

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 inaktíválására.

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⁻ 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 sejtfelszíni 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 hátterében 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, β 2-glikoprotein-1, foszfatidil 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. Éjszakán 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 előállítás

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)-glutation 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 (5×10^6 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 3×10^6 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 MgSO₄, 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 4°C-on inkubáltuk. A ligációs reakciót ezután fenolkloroformmal 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 szérum titerük 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 szérum 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 megfelelően. 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: FRRDSHPMAV (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 kudarckok 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 Ca²⁺-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