-150.) szintén a molekula felszínén található meg. Érdekes itt megjegyezni, hogy annak a régióknak a része, amely az E.coli CS keresztreaktív determinánsok közül kettőt is tartalmaz (124-133. és 174-183.). Véleményünk szerint, a molekula ezen része (124-183.) a saját-reaktív (patológiás) és a veleszületett szerű nAAb-ok fő célpontja. Nem találtunk homológiát az izolált humán CS 145-150. peptid fragmens valamint a nukleoszóma fehérjék primer szekvenciái között, az izolált szekvencia motívum (AALPSH) azonban hidrofób és valószínűleg képes hasonló immunreaktivitás kiváltására, mint a szintén erősen hidrofób nukleoszóma fehérjék. Eredményeink felhívják a figyelmet a saját-struktúrákat felismerő hálózat olyan általános megváltozására patológiás állapotokban, amely keresztreaktív epitóp mintázatokat eredményezhet.

### **Elméleti következtetések és jövőbeli lehetőségek**

Összefoglalva, sikerrel alkalmaztunk egy filamentózus fág felszínén megjelenített random peptid könyvtárat két mAb-unk (anti-CD45RC és anti-HBX) epitóp térképezésére. Kimutattuk a CS-t felismerő nAAb-ok jelenlétét. Létrehoztunk egy lambda fág felszínén megjelenített CS antigén fragmens könyvtárat, valamint kimutattuk, hogy a CS-on talált epitóp mintázat eltérést mutat fiziológiás állapotban és patológiás (SLE) állapotban. Keresztreaktív epitópokat azonosítottunk a humán és a bakteriális CS között. Továbbá a CS affinitás tisztított szérumok keresztreaktivitását mutattunk ki a nukleoszóma antigénnel. Ezek az adatok arra utalnak, hogy elméletben egy adott saját-antigénre „specifikus” nAAb részt vehet a veleszületett-szerű védekezési mechanizmusokban, és ugyanakkor felismerheti egy szisztémás autoimmun betegség cél antigénjét. A nAb-ok termeléséhez használt immunglobulin gén repertoár korlátozottsága, ezen gének közel csíravonali szekvenciája, valamint a nAb-ok jelen munkánk során kimutatott ligand kötési promizskuitása alapján, feltételezzük, hogy a nAb-ok antigén felismerő tulajdonságaikat tekintve a bevezetőben említett mintázatfelismerő receptorokat idézik. Tehát a felismerésre kerülő epitópok szintjén egy lehetséges új kapcsolat áll fenn a humorális immunrendszer veleszületett-szerű része valamint az adaptív-autoimmun része között.

A genetikailag konzervált struktúrák különleges szerepet töltenek be a különböző biológiai szabályozásokban, beleértve a metabolizmust, az endokrin szabályozást, a sejt-sejt interakciókat, az intracelluláris jelátvitelt valamint az immunválaszt. Jól ismertek az autoimmun betegségekben célponttá váló antigének valamint a különböző patogének (vírusok és baktériumok) konzervált szekvenciái közti primer szerkezetbeli homológiák. Ez az úgynevezett „molekuláris mimikri” intenzív kutatások tárgya, azonban a fertőzések közvetlen oki szerepét az autoimmun betegségek kialakulásában csak néhány beteg esetében sikerült bizonyítani. Ezek a vizsgálatok elsősorban a primer szerkezetben lévő homológiákra koncentrálnak, azonban, - ahogy eredményeink is sugallják - az emlős antigének és a mikroorganizmusokra jellemző struktúrák közti fiziko-kémiai molekuláris megjelenésbeli hasonlóságok képezhetik a biológiai felismerés valódi szerkezeti alapját. Annak ellenére, hogy az E.coli CS és az emlős CS hosszú homológ szakaszokat tartalmaznak a primer szerkezetükben, az általunk autoantitestekkel azonosított keresztreaktív epitópok eltérő primer szekvenciát hordoznak, erősen azonos elektromos töltésű és hidrofobicitású motívumokkal.

Továbbá nem mutatható ki homológia a nukleoszóma antigén primer szerkezete és a keresztreaktív epitópként azonosított emlős CS szekvencia között. Azonban, hasonló fizikokémiai molekuláris felszínnel rendelkező aminosav csoportok valószínűleg jelen vannak, és a CS-specifikus IgM autoantitestek mindkét antigént hasonló aviditással ismerhetik fel. Eredményeink egyetértésben vannak a közelmúltban publikált adatokkal, amelyek alapvető szerepet javasolnak a konzervált antigének háromdimenziós molekuláris megjelenésének a célzó immunválaszban, valamint a toleranciában egyaránt.

Az immunválasz elindításához hasonlóan a tolerancia fenntartása is magában foglalja az immunrendszer mindhárom szintjét. A veleszületett, a természetes és az adaptív immunrendszer összetevői közti együttműködés zavara a célzó immunválasz valamint a tolerancia károsodását egyaránt eredményezheti, elősegítve az immundeficienciák és a patológiás autoimmun jelenségek kialakulását.

### **Köszönetnyilvánítás**

Először is szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Prof. Németh Péternek, hogy lehetővé tette számomra az intézetében való munkát. Szeretném megköszönni azt is, hogy mindvégig vezetőm volt ezalatt a tudományos kalandozás alatt, és hogy hitt ebben a munkában a sikerek és kudarck idején egyaránt.

Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Czirják Lászlónak az autoimmun betegek szérum mintáinak rendelkezésünkre bocsátásáért, valamint Prof. Füst György és Dr. Prohászka Zoltán uraknak a finn véradók szérum mintáiért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Alessandra Luzzago-nak a filamentózus fág random peptid könyvtár és a lambda fág vektor rendelkezésünkre bocsátásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Hudecz Ferencnek és Bősze Szilviának a multi-pin peptid szintéziséért.

Nagyon köszönöm és nagyra értékelem Olasz Katalin és Dr. Simon Diána technikai segítségét.

Végül, köszönöm a munkám során kapott segítséget az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának.

## Közlemények

### Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

**Czompoly T**, Olasz K, Simon D, Nyarady Z, Palinkas L, Czirjak L, Berki T, Nemeth P.  
A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?  
Mol Immunol. 2006 Apr;43(11):1761-8 Impact factor: 3.19

**Tamás Czömpöly**, Árpád Lábadi, Mercédesz Balázs, Péter Németh, Péter Balogh  
Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors  
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 8;307(4):791-6. Impact factor: 2.93

József Pál, **Tamás Czömpöly**, Zoltán Nyárády, Ilona Marcinovits, Tamás Janáky, Zoltán Kele, Péter Németh  
Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal antibody using microanalytical and molecular biological methods  
Mol Immunol. 2003 Sep;40(5):241-6 Impact factor: 3.19

Nyarady Z, **Czompoly T**, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, Pal J, Hudecz F, Berki T, Nemeth P  
Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies.  
Mol Immunol. 2006 Mar;43(7):830-8. Impact factor: 3.19

Pal J, Palinkas L, Nyarady Z, **Czompoly T**, Marcinovits I, Lustyik G, Saleh Ali Y, Berencsi G, Chen R, Varro R, Par A, Nemeth P.  
Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of hepatitis B virus X antigen level in human sera.  
J Immunol Methods. 2005 Nov 30; 306(1-2):183-92. Impact factor: 2.46

### Egyéb közlemények:

Kvell K, **Czompoly T**, Pikkarainen T, Balogh P.  
Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines.  
Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 24;341(4):1193-202. Impact factor: 2.93

Rekasi Z, **Czompoly T**, Schally AV, Boldizsar F, Varga JL, Zarandi M, Berki T, Horvath RA, Nemeth P.  
Antagonist of growth hormone-releasing hormone induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells through a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway.  
Proc Natl Acad Sci. USA. 2005 Mar 1;102(9):3435-40. Impact factor: 10.5

Halmos G, Schally AV, **Czompoly T**, Krupa M, Varga JL, Rekasi Z.  
Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer.  
J Clin Endocrinol Metab. 2002 Oct;87(10):4707-14. Impact factor: 5.19

Rekasi Z, **Czompoly T**.  
Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro.  
J Mol Endocrinol. 2002 Feb;28(1):19-31. Impact factor: 4.35

Rekasi Z, Schally AV, Plonowski A, **Czompoly T**, Csernus B, Varga JL.

Regulation of prostate-specific antigen (PSA) gene expression and release in LNCaP prostate cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide.

Prostate. 2001 Aug 1;48(3):188-99. Impact factor: 3.15

Rekasi Z, **Czompoly T**, Schally AV, Halmos G.

Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers.

Proc Natl Acad Sci. USA. 2000 Sep 12;97(19):10561-6. Impact factor: 10.7

Halmos G, Schally AV, Varga JL, Plonowski A, Rekasi Z, **Czompoly T**.

Human renal cell carcinoma expresses distinct binding sites for growth hormone-releasing hormone.

Proc Natl Acad Sci. USA. 2000 Sep 12;97(19):10555-60. Impact factor: 10.7

Kahan Z, Varga JL, Schally AV, Rekasi Z, Armatis P, Chatzistamou L, **Czompoly T**, Halmos G.

Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice.

Breast Cancer Res Treat. 2000 Mar;60(1):71-9. Impact factor: 3.13

Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Armatis P, Groot K, **Czompoly T**.

Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers.

Endocrinology. 2000 Jun;141(6):2120-8. Impact factor: 5.09

Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Groot K, **Czompoly T**.

Antagonistic actions of analogs related to growth hormone-releasing hormone (GHRH) on receptors for GHRH and vasoactive intestinal peptide on rat pituitary and pineal cells in vitro.

Proc Natl Acad Sci. USA. 2000 Feb 1;97(3):1218-23. Impact factor: 10.7

**PhD thesis**

**Epitope mapping of natural antibodies**

**Dr. Tamás Czömpöly**

**Department of Immunology and Biotechnology  
University of Pécs, Faculty of Medicine**

Project leader: Prof. Dr. Péter Németh

Department of Immunology and Biotechnology  
University of Pécs, Faculty of Medicine

**P é c s**

**2006**

## Summary

The evolutionarily ancient innate immunity operates with non-clonally distributed promiscuous recognizing molecules. The later appeared adaptive recognizing system uses cells expressing clonally distributed highly variable antigen receptors.

Natural antibody (nAb) producing B-1 B cells are considered an intermediate stage of evolution between innate and adaptive immunity. nAbs are immunoglobulins that are produced without antigen priming. nAbs can recognize foreign targets and may serve in the first line of immune defense during an infection. Natural autoantibodies (nAAbs) present in the serum of both healthy humans and patients suffering from systemic autoimmune diseases recognize a set of evolutionarily conserved self-structures. Because of their endosymbiotic evolutionary origin, proteins compartmentalized into mitochondria represent an interesting transition from prokaryotic foreign (non-self) to essential (self) molecules.

In this work we have demonstrated the presence CS recognizing nAAbs. We investigated the possible overlap in recognized epitopes of innate and self-reactive nAbs and surveyed changes in physiological autoreactivity under pathological autoimmune conditions.

In order to be able to perform the epitope mapping analysis we have set up a filamentous phage based random peptide library method with monoclonal antibodies recognizing the Hepatitis B virus X antigen and mouse CD45, respectively. We have built a lambda phage based CS antigen fragment library for further mapping.

Epitope mapping analysis of the mitochondrial inner membrane enzyme, citrate synthase (CS) (EC 2.3.3.1) by synthetic overlapping peptides and phage display libraries using sera from healthy individuals and from SLE patients revealed CS recognizing nAAbs with IgM isotype. Our results show that while there is no favored region of the CS molecule recognized exclusively either by healthy individuals or patients with SLE, the fine epitope pattern is different in the two groups examined. We analyzed cross reactive epitopes on human CS, bacterial CS, and various standard autoantigens. We have found three cross-reactive epitopes between human and bacterial CS, and we have identified a cross reactive antigen determinant on nucleosome antigen.

The anti-CS nAAbs by participating in the nAb network, could function in innate defense mechanisms and at the same time recognize a target antigen (nucleosome) in a systemic autoimmune disease. Thus, at the level of recognized epitopes there is a possible new link between the innate like component and the adaptive-autoimmune arm of the humoral immune system. We speculate that some nAbs in terms of their antigen recognizing characteristics are resembling the non-clonally distributed pattern recognition receptors of innate immunity.



## Introduction

Microorganisms present in the environment continuously come into contact with the human body through external or internal epithelial surfaces. During evolution all multicellular organisms have developed defense mechanisms capable of eliminating these invading pathogens without causing damage to self structures. Consequently, discriminating self from non-self is of key importance for directing immune functions effectively operating on the basis of distinct recognition systems: innate and adaptive. These two arms differ from each other in several important features and their cooperation is essential for the correct function of immune defense. As a connection bridging the evolutionarily oldest innate and the newly evolved adaptive systems a third compartment of immune machineries, the natural immune system has recently been described.

Innate immunity serves as first line of defense against pathogens. Its early evolutionary appearance is indicated by its presence in all multicellular organisms including plants, invertebrates and vertebrates. Innate immunity uses receptors that are ancient in their evolutionary origin. These non-clonally distributed receptors have to be able to recognize a wide variety of molecular structures associated with pathogens without damaging self-structures. The pathogen associated molecular patterns (PAMPs) are conserved products of microbial metabolism and are essential for microbial survival. The receptors recognizing these PAMPs are termed pattern recognition receptors (PRRs). We distinguish three functional classes of PRRs: endocytic receptors such as cellular C-type lectins, secreted proteins including mannose binding lectin, and the third functional group of Toll-like receptors (TLRs).

PAMPs are targets for many PRRs in innate immunity. PRRs are expressed on cells positioned strategically in the first line of pathogen encounter such as surface epithelia, marginal zone of spleen, and on antigen presenting cells (APCs) such as macrophages and dendritic cells.

It is important to note that the relatively broad spectrum of ligands recognized by TLR family members also includes glycoproteins, which points toward the adaptive recognition system. Thus, the TLR family possibly represents an important milestone on the way to a recognition system characteristic for adaptive immunity.

One of the most important events caused by PAMPs recognition is the surface expression of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) co-stimulatory molecules on APCs, which is necessary for the priming of T-dependent adaptive immune responses. Therefore in addition to activate direct first line defense mechanisms, innate immunity substantially contributes to the adaptive response as well.

The adaptive immune system containing specialized organs (bone marrow, thymus, spleen, lymph nodes, highly structured lymphatic tissues associated with the wet and dry body surfaces), that provide appropriate microenvironment for cells which are committed to antigen specific immune defense (T and B cells), appeared later during the evolution. However, in vertebrates the adaptive immunity generates a virtually indefinite pool of recognizing molecules: the T and B cell receptors (TCR, BCR), which repertoire makes the adaptation of each individual to pathogenic challenges possible. According to the clonal selection hypothesis these receptors are clonally distributed, each of them represented by single cell clone.

The benefit of the high number of available antigen receptors in adaptive immunity comes with the cost of potentially dangerous recognition of self-structures, leading to autoimmunity. Therefore carefully orchestrated selection mechanisms exist to select the potentially useful clones, and to eliminate or inactivate the autoreactive ones.

Since the innate recognition system discriminates self from non-self perfectly, the contribution of innate immunity to the activation of adaptive responses seems to be of vital importance for maintaining tolerance at the periphery.

## **Natural immune system**

A well defined immune machinery has recently been described between the innate and adaptive type immune systems. A distinct set of lymphocytes – both T and B cells – exists with characteristic phenotypes and specialized functions. B1 B cells and  $\gamma\delta$ T cells studied intensively both in humans and mice. These subsets of cells exhibit common phenotypic characteristics and possess both innate and adaptive features, suggesting a transitional stage in the immune system's evolution. The functional character of antigen recognition by  $\gamma\delta$  T cells and B1 B cells (and the immunoglobulins produced by B1 B cells) are closer to the pattern recognition features than to the classical adaptive type immunological recognition, however, the recognizing molecules are genuine T and B cell surface receptors.

## **B1 B cells**

The peripheral naive B cell pool could be divided into three distinct subgroups: mature follicular B cells, marginal zone B cells and B1 B cells. Follicular B cells participate in T-dependent germinal center responses, while marginal zone B cell due to their specialized tissue localization respond to blood borne pathogens in a T-independent fashion. Since marginal zone B cells express high level of costimulatory molecules CD80 and CD86 they may also present blood borne antigens to naive T cells, thus they also might participate in T-dependent responses. In addition, they may also serve as antigen-transport cells into the follicles.

Originally, B1 B cells were distinguished from B2 cells on the basis of their expression of CD5, a glycoprotein marker previously considered to be T cell specific. Later on a CD5<sup>-</sup> B1 B cell population was also identified and termed B1b B cells. Differences in the function and developmental requirements of the two B1 B cell subgroups are poorly characterized; however, it seems that the BCR/CD19 complex is of crucial importance in developmental decisions between B1a and B1b B cells.

In addition to surface phenotype, B1 B cells have several unique properties distinguishing them from conventional B2 cells. B1 B cell represent a self-renewing population found in high number in the peritoneal and pleural cavities, while they are virtually absent from peripheral lymph nodes and can be found in low number among splenic B cells. They are long lived in vitro, can be forced with phorbol esters to proliferate, and they could not be activated through BCR crosslinking. The immunoglobulin repertoire of B1 B cells is restricted in the number of immunoglobulin genes used, it is dominated by rearrangement of J-proximal V genes and has significantly fewer N insertions than the repertoire of B2 cells.

Functions of B1a cells include the participation in the early phases of immune responses and most importantly the production of natural antibodies, which is substantiated by the ability of B1 cells transferred adoptively into irradiated mice to restore normal IgM level. These lines of evidence and the properties of B1 B cell produced natural antibodies indicate that B1 B cells represent an intermediate stage of evolution between innate and adaptive immunity.

## **Natural antibodies and natural autoantibodies**

Natural antibodies (nAbs) are immunoglobulins mostly of IgM isotype, and are secreted by B1 cells without immunization with antigen. These antibodies can recognize genetically conserved sequences of pathogens and may serve in the first line of immune defense during an infection. In contrast, natural autoantibodies (nAAbs) present in the serum of both healthy humans and patients with systemic autoimmune diseases recognize a set of self-structures that have been conserved during evolution. Most nAAbs belong to the IgM or IgG isotype and show polyreactivity with a broad range of affinities for the recognized epitopes. Several functions have been suggested for nAAbs: they may participate in the selection of immune repertoires, play a role in the acceleration of primary immune responses, aid the clearance of apoptotic cells, possess anti-inflammatory effects and contribute to the maintenance of immune homeostasis. Discrimination of nAbs from nAAbs is somewhat artificial since given the limited B1 immunoglobulin gene repertoire driving natural antibody production and the

numerous distinct antigens recognized it is probable that specificities with self non-self cross reactivity exist.

### **Mitochondrial inner membrane enzymes**

The basic structural elements of living cells such as the cytoskeleton, metabolic organelles, transporters, molecular components of transcription and translation etc., are genetically conserved. The maintenance of immunological tolerance against these structures is a basic functional duty of immune machinery in all of the three levels. The mitochondrion is absolutely necessary for eukaryotic cell function. Genetic alterations which affect mitochondrial proteins have serious consequences, if the mutation is compatible with life at all. Because of their endosymbiotic evolutionary origin, proteins compartmentalized into mitochondria represent an interesting transition from prokaryotic foreign to essential self molecules. To date there are only a limited number of epitope mapping analyses performed on human antigens that are recognized by nAAbs. In particular, little is known about the possible overlap between recognized epitopes of innate and self-reactive nAAs.

The structural and functional conservation of mitochondrial components makes them candidate antigens for detailed analysis of evolutionary connections between the innate and adaptive immune response. No classical mitochondrion targeted autoimmune disease – with the exception of the primary biliary cirrhosis is known, suggesting a well established tolerance both at the innate and adaptive level. The inner membrane enzymes, especially the citric acid cycle enzymes offer appropriate models for testing their immunoreactivity. because they are in continuous connection with both innate and adaptive components of the immune system during physiologic turnover of cells. The immunological recognition and the immunoreactivity with these molecules are less studied, and the possible changes in physiological autoreactivity under pathological autoimmune conditions remain largely unclear.

### **Aims of the presented work**

1. Setting up the bacteriophage displayed random peptide library method in our laboratory for epitope mapping
2. Detection of nAAs in the sera of healthy individuals and patients with systemic autoimmune disease.
3. Affinity purification of anti-CS nAAs and cross-reactivity testing with other mitochondrial inner membrane enzymes, with bacterial CS and with autoantigens targeted in autoimmune diseases.
4. Building of a CS antigen fragment library displayed on phage lambda.
5. Comparison of epitopes recognized by nAAs in healthy individuals with those recognized in systemic autoimmune patients.

### **Methods**

#### **Patients and control sera**

Serum samples from healthy individuals: 63 Hungarian blood donors from the Blood Transfusion Service of Baranya county, Pécs; a standardized panel from 51 British blood donors and 176 Finnish blood donors (by the courtesy of professor G. Füst and Z. Prohaszka, 3<sup>rd</sup> Department of Internal Medicine at the Semmelweis University, Budapest); 44 serum samples from healthy infants from the Pediatrics Clinic, University of Pécs and samples of patients with systemic autoimmune diseases: 326 clinically well-documented cases of systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, undifferentiated connective tissue

disease, polymyositis/dermatomyositis, systemic sclerosis, Raynaud syndrome and Sjögren syndrome from the Immunology and Rheumatology Clinic, University of Pécs were used in this work with the permit of the Ethical Committee of the Medical Center of the University of Pécs.

### **Detection of mitochondrial enzyme specific autoantibodies by ELISA**

96-well polystyrene plates were coated with CS, malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) and pyruvate dehydrogenase (PDH; EC 1.2.4.1) from porcine heart in 0.1M bicarbonate buffer. Following the saturation of non-specific binding sites with 0.5% gelatin, serum samples were incubated in triplicates at 1:100 dilutions in washing buffer for 60 min. Finally, the plate was incubated with HRPO conjugated anti-human-IgA, or -IgG or -IgM specific secondary antibody for 60 min. The reaction was developed with *o*-phenylenediamine, and measured at 492 nm. Cut off values of each groups examined were calculated from the average of measured OD<sub>492</sub> data. Sera having higher OD value than average + 2SD were considered positive. All measurements were standardized with a monoclonal anti-citrate synthase antibody (Clone 4H3-E5) we produced previously.

### **Affinity purification of sera on CS**

CS from porcine heart was coupled to cyanogen-bromide activated sepharose 4B according to the manufacturer's instructions. Fifteen ml sera of 30 healthy blood donors and 14 patients with autoimmune disease were passed three times through the CS-sepharose resin. After washing antibodies were eluted in glycine-HCL pH 2.5, fractions were neutralized with 1 M TRIS and were tested for CS reactivity with indirect ELISA using HRPO conjugated anti-human-IgA, or -IgG or -IgM specific secondary antibody

### **Cross reactivity testing of CS affinity purified sera**

Cross reactivity with additional mitochondrial inner membrane enzymes was tested with indirect ELISA using MDH and PDH from porcine heart as antigens.

Reactivity with E.coli CS was tested with pin-bound overlapping decapeptides as described previously.

Recognition of autoantigens implicated in various autoimmune diseases were tested using indirect ELISA kits developed for the quantitative measurement of double stranded DNA, nucleosome, Cenp-B, MPO, PR3, alpha-fodrin, gastric parietal cell, intrinsic factor, Asca, gliadin, tissue transglutaminase, cardiolipin,  $\beta$ 2-glycoprotein-1, phosphatidyl serine, prothrombin and Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70, Jo-1, CCP, thyroglobulin, glomerular basal membrane specific autoantibodies.

### **Immunocytochemistry**

Immunocytochemistry with affinity purified anti-CS sera from SLE patients was performed on Hep-2 cells using the Anafluo kit. In brief, slides were incubated with sera diluted 1:100 in PBS for 30 min. Following 3x5 min wash in PBS rabbit anti-human IgM secondary antibody (1:100) was added and incubated for 30 min. After washing the bound antibodies were visualized with a goat anti-rabbit FITC conjugate.

### **Random peptide library screening**

The filamentous phage library displaying cyclic nine amino acid random peptides as a fusion to the N-terminal of the M13 major coat protein VIII was constructed previously. In order to set up the method, affinity selection of the library was initially performed with two of our monoclonal antibodies (mAb), produced against the hepatitis B virus X antigen (HBX) and the mouse CD45 molecule (IBL-8 mAb). Then affinity selection of phages with CS affinity purified sera from SLE patients was performed using the biopanning technique. In brief, microtiter plates were coated with mAbs or affinity purified anti-CS sera (40  $\mu$ g/ml during the first and 4  $\mu$ g/ml during the second and third rounds of panning). After washing and blocking,  $10^{10}$  phage was added and incubated for 2h. The plate was washed and the bound phage were

eluted and following neutralization 10 ml of E.coli XL1-Blue was infected and plated on LB agar plates containing ampicillin. The next day the colonies were scrapped off the plates, were resuspended in 10 ml LB and were superinfected with  $10^{11}$  M13KO7 helper phage. After an overnight incubation at 37°C, phage were precipitated. Enrichment was monitored by indirect ELISA with phage pools after each selection step. Following the third round of panning, randomly chosen clones were picked up and tested for reactivity with the selecting sera by indirect ELISA. Based on the ELISA results forty clones were selected for DNA sequencing.

### **Construction of recombinant overlapping HBX fragments**

Three overlapping parts of the HBX gene were amplified by PCR using primers with BamHI and EcoRI restriction sites. The fragments were cloned into the expression vector pGEX-6P-1. Each construct was verified by sequencing. Fusion proteins were expressed in E. coli DH5- $\alpha$ , and the recombinant proteins were purified using the glutathione-S-transferase (GST)-glutathione affinity system with modifications.

### **Flow cytometry**

The inhibitory effect of phages displaying the putative IBL-8 epitope was determined using phages purified with precipitation. The phages ( $10^{12}$ /ml) were incubated with 1  $\mu$ g/ml purified mAb in the final volume of 100  $\mu$ l for 30 min at room temperature, then to the phage-mAb mixture 50  $\mu$ l lymph node cell suspension ( $5 \times 10^6$  cells/ml) was added. After 20 mins on ice, the cells were washed, and incubated with phycoerythrin-conjugated goat anti-rat IgG. The reaction was stopped by repeated washing, the cells were fixed, and the samples were analysed by flow cytometry. Controls included anti-CD45RA/B220 mAb in place of IBL-8 mAb, and M13 phages replacing the IBL-8 epitope expressing phages.

### **Construction of a CS antigen fragment library**

Total RNA was isolated from  $3 \times 10^6$  mononuclear cells from peripheral blood of a healthy blood donor. 5  $\mu$ g total RNA was reverse transcribed with Superscript II RT according to the manufacturer's instructions. cDNA encoding for the full length human mitochondrial citrate synthase was amplified with the following primers: 5'-ATGGCTTTACTTACTGCGGC-3' and 5'-TTACCCTGACTTAGAG TCCAC-3'. The PCR reaction contained 300mM of each dNTP, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ M of each primer, 5  $\mu$ l cDNA and 5 units of ProofStart DNA polymerase in a 100  $\mu$ l final volume, cycling was done with the following profile: 95 C 5min, 35 cycles of 95 C 1min, 51 C 30s, 72 C 2min, final extension at 72 C for 10 min. The PCR product was separated on a 1.5% agarose gel and purified. Following A-addition it was cloned into a T/A vector. The identity of insert was verified by sequencing.

Library construction was done using the lambdaD-bio phage display vector (a kind gift from Dr. Alessandra Luzzago; Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare, Italy) as described. In brief, inserts were produced by tagged random primed elongation and amplification using SpeI and NotI tagged random primers and CS cDNA as template excised with BamHI and EcoRI digestion from the plasmid mentioned above. Following purification and size selection inserts were digested with SpeI and NotI. Twenty ligations were set up containing 1  $\mu$ g of SpeI/NotI digested lambdaD-bio DNA, 25 ng of SpeI/NotI digested insert, 30U of T4 DNA ligase in a final volume of 5 $\mu$ l and incubated 48 hours at 4C. The ligation mixture was phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated and packaged into lambda phage particles. Phage were amplified by infecting log phase E.coli BB4 cells and plating them on LB agar plates. After plaque formation phage were eluted, concentrated with precipitation and resuspended in buffer supplemented with protease inhibitors.

### **Affinity selection of CS antigen fragment library**

Microtiter plates were coated with affinity purified anti-CS sera or anti-CS mAb 4H3E5 (developed in our lab) at 10  $\mu$ g/ml in coating buffer. After blocking  $10^{10}$  phage were incubated for 2 h at room temperature. Wells were washed five times and bound phages were recovered by in well infection of E.coli BB4 cells. The infected bacteria were plated on LB

agar plates and phage were eluted then concentrated as described above. The affinity selection was repeated one more time and individual clones were picked up for DNA sequencing.

## **Results and Discussion**

### **Introduction of the phage displayed random peptide library technique**

In order to set up and optimize the phage displayed random peptide library method, affinity selection of the library was initially performed with our two mAbs, produced against the mouse CD45 molecule and the hepatitis B virus X antigen (HBX), respectively. CD45, a transmembrane phosphotyrosine phosphatase, is amongst the most abundant glycoproteins displayed by leukocytes. The alternative splicing and variable expression of the exons near to the N-terminus of the molecule result in distinct extracellular isoforms expressed by cells with different functional and developmental properties, which are heavily glycosylated. Our aim was to map the epitope of our new rat monoclonal antibody IBL-8 against the exon C and to define the expression pattern of CD45RC isoform in mature and immature mouse B cells by using IBL-8. Among the 20 clones, we have identified two types of clones displaying slightly different nonapeptides. A comparison of the deduced amino acid sequence of these two groups of clones with the primary sequence of the CD45 molecule assigns the epitope recognised by the IBL-8 mAb to amino acids 136–144 (ADTAFPVDT). This sequence lies within the exon C of the mouse CD45 molecule. Preincubation with both cA3 and cB6 phages as prototypes for the two groups completely inhibited the subsequent recognition of native antigen by IBL-8 mAb.

We developed a set of mAbs against the Hepatitis B virus X antigen (HBX) for research and diagnostic use. Hepatitis B virus (HBV) is an important etiologic agent of chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. The smallest open reading frame of HBV, called X, encodes a 17 kDa protein of 154 amino acid with highly hydrophobic and disulfide-bonded characters. The X protein (HBX) is a multifunctional regulatory protein which modulates transcription, cell responses to genotoxic stress, protein degradation, and signaling pathways, but the precise function of HBX is not well understood. We used a recombinant HBX protein fused to glutathione S-transferase (GST) as antigen for immunization and for subsequent testing. The fine epitope specificity of the newly generated monoclonal antibodies were unknown. However, the precise information about the epitope specificity of these antibodies was important for the further practical applications.

Based on immunoscreening and ELISA tests, we chose ten phage clones for DNA sequencing. A comparison of the deduced amino acid sequences of these clones revealed a consensus sequence of LPxxLH. This sequence can be found in the primary structure of HBX (amino acids 88.-93.).

In order to confirm the result obtained by random peptide library, we constructed three overlapping GST fusion peptides spanning amino acids 77-142. of the HBX. The anti-HBX Mab recognized only the segment representing amino acids 77-116. No reaction was found when peptides containing sequence 96-135. and 116-142. were tested. According to the alignment of recombinant HBX segments only the sequence 77-95. could possibly contain the epitope bound by the anti-HBX Mab. This calculation has verified the results of the random peptide library screen.

In summary, we employed the screening of a random peptide library displayed on filamentous phage for epitope mapping of two of our mAbs. The method proved to be a good approach for the mapping of linear epitopes both on a cell surface molecule (CD45) and on a protein with special physicochemical properties (HBX).

### **Anti-mitochondrial enzyme specific antibodies in healthy individuals and systemic autoimmune patients**

Using simple binding ELISA we demonstrated the presence of antibodies recognizing CS, MDH, and PDC in the sera of both healthy individuals and systemic autoimmune patients. Isotype-specific ELISA showed that enzyme-specific antibodies with IgM isotype are more

frequently present in all investigated groups than those of IgG or IgA isotypes. No differences were found among the subgroups of healthy individuals; however, the incidence of anti-CS and anti-MDH autoantibodies with IgM isotype was significantly higher in autoimmune patients compared to the healthy controls.

We continued our investigations with CS specific IgM autoantibodies, as this group showed the most characteristic pattern of distribution. We followed the titer of anti-CS IgM antibodies in 53 healthy individuals selected from British and Hungarian blood donors with repeated sample collection minimum 3 times over a 5 years period. We found that the CS reactivity of individual sera remained permanently constant over this period.

Our findings that the majority of these antibodies have IgM isotype, are already present in infants, and the long term stability of their serum titers in adults indicate that these specificities belong to the nAAb repertoire established early in postnatal life.

### **Affinity purification and cross reactivity testing of CS reactive sera**

To exclude the masking effects of nonspecific bindings we purified anti-CS antibodies from 44 human sera (30 healthy and 14 autoimmune patients: 9 with SLE, 3 with systemic sclerosis and 2 with rheumatoid arthritis) by affinity chromatography for further experiments. Affinity purification was successful only in those cases (2 healthy and 2 SLE patients) where the actual serum had extraordinary high (OD<sub>492</sub> >1.5) anti-CS reactivity. The eluted anti-CS antibodies from such sera were exclusively with IgM isotypes.

Cross-reactivity of the affinity purified anti-CS antibodies with other mitochondrial inner membrane enzymes (MDH and PDC) was tested by indirect ELISA. The affinity-purified anti-CS antibodies did not recognize any of these antigens. Since previous studies have suggested that natural antibodies play an important role in the innate like component of the humoral immune response, we investigated the possible overlap in nAAb recognized epitopes on mammalian and bacterial CS. Due to the prokaryotic origin of mitochondria, CS represents an attractive target molecule to examine the self-reactive nAAbs' capability to recognize epitopes on the foreign counterpart of the same molecule. To achieve this, we used sera affinity purified on mammalian CS for epitope mapping on CS from E.coli, using the overlapping synthetic peptide method. Only three cross reacting sequences were found: amino acids 124-133: FRRDSHPMAV (identity with human CS: 40%, similarity: 60%); amino acids 174-183: MCKYKYSIGQP (identity with human CS: 30%, similarity: 40%) and amino acids 351-360: YFIEKKLYPN (identity with human CS: 40%, similarity: 60%), respectively. The three recognized sequences show only a limited homology with human CS, even though identical amino acids with a possible anchor function are present at corresponding positions. These amino acids contain either polar or charged side chains, which is in agreement with previous reports about the preferential amino acid composition of nAAb epitopes. The three peptides, according to the three dimensional model, are located on the surface of the molecule. Moreover, two of the peptides (124-133 and 174-183), though separated by 50 amino acids in the primary sequence, are in close proximity on the structural model of folded protein, indicating that they represent the same antigenic region.

In order to examine the cross-reactivity of affinity-purified anti-CS sera on autoantigens attributed with a role in various autoimmune diseases, we performed several indirect ELISAs with commercially available autoantibody kits (see methods for the listing of antigens tested). The affinity-purified anti-CS sera from two SLE patients recognized nucleosome antigen. To exclude the possibility of CS contamination in the nucleosome antigen preparation, we used our anti-citrate synthase mAb 4H3E5 in the same ELISA system. For further verification of our results we carried out competition ELISA experiments using CS from porcine heart as competitor.

To obtain further support for these findings we screened 46 additional sera from SLE patients for CS and nucleosome reactivity and performed CS affinity purification from the 11 double positive (high CS and nucleosome reactivity) patients' sera. All of the above mentioned 11 CS affinity-purified sera recognized the nucleosome antigen, which reactivity could be inhibited in competition with CS. In addition we performed fluorescent immunocytochemistry

on Hep-2 cells. All of the CS affinity purified SLE patients' sera resulted a low-intermediate staining intensity in the nucleus - the nucleoli of the nuclei were consequently negative - characteristic for the recognition of nucleosomes. In addition we found an intermediate-high staining intensity in the cytoplasm, characteristic for the recognition of CS. Our results show that there is indeed a cross-reactivity of anti-CS antibodies from SLE patients with nucleosome antigen.

### **CS antigen fragment library construction**

Bacteriophage surface display of peptides is an extensively used technique for a variety of applications. The most commonly used systems are based on fusion to a filamentous phage coat protein. However, the life cycle of these phages limits the size of the displayed peptide, therefore we have chosen phage lambda for construction of a phage displayed CS antigen fragment library.

The library contains approximately  $10^7$  insert bearing independent clones. First we tested the library by performing an affinity selection with the anti-CS mAb 4H3E5. After the second round of affinity selection 30 clones were chosen for DNA sequencing. Among them 4 distinct sequences were found repeatedly. These sequences could be aligned with amino acids 7-65. of human CS and the minimal epitope of our anti-CS mAb could be restricted to amino acids 31-59.

### **Affinity selection of CS antigen fragment library with CS purified sera**

Having demonstrated the effectiveness of our phage display CS antigen fragment library for epitope mapping, we proceeded to the epitope mapping of affinity-purified anti-CS sera. Following two rounds of affinity selection 20 clones selected with each serum were picked up for DNA sequencing. In contrast to the selection with our anti-CS mAb, these clones carry short peptide sequences which could also be aligned to human CS. These short sequences are scattered throughout the human CS sequence and it seems that practically the same regions of the molecule are recognized by the two groups of sera. According to our results obtained with phage displayed antigen fragments, while there is no favored region of the CS molecule recognized exclusively either by healthy individuals or patients with SLE, the fine epitope pattern is different in the two groups examined.

### **Random peptide library screening with CS purified sera**

The unexpected cross-reactivity of SLE patients' CS affinity-purified sera with nucleosome antigen could not have been unequivocally explained by the results of epitope mapping performed either by the synthetic overlapping peptide or phage displayed antigen fragment method. Therefore we screened a nine amino acid random peptide library with CS affinity purified sera from two patients with SLE. In this system random peptides are presented at high copy number, making the identification of low affinity interactions easier. The 40 sequenced clones carry similar peptides which show partial homology with human CS. We isolated a phage clone (YAAPSHQSH phage#5) which carries a peptide corresponding to amino acids 145-150. of human CS and performed competition ELISA with it both for CS and nucleosome antigen. According to our results, phage#5 inhibited the CS reactivity of CS affinity purified sera from SLE patients but not from healthy individuals. When tested for blocking nucleosome reactivity, phage#5 proved to be an efficient inhibitor of the nucleosome reactivity measured with CS affinity purified sera from SLE patients. These results indicate that the CS-nucleosome cross-reactivity is at least partly caused by antibodies recognizing the CS epitope (amino acids 145-150.) mimicked by phage#5. The cross reactive epitope identified on human CS (145-150.) is located on the surface of the molecule. It is interesting to note that it is part of the region which contains two of the E.coli CS cross reactive determinants (124-133 and 174-183). We hypothesize that this (124-183.) part of the molecule is the major target for both the self-reactive (pathological) and innate like nAAbs. We did not find homology in the primary structures between the isolated huCS 145-150 peptide fragment and the nucleosome proteins; however, the isolated sequence motif



(AALPSH) is hydrophobic and it is probably able to induce similar immunoreactivity as the also strongly hydrophobic nucleosome sequences. Our data call the attention for the general changes in self-recognition network under pathological conditions, which may result in cross-reactive epitope patterns.

### **Theoretical conclusions and future perspectives**

In conclusion, we have successfully employed a random peptide library displayed on filamentous phage for the epitope mapping of two of our mAbs (anti-CD45RC and anti-HBX). We demonstrated the presence of CS recognizing nAAbs. We constructed a CS antigen fragment library displayed on phage lambda and showed, that the fine epitope pattern on CS is different under physiological and pathological (SLE) conditions. We identified cross-reactive epitopes on human and bacterial CS. In addition, we demonstrated cross reactivity of CS affinity-purified sera with nucleosome antigen. These data indicate that, in theory, nAAbs „specific” for a given self antigen could fulfill the function of participating in innate defense mechanisms and, at the same time, recognize a target antigen in a systemic autoimmune disease. On the basis of the limited immunoglobulin gene repertoire used for the production of nAbs, of the near germline sequence of these genes, and on the basis of the promiscuity in ligand binding of nAbs demonstrated in our present work, we speculate that nAbs in terms of their antigen recognizing characteristics are resembling the pattern recognition receptors mentioned in the introduction. Thus, at the level of recognized epitopes there is a possible new link between the innate like part and the adaptive-autoimmune arm of the humoral immune system.

Genetically conserved structures play a special role in various biological regulations, including metabolism, endocrine regulation, cell-cell interactions, intracellular signaling pathways and the immune response. Primary structure homologies between the antigens targeted in some autoimmune diseases and conserved sequences of different pathogens (viruses and bacteria) are well known. This so called “molecular mimicry” has been extensively studied however, direct causality of infections in the development of autoimmune diseases has only been verified in a few patients. These studies are more focused for homologies in primary structure, but, - as our results suggest - the similarities in the physico-chemical molecular shape between the mammalian antigens and the structures of microorganisms could provide a real structural basis for the biological recognition. Despite the fact that *E.coli* CS and mammalian CS exhibit long homologies in their primary structure, the cross-reactive epitopes which we identified by autoantibodies carry altered primary structures with strong identical motifs in electric charge and hydrophobicity. Moreover, no homology could be found between the primary structure of nucleosome antigen and the sequence of mammalian CS identified as the cross reactive epitope. However, stretches of amino acids with a possibly similar physico-chemical molecular surface, are likely to be present, and the CS-specific IgM autoantibodies could recognize both antigens with a similar avidity. Our results are harmonizing with recently published data which suggest a pivotal role of three-dimensional shape of conserved antigens in both targeting type immunity and tolerance.

Similarly to the initiation of immune response the maintenance of tolerance involves all three compartments of the immune system. Disturbances in co-operation among innate, natural, and adaptive immune system components may result in the impairment of both targeting type immune response and the self tolerance, thus paving the way for development of immunodeficiencies and pathological autoimmune phenomena.

## **Acknowledgements**

First of all I would like to thank my supervisor Prof. Péter Németh for giving me the possibility to work at his institute. I would also like to thank him for leading me during this scientific endeavor and for having faith in this project at both ups and downs.

I would like to thank Prof. László Czirják and Prof. György Füst and Dr. Zoltán Prohászka for the autoimmune patient's sera and for the Finnish blood donor serum samples, respectively.

I would like to thank Dr. Alessandra Luzzago for providing us the filamentous phage random peptide library and the lambda phage display vector.

I would like to thank Prof. Ferencz Hudecz and Szilvia Bősze for the multi-pin peptide synthesis.

I greatly appreciate the technical assistance of Katalin Olasz and Dr. Diána Simon.

Finally, I would like to thank all members of Department of Immunology and Biotechnology for helping me in this work.

## Publications

### Publications related to this thesis:

**Czompoly T**, Olasz K, Simon D, Nyarady Z, Palinkas L, Czirjak L, Berki T, Nemeth P.  
A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?  
Mol Immunol. 2006 Apr;43(11):1761-8 Impact factor: 3.19

**Tamás Czömpöly**, Árpád Lábadi, Mercédesz Balázs, Péter Németh, Péter Balogh  
Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors  
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 8;307(4):791-6. Impact factor: 2.93

József Pál, **Tamás Czömpöly**, Zoltán Nyárády, Ilona Marcinovits, Tamás Janáky, Zoltán Kele, Péter Németh  
Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal antibody using microanalytical and molecular biological methods  
Mol Immunol. 2003 Sep;40(5):241-6 Impact factor: 3.19

Nyarady Z, **Czompoly T**, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, Pal J, Hudecz F, Berki T, Nemeth P  
Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies.  
Mol Immunol. 2006 Mar;43(7):830-8. Impact factor: 3.19

Pal J, Palinkas L, Nyarady Z, **Czompoly T**, Marcinovits I, Lustyik G, Saleh Ali Y, Berencsi G, Chen R, Varro R, Par A, Nemeth P.  
Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of hepatitis B virus X antigen level in human sera.  
J Immunol Methods. 2005 Nov 30; 306(1-2):183-92. Impact factor: 2.46

### Other publications:

Kvell K, **Czompoly T**, Pikkarainen T, Balogh P.  
Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines.  
Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 24;341(4):1193-202. Impact factor: 2.93

Rekasi Z, **Czompoly T**, Schally AV, Boldizsar F, Varga JL, Zarandi M, Berki T, Horvath RA, Nemeth P.  
Antagonist of growth hormone-releasing hormone induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells through a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 1;102(9):3435-40. Impact factor: 10.5

Halmos G, Schally AV, **Czompoly T**, Krupa M, Varga JL, Rekasi Z.  
Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer.  
J Clin Endocrinol Metab. 2002 Oct;87(10):4707-14. Impact factor: 5.19

Rekasi Z, **Czompoly T**.  
Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro.  
J Mol Endocrinol. 2002 Feb;28(1):19-31. Impact factor: 4.35

Rekasi Z, Schally AV, Plonowski A, **Czompoly T**, Csernus B, Varga JL.

Regulation of prostate-specific antigen (PSA) gene expression and release in LNCaP prostate cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide.

Prostate. 2001 Aug 1;48(3):188-99. Impact factor: 3.15

Rekasi Z, **Czompoly T**, Schally AV, Halmos G.

Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 12;97(19):10561-6. Impact factor: 10.7

Halmos G, Schally AV, Varga JL, Plonowski A, Rekasi Z, **Czompoly T**.

Human renal cell carcinoma expresses distinct binding sites for growth hormone-releasing hormone.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 12;97(19):10555-60. Impact factor: 10.7

Kahan Z, Varga JL, Schally AV, Rekasi Z, Armatis P, Chatzistamou L, **Czompoly T**, Halmos G.

Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice.

Breast Cancer Res Treat. 2000 Mar;60(1):71-9. Impact factor: 3.13

Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Armatis P, Groot K, **Czompoly T**.

Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers.

Endocrinology. 2000 Jun;141(6):2120-8. Impact factor: 5.09

Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Groot K, **Czompoly T**.

Antagonistic actions of analogs related to growth hormone-releasing hormone (GHRH) on receptors for GHRH and vasoactive intestinal peptide on rat pituitary and pineal cells in vitro.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 1;97(3):1218-23. Impact factor: 10.7