

**PhD tézis**

**Topoizomeráz I ellenes természetes és betegség asszociált  
autoantitestek epitóp mintázatának vizsgálata szisztémás  
sclerosisban és szisztémás lupus erythematosusban**

**Dr. Simon Diána**

**PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinika**

Témavezetők:

Prof. Dr. Czirják László  
PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinika

Prof. Dr. Németh Péter  
PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

P é c s

**2010**

# TARTALOMJEGYZÉK

|  |    |
|--|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....  | 3  |
| ÖSSZEFOGLALÁS .....  | 4  |
| BEVEZETÉS.....   | 5  |
| Veleszületett és adaptív immunitás .....   | 5  |
| Természetes immunrendszer .....  | 7  |
| B1 B-sejtek.....   | 9  |
| Természetes antitestek és természetes autoantitestek.....  | 10 |
| Előzmények .....   | 12 |
| Anti-topo I autoantitestek .....   | 12 |
| Topo I .....   | 12 |
| Anti-topo I autoantitestek kimutatása.....   | 13 |
| Anti-topo I autoantitestek klinikai jelentősége.....   | 14 |
| Anti-topo I autoantitestek epitóp specificitása .....  | 14 |
| Anti-topo I autoantitestek lehetséges szerepe az SSc patomechanizmusában .....   | 15 |
| CÉLKITŰZÉSEK.....  | 18 |
| ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....  | 19 |
| Vizsgált szérumminták .....  | 19 |
| Topo I antigén fragmens könyvtár létrehozása.....  | 19 |
| Szérumok tisztítása protein G szefaróz oszlopon.....   | 20 |
| Topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója.....  | 21 |
| MBP-topo I fragmens fúziós fehérjék előállítása.....   | 22 |
| A dcSSc-s, lcSSc-s, SLE-s és kontroll szérumminták tesztelése MBP-topo I fúziós<br>fragmenseken indirekt ELISA-val.....        | 24 |
| Kompetíciós ELISA az MBP-topo I fúziós fragmensekkel .....   | 24 |
| A dcSSc-s, lcSSc-s, SLE-s és kontroll szérumminták tesztelése MBP-topo I fúziós<br>fragmenseken Western blottal .....          | 25 |
| A topo I epitópok ellen termelődött antitestek reaktivitásának longitudinális vizsgálata                                       | 25 |
| A felismert topo I fragmensek klinikai jelentőségének meghatározása .....  | 25 |
| EREDMÉNYEK.....  | 26 |
| Anti-topo I autoantitestek epitóp térképezése bakteriofág felszínen megjelenített topo I<br>antigén fragmens könyvtárral ..... | 26 |
| Anti-topo I autoantitestek egészséges egyének szérumában is kimutathatóak.....   | 27 |
| Szisztémás autoimmun betegek szérummintáinak reaktivitása a topo I rekombináns F4<br>fragmensén .....                          | 28 |
| A topo I rekombináns F4 fragmensét felismerik természetes autoantitestek.....  | 29 |
| SSc-s és SLE-s betegek szérummintáinak reaktivitása az MBP-topo I fúziós fehérjéken  | 30 |
| A topo I epitópok ellen termelődött antitestek reaktivitásának longitudinális vizsgálata                                       | 31 |
| Klinikai eredmények .....  | 32 |
| MEGBESZÉLÉS .....  | 35 |
| PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....   | 44 |
| IRODALOMJEGYZÉK .....  | 45 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....  | 57 |
| MELLÉKLETEK (AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK).....   | 58 |

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|             |   |
|-------------|---|
| AA          | aminosav  |
| anti-topo I | anti-topoizomeráz I (Scl-70)                                |
| APC         | antigén prezentáló sejt                                     |
| BCR         | B-sejt receptor   |
| BSA         | szarvasmarha szérum albumin                                 |
| dcSSc       | diffúz kután szisztémás sclerosis                           |
| GI          | gasztrointesztinális  |
| HRPO        | tormaperoxidáz  |
| IEL         | intraepiteliális limfocita                                  |
| iNKT-sejt   | invariáns természetes ölő T-sejt                            |
| lcSSc       | limitált kután szisztémás sclerosis                         |
| MAIT-sejt   | mukóza asszociált invariáns T-sejt                          |
| MBP         | maltóz-kötő fehérje   |
| MHC         | fő hisztokompatibilitási komplex                            |
| MR1         | fő hisztokompatibilitási komplexhez kapcsolódó 1-s molekula |
| PAMP        | patogénhez asszociált molekuláris mintázat                  |
| PDGFR       | trombocita eredetű növekedési faktor receptor               |
| PRR         | mintázat felismerő receptor                                 |
| PAGE        | poliakrilamid gélelektroforézis                             |
| SLE         | szisztémás lupus erythematosus                              |
| SSc         | szisztémás sclerosis  |
| TCR         | T-sejt receptor   |
| TLR         | Toll-szerű receptor   |
| topo I      | DNS topoizomeráz I  |

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám fő célkitűzése egy szisztémás autoimmun betegsége, a szisztémás sclerosisra (SSc) jellemző autoantitest, az anti-topoizomeráz I (Scl-70) (továbbiakban anti-topo I) által felismert epitópok térképezése az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben korábban kifejlesztett fág könyvtár technika segítségével.

Vizsgálataink során kimutattunk a topoizomeráz I (topo I) – az SSc-ben betegség-asszociálnak tekintett autoantitest cél antigénje - ellen termelődött természetes autoantitesteket is. Elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a topo I ellen termelődött autoantitestek egyaránt jelen vannak egészséges, valamint különböző szisztémás autoimmun betegségben szenvedő egyének szérumában is. Az epitóp térképezési technika segítségével összehasonlítottuk a természetes és a patológiás autoantitestek által felismert epitóp mintázatokat. Azonosítottuk azt az epitópot (F4), amely ellen mind egészséges egyéneknél, mind SSc-ben és szisztémás lupus erythematosus (SLE) esetén, valamint más szisztémás autoimmun betegségekben is autoantitestek mutathatók ki. Ez a topo I molekulán belül egy 150 aminosav hosszúságú, genetikailag konzervált szakasz.

Az epitóp térképezési technika segítségével bizonyítottuk, hogy ezen az immundomináns fragmensén kívül a diffúz kután SSc-s (dcSSc-s), a limitált kután SSc-s (lcSSc-s) és az SLE-s betegek széruma más, eltérő topo I epitópokon is mutat reaktivitást. Megállapítottuk, hogy az anti-topo I autoantitestek által felismert epitóp mintázat különbözik dcSSc, lcSSc és SLE esetén. Kimutattuk, hogy a vizsgált topo I fragmensek többségén mutatott reaktivitás egyéni különbségekkel magyarázható, nem pedig az adott betegcsoportokra specifikus. Ugyanakkor a topo I molekula N-terminális végén elhelyezkedő F1 fragmensén (genetikailag egy relatíve újabb, csak a gerincesekre jellemző szekvencia) főként a dcSSc-s betegek széruma mutatott reaktivitást. A molekula egy másik régiójában lokalizált F8 fragmenst pedig az SLE-s betegek széruma ismert fel, ami arra utal, hogy az F1 fragmens a dcSSc-re, az F8 fragmens az SLE-re specifikus epitópokat tartalmazhat. A vizsgált klinikai adatok statisztikai analízise során nem találtunk összefüggést az anti-topo I antitest epitópok és az SSc klinikai manifesztációja között, ugyanakkor szignifikáns különbség mutatkozott az SSc-s betegek anti-F1 antitest pozitív és anti-F1 antitest negatív csoportjai között a betegségük fennállásának időtartamában. Mindezek alapján az F1 fragmens ellenes autoantitestek megjelenése a késői stádiumú dcSSc újonnan azonosított laboratóriumi diagnosztikai markere lehet, míg az anti-F8 antitest jelenléte egy enyhébb lefolyású SLE-t jelezhet.

## BEVEZETÉS

Minden többsejtű élőlény olyan védekező mechanizmusokkal rendelkezik, amelyek képesek a kórokozók eliminálására anélkül, hogy károsítanák a saját struktúrákat. A saját és nem-saját közti különbségtétel tehát kulcsfontosságú az immunológiai funkciók irányításában. Mind a veleszületett, mind a szerzett (adaptív) immunválaszban különböző szintű biológiai mechanizmusok biztosítják a saját struktúrák toleranciáját és a patogénekkal szembeni hatékony immunválaszt. Ez a két rendszer nemcsak abban különbözik, hogy az evolúció más és más fázisaiban jelentek meg, hanem molekuláris és sejtes komponenseiben, valamint számos, fontos funkcióban is eltérnek egymástól. Ugyanakkor, a magasabb rendűekben a szoros és koordinált együttműködés a veleszületett és az adaptív immunválasz között már nélkülözhetetlen mind a hatékony védekezés fenntartásában, mind a saját struktúrák toleranciájában.

Az evolúciós szempontból régebbi – a veleszületett - és az újabban kialakult – adaptív - immunrendszer felépítése és működése közötti különbségek (pl. antigén specificitás, memória) túl nagyok ahhoz, hogy egyszerűen „előnyös és domináns” mutációkkal megmagyarázhatók lennének. A biológiai mechanizmusai alapvetően különböző veleszületett és a szerzett immunválasz közti összekötő evolúciós kapocsként a közelmúltban került leírásra az ún. „természetes immunrendszer”, melynek működéséről csak napjainkban kezdenek összegyűlni a részletes ismereteink.

### **Veleszületett és adaptív immunitás**

A veleszületett immunitás a patogének elleni védekezés első vonalában játszik szerepet. Alapmechanizmusainak az evolúció korai szakaszában történő megjelenésére utal, hogy minden többsejtű élőlényben, így a növényekben, a gerinctelenekben és a gerincesekben is nagyon hasonló molekuláris és sejtes funkciók formájában jelennek meg (1). A veleszületett immunitás evolúciós szempontból ősi receptorokat, ún. mintázat felismerő receptorokat („pattern recognition receptor”: PRR) használ. Ezek a nem-klonális eloszlású receptorok a patogénekhez társuló molekulák széles körét képesek felismerni, a saját-struktúrák károsítása nélkül. A patogénekhez társuló molekuláris mintázatok („pathogen associated molecular pattern”: PAMP) a mikrobiális metabolizmus konzervált termékei és nélkülözhetetlenek a mikroba túléléséhez. A PAMP-ok több PRR célmolekulái között is szerepelnek (2). A PRR-ok olyan, a védekezés első vonalába lokalizált, stratégiai

szerepet betöltő sejteken expresszálódnak, mint a felszíni hám, a lép marginális zónája, valamint az antigén prezentáló sejtek (APC - pl. a makrofágok és a dendritikus sejtek). A PRR-ek három funkcionális csoportját különítjük el: az endocitózisban szerepet játszó receptorok (pl. a C-típusú lektinek), a szekretált fehérjék (pl. a mannóz kötő lektin), a harmadik csoportként pedig a jelátvivő receptorok, a Toll-like receptorok (TLR) (3). 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 (4). 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 immunválasz elindításához szükséges. Ez is egy jó példa arra, ahogy a veleszületett immunitás mellett, hogy közvetlen első vonalbeli védekező mechanizmusokat aktivál, jelentősen hozzájárul az adaptív immunválasz kialakulásához is (5). A PRR-ek molekuláris mintázatokat ismernek fel és nem egy adott antigénre jellegzetes molekula részletet (epitópot). A nagymértékű redundancia és promiscuitás ellenére tökéletesen képesek elkülöníteni a sajátot a nem-sajáttól. Kézenfekvő magyarázatnak tűnik, hogy a PRR-ek az evolúció során fokozatosan alakultak ki és azok az organizmusok, amelyek sajátot felismerő PRR-eket expresszáltak végül kiszelektálódtak. Így érthető, hogy autoimmun jelenségeket eddig olyan élőlényekben, melyek csak veleszületett immunitással rendelkeznek, nem észleltek.

Az adaptív immunrendszer az evolúció során később jelent meg. Az adaptív immunitás a gerincesekben az antigén specifikus felismerő molekulák gyakorlatilag végtelen készletét hozza létre, T- és B-sejt receptorok formájában (6). Ez a repertoár lehetővé teszi az egyedek adaptációját a patogének általi kihívásokhoz. Az adaptív immunitásban rendelkezésre álló nagyszámú antigén receptorral járó előny viszont a saját struktúrák potenciálisan káros felismerésének kockázatával jár együtt, ami autoimmunitáshoz vezethet. Ennek elkerülésére gondosan szervezett szelekciós mechanizmusok fejlődtek ki és működnek folyamatosan a potenciálisan hasznos klónok kiválasztására és az autoreaktív klónok eliminálására vagy inaktiválására (7, 8).

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 is (9). A kostimulációs molekulák megjelenése az APC sejtek felszínén, mind a T-sejtek mind a B-sejtek aktiválásához nélkülözhetetlen. A megfelelő kostimuláció hiányában az aktivációs

jel nem éri el az adaptív immunrendszer aktiválódásához szükséges szintet (10). Számos további példa bizonyítja a két rendszer szoros együttműködését, de nem adnak magyarázatot a fejlődéstani háttérrel.

### **Természetes immunrendszer**

A természetes immunrendszer hidat képez a veleszületett és az adaptív immunrendszer között. A limfociták jellemző fenotípusú és specializált funkciójú meghatározott csoportjai – a T- és a B-sejtek egyaránt – részt vesznek ebben a rendszerben. Ezek a sejtek korlátozott számú, szemi-invariáns, csiravonalban kódolt, autoreaktív antigén receptorokat hordoznak a felszínükön, közös fenotípusos sajátosságokat mutatnak, valamint rendelkeznek a veleszületett és az adaptív rendszerekre jellemző tulajdonságokkal, ami egy átmeneti állapotra utal az immunrendszer evolúciója során. A természetes immunrendszer eddig megismert legfontosabb sejtes elemei az invariáns természetes ölő T (iNKT) sejtek, a mukóza asszociált invariáns T (MAIT) sejtek, a  $\gamma\delta$  T-sejtek és a B1 B-sejtek. Ezen sejtek antigén felismerésének funkcionális jellemzői (valamint a B1 B-sejtek által termelt immunglobulinok tulajdonságai) közelebb állnak a mintázat felismerő receptorokhoz, mint a klasszikus adaptív típusú immunológiai felismeréshez. Ezek a felismerő receptorok azonban valódi T- és B-sejt receptorok. Feltételezhető tehát, hogy az egyes limfocita alosztályok között evolúciós különbségek állnak fenn.

A nem-konvencionális T-sejteknek csak két alcsoportja expresszál T-sejt receptort (TCR-t) és a különböző fajok között nagymértékben konzervált non-polimorf fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) Ib molekulát: az iNKT és a MAIT-sejtek (11, 12). Ez a két sejtpopuláció invariáns TCR alfa láncsal és nagymértékben korlátozott TCR készlettel rendelkezik. Mindkét sejtcsoport szelekciójában hemopoetikus sejtek vesznek részt, amelyek evolúciósan konzervált MHC Ib molekulát expresszálnak: CD1d-t az NKT-sejtek (13), a fő hisztokompatibilitási komplexhez kapcsolódó 1-s molekulát (MR1-t) a MAIT-sejtek számára (14). A CD1d korlátozott iNKT-sejtek és az MR1 által szelektált MAIT-sejtek a T-sejtek filogenetikailag konzervált alcsoportjai, feltételezhetően kezdettől fogva alapvető szerepet játszanak az emlősök immunrendszerében.

A MAIT-sejtek tímuszbeli non-B non-T hemopoetikus sejt felszíni MR1 általi szelekciójuk során memória fenotípusra tesznek szert, majd a gasztrointesztinális (GI) rendszer lamina propriájában és a mezenterialis nyirokcsomókban halmozódnak fel, amihez a B-sejtek mellett a bélrendszer normál bakteriális kolonizációja is szükséges. Azaz

fejlődésük egyedi mintázatot mutat, ami az iNKT és a  $\gamma\delta$  T-sejtek közötti átmenetnek felel meg (15). A MAIT-sejtek az orális úton szerzett fertőzések leküzdésében, valamint a GI nyálkahártya egyensúlyának fenntartásában játszhatnak szerepet. Részt vehetnek a GI immunválasz kontrollálásában és az orális tolerancia kialakulásában is. Az immunválasz és a tolerancia közötti egyensúly fenntartása a GI rendszerben alapvető fontosságú, ami magyarázhatja a MAIT-sejtek fajok közötti konzerváltságát (16). A MAIT-sejtek folyamatos funkcionális aktivitására utal az is, hogy a keringő limfociták 1-4%-át teszik ki.

Az iNKT-sejtek a tímuszban szelektálódnak, sokasodnak és itt alakul ki a veleszületett-szerű fenotípusuk és funkciójuk. A májban és a lépben exogén stimulusoktól, mint például a normál bakteriális flóra jelenlététől függetlenül akkumulálódnak (17). Az iNKT-sejtek fontos szerepet játszanak mind a védekező, mind a szabályozó mechanizmusokban. Az általuk képviselt immunválasz természete a környezetük citokin mintázata által meghatározott. IL-10 termelő sejtekkel való kölcsönhatásuk regulátor T-sejt típusú iNKT-sejtek indukciójához (18), IL-12 termelő sejtekkel való interakciójuk Th1 típusú válaszhoz vezet, IFN $\gamma$  termelésükkel mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer aktivációjához hozzájárulnak (19). Az iNKT-sejtek több biológiai funkcióban is részt vesznek, így fontos szerepet játszanak a daganat sejtek eliminálásában, de leírták szerepüket az elhízás kialakulásában is (20).

A  $\gamma\delta$  T-sejtek TCR készlete a veleszületett immunrendszer sejtjeinek receptoraihoz hasonlóan az evolúció során szelektálódott (21). A tímuszban zajló szelekció nem a  $\gamma\delta$  T-sejtek antigén specificitását, hanem a sejtek effektor funkcióját határozza meg. Általánosságban elmondható, hogy a  $\gamma\delta$  T-sejtek elsősorban saját antigéneket ismernek fel, és az epiteliális sejtek homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet (22). Az intraepiteliális limfociták (IEL) nagyon korai stádiumban elhagyják a tímuszt és a GI nyálkahártyában telepednek meg, ahol befejeződik az érésük (23). Sőt speciális intesztinális limfoid aggregátumokban, úgynevezett kriptoplakkokban („cryptopatches”), csontvelői eredetű prekurzorokból, közvetlenül is kifejlődhetnek (24). A pozitív szelekció, valamint az antigén specifikus elköteleződés hiánya ideális feltételnek tűnik ahhoz, hogy a védekezés első vonalában vegyenek részt. TCR-en keresztüli aktiváció során a ligand-naív  $\gamma\delta$  T-sejtek IL-17-et, a gyulladás fő iniciátorát termelik, míg a liganddal már találkozott  $\gamma\delta$  T-sejtek IFN $\gamma$ -t termelnek (25). Az IL-17 egyik fő funkciója a neutrofil granulociták expansziójának és érésének elősegítése a csontvelőben. Így kritikus szerepet játszanak az akut gyulladásos reakció kezdetekor, amely olyan kórokozók ellen irányul, amelyekkel



először találkozik a gazdaszervezet. De ugyanez a mechanizmus indíthat el autoimmun folyamatokat egy sérülés során elérhetővé váló, addig az immunrendszer elől rejtve maradt saját antigének ellen is (26). A  $\gamma\delta$  T-sejtek további hatással lehetnek az antigén specifikus  $\alpha\beta$ T és B-sejtes válaszok kialakulására, ezzel a  $\gamma\delta$  T-sejtek az adaptív immunválasz megfelelő aktiválásában is fontos szerepet játszhatnak. Mivel a  $\gamma\delta$  T-sejtek több ponton is hozzájárulnak a szervezet immunkompetenciájához, érthető miért maradtak fenn ezek a sejtek az emlősökben is, annak ellenére, hogy az antigén specifikus receptorral rendelkező, nagy hatékonyságú  $\alpha\beta$  T- és B-sejtek is jelen vannak.

## **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 (1. táblázat).

A folliculáris B-sejtek a T-dependens centrum germinatívum 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 sejtneként is működhetnek.

Eredetileg a B1 B-sejteket egy korábban T-sejt specifikusnak tartott glikoprotein marker- a CD5 expresszió -, alapján különítették el a B2 sejtektől (27). Mivel a CD5 transzmembrán glikoprotein, kapcsolatban áll az antigén receptor jelátviteli komplexekkel, a CD5 molekulát a T-sejt és B-sejt receptorok negatív regulátorának tartják (28, 29). Később egy CD5<sup>-</sup> B1 B csoport is azonosításra került, amit B1b B-sejteknek neveztek el. A két B1 B-sejt alcsoport funkciójáról és fejlődési igényeiről kevés adat áll rendelkezésre, azonban, úgy tűnik, hogy a B-sejt receptor (BCR)/CD19 komplex alapvető fontosságú a B1a és a B1b-sejtek közti fejlődési döntésekben (30). A sejtfelszíni fenotípus mellett (31) a B1 B-sejtek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, ami megkülönbözteti őket a konvencionális B2 sejtektől.

| Sejt típus                | Sejtfelszíni fenotípus  |
|---------------------------|---|
| Érett folliculáris B-sejt | B220 <sup>hi</sup> IgD <sup>hi</sup> IgM <sup>lo</sup> CD23 <sup>+</sup> CD21 <sup>int</sup>                    |
| Marginális zóna B-sejt    | B220 <sup>+</sup> IgD <sup>lo/-</sup> IgM <sup>hi</sup> CD23 <sup>-</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD1d <sup>hi</sup> |
| B1a B-sejt                | B220 <sup>+</sup> IgD <sup>lo/-</sup> IgM <sup>hi</sup> CD11b(Mac-1) <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>              |
| B1b B-sejt                | B220 <sup>+</sup> IgD <sup>lo/-</sup> IgM <sup>hi</sup> CD11b(Mac-1) <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup>              |

**1. táblázat** B-sejt alcsoportokra jellemző sejtfelszíni markerek egérben

A B1 B-sejtek egy önmegújításra képes populációt jelentenek, nagy számban található meg a savós hártályakon (a peritoneális és a pleurális üregekben), miközben gyakorlatilag hiányoznak a perifériás nyirokcsomókból és alacsony számban található meg a lépben (32, 33). In vitro hosszú életűek, forbolésztterekkel proliferációra bírhatók, a BCR keresztkötésével aktiválhatók (34-36). 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 B-sejteké (37, 38).

Számos bizonyíték van arra, hogy a B1 B-sejtek evolúciós átmenetet képeznek a veleszületett és az adaptív immunitás között. Bár autoreaktivitásuk miatt maguk is reguláció alatt állnak, ezen B1 B-sejtek fontos szerepet játszanak az autoimmunitás kontrollálásában (39, 40). A B1 B-sejtek a csontvelő elhagyását követően „természetes módon” aktiválódnak egy autoantigén vagy egy antigén receptor idiotipikusan komplementer V régiója által (41-43). Néhány sejt affinitásérést követően magas affinitású idegen, vagy saját antigént felismerő antitesteket termel a CD5 expressziótól függetlenül (44).

A B1 B-sejtek funkciói magukban foglalják az immunválasz korai szakaszában való részvételt (45-47) és legfontosabban a természetes antitestek termelését, amit az is alátámaszt, hogy a besugarazott egérbe adoptív transzferrel átvitt B1 B-sejtek visszaállítják a normális IgM szintet (48). 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 olyan immunglobulinok, amelyeket a B1 B-sejtek termelnek az antigénnel való előzetes immunizálás nélkül (49). Ezen antitestek

genetikailag konzervált patogén szekvenciákat ismernek fel, így egy fertőzés során a védekezés első vonalában szerepelhetnek (50). A természetes autoantitestek viszont az evolúció során konzervált saját struktúrákat is felismernek (2. táblázat) és jelen vannak mind egészséges egyének, mind szisztémás autoimmun betegségben szenvedők szérumában (51).

|                         |   |
|-------------------------|---|
| hősokk fehérjék (hsp)   | hsp65, hsp70, hsp90, ubikvitin                            |
| Enzimek                 | aldoláz, citokróm c, SOD, NAPDH, citrát-szintáz           |
| sejtmembrán komponensek | $\beta$ 2-mikroglobulin, spektrin, acetilkolin receptor   |
| citoplazma komponensei  | aktin, miozin, tubulin, mioglobin, mielin bázikus fehérje |
| sejtmag komponensei     | DNS, hisztonok  |
| plazma fehérjék         | albumin, IgG, transferrin                                 |
| citokinek, hormonok     | IL-1, TNF, IFN, inzulin, tireoglobulin                    |

**2. táblázat** Természetes autoantitestek által leggyakrabban felismert antigének

Az autoreaktív repertoárok már az ontogenezis korai szakaszában, a magzati életben kiválasztódnak. A természetes autoantitestek többségét csírvonalbeli gének közvetlenül kódolják (52), elsősorban IgM vagy IgG izotípusúak (53, 54), polireaktívak és széles spektrumú affinitást mutatnak a felismert epitópokhoz (55, 56). A polireaktivitás nem jelenti azonban a specifikusság hiányát, azaz minden polireaktív természetes autoantitest különböző epitópok csoportját ismeri fel és ilyen értelemben egyedi (57). Számos funkciót javasoltak már a természetes autoantitesteknek: immunológiai repertoárok szelekciójában vehetnek részt, szerepet játszhatnak az elsődleges immunválasz felgyorsításában (58), apoptotikus sejtek eltakarításában segédkezhetnek (59), gyulladás gátló hatással rendelkezhetnek (60), valamint hozzájárulhatnak az immunológiai homeosztázis fenntartásához (61). A természetes antitestek megkülönböztetése a természetes autoantitestektől kissé mesterkéltnek tűnhet, mivel a természetes antitestek termelésének hátterében álló B1 immunoglobulin gén készlet korlátozottsága, valamint a nagyszámú felismert antigén miatt valószínű, hogy jelen vannak saját és nem-saját keresztreakciót egyaránt mutató specificitások is (62, 63).

## Előzmények

Endoszimbiotikus evolúciós eredetük miatt a mitokondriumban kompartmentalizálódott fehérjék egy érdekes átmenetet képeznek a prokarióta idegentől a nélkülözhetetlen saját molekulák felé. A mitokondriális összetevők szerkezeti és funkcionális konzerváltsága alkalmassá teszi azokat a veleszületett és az adaptív immunválasz közti evolúciós kapcsolatok részletes vizsgálatára. A belső membrán enzimek, különösen a citrát kör enzimek (közülük is a citrát-szintáz) megfelelő modellt jelentenek az előbbieket vizsgálatára, mivel a sejtek fiziológiás körforgása során folyamatos kapcsolatba kerülnek a veleszületett és az adaptív komponensekkel egyaránt. Intézetünkben korábbi vizsgálatokkal kimutattunk citrát-szintáz ellenes autoantitesteket, mind egészséges egyéneknél, mind szisztémás autoimmun betegekben. Elvégeztük ezen autoantitestek epitóp térképezését fiziológiás és patológias állapotokban (szisztémás autoimmun betegségekben). Azt találtuk, hogy a citrát-szintázon felismert epitóp mintázat jelentős eltérést mutat egészséges egyéneknél és szisztémás autoimmun betegekben (62, 63).

Ezek az előzetes vizsgálatok vetették fel egy jól definiált patológias állapotra jellemző, a klinikumban diagnosztikus értékkel bíró autoantitest epitóp térképezésének szükségességét. **Eldöntendő kérdésünk az volt, hogy ezen betegség-asszociált autoantitest cél antigénje ellen termelődhetnek-e természetes autoantitestek is. Feltételeztük, hogy a természetes és a patológias autoantitestek által felismert epitóp mintázatok összehasonlító elemzése hozzájárulhat a természetes és a betegség-asszociált autoantitestek közötti különbségek jobb megismeréséhez.**

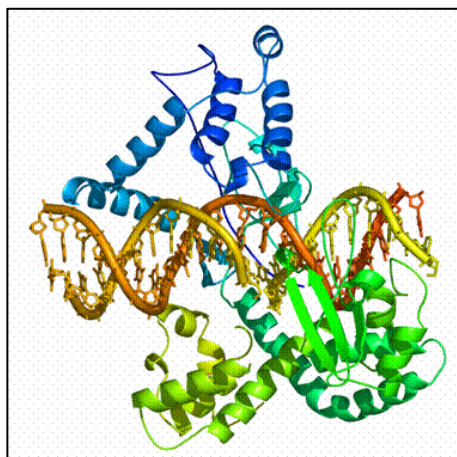
Modellként az SSc diagnózisában jelentős topo I ellenes autoantitestek vizsgálatát választottuk.

## Anti-topo I autoantitestek

### Topo I

A topo I a topoizomerázok IB alcsaládjába tartozó enzim, amely a kétszálú, szuperhelikális állapotú DNS relaxációját úgy hozza létre, hogy a DNS egyik szálát elhasítja és az elhasított DNS 3' végi foszfátjához kovalensen kapcsolódik (64). A topo I egy 765 aminosavból (AA) álló enzim, amely 5 különböző régiót tartalmaz melyek genetikailag különböző mértékben konzervált struktúrák: az N-terminális domén (1-125 AA), központi domén (core subdomain) I-II (216- 435 AA), központi domén (core

subdomain) III (436-636 AA), összekötő (linker) domén (637-713 AA) és a C-terminális domén (714-765 AA) (65).



**1. ábra** A humán DNS topozimeráz I szerkezete DNS komplexben (Redinbo és mtsai, 1998)

### **Anti-topo I autoantitestek kimutatása**

Az anti-topo I autoantitesteket először Western blottal mutatták ki. Az SSc-s betegek szérumában lévő immunglobulinok egy 70 kDA-os nukleáris fehérjével reagáltak, így ezeket az autoantitesteket először anti-Scl 70 antitesteknek nevezték el (66). Azóta kimutatták, hogy az Scl-70 a topo I bomlási terméke (67). Az anti-topo I antitestek leggyakrabban IgG izotípusúak, de kimutattak már IgA és IgM izotípusúakat is (68). Laboratóriumi diagnosztikai számára jelenleg elérhető anti-topo I kimutatási lehetőségek az indirekt immunfluoreszcencia HEp-2 sejteken valamint HEp-2 sejtek lizátumát illetve rekombináns topo I antigénet felhasználó ELISA, immunoblot valamint Luminex technikák. A PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinikán rutinszerűen használták a HEp-2 sejteken végzett indirekt immunfluoreszcencia technikát. A kapott festődési mintázatok alapján következtettek a betegek szérumában található autoantitestekre. A specifikus mintázatok felismerése nehézségekbe ütközhet, elkülönítésük nagy tapasztalatot igényel, a kapott eredmény kvalitatív. A PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet - NAT által NAT-1-1552/2008 nyilvántartási számon akkreditált - diagnosztikai laboratóriumában a betegek szérumából ELISA technikával végzett vizsgálatokkal mutatják ki az antinukleáris autoantitesteket. Az így kapott objektív, kvantitatív eredmények nagymértékben hozzájárulnak a szisztémás autoimmun betegségek pontosabb diagnózisához.

### **Anti-topo I autoantitestek klinikai jelentősége**

Az SSc a kötőszöveti betegségek közé tartozik, a bőr és bizonyos belső szervek (a tüdő, a szív, a gasztrointesztinális traktus és a vese) fibrózisával és késői atrófiájával, valamint generalizált obliteratív vaszkulopátiájával jellemezhető megbetegedés (69-71). Az SSc-s betegek klinikailag a jelenlegi klasszifikáció alapján két csoportra oszthatóak: a dcSSc-re a bőr és a tüdő, valamint egyéb belső szervek kiterjedt fibrózisa jellemző, míg lcSSc-ben a vaszkuláris eltérések dominálnak, a fibrózis mértéke korlátozott, elsősorban a test akrális részeinek bőrét érinti (72, 73)

Az anti-topo I antitest jelenlétéhez emelkedett mortalitás, pulmonáris fibrózis, muszkuloszkeletális és kardiális érintettség, valamint proteinuria társul (74). Az anti-topo I autoantitest szérumszintje dcSSc esetén összefüggést mutat a bőr fibrózisának kiterjedtségével és a belső szervi érintettség mértékével, ezért a betegség aktivitási markereként szolgálhat (75-77). Bár az anti-topo I autoantitesteket a dcSSc-re tartják jellemzőnek (78, 79) jelenlétük nem korlátozódik teljes mértékben a dcSSc-re, mivel anti-topo I autoantitestek mutathatók ki az lcSSc-s betegek egy részében is (78). Bár az anti-topo I autoantitestek jelenléte SSc-re nagymértékben specifikusnak tartott (80), SSc mellett SLE-ben, illetve más – esetenként gyulladásszerű betegségekben - is kimutatták (81, 82).

### **Anti-topo I autoantitestek epitóp specificitása**

Az anti-topo I antitestek epitóp specificitását SSc-ben számos korábbi tanulmányban vizsgálták. Molekuláris biológiai módszerek segítségével több vizsgálat során is igazolták, hogy SSc-s betegekben jelenlévő anti-topo I antitestek többféle epitópot ismernek fel, bár a vizsgálatok során használt rekombináns topo I fragmensek eltérőek voltak.

Rekombináns topo I-et használva számos epitópot határoztak meg a molekula középső és a C-terminális részein (83-89). Verheijen és mtsai három különböző epitóp régiót állapított meg, amelyek lefedik a teljes molekulát (84). D'Arpa és mtsai a topo I hat fragmensét expresszálták és kimutatták, hogy az anti-topo I pozitív szérumok többsége számos epitópot ismer fel (83). Kuwana és mtsai négy epitóp régiót találtak a topo I molekulán és kimutatták, hogy a 43 anti-topo I pozitív SSc-s szérumminta 83%-a reaktivitást mutatott azzal a fúziós fehérjével, ami a topo I 485-601 AA fragmensét tartalmazta (87). Piccinini és mtsai azt találták, hogy a topo I 405-484 AA szakaszán az összes általuk vizsgált anti-topo I pozitív szérum mutatott reaktivitást, de nem találtak epitópot a 485-765 AA között, ami az általuk vizsgált szérumminták kis számával lehet

magyarázható (85). Hu és mtsai magas reaktivitást mutattak ki a központi szubdomén I és II (236-435) valamint a központi szubdomén III (436-636) ellen. Kimutatták, hogy az antitestek gyakrabban ismerik fel az I és II-es központi domént mint a III-as központi domént (89).

Szintetikus peptidekkel végzett epitóp térképezés során négy fő epitópot azonosítottak, amelyek közül három a központi szubdomén I és II-ben (236-435 AA) egy pedig a központi szubdomén III-ban (436-636 AA) található (90). Ezen tanulmányok mindegyike anti-topo I antitestek által felismert topo I fragmenseket írt le a 484-560 AA régióban, ebből arra következtettek, hogy az immundomináns B-sejt epitópok ezen a régióon belül helyezkedhetnek el. A fragmenseket a topo I doménes szerkezete vagy antigenitás predikció alapján tervezték, így mindkét esetben figyelmen kívül hagyhattak további lehetséges epitópokat.

A topo I random fragmensekkel történt epitóp térképezéséről ez ideig csak egy tanulmány számolt be (91). A molekula random fragmenseit limitált dezoxiribonukleáz emésztéssel állították elő majd a létrehozott könyvtárat egy SSc-s beteg egyetlen szérummintájával tesztelték. Egy immundomináns epitóp régiót találtak, az összekötő domén 653-704 AA szakaszát. Az anti-topo I antitestek longitudinális vizsgálata során ezen régiók elleni reaktivitás stabilnak bizonyult (89, 92), ugyanakkor egy kisszámú szérummintán alapuló kísérlet során az anti-topo I antitestek által felismert régiók idővel változást mutattak (93). Bár az anti-topo I autoantitestek epitóp specificitását SSc-ben számos csoport vizsgálta, a dcSSc-ban, lcSSc-ban, SLE-ben megjelenő anti-topo I antitestek összehasonlító epitóp térképezését ez ideig még nem végezték el.

### **Anti-topo I autoantitestek lehetséges szerepe az SSc patomechanizmusában**

Az SSc patomechanizmusa igen komplex, a funkcionális (vazospazmus) és morfológiai vaszkuláris eltérések (vaszkuláris endotél károsodás, kapillárlézió, kisartéria lézió), a következményes iszkémiás-reperfúziós károsodás mellett a kórképre jellemző a kóros fibrózis következtében kifejezett kollagén és extracelluláris mátrix akkumuláció a bőrben valamint a belső szervekben, illetve határozott autoimmun jelenségek (69-71, 94). A betegség késői stádiumában pedig az obliteratív vaszkulopátia és a szöveti atrófia válik meghatározóvá. Az anti-topo I autoantitesteknek az SSc patomechanizmusában játszott szerepe még nem tisztázott. Ugyanakkor számos indirekt bizonyíték szól amellett, hogy az anti-topo I autoantitestek hozzájárulhatnak az SSc patogeneziséhez. Topo I szerepet játszhat a kollagén nagyfokú termelődésében, fokozhatja a kollagén típusú fehérje gén

transzkripciót. A topo I DNS kötő helyének és a kollagén gének szekvencia vizsgálatai során kapott eredmények alapján lehetséges, hogy a dermális kollagén gének szerkezetükből adódóan fokozottan érzékenyek a topo I aktivitására. A topo I molekulák többsége fiziológiás inhibitorok által inaktív állapotban tartott, ezen negatív szabályozás elvesztése patológiai konzekvenciákkal járhat (95, 96).

Az anti-topo I autoantitestek már az SSc nagyon korai stádiumában kimutathatóak (97). Jelenlétük általában a betegség súlyosabb formájához társul (74) és ezen autoantitestek szérumszintje összefüggésben állhat a betegség aktivitásának mértékével (75-77). Mindazonáltal fontos lenne ezen klinikai szempontból fontos jelenségek molekuláris és celluláris mechanizmusokkal történő alátámasztása, valamint annak igazolása, hogy az anti-topo I autoantitestek szerepet játszhatnak az SSc patogenezisében. Ehhez az immunológiai eltérések és a fibrózis közötti kapcsolat tisztázása látszik a kulcskérdésnek. Lehetséges, hogy az SSc specifikus autoantitestek képesek a fibroblasztok felszínéhez kötődni és miofibroblaszt irányú átalakulást indukálni. A trombocita eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) elleni stimuláló autoantitesteket már kimutattak SSc-s betegek szérumában (98, 99). Ugyanakkor ezen eredmények nagyszámú beteganyagban való megerősítése még nem történt meg.

Az intracelluláris vagy nukleáris antigének ellen irányuló antitestek feltételezett patogenetikai szerepével kapcsolatban általánosságban felmerülő kérdés, hogy ezen antitestek hogyan képesek a sejtfelszínhez kötődni és sejtkárosodást előidézni, vagy azt folyamatosan fenntartani. Az anti-topo I autoantitestek fibroblasztok felszínéhez való kötődését már leírták (100), később azt találták, hogy a topo I molekula képes fibroblaszt sejtek felszínéhez kötődni és így kötődési helyet biztosítani az anti-topo I autoantitesteknek (101). Ugyanezen kutatócsoport azt is kimutatta, hogy a fibroblasztok felszínén lévő topo I-anti-topo I immunkomplexek monociták adhézióját és aktivációját stimulálják in vitro. Ugyanakkor a topo I molekula számára a fibroblaszt felszínén a kötési helyet biztosító ligand még nem került azonosításra, valamint a topo I hasonló mértékben kötődött egészséges egyénekből és SSc-s betegekből származó fibroblasztokhoz. Bár mindezen eredmények az első experimentális bizonyítékát adják az anti-topo I autoantitestek sejtfelszínhez való kötődésének, nem magyarázzák, hogy az anti-topo I antitestek miért jellemzőek SSc-re és hogy milyen direkt vagy indirekt kapcsolat lehet ezen antitestek és a fibrózis kialakulása között.



Bár az anti-topo I antitestek szerepe az SSc patogenezisében még nem tisztázott, ugyanakkor a topo I elleni immunválasz eltérő lehet az anti-topo I pozitív betegekben, ami különböző epitóp specificitású anti-topo I autoantitestek termelődéséhez vezethet. Azaz az anti-topo I antitestek jelenlétének többféle klinikai következménye is lehet, illetve az anti-topo I antitestek jelenléte többféle patológiás folyamatot is jelezhet. Mindezek alapján az anti-topo I antitestek által felismert epitópok vagy epitóp mintázatok azonosítása hozzájárulhat a korai diagnózishoz és segíthet a különböző szervi érintettségek előrejelzésében, a korai prognózis felállításában, és ezáltal az adekvát terápiás stratégia kiválasztásában.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. Egy lambda fág felszínén megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár létrehozása.
2. A topo I lambda fág könyvtár affinitás szelekciója ismertén magas anti-topo I autoantitest titerű dcSSc-s, lcSSc-s, és SLE-s betegek szérumából izolált IgG izotípusú ellenanyagokkal.
3. A lambda fág felszínén megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója alapján kiválasztott szekvenciáknak megfelelő maltóz-kötő fehérje (MBP)-topo I fragmens fúziós fehérjék előállítás.
4. Nagyszámú dcSSc-s, lcSSc-s, SLE-s betegek és egészséges egyének szérummintáinak tesztelése az MBP-topo I fúziós fragmenteken ELISA-val és Western blottal.
5. A dcSSc-s, lcSSc-s és SLE-s betegek valamint egészséges egyének szérummintáiban előforduló anti-topo I autoantitestek epitóp mintázatának összehasonlítása.
6. Az anti-topo I autoantitestek epitóp mintázatának longitudinális vizsgálata.
7. A felismert topo I fragmentek klinikai jelentőségének meghatározása.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Vizsgált szérumminták**

A PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinikán kezelt 293 SSc-s beteg közül 59 (34 dcSSc-s, 25 lcSSc-s), a vizsgált 265 SLE-s beteg közül csak 8 mutatott anti-topo I pozitivitást a rutin diagnosztikában használt konvencionális anti-topo I ELISA teszttel (Hycor). A kiválasztott 59 SSc-s és 8 SLE-s betegtől betegenként 3 szérummintát vizsgáltunk, melyeket 6-12 hónapos időközönként gyűjtöttünk a 2004 és 2007 közötti időszakban. A betegek klinikai adatai a PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinika standardizált protokollja szerint lettek rögzítve (102). A kutatás klinikai jelentőségének szélesebb körben való megítéléséhez megvizsgáltuk a DE OEC ÁOK Belgyógyászati Intézet Reumatológiai Tanszéke által rendelkezésünkre bocsátott 51 anti-topo I pozitív SSc-s (11 dcSSc-s, 40 lcSSc-s) beteg szérummintáját is és elemeztük klinikai adataikat.

Kontrollként 63 magyar (átlag életkor:  $36.8 \pm 12.1$  év; az Országos Vérellátó Szolgálat Pécsi Regionális Vérellátó Központtól) 44 finn, 44 brit véradó (Prof. Füst György és Dr. Prohászka Zoltán - SOTE III. Belgyógyászati Klinika - által rendelkezésünkre bocsátva) és 65 idős egészséges egyén (átlagéletkor:  $62.4 \pm 5.4$  év, a PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinikától), valamint 110 idős, SSc-től és SLE-től különböző szisztémás autoimmun betegségben (8 vasculitis, 40 szeronegatív spondylarthritis, 11 myositis, 11 Sjögren szindróma, 10 arthritis psoriatica, 20 rheumatoid arthritis, 10 polymyalgia rheumatica) szenvedő, anti-topo I negatív beteg (átlag életkor:  $65.5 \pm 4.8$  év, a PTE KK Reumatológiai és Immunológia Klinikától) szérummintáit használtuk fel.

A vizsgálatok elvégzéséhez az etikai engedélyt a PTE KK Etikai Bizottsága adta meg. Megfelelő tájékoztatást követően minden beteg és egészséges egyén beleegyező nyilatkozatot írt alá.

### **Topo I antigén fragmens könyvtár létrehozása**

Egy egészséges véradó perifériás véréből Ficoll Paque (Amersham Pharmacia) gradiens centrifugálással tisztított  $5 \times 10^6$  mononukleáris sejtből TriReagenssel (Sigma) RNS-t izoláltunk. 5  $\mu$ g totál RNS-sel reverz transzkripciót végeztünk Superscript II RT enzimet (Invitrogen) használva.

A teljes hosszú humán topo I-et kódoló cDNS-t a következő primerekkel amplifikáltuk: 5'-ATGAGTGGGGACCACCTCCAC-3' és 5'-CTAAACTCATAGTCTTCATC-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 (Qiagen). Az amplifikációt a következő profillal végeztük: 95 °C 5 min, majd 35 ciklus: 94 °C 45sec 58 °C 30sec, 72 °C 3 min, végső extenzió: 72 °C 10 min. A PCR terméket 1.5%-os agaróz gélen választottuk el, majd megtisztítottuk (Quiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen), A-addíciót követően T/A vektorba klónoztuk (InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit, Fermentas). Az inzertet a topo I teljes kódoló régiójának szekvenálásával ellenőriztük Beckman Coulter CEQ 8800-zal.

A könyvtár létrehozását a lambdaD-bio fág display vektor (Dr. Alessandra Luzzago által rendelkezésünkre bocsátva; Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare, Olaszország) felhasználásával végeztük (103) kisebb módosításokkal (62) Lényegében az inzerteket SpeI és NotI helyeket tartalmazó random primerek (104) valamint templátként a fent említett plazmidből BamHI és EcoRI enzimekkel (Promega) való emésztés során kivágott topo I cDNS felhasználásával állítottuk elő. Tisztítás (Quiaquick PCR purification kit, Qiagen) és méret szelekció (Wizard columns, Promega) után az inzerteket SpeI és NotI enzimekkel (Promega) 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 (Fermentas) tartalmazott 5µl végtérfogatban, majd 48 órán át 4 °C -on inkubáltuk. A ligációs reakciót ezután fenol-kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, majd lambda fág részecskébe csomagoltuk (Ready To Go Lambda Packaging Kit, AmershamPharmacia). A lambda fágokat log fázisú E.coli BB4 fertőzésével és LB agar lemezekre való felvitelével amplifikáltuk. A plakkok kialakulása után a fágokat SM pufferrel (100mM NaCl, 8.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM Tris-HCl pH 7.5) éjszakán át eluáltuk, polietilén-glikolos kicsapással koncentráltuk, és proteáz gátlókat (Complete EDTA Free Proteasae Inhibitor Cocktail, Roche) tartalmazó pufferben reszuszpendáltuk.

### **Szérumok tisztítása protein G szefaróz oszlopon**

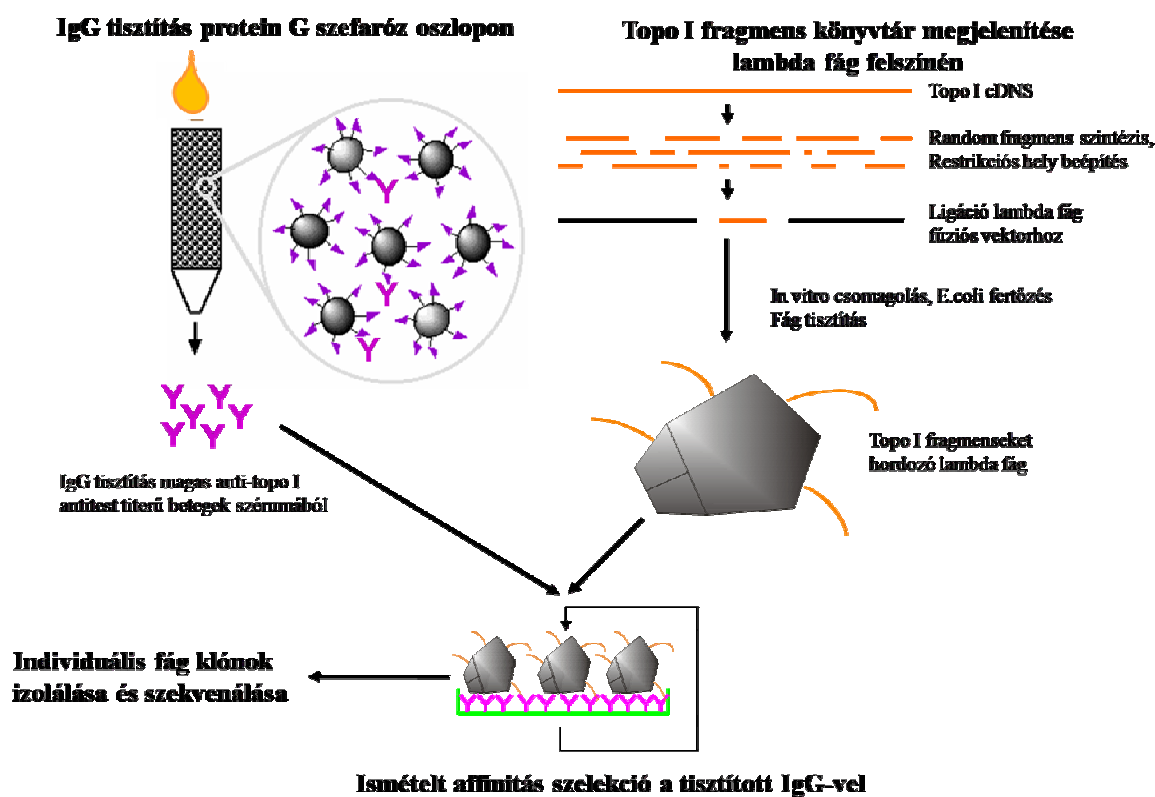
Az 5 dcSSc-s, 6 lcSSc-s és 4 SLE-s beteg PBS-sel kétszeresére hígított szérumát háromszor engedték át protein G szefaróz oszlopon (Amersham Pharmacia). Mosás után az antitesteket pH 2.5 glicin-HCl-el eluáltuk, a frakciókat 1 M TRIS-el neutralizáltuk, majd

indirekt ELISA-val teszteltük anti-topo I reaktivitásukat tormaperoxidázzal (HRPO) konjugált anti-humán IgG (Dako) másodlagos ellenanyagot használva.

### Topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója

A topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója a dcSSc-s, lcSSc-s és SLE-s betegek szérumból protein G szefaróz oszlopon tisztított anti-topo I ellenanyagokkal lényegében a Santini és mtsai által leírt módszer szerint történt (105).

Az 5 dcSSc-s, 6 lcSSc-s és 4 SLE-s beteg szérumból protein G szefaróz oszlopon tisztított anti-topo I ellenanyagokkal Nunc MaxiSorp lemezeket érzékenyítettünk, a lemezeket blokkolás után  $10^{10}$  topo I-lambda fággal 2 órán át inkubáltuk. A lyukakat ötször mostuk, majd a kötődött fágokkal a lyukakban E.coli BB4 sejteket fertőztünk. A fertőzött baktériumokat LB agar lemezekre vittük fel, majd a fágokat a fent ismertetett módon eluáltuk és koncentráltuk. Az affinitás szelekciót még kétszer megismételtük. A harmadik dúsítás után független klónokat állítottunk elő, végül elvégeztük a fág genomok megfelelő szakaszának DNS szekvenálását.



2. ábra A topo I antigén fragmens könyvtár létrehozása fág display technikával

## MBP-topo I fragmens fúziós fehérjék előállítása

A lambda fág felszínen megjelenített topo I antigén fragmnes könyvtár affinitás szelekciója alapján kiválasztott topo I fragmenseket rekombináns MBP fúziós fehérjékként expresszáltuk a pMal Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) felhasználásával.

A kiválasztott topo I fragmenseket [AA 5-30 (F1), 69-92 (F2), 87-145 (F3), 450-600 (F4), 640-705 (F5), 170-290 (F6), 295-350 (F7), 350-400 (F8), 295-400 (F9)] kódoló cDNSeket PCR-ral amplifikáltuk. Ehhez a következő EcoRI és BamHI restrikciós helyeket tartalmazó primereket használtuk:

5'-GGAATTCCTGCACCTCCACAACGATCCCA-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTAATCTTTGTGTTTATCTTTG-3' (F1),  
5'-GGAATTCCTGCACAAAGATGGAAGCTCAGA-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTATTCCTCTTTTCGTTTTTCC-3' (F2),  
5'-GGAATTCCTGGAAAAACGAAAAGAGGAAAAG-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTAAGCATCATCCTCATCTC-3' (F3),  
5'-GGAATTCCTGCTGAAAAAATGTGTGGACAAG-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTACTGCTGTAGCGTGATGGAG-3' (F4),  
5'-GGAATTCCTGTTTGAGAAGTCTATGATGAAC-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTAGGCTTGAAGCTTCCAGCTTC-3' (F5),  
5'-GGAATTCCTGGATGGTAAATTGAAAAAACC-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTACTCTTCATTAGTCATTTCC-3' (F6),  
5'-GGAATTCCTGACCAACCTAAGCAAATGTG-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTAAATCCTCTCTTTGTGG-3' (F7),  
5'-GGAATTCCTGATTGCTAACTTCAAGATAG-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTACTTATGTCCTGGAGGAG-3' (F8),  
5'-GGAATTCCTGACCAACCTAAGCAAATGTG-3' és  
5'-CGGGATCCCGCTACTTATGTCCTGGAGGAG-3' (F9).

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 (Qiagen). Az amplifikációt a következő profillal végeztük: 95 °C 5 min, majd 35 ciklus: 94 °C 45 sec 58 °C 30 sec, 72 °C 1 min, végső extenzió: 72 °C 10 min. A PCR terméket 0,8%-os agaróz gélen választottuk el, majd megtisztítottuk (Quiaquick Gel

Extraction Kit, Qiagen), A-addíciót követően T/A vektorba klónoztuk (InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit, Fermentas). A fent említett plazmidból BamHI és EcoRI enzimekkel (Promega) való emésztés során kivágott topo I cDNS szakaszokat pMal-c2 vektorba klónoztuk. A konstrukciókat DNS szekvenálással ellenőriztük Beckman Coulter CEQ 8800-zal.

A fúziós fehérjét E. coli TB1-ben expresszáltattuk a gyártó utasításait alapul véve (New England Biolabs). Lényegében a baktérium kultúrákat 37 °C-on rázó inkubátorban ampicillint (50 µg/ml) és glükózt (0.2%) tartalmazó LB médiumban addig növesztettük, amíg a 600nm-en mért OD 0.7-1 közötti értéket el nem érte.. Centrifugálást (5000rpm 10 perc) követően a pelletet LB médiumban reszuszpendáltuk és isopropyl-β-D-thiogalactopyranozid (0.3 mM) hozzáadásával indukáltuk a fúziós fehérjék expresszióját. Két óras 30 °C-os rázóban való inkubálást követő centrifugálás (5000rpm, 10 perc) után a pelletet proteáz gátlókat (Complete Mini EDTA Free Proteasae Inhibitor Cocktail, Roche) tartalmazó PBS pufferben reszuszpendáltuk. 100 µg/ml koncentrációban lizozimet (Sigma-Aldrich) adtunk hozzá, majd 30 percig szobahőmérsékleten forgattuk. Ezt követően folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd 55.5 °C-os vízfürdőben felolvasztottuk, amit még négyszer megismételtünk. A baktériumok lizátumához ezek után 10 µg/ml koncentrációban DNáz-t (Sigma-Aldrich) adtunk, majd szobahőmérsékleten 90 percig forgattuk. Centrifugálást (10000rpm, 10 perc) követően a felülúszót és a PBS-ben reszuszpendált pelletet valamint az indukció előtti, PBS-ben reszuszpendált baktérium pelletet 10% merkaptóetanolt tartalmazó SDS mintapufferrel 1:1 arányban hígítottuk, majd 10 perces forralás után 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) során elválasztottuk és Coomassie brilliant kék festéssel láthatóvá tettük. Így ellenőriztük az indukció sikerességét.

Az MBP-topo I fragmens fúziós fehérjét amilóz gyantával tisztítottuk a következők szerint: A rekombináns fúziós fehérjét tartalmazó, PBS-sel a kétszeresére hígított, 0.45 µm-es szűrőn (Sarstedt) átszűrt felülúszóhoz hozzáadtuk a PBS-sel átmosott amilóz gyantát, majd 4 °C -on forgattuk éjszakán át. Az MBP-topo I fragmens fúziós fehérjét 10 mM maltózt és proteáz inhibitorokat (Complete Mini EDTA Free Proteasae Inhibitor Cocktail, Roche) tartalmazó PBS pufferrel eluáltuk. A tisztított fehérjét SDS-PAGE-t követő Coomassie brilliant kék festéssel ellenőriztük.

## **A dcSSc-s, lcSSc-s, SLE-s és kontroll szérumminták tesztelése MBP-topo I fúziós fragmenseken indirekt ELISA-val**

Az indirekt ELISA vizsgálatok során 96 lyukú poliszitirén Nunc Maxisorp lemezeket 10 µg/ml koncentrációjú, PBS-ben oldott rekombináns topo I fragmensekkel vagy MBP-vel érzékenyítettünk. A lemezeket mosó pufferrel mostuk (PBS, 0.05% Tween-20) majd 3% szarvasmarha szérum albumin (BSA) tartalmú mosó pufferrel 1 órán át blokkoltuk. A 2% BSA tartalmú mosó pufferrel 1:250 arányban hígított szérummintákat triplikátumokban 1 órán keresztül inkubáltuk. Végül a lemezeket HRPO-val jelölt, 1:5000 arányban hígított anti-humán IgG (Dako) vagy 1000-szeresre hígított anti-humán IgM (Dako) másodlagos antitestekkel 1 órát inkubáltuk. Pozitív kontrollként az MBP fúziós fehérjék kimutatásához elsődleges antitestnek nyúl anti-MBP antitestet (New England Biolabs) 1:5000 hígításban, másodlagosnak HRPO-val jelölt kecske anti-nyúl antitestet 1:500 hígításban használtunk. A reakciót *o*-feniléndiaminnal (Sigma-Aldrich) hívtuk elő, majd 492 nm-en mértük az optikai denzitást (OD). Pozitívnak tekintettük a reakciót, ha a szérumminta MBP-topo I fragmenszen mért reaktivitásából levonva az MBP-n mért reaktivitását a kapott OD>0.1.

## **Kompetíciós ELISA az MBP-topo I fúziós fragmensekkel**

A kompetíciós ELISA vizsgálatok során 96 lyukú poliszitirén Nunc Maxisorp lemezeket 10 µg/ml koncentrációjú, PBS-ben oldott rekombináns topo I F4 fragmenssel érzékenyítettünk. A lemezeket mosó pufferrel mostuk (PBS, 0.05% Tween-20) majd 3% BSA tartalmú mosó pufferrel 1 órán át blokkoltuk. A 2% BSA tartalmú mosó pufferrel 1:250 arányban hígított, kiválasztott anti-F4 antitest pozitív szérummintákat egy-egy 0, 10 vagy 50 µg MBP-topo I fúziós fragmenssel (F1-F9) 1 órán keresztül inkubáltuk. Majd az így előkészített mintákkal az előzőleg érzékenyített és blokkolt lemezeket 1 órán keresztül inkubáltuk. Végül a lemezeket HRPO-val jelölt, 1:5000 arányban hígított anti-humán IgG (Dako) vagy 1000-szeresre hígított anti-humán IgM (Dako) másodlagos antitestekkel 1 órát inkubáltuk. Pozitív kontrollként az MBP fúziós fehérjék kimutatásához elsődleges antitestnek nyúl anti-MBP antitestet (New England Biolabs) 1:5000 hígításban, másodlagosnak HRPO-val jelölt kecske anti-nyúl antitestet 1:500 hígításban használtunk. A reakciót *o*-feniléndiaminnal (Sigma-Aldrich) hívtuk elő, majd 492 nm-en mértük az optikai denzitást.



## **A dcSSc-s, lcSSc-s, SLE-s és kontroll szérumminták tesztelése MBP-topo I fúziós fragmenseken Western blottal**

Az indirekt ELISA-val kapott eredményeket Western blottal erősítettük meg. A 40 µg/ml koncentrációjú, 10% merkaptóetanol tartalmú SDS mintapufferrel 1:1 arányban hígított MBP fúziós topo I fragmenseket valamint az MBP-t 10 perces forralást követően 10%-os SDS-PAGE során elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránokra blottoltuk. A nitrocellulóz membránokat 5% tejpor (Bio-Rad) tartalmú mosó pufferben (100mM NaCl, 10mM Tris-base pH 7.4, 0.1% Tween 20) 1 órán át blokkoltuk, majd 2% tejpor tartalmú mosó pufferrel 1:500 arányban hígított szérummintákkal inkubáltuk újabb 1 órán keresztül. Mosást követően HRPO-val jelölt, 1:2000 arányban hígított anti-humán IgG-vel (Dako) 1 órát inkubáltunk. Pozitív kontrollként az MBP fúziós fehérjék kimutatásához elsődleges antitestnek nyúl anti-MBP antitestet (New England Biolabs) 1:5000 hígításban, másodlagosnak HRPO-val jelölt kecske anti-nyúl antitestet 1:2000 hígításban használtunk. A membránokat SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) hívtuk elő majd röntgen filmre exponáltuk.

## **A topo I epitópok ellen termelődött antitestek reaktivitásának longitudinális vizsgálata**

Az F1, F4 és F8 fragmensek elleni reaktivitás időbeli állandóságának vizsgálatához az anti-topo I antitestek reaktivitását sorozat szérummintákkal vizsgáltuk. A 34 dcSSc-s, 25 lcSSc-s és 8 SLE-s betegtől származó, betegenként 3 szérummintát teszteltük ELISA-val. Az ELISA-val kapott eredményeket Western blottal támasztottuk alá a 10 F1 pozitív, 10 random módon kiválasztott F4 pozitív és a 4 F8 pozitív beteg szérummintáit vizsgálva. A szérummintákat konvencionális anti-topo I ELISA-val is teszteltük.

## **A felismert topo I fragmensek klinikai jelentőségének meghatározása**

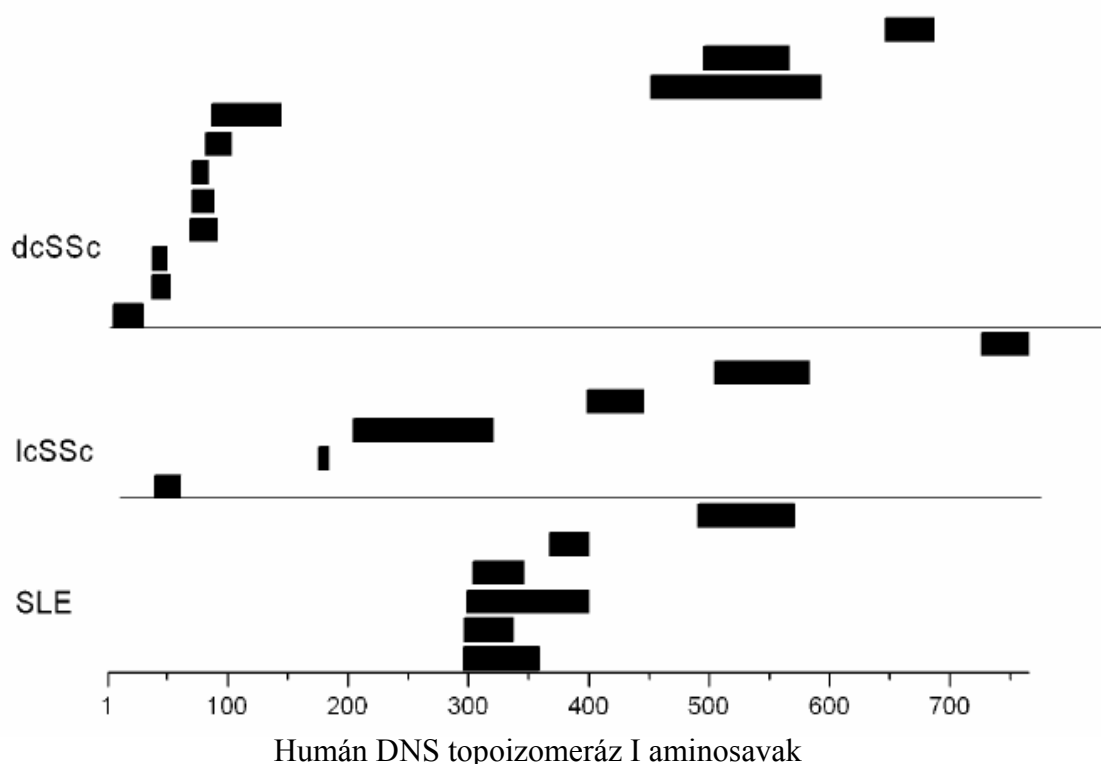
A vizsgált klinikai adatok statisztikai analízise során a kategórikus adatokat chi-négyzet teszttel, a folytonos változókat Student-féle t próbával vizsgáltuk. Az optikai denzitás és a folytonos változók közötti összefüggéseket Spearman-féle korrelációs teszttel vizsgáltuk.

A 0.05 alatti p érték esetén az eredményeket szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai analízist az SPSS statisztikai szoftver csomag segítségével végeztük el.

## EREDMÉNYEK

### Anti-topo I autoantitestek epitóp térképezése bakteriofág felszínén megjelenített topo I antigén fragmens könyvtárral

Az anti-topo I antitestek által felismert epitópok vizsgálatához létrehoztunk egy lambda fág felszínén megjelenített topo I antigén random fragmens könyvtárat. A létrehozott könyvtárunk megközelítőleg  $2 \times 10^7$  véletlen kezdőpontú és hosszúságú inzertet hordozó klont tartalmaz. A könyvtár affinitás szelekcióját 5 dcSSc-s, 6 lcSSc-s és 4 SLE-s betegek szérumból tisztított IgG izotípusú anti-topo I ellenanyagokkal végeztük el. A harmadik affinitás szelekció után 60 klont választottunk ki DNS szekvenálásra. A lambda fág felszínén megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciójával kapott eredmények alapján az anti-topo I autoantitestek által felismert epitóp mintázat különbözik dcSSc, lcSSc és SLE esetén (3. ábra).



**3. ábra** A dcSSc-s, lcSSc-s és SLE-s betegek szérumbmintái által felismert topo I epitópok mintázata eltérő

A dcSSc-s betegek szérumból tisztított IgG-vel affinitás szelektált fág klónok között 11 különböző klón ismétlődött: 8 részben átfedő fág klón, amelyek az N-terminális domén AA 5-145 szakaszát lefedő fragmenseket, 2 átfedő klón melyek a központi

szubdomén III AA 451-593 szakaszát lefedő fragmenseket jelenítenek meg, valamint 1 egyedülálló klón, amely az összekötő domén AA 640-705 szakaszát reprezentálja.

Az lcSSc-s betegek szérumból tisztított IgG izotípusú antitestekkel való affinitás szelekció során 6 különböző fág klónt sikerült elkülöníteni: 2 klón az N-terminális domén AA 40-61 és AA 176-184 szakaszát lefedő fragmenseket, 1 klón a központi szubdomén I-II AA 205-321 részét, 1 a központi szubdomén I-II és központi szubdomén III közötti junkció AA 399-445 szakaszát, 1 a központi szubdomén III AA 505-583 részét, 1 klón pedig a C-terminális domén AA 726-765 szakaszát lefedő fragmenst expresszálja.

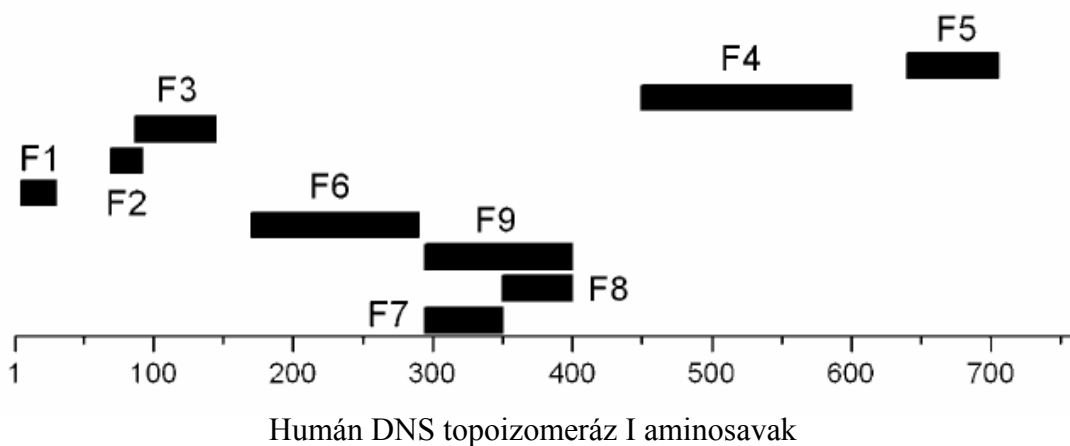
Az SLE-s betegek szérumból tisztított IgG-vel affinitás szelektált 6 fág klónok közül 5 a központi szubdomén I-II AA 296-400 szakaszát, 1 pedig a központi szubdomén III AA 491-571 részét reprezentálja.

A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a dcSSc-s betegek szérummintái elsősorban az N-terminális doménben, az SLE-s betegeké a központi domén I-II területén, míg az lcSSc-s betegek szérummintái a topo I molekula teljes hosszában ismernek fel epitópokat. A topo I AA 451-593 szakaszával azonban mindhárom betegcsoport mindegyik tagjának szérummintája mutatott reaktivitást.

#### **Anti-topo I autoantitestek egészséges egyének szérumban is kimutathatóak**

A lambda fág felszínen megjelenített topo I antigén fragmens könyvtárral kapott eredmények megerősítése érdekében rekombináns MBP-topo I fúziós fehérjéket állítottunk elő. A fág könyvtár affinitás szelekciójával kapott szekvenciáknak megfelelően előállítottunk kilenc MBP-topo I fragmens fúziós fehérjét (F1-F9)

(4. ábra).



**4. ábra** A vizsgálataink során előállított és alkalmazott MBP-topo I fúziós fehérjék

A fúziós fehérjéket először egészséges egyének szérummintáival teszteltük, amelyek az előzőleg elvégzett konvencionális ELISA teszt alapján anti-topo I negatívnak bizonyultak. Azt az eredményt kaptuk, hogy a 63 magyar (átlag életkor:  $36.8 \pm 12.1$  év) véradó 44%-ának szérummintájában a topo I F4 (AA 450-600) fragmense ellen IgG izotípusú autoantitestek mutathatóak ki. A többi topo I fragmenst (F1-3, F5-9) felismerő antitestek a véradók szérummintáiban nem voltak kimutathatóak (3. táblázat). Az anti-topo I autoantitestek egészséges egyénekben való jelenlétének kiterjedtebb vizsgálata céljából 44 finn és 44 brit véradó valamint 65 idős, egészséges magyar egyén (átlag életkor:  $62.4 \pm 5.4$  év) szérummintáját is teszteltük. Mind az IgM mind az IgG izotípusú anti-F4 antitestek jelen vannak egészséges egyénekben függetlenül az életkortól és a földrajzi elhelyezkedéstől (3. táblázat)

|   | <b>Anti-F4 IgM pozitív<br/>(átlag OD)</b> | <b>Anti-F4 IgG pozitív<br/>(átlag OD)</b> |
|---|---|---|
| <b>Magyar véradók (63)</b>                    | 37%<br>( $0.254 \pm 0.057$ )              | 44%<br>( $0.189 \pm 0.066$ )              |
| <b>Finn véradók (44)</b>                      | 52%<br>( $0.343 \pm 0.068$ )              | 9%<br>( $0.350 \pm 0.076$ )               |
| <b>Brit véradók (44)</b>                      | 76%<br>( $0.265 \pm 0.047$ )              | 25%<br>( $0.190 \pm 0.043$ )              |
| <b>Idős, egészséges magyar<br/>egyén (65)</b> | 17%<br>( $0.205 \pm 0.065$ )              | 51%<br>( $0.359 \pm 0.083$ )              |

**3. táblázat** A topo I F4 fragmense elleni autoantitestek előfordulási gyakorisága egészséges egyénekben

### **Szisztémás autoimmun betegek szérummintáinak reaktivitása a topo I rekombináns F4 fragmensén**

Megvizsgáltuk 34 dcSSc-s, 25 lcSSc-s és 8 SLE-s beteg konvencionális ELISA-val anti-topo I pozitívnak bizonyult szérummintáját, valamint 110 idős, SSc-től és SLE-től különböző szisztémás autoimmun beteg szérummintáját, hogy kimutathatóak-e bennük anti-F4 antitestek. Az F4 fragmensén mind a 67 anti-topo I pozitív szérumminta mutatott reaktivitást valamint az SSc-től és SLE-től különböző szisztémás autoimmun beteg szérummintáiban is kimutatható volt anti-F4 antitest (4. táblázat).

|  | <b>Anti-F4 IgM pozitív<br/>(átlag OD)</b> | <b>Anti-F4 IgG pozitív<br/>(átlag OD)</b> |
|--|---|---|
| <b>Idős, szisztémás autoimmun<br/>beteg (110)</b>        | 71%<br>(0.456 ± 0.092)                    | 31%<br>(0.217 ± 0.052)                    |
| <b>Anti-topo I pozitív SSc-s és<br/>SLE-s beteg (67)</b> | 53%<br>(0.726 ± 0.512)                    | 100%<br>(0.735 ± 0.212)                   |

**4. táblázat** A topo I F4 fragmense elleni autoantitestek előfordulási gyakorisága szisztémás autoimmun betegekben

### **A topo I rekombináns F4 fragmensét felismerik természetes autoantitestek**

Szisztémás autoimmun betegek és egészséges egyének szérumban lévő anti-F4 autoantitestek ELISA vizsgálatával kapott átlag OD értékek összehasonlítása alapján megállapíthatjuk, hogy az IgM izotípusú antitestek a legmagasabb titerben az anti-topo I pozitív SSc-s vagy SLE-s betegek szérumban vannak jelen. Ugyanakkor nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy mind a 67 anti-topo I pozitív SSc-s vagy SLE-s beteg szérumban kimutathatóak voltak IgG izotípusú anti-F4 antitestek és ezen antitestek titere ebben a csoportban volt a legmagasabb az összes vizsgált csoport közül.

Ezen eredmények alátámasztására a kilenc rekombináns topo I fragmensevel és az MBP-vel kompetíciós ELISA-t végeztünk mindegyik vizsgált csoportból a legmagasabb anti-F4 antitest titerű szérummintákkal. Csak az F4 fragmens tudta szignifikáns mértékben gátolni a szérumban reaktivitását az F4 fragmens ellen (átlag anti-F4 IgM reaktivitás OD<sub>492</sub>: 0.58 ± 0.18 kompetíció nélkül; 0.28 ± 0.08 a 10 µg F4 fragmensevel való kompetícióval és 0.08 ± 0.03 az 50 µg F4 fragmensevel történt kompetícióval; átlag anti-F4 IgG reaktivitás OD<sub>492</sub>: 0.48 ± 0.15 kompetíció nélkül; 0.32 ± 0.11 a 10 µg F4 fragmensevel való kompetícióval és 0.06 ± 0.03 az 50 µg F4 fragmensevel történt kompetícióval).

A kapott eredmények szerint mind az IgG mind az IgM izotípusú anti-F4 antitestek nem csak az SSc-s betegek szérumban vannak jelen, hanem kimutathatóak SSc-től és SLE-től különböző szisztémás autoimmun betegek valamint egészséges egyének szérummintáiban is függetlenül az életkortól és a földrajzi elhelyezkedéstől. Az a tény, hogy az egészséges egyének és az SSc-től valamint SLE-től különböző szisztémás autoimmun betegek anti-topo I negatívnak bizonyultak a teljes hosszú antigént használó

konvencionális ELISA teszttel felveti a lehetőségét, hogy a 450-600 AA szakaszt reprezentáló F4 fragmens rejtve lehet a topo I molekula háromdimenziós szerkezetében.

Mindezek alapján lehetséges, hogy az egészséges egyének és a szisztémás autoimmun betegek szérumban kimutatható F4 fragmens elleni antitestek a természetes autoantitestek közé tartoznak.

### **SSc-s és SLE-s betegek szérummintáinak reaktivitása az MBP-topo I fúziós fehérjéken**

A kilenc MBP-topo I rekombináns fehérje elleni reaktivitást teszteltük 34 dcSSc-s, 25 lcSSc-s és 8 SLE-s anti-topo I pozitív beteg szérummintájával. Az IgG izotípusú ELISA vizsgálat eredményeit az 5. táblázat tartalmazza.

| <b>Topo I fragmensek (AA)</b> | <b>dcSSc<br/>(n = 34)</b> | <b>lcSSc<br/>(n = 25)</b> | <b>SLE<br/>(n = 8)</b> |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| <b>F1 (5-30)</b>              | 9 (26%)                   | 1 (4%)                    | 0                      |
| <b>F2 (69-92)</b>             | 1 (3%)                    | 1 (4%)                    | 0                      |
| <b>F3 (87-145)</b>            | 1 (3%)                    | 0                         | 0                      |
| <b>F4 (450-600)</b>           | 34 (100%)                 | 25 (100%)                 | 8 (100%)               |
| <b>F5 (640-705)</b>           | 2 (6%)                    | 0                         | 0                      |
| <b>F6 (170-290)</b>           | 2 (6%)                    | 2 (8%)                    | 0                      |
| <b>F7 (295-400)</b>           | 0                         | 0                         | 1 (12%)                |
| <b>F8 (350-400)</b>           | 0                         | 0                         | 4 (50%)                |
| <b>F9 (295-350)</b>           | 0                         | 0                         | 1 (12%)                |

**5. táblázat** A rekombináns topo I fragmensek felismerési gyakorisága anti-topo I antitest pozitív SSc-s és SLE-s betegek szérumban

A topo I F4 fragmensét mindegyik, konvencionális ELISA teszttel előzőleg anti-topo I pozitívnak bizonyult dcSSc-s, lcSSc-s, valamint SLE-s beteg szérummintája felismerte. Az F1 fragmenst (5-30 AA) a 34 dcSSc-s beteg közül 9 ismerte fel. Az F8 fragmenst (350-400 AA) a 8 közül 4 SLE-s beteg széruma ismerte fel.

A többi fragmens (F2-F3, F5-F7, F9) elleni antitestek 1-2 beteg szérumában voltak kimutathatóak, jelenlétüket egyéni különbségek magyarázhatják.

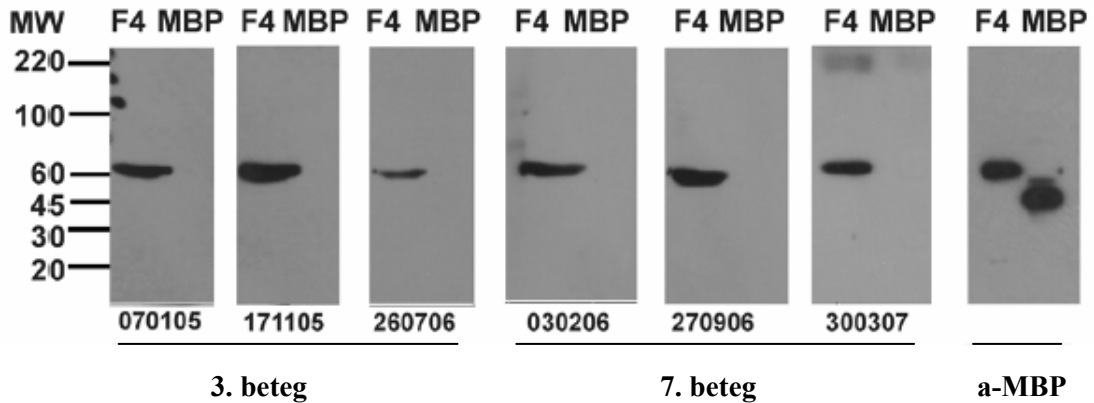
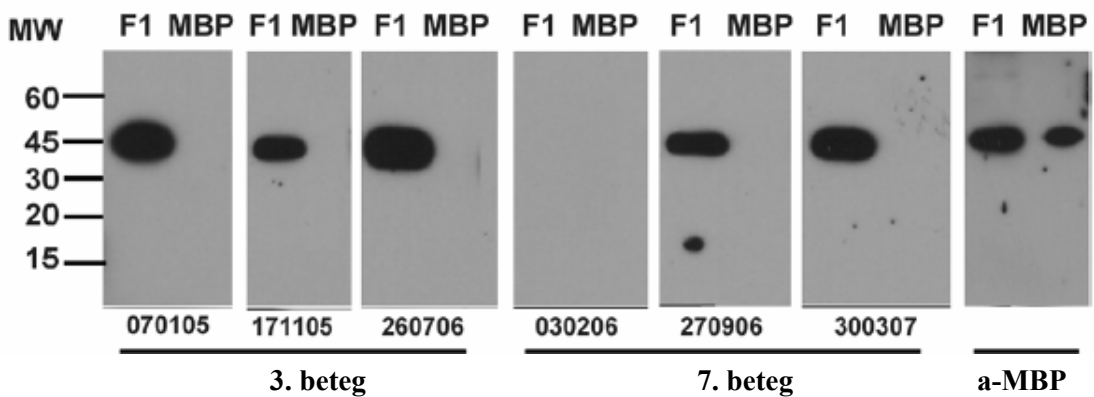
### **A topo I epitópok ellen termelődött antitestek reaktivitásának longitudinális vizsgálata**

Az F1, F4 és F8 fragmensek elleni reaktivitás időbeli változásának vizsgálatához ezen fragmensek ellen termelődött antitesteket teszteltük az 59 SSc-s és 8 SLE-s betegől származó, betegenként 3 szérummintában, melyeket 6-12 hónapos időközönként gyűjtöttünk a 2004 és 2007 közötti időszakban. Az ELISA-val kapott eredményeket Western blottal erősítettük meg a 10 F1 pozitív dcSSc-s beteg, 10 random módon kiválasztott F4 pozitív beteg, valamint a 4 F8 pozitív SLE-s beteg szérummintáit használva. Mindegyik szérummintát konvencionális anti-topo I ELISA-val is teszteltük.

Longitudinális vizsgálatunk során azt az eredményt kaptuk, hogy az F4 fragmens ellen termelődött antitestek reaktivitása az esetek 94%-ában (61/67 beteg) időben állandó volt. A 67 beteg közül 18-nak volt legalább egy olyan szérummintája, amelyből anti-topo I antitestek konvencionális ELISA-val nem voltak kimutathatóak. Az egy beteghez tartozó három különböző időpontban vett minták vizsgálata során 8 esetben a legkorábbi minta bizonyult konvencionális ELISA teszttel negatívnak. Az ELISA-val kimutatott anti-F4 antitestek jelenlétét Western blottal is igazoltuk (5/A ábra).

Az anti-F1 antitestek elleni reaktivitás időbeli változást mutatott. Az anti-F1 antitestre pozitív 9 dcSSc-s beteg közül 4-nek a legkorábbi szérummintájában F1 fragmens elleni antitestek jelenléte nem volt igazolható, de az immunreakció idővel pozitívvá vált és erősödött is. Egy esetben az anti-F1 antitestek a második mintában kimutathatóak voltak, de a harmadik mintában már nem. A maradék 4 dcSSc-s beteg esetében mind a 3 szérumminta pozitív volt anti-F1 antitestre. Az ELISA-val kapott eredményeket ez esetben is Western blottal támasztottuk alá (5/B ábra).

Az anti-F8 antitestre pozitív 4 SLE-s beteg közül csak 1 beteg esetében volt időben állandó az F8 fragmens ellen termelődött antitestek reaktivitása, 3 esetben idővel változást mutatott. Az anti-F8 antitestek Western blottal nem voltak kimutathatóak, ami arra utal, hogy az ezen fragmens által megjelenített epitóp(ok) konformációs epitópok.

**A****B**

**5. ábra** A topo I F4 és F1 fragmense elleni autoantitestek reprezentatív longitudinális vizsgálata Western blot technikával

### Klinikai eredmények

A vizsgált klinikai adatok (bőrérintettség kiterjedése, kézkontraktúrák, azotémia és/vagy malignus hipertónia, szívérintettség, artéria pulmonális hipertónia, nyelőső szűkület/tágulat és diszmotilitás jelenléte, tüdőfibrózis kiterjedtsége, forszírozott vitál kapacitás és diffúziós kapacitás értéke) statisztikai analízise során nem találtunk összefüggést az anti-topo I antitestek epitóp specificitása és az SSc klinikai megjelenése között.

Azonban szignifikáns különbség mutatkozott az SSc-s betegek anti-F1 antitest pozitív és anti-F1 antitest negatív csoportjai között a betegek életkorában [F1 negatív SSc-s betegek átlag életkora:  $54.8 \pm 13.5$  év; F1 pozitív SSc-s betegek átlag életkora:  $63.9 \pm 9.4$  év;  $p=0.048$ ; (6/A táblázat)] és betegségük fennállásának időtartamában [F1 negatív SSc-s betegek átlagos betegség fennállása:  $10.0 \pm 7.3$  év; F1 pozitív SSc-s betegek átlagos betegség fennállása:  $17.1 \pm 12.9$  év;  $p=0.019$ ; (6/B táblázat)]. Továbbá szignifikáns volt a különbség a dcSSc-s betegek anti-F1 antitest pozitív és anti-F1 antitest negatív csoportjai



között is a betegek életkorában [F1 negatív dcSSc-s betegek átlag életkora:  $51.9 \pm 14.3$  év; F1 pozitív dcSSc-s betegek átlag életkora:  $63.7 \pm 10.0$ ;  $p=0.03$ ; (6/A táblázat)].

## A

|  | Betegek száma | Átlag életkor (év) |
|--|---------------|--------------------|
| Anti-F1 antitest negatív SSc-s betegek   | 49            | $54.8 \pm 13.5$    |
| Anti-F1 antitest pozitív SSc-s betegek   | 10            | $63.9 \pm 9.4$ *   |
| Anti-F1 antitest negatív dcSSc-s betegek | 25            | $51.9 \pm 14.3$    |
| Anti-F1 antitest pozitív dcSSc-s betegek | 9             | $63.7 \pm 10.0$ *  |

\*  $p<0.05$

## B

|  | Betegek száma | Átlagos betegség fennállás (év) |
|--|---------------|---------------------------------|
| Anti-F1 antitest negatív SSc-s betegek | 49            | $10.0 \pm 7.3$                  |
| Anti-F1 antitest pozitív SSc-s betegek | 10            | $17.1 \pm 12.9$ *               |

\*  $p<0.05$

**6. táblázat** Anti-F1 antitest negatív és pozitív SSc-s és dcSSc-s betegek átlag életkorának és az SSc-s betegek átlagos betegség fennállásának összehasonlítása

A PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinikán kezelt SSc-s betegek vizsgálatát a DE OEC ÁOK Belgyógyászati Intézet Reumatológiai Tanszéke által rendelkezésünkre bocsátott 51 anti-topo I pozitív SSc-s (11 dcSSc-s, 40 lcSSc-s) beteg szérummintáinak és klinikai adatainak analízisével kiegészítve a korábbi eredményeinket megerősítettük. A vizsgált klinikai adatok statisztikai analízise során ez esetben sem találtunk összefüggést az anti-topo I antitestek epitóp specificitása és az SSc klinikai megjelenése között. Ugyanakkor szignifikáns különbség mutatkozott az SSc-s betegek anti-F1 antitest pozitív és anti-F1 antitest negatív csoportjai között a betegségük fennállásának időtartamában [F1 negatív SSc-s betegek átlagos betegség fennállása:  $10.6 \pm 6.5$  év; F1 pozitív SSc-s betegek átlagos betegség fennállása:  $15.9 \pm 11.6$  év;  $p=0.015$ ; (7/A táblázat)]. Szintén szignifikáns volt a különbség a dcSSc-s betegek anti-F1 antitest pozitív és anti-F1 antitest negatív csoportjai között a betegek életkorában [F1 negatív dcSSc-s betegek átlag életkora:  $49.1 \pm 14.2$  év; F1 pozitív dcSSc-s betegek átlag életkora:  $59.6 \pm 13.1$ ;  $p=0.035$ ; (7/B táblázat)] valamint a betegségük fennállásának időtartamában is [F1

negatív dcSSc-s betegek átlagos betegség fennállása:  $8.9 \pm 4.8$  év; F1 pozitív SSc-s betegek átlagos betegség fennállása:  $14.6 \pm 10.8$  év;  $p=0.02$ ; (7/A táblázat)].

## A

|  | Betegek száma | Átlagos betegség fennállás (év) |
|--|---------------|---------------------------------|
| Anti-F1 antitest negatív SSc-s betegek   | 97            | $10.6 \pm 6.5$                  |
| Anti-F1 antitest pozitív SSc-s betegek   | 13            | $15.9 \pm 11.6$ *               |
| Anti-F1 antitest negatív dcSSc-s betegek | 34            | $8.9 \pm 4.8$                   |
| Anti-F1 antitest pozitív dcSSc-s betegek | 11            | $14.6 \pm 10.8$ *               |

\*  $p<0.05$

## B

|  | Betegek száma | Átlag életkor (év) |
|--|---------------|--------------------|
| Anti-F1 antitest negatív dcSSc-s betegek | 34            | $49.1 \pm 14.2$    |
| Anti-F1 antitest pozitív dcSSc-s betegek | 11            | $59.6 \pm 13.1$ *  |

\*  $p<0.05$

**7. táblázat** Anti-F1 antitest negatív és pozitív a PTE KK Reumatológiai és Immunológiai Klinikán és a DE OEC ÁOK Belgyógyászati Intézet Reumatológiai Tanszékén kezelt SSc-s és dcSSc-s betegek átlagos betegség fennállásának és a dcSSc-s betegek átlag életkorának összehasonlítása

Annak tisztázására, hogy az F1 fragmens elleni antitestek specifikus-e SSc-re és megjelenésük nem csupán az öregedés következménye 65, az SSc-s betegekhez hasonló életkorú (átlag életkor:  $62.4 \pm 5.4$  év) egészséges egyént valamint 110, az SSc-s betegekhez hasonló életkorú (átlag életkor:  $65.5 \pm 4.8$  év), az SSc-től különböző szisztémás autoimmun beteget is megvizsgáltunk. Az egészséges egyének szérummintái közül csak 1, az SSc-től különböző szisztémás autoimmun betegek szérummintái közül pedig csak 4 (2 szeronegatív spondylarthritises, 1 myositises, 1 Sjögren szindrómás) volt pozitív az anti-F1 antitestre.

A 4 anti-F8 antitest pozitív és a 261 negatív SLE-s beteg klinikai adatainak összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy az anti-F8 antitest pozitív SLE-s betegeknek Raynaud jelensége van, betegségük pedig enyhébb lefolyású (arthritis, központi idegrendszeri és veseérintettség hiánya).

## MEGBESZÉLÉS

A közelmúltban leírt természetes antitestek evolúciós összekötő kapcsot jelentenek a biológiai mechanizmusában alapvetően különböző veleszületett és a szerzett immunválasz között. Az immunválasz elindításához hasonlóan a tolerancia fenntartása is magában foglalja az immunrendszer mindhárom részét. A veleszületett, a természetes és az adaptív immunrendszer összetevői közti együttműködés zavara a patogének ellen irányuló immunválaszt, valamint a tolerancia károsodását egyaránt eredményezheti, hozzájárulva az immundeficienciák és a patológiás autoimmun jelenségek kialakulásához.

Az autoimmunitás kifejezés számos különböző etiológiájú kórképre utal. Általánosan elfogadott, hogy az autoimmun betegségek genetikai és környezeti faktorok komplex interakciójának következményeként alakulnak ki, melynek részletei nagyrészt még nem tisztázottak (106-108). Az autoimmun betegségek közös vonása a szövetkárosodás, amelyhez mind a humorális mind a celluláris immunválasz hozzájárul. Napjainkban már széles körben elfogadott, hogy a természetes immunitás komponensei is lényeges szerepet játszanak az autoimmun rendellenességek kialakulásában és fenntartásában. Mivel a legtöbb autoreaktív válasz önmagát korlátozó, számos kritériumnak kell az autoreaktív limfocitáknak megfelelniük ahhoz, hogy patológiássá váljanak. Legfontosabb a folyamatos antigén prezentáció és a T-sejtek aktivációjához szükséges kostimulációs szignálok jelenléte. Mindkét feltétel biztosításához jelentős mértékben hozzájárulnak a természetes immunitáshoz tartozó sejtek és citokinek (11, 18-19, 25-26).

A természetes immunitás alapvető szerepet játszik a fertőzésekre és sérülésekre adott korai immunválasz kialakulásában, a gyulladásos válasz elindításában. Megfigyelték, hogy számos klinikai és kísérletes autoimmun betegség megjelenése, fellángolása fertőzés által kiváltott gyulladásos válaszokkal provokált, egy fertőzés gyakran erősíti az aktuálisan zajló autoimmun választ (109-113). Epstein-Barr vírus (114), parvovírus B19 (115, 116) és leginkább a cytomegalovírus (117, 118) okozta fertőzések SSc kialakulásában játszott szerepe is felmerült. Ismertek az autoimmun betegségekben célponttá váló antigének, valamint a különböző patogének 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 kórkép és csak néhány beteg esetében sikerült elfogadhatóan bizonyítani (119-122). Más mechanizmusokról is feltételezik, hogy magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy az infekciók

hogyan törik meg a saját antigénnel szembeni toleranciát. Ilyen folyamatok lehetnek például a járulékos („bystander”) károsodás, az elrejtett epitópok felismerhetővé válása, valamint az epitóp kiterjeszkedés („epitope spreading”) (123). Ugyanakkor a legmeggyőzőbb bizonyíték az infekciók autoimmunitást provokáló hatásáról abból a megfigyelésből fakad, hogy a mikroorganizmusok gyulladást tudnak kiváltani. A gyulladás a természetes immunrendszer egy vagy több sejtjes elemének aktivációját vonja maga után (mint például iNKT-sejtek,  $\gamma\delta$  T-sejtek) ami kostimulációs jeleket szolgáltat mind az adaptív, mind az autoimmun válasz kialakulásához. A természetes immunrendszer sejtjei autoreaktív B- és T-sejteket aktiválhatnak direkt módon, vagy citokinek közvetítésével, amelyek Th1 vagy Th2 irányba terelhetik az immunválaszt (11, 18-19, 25-26).

A természetes immunrendszer másik fontos komponensei a természetes antitestek, amelyek antigén stimulus nélkül is jelen vannak. A természetes antitestek nagy része eleve autoreaktív, és genetikailag konzervált struktúrák ellen irányul (49-51). A szisztémás autoimmun betegségekben gyakran magas a sejt funkcionális struktúrái (nukleinsav, sejtmag komponensek, receptorok stb.) ellen termelődött autoantitestek szintje. Jelenlétük központi szerepet játszik ezen betegségek diagnózisában és klasszifikációjában. Továbbá számos longitudinális vizsgálat kimutatta, hogy a klinikai tünetek megjelenése előtt már évekkel megjelenhetnek az autoantitestek, így prediktív értékük is lehet (124).

A betegség kezdete összefüggést mutathat az IgM izotípusú autoantitestek helyett az IgG izotípusúak megjelenésével. Bár az IgM izotípusú autoantitestek funkciói, vagy az izotípus váltás szerepe nem pontosan ismertek, meg kell említeni, hogy az IgM izotípusú autoantitestek szerepet játszhatnak az autoimmunitás elleni védelemben az apoptotikus sejtek eltávolításának elősegítésével és a B-sejtek saját antigének felé mutatott toleranciájának fokozásával (125). Mivel az immunrendszer egyik alapvető feladata annak megakadályozása, hogy saját antigének gyulladást provokáljanak, az autoantitestek jelenléte a cél antigénnel szemben kialakult B-sejtjes tolerancia károsodásának következménye. A tolerancia megváltozásához vezető mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Azt gondolhatnánk, hogy az autoreaktív limfociták jelenléte egészséges egyének perifériás limfocita készletében arra utal, hogy az immunológiai toleranciához vezető folyamatok valójában nem tökéletesek, de pontosabbnak tűnik azt feltételezni, hogy a saját védelme és az autoimmunitás közötti határ keskeny, sőt, átfedést is mutathat. Az autoreaktív IgM izotípusú autoantitestek affinitás szintje és lokális koncentrációja, valamint az antigén expozíció időzítése meghatározhatja, melyik kimenetel valósul meg, azaz, hogy autoimmun reakció alakul-e ki, vagy tolerancia lép-e fel (126).

A természetes autoantitestek jelenléte önmagában nem elégséges az autoimmunitás kialakulásához, a természetes immunrendszer legtöbb komponense valamilyen módon szerepet játszik az autoimmun eltérésekben. Néhányan közülük inkább a betegség patogenezisében, míg mások a krónikus betegség fenntartásában vagy annak néhány klinikai manifesztációjának kialakulásában játszhatnak szerepet (124, 126). A természetes immunitás komplex szerepét az autoimmun jelenségekben kiemeli az a tény, hogy ugyanazon komponens kétélű fegyverként védő vagy triggerelő szerepet játszhat a fennálló mikro környezet, a genetikai és az anatómiai adottságok függvényében.

Jelen munkánk során egy szisztémás autoimmun betegségre, az SSc-re jellemző autoantitest, az anti-topo I autoantitest epitóp térképezését végeztük el valamint megvizsgáltuk, hogy ezen betegség-asszociált autoantitest cél antigénje ellen termelődhetnek-e természetes autoantitestek is. Bár az átfedő szintetikus peptidekkel való epitóp térképezés széles körben alkalmazott technika (127, 128) de hátrányai közé tartoznak az *in silico* B-sejt epitóp predikcióval járó bizonytalanságok (129), a nem megjósolt, vagy konformációs epitópok lehetséges elvesztése, valamint annak a lehetősége, hogy a szintetikus peptidek csak részlegesen fedik le a primer szekvenciát. Ezen problémák kiküszöbölése érdekében az epitóp térképezéshez egy alapjaiban más módszert, a fiziológiás antigén konformációt leginkább megközelítő és előzetes epitóp predikciót nem igénylő, bakteriofág felszíni megjelenítést választottuk. A módszer rekombináns peptidek és proteinek valamely fág köpenyfehérjéhez fuzionáltatott expresszióját jelenti. A technika nagy előnye, hogy fizikai kapcsolat áll fenn a bemutatott fehérje és az azt kódoló nukleinsav között, lehetővé téve az ismételt affinitás szelekciót és az azt követő sokszorosítást. A peptidek bakteriofág felszíni megjelenítése egy széles körben használt technika számos felhasználási lehetőséggel (130-133). A legáltalánosabban használt rendszerek a vizsgálni kívánt fehérje valamely filamentózus fág köpenyfehérjéhez való fúzióján alapulnak. Ezen fágok életciklusa azonban korlátozza a megjeleníthető peptidek méretét, ezért munkánk során a fág felszínen megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár létrehozásához a lambda bakteriofágokat választottuk.

A lambda bakteriofág felszínen megjelenített topo I antigén fragmens könyvtárunk random kezdőpontú és hosszúságú topo I fragmenseket tartalmaz, így az előzetesen megtervezett fragmenseket, vagy az átfedő szintetikus peptideket alkalmazó módszerek teoretikus és technikai limitációitól mentes. Ezzel a fág display alapú megközelítéssel összehasonlítottuk a dcSSc-s, lcSSc-s és SLE-s betegek szérummintáiban előforduló anti-topo I autoantitestek epitóp mintázatát. Azt találtuk, hogy az anti-topo I autoantitestek által

felismert epitóp mintázat különbözik dcSSc, lcSSc és SLE esetén. Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (83, 84, 86, 134, 135) mi is találtunk egy, mind a 15 vizsgált beteg széruma által felismert fragmenst, amely a 451-593 AA régióban helyezkedik el. Továbbá dcSSc-s betegek széruma számos, az N-terminális doménben (5-145 AA) található rövid fragmenszen mutatott pozitivitást. Korábbi vizsgálatok során, amelyeket az N-terminális régiót a 70 AA-tól kezdődően lefedő fúziós fehérjék segítségével végeztek el, azt találták, hogy a molekulának ezen szakaszát felismerik az anti-topo I autoantitestek (84, 87, 93). Ugyanakkor ennek ellenkezőjét írták le Hu és munkatársai, akik a teljes N-terminális domént (1-123 AA) lefedő fúziós fehérjét használták és nem sikerült ezt a régiót felismerő anti-topo I antitesteket kimutatniuk (89). Ezeket az ellentmondónak tűnő eredményeket magyarázhatja a különböző módszerek és antigén konstrukciók használata, valamint a konformációt befolyásoló faktorok szerepe, amelyek módosíthatják a harmadlagos szerkezetben rejtve elhelyezkedő rövid epitópokhoz való hozzáférhetőséget. Fontos megemlíteni, hogy az általunk az N-terminális doménben újonnan azonosított epitópok csak 20-30AA hosszúak. Az F1 fragmens (5-30AA) tartalmaz egy experimentálisan igazolt granzim B hasítási helyet (136). Így lehetséges, hogy *in vivo* a T-sejt mediálta citotoxikus reakció során felszabaduló granzim B általi hasítás következményeként a topo I molekulában új antigén determináns jön létre az F1 fragmens formájában. Előfordulhat, hogy az antigénként a teljes hosszú topo I molekulát, vagy annak N-terminális doménjét használó *in vitro* vizsgálatok nem mutatnak ki ezen rövid epitópokat felismerő anti-topo I antitesteket, amelynek háttérében konformációs változások állhatnak, ami jelentős konformációs érzékenységre utal.

A fág könyvtár affinitás szelekciójával kapott szekvenciáknak megfelelően előállítottunk kilenc MBP-topo I fragmens fúziós fehérjét. A fúziós fehérjét először egészséges egyének szérummintáival teszteltük és azt találtuk, hogy az egészséges egyének jelentős része rendelkezik a topo I F4 fragmens elleni IgM és IgG izotípusú antitestekkel. Ez a topo I molekulán belül egy 150 aminosav hosszúságú, genetikailag konzervált szakasz. Nagyszámú szérummintát tesztelve kimutattuk, hogy mind az IgM mind az IgG izotípusú anti-F4 antitestek az életkortól és földrajzi elhelyezkedéstől függetlenül jelen vannak egészséges egyékekben. Továbbá F4 fragmens elleni antitestek voltak kimutathatóak SSc-től és SLE-től eltérő szisztémás autoimmun betegségekben szenvedő egyének szérummintáiban is. Az IgM izotípusú antitestek a legmagasabb titerben az anti-topo I pozitív SSc-s vagy SLE-s betegek szérumában voltak jelen. Ugyanakkor nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy mind a 67 anti-topo I pozitív SSc-s vagy SLE-s beteg

szérumban kimutathatóak voltak IgG izotípusú anti-F4 antitestek és ezen antitestek titere ebben a csoportban volt a legmagasabb az összes vizsgált csoport közül. Az a tény, hogy ezen szérumminták a laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott, antigénként a teljes hosszú topo I molekulát használó ELISA teszttel negatívnak bizonyultak, arra utalhat, hogy az F4 fragmens által képviselt szekvencia a teljes hosszú molekula háromdimenziós szerkezetében rejtve lehet. Mindezek alapján felmerül annak lehetősége, hogy a kimutatott anti-F4 antitestek a természetes antitestek közé tartoznak. Ismereteink szerint ezek az első publikált eredmények a topo I ellenes természetes autoantitestek humán szérumból történt kimutatásáról.

Nem példa nélküli az a jelenség, hogy természetes autoantitestek ismernek fel olyan antigéneket, amelyek autoimmun betegségekben megjelenő autoantitestek célpontjai is. Számos bizonyíték szól amellett, hogy a VIII-as faktor, tireoglobulin, DNS, endotél sejtmembrán komponensek ellenes autoantitestek jelen vannak egészséges egyének és autoimmun betegek szérumban is (137-140). Ugyanakkor anti-topo I antitesteket mutattak ki glomerulonephritises betegek szérumban (141). Krónikus graft versus host betegség egyes eseteiben anti-topo I antitest pozitivitás mellett SSc-szerű tünetek is kimutathatóak (142). Krónikus hepatitis C vírus okozta májbetegségben szenvedők szérumban gyakrabban mutattak ki anti-topo I antitesteket, mint hepatitis C vírus negatív májbetegékeiben. Az anti-topo I antitest titer interferon kezelést követően néhány esetben csökkent, aminek hátterében inkább az interferon immunmoduláns hatását, mint a vírus eliminálását valószínűsítik (143). Anti-topo I antitest pozitivitást primer biliaris cirrhosisban is leírtak (144). Felmerül a kérdés, hogy ezen esetekben kimutatott antitestek patológiás autoantitestek, vagy a természetes antitestek közé tartoznak. Mivel a topo I F4-es fragmense a molekula 150 AA hosszú szakasza, lehetséges, hogy a természetes és betegség asszociált anti-F4 antitestek által felismert finom epitóp mintázat különböző.

SSc esetén kulcsfontosságú a korai diagnózis és a megfelelő terápia mielőbbi elkezdése, mivel alattomos kezdet után a betegség az esetek egy részében néhány év alatt a beteg halálához vezethet. Korai dcSSc esetén a diagnózis felállítása viszont sokszor nehéz, pedig sürgős, mert ebben az alcsoportban viszonylag gyorsan irreverzibilis, súlyos belső szervi károsodások alakulhatnak ki. A megfelelő terápia időben való elkezdése pedig lényegbevágó, mivel a prognózist alapvetően a folyamat aktivitása, és még inkább a már létrejött károsodások mértéke határozza meg (145). Pulmonáris fibrózis kialakulása esetén kezelni csak a korai eseteket lehet, amíg a fibrózis nem kiterjedt. A korai diagnózishoz nagy felbontású tüdő-CT, valamint bronchoalveolaris lavage elvégzése szükséges. A

súlyos pulmonális arteriális hipertónia diagnózis végső kimondása csak a jobb szívfél katéterezése után lehetséges. A rossz prognózis miatt viszont az invazív vizsgálatot indokolt esetben haladéktalanul el kell végezni (146, 147). A miokardiális fibrózis kialakulásának következményeként változatos ingervezetési-ingerképzési zavarok léphetnek fel, melyek hirtelen halált okozhatnak (148-150). A malignus hipertoniával, gyorsan progrediáló azotémiával-urémiával járó ún. scleroderma renális krízis az életet közvetlenül veszélyeztető állapot (151, 152). Az SSc kezelése alapvetően nem megoldott, azonban az egyes szervi érintettségnek megfelelő szupportív kezeléssel, valamint bizonyos szervek manifesztációja esetén immunszuppresszív terápiával a betegség kedvezően befolyásolható. A dcSSc prognózisa javulni látszik, de a gyors progressziójú, fatális esetek aránya még mindig magas. Az lcSSc jóindulatú megbetegedés, ami adekvát kezelés esetén az életkilátásokat alig befolyásolja (153-155).

Mivel az anti-topo I antitest jelenlétéhez emelkedett mortalitás, pulmonáris fibrózis, muszkuloszkeletális és kardiális érintettség, valamint proteinuria társul (74), valamint az anti-topo I autoantitest szérumszintje dcSSc esetén összefüggést mutat a bőr fibrózisának kiterjedtségével és a belső szervi érintettség mértékével, ezért a betegség aktivitási markereként szolgálhat (75-77). Bár az anti-topo I autoantitesteket a dcSSc-re tartják jellemzőnek (78, 79), jelenlétük nem korlátozódik teljes mértékben a dcSSc-re, mivel anti-topo I autoantitestek mutathatók ki az lcSSc-s és SLE-s betegek egy részében is (78, 80, 81, 82). Az F4 fragmenszen a jelenleg rutin diagnosztikában alkalmazott anti-topo I ELISA vizsgálatban negatív eredménnyel rendelkező betegek is mutatnak pozitivitást. Ezek szerint az F4 fragmenssel végzett ELISA vizsgálat a jelenleg rutin diagnosztikában alkalmazott anti-topo I tesztnél érzékenyebb módszer lehet az anti-topo I pozitívítás meghatározására, így hozzájárulhat a diagnózis minél korábbi felállításához, a betegség aktivitásának követéséhez.

Az SSc-s és SLE-s betegek anti-topo I antitest pozitív szérummintáit megvizsgálva azt találtuk, hogy a rekombináns topo I fragmenseink többségét (F2, F3, F5-7, F9) felismerő antitestek nem a vizsgált betegcsoportokra specifikusak, hanem egyéni különbségekkel magyarázhatóak. Ez egyetértésben van a Henry és munkatársai által leírtakkal, akik individuális és longitudinális különbségeket állapítottak meg a topo I molekulán felismert epitópok között (93). Ugyanakkor minden, a rutin diagnosztikában használt ELISA teszttel anti-topo I pozitívnak bizonyult beteg széruma tartalmazott anti-F4 antitestet. A topo I ezen korábban is leírt immundomináns régiója mellett két új szakaszt (F1 és F8) azonosítottunk, melyekről korábban még nem mutatták ki, hogy anti-topo I



antitestek célpontjai lennének, melyek közül az F1 fragmens genetikailag egy relatíve újabb, csak a gerincesekre jellemző szekvencia, míg az F8 egy ősi, genetikailag nagymértékben konzervált szakasz. Az F1 fragmenst felismerő antitestek a dcSSc-s betegek 26%-ában, F8 fragmens elleni antitestek SLE-s betegek 50%-ában voltak kimutathatóak, ezen fragmensek dcSSc-re illetve SLE-re jellemző epitópot tartalmazhatnak. A longitudinális vizsgálat során az anti-topo I antitestek F4 fragmens elleni reaktivitása 94%-ban állandó volt, az F1 és F8 fragmens elleni reaktivitás mértéke idővel változott.

Az anti-topo I autoantitestek epitóp specificitása és az SSc bőr és belső szervi manifesztációi közötti lehetséges összefüggéseket is elemeztük.

Vizsgáltuk a *bőrérintettség* kiterjedtségét. Az ujjak bőrének vastagabbá, feszesebbé, nehezen elemelhetővé válását, sclerodactylia jelenlétét. A kezdeti tünetek esetén a bőr megvastagodása alapvető fontosságú. A bőrfolyamat jelen lehet az akrális részeken, elsősorban periorálisan, füleken és az orron (acrosclerosis). A törzs bőrének (és/vagy a végtagok proximális, könyök-térd feletti részének) érintettsége az SSc súlyosabb formájára, a dcSSc fennállására utal. DcSSc-ben a belső szervi tünetek súlyossága általában párhuzamosan halad a bőrfolyamat kiterjedésének mértékével (156). Késői tünetként többszörös ízületi kontraktúrák észlelhetők. Az egyéb bőrtünetek közé tartozik a teleangiectázia, a hipo- és/vagy hiperpigmentáció, a szubkután kalcinózis, az ujjbegyeken lévő fekélyek valamint a csillag alakú hegek (157).

A belső szervi tüneteket tekintve a *tüdőérintettség* a leglényegesebb. A két fő pulmonális tünetként az artéria pulmonális hipertónia és a pulmonális fibrózis mértékét vizsgáltuk. A pulmonális fibrózis dominálónan a tüdők bazális részein kezdődik, a folyamat gyakran válik diffúzzá. Késői következményként a lépesméztüdő képe is gyakori. Jellemző a kórképre a restriktív ventilációs zavar fennállása. A korai és egyben érzékenyebb paraméter a diffúziós kapacitás csökkenése, amit a vitálkapacitás arányos csökkenése követ. A súlyos pulmonális arteriális hipertóniára jellemző, hogy echokardiográfia során a számított jobb kamrai nyomás értéke emelkedett, a diagnózis végső kimondására azonban csak a jobb szívfél katéterezése alkalmas. A légzésfunkciós vizsgálatok során közel normális vitálkapacitás mellett általában jelentős diffúziós kapacitás csökkenés észlelhető (146, 147). A *gasztrointesztinális* rendszert érintő tünetek közül a nyelőcső érintettségeként diszmotilitás/hipomotilitás jelenlétét kerestük, ami az egyik leggyakoribb belső szervi tünet (158). A későbbiekben fibrótikus strikturák is kialakulhatnak, gyakran súlyos tágulattal. Hipomotilitás a gasztrointesztinális traktus egyéb szakaszain, a gyomorban, a vékony- és

vastagbelekben is jelen van. Késői következményként malabszorpciós szindróma is kialakulhat (159, 160). A szív érintettség leglényegesebb eleme a miokardiális fibrózis, melynek következményeként változatos ingervezetési-ingerképzési zavarok léphetnek fel. A balkamra diasztolés funkciójának károsodása gyakori. A szív koszorús ereinek léziója, a miokardiumban is előforduló kapilláris károsodás a szívizomzat megbetegedését súlyosbíthatja (148-150). A vese érintettsége elsősorban a kórlefolyás első éveiben, dcSSc-s betegeknel fordul elő. Az ún. scleroderma renális krízis rossz prognózisú, malignus hipertóniával, gyorsan progrediáló azotémiával-urémiával járó az életet közvetlenül veszélyeztető állapot. Lényege az iszkémiás vesekárosodás, amit a vese kisartériáinak obliteratív vaszkulopátiája okoz (151, 152).

A vizsgált klinikai adatok statisztikai analízise során nem találtunk összefüggést az anti-topo I antitest epitóp specificitás és az SSc klinikai megjelenése között. Ez egyetértésben van a Henry és munkatársai által találtakkal, akik szintén nem tudtak összefüggést kimutatni az anti-topo I antitestek és a klinikai paraméterek között (93). A betegség fennállásának időtartamában lévő szignifikáns különbség az anti-F1 antitest pozitív és negatív dcSSc-s betegcsoportok között a longitudinális vizsgálatunk során kapott eredményeinkkel együtt arra utalhat, hogy a topo I ellenes immunválasz során a molekula immundomináns részének (F4-es fragmens) általános felismerése mellett a betegség későbbi fázisában jelenhetnek meg az N-terminális domén ellenes autoantitestek. Ezek szerint az F1 fragmens ellenes autoantitestek megjelenése a késői stádiumú dcSSc újonnan azonosított markere lehet.

Az anti-F8 antitest pozitív és negatív SLE-s beteg klinikai adatainak összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy az anti-F8 antitest pozitív SLE-s betegeknek Raynaud jelensége van, betegségük pedig enyhébb lefolyású (arthritis, központi idegrendszeri és veseérintettség hiánya).

Az SSc patogenezeise nagyon összetett. Néhány kezdeti esemény vaszkuláris károsodáshoz, gyulladáshoz, a veleszületett és adaptív immunrendszer aktiválódásához és fibrózis kialakulásához vezet. Ezen események hierarchikus sorrendje, ha egyáltalán létezik ilyen, még nem teljesen tisztázott, de a vaszkuláris károsodás egy korai és elsődleges folyamatnak tűnik (161). Az anti-topo I autoantitestek az egyik legjellemzőbb autoantitestek SSc-ben. Ugyanakkor autoantitestek más nukleáris és citoplazmatikus antigének ellen is kimutathatóak SSc-ben. Számos kutatócsoport mellett mi is megvizsgáltuk az anti-topo I antitestek epitóp specificitását. Bár a módszerek és a betegcsoportok különbözőek voltak a vizsgálatok során, úgy tűnik, hogy a topo I

molekulának van egy immundomináns régiója (450-600 AA) amely a III-as központi szubdoménben található. Mivel az anti-topo I autoantitestek jelenléte elsősorban a súlyosabb fibrózissal járó dcSSc-re jellemző, az anti-topo I antitestek vagy a fibrózis kialakulásához járulhatnak hozzá, vagy más események (vaszkuláris vagy celluláris károsodás) hatására termelődhetnek és nincs patogénikus szerepük az SSc kialakulásában, de a folyamatok aktivitásának mértékét is tükrözhetik. Az első feltételezés mellett szól, de nem kellő mértékben bizonyítja az anti-topo I antitestek fibroblasztokhoz való kötődési képességének kimutatása.

Lehetséges, hogy a betegség asszociált autoantitestek kialakulásának alapvető feltétele a természetes antitestek jelenléte, mivel a természetes autoantitestek megfelelő körülmények között templátként szolgálhatnak magasabb affinitású és izotípus váltáson átesett patológiás autoantitestek kialakulásához (162-164). IgG izotípusú betegség asszociált autoantitestek genetikailag meghatározott epitópokat (epitóp mintázatokat) ismerhetnek fel, genetikailag predisponált egyedekben jelenhetnek meg, ahogy azt egy egypetéjű SLE-s ikerpárokat vizsgáló tanulmány is felvetette (165). A konzervatív antigének elleni tolerancia tehát elsősorban genetikailag meghatározott (konszenzus szekvenciák). A tolerancia kialakulásában, illetve fenntartásában jelentkező tartós károsodás autoimmun betegség kialakulásához vezethet. A mintázat felismerési mechanizmusról azt gondolták, hogy a veleszületett immunitás jellegzetessége és az evolúciósan alacsonyabb rendű fajok védekezési mechanizmusa, de eredményeink szerint a természetes autoantitestek az antigén felismerő tulajdonságaikat tekintve a mintázat felismerő receptorokat idézik, epitóp mintázatokat ismernek fel. Az autoimmun betegségekben kimutatható patológiás autoantitestek viszont főként egy jól körülírt, betegség-asszociált szekvencia (epitóp) ellen termelődnek.



**6. ábra** F1, F4 (piros), F8 (sárga) fragmensek ábrázolása a topo I szalagmodelljén; F1 a kristályosítás során nem látszott (<http://pdb.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1EJ9> alapján)

## PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A tézis alapját képező közlemények

**Diána Simon**, Tamás Czömpöly, Tímea Berki, Tünde Minier, Attila Peti, Eszter Tóth, László Czirják, Péter Németh:

Naturally occurring and disease associated autoantibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus

Int Immunol. 2009;21(4):415-22. IF:3.181\*

Tamás Czömpöly, **Diána Simon**, László Czirják, Péter Németh:

Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis

Autoimmun Rev 2009;8(8):692-6. IF:5.371\*

Tamás Czömpöly, Katalin Olasz, Zoltán Nyárády, **Diána Simon**, Judit Bovári, Péter Németh:

Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies.

Autoimmun Rev. 2008;7(6):463-7. IF:5.371

Tamás Czömpöly, Katalin Olasz, **Diána Simon**, Zoltán Nyárády, László Pálinkás, László Czirják, Tímea Berki, Péter Németh:

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;43(11):1761-8. IF:4.768

Tünde Minier, Zoltán Nagy, Zsófia Bálint, Helka Farkas, Judit Radics, Gábor Kumánovics, Tamás Czömpöly, **Diána Simon**, Cecília Varjú, Péter Németh, László Czirják:

Construct validity evaluation of the European Scleroderma Study Group activity index, and investigation of possible new disease activity markers in systemic sclerosis.

Rheumatology 2010; 49(6):1133-45. IF:4.136\*

### Egyéb közlemények

**Diána Simon**, Alastair K. O. Denniston, Paul J. Tomlins, Graham R. Wallace, Saaeha Rauz, Mike Salmon, Philip I. Murray, S. John Curnow:

Soluble gp130, an antagonist of IL-6 trans-signaling, is elevated in uveitis aqueous humor.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(9):3988-91. IF:3.582

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313–1318.
2. Medzhitov R, Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173:89–97.
3. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4–9
4. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–376.
5. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50–53.
6. Klein J, Nikolaidis N. The descent of the antibody-based immune system by gradual evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(1):169-74.
7. von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, et al. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 2003;191:62-78.
8. Cancro MP, Kearney JF. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J Immunol* 2004;173(1):15-19.
9. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296(5566):298-300.
10. Medzhitov R. Toll like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-145.
11. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25: 297–336.
12. Treiner E, Duban L, Moura IC, Hansen T, Gilfillan S, et al. Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells: an evolutionarily conserved T cell subset. *Microbes Infect* 2005;7:552–559.
13. Bendelac A. CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science* 1995;269: 185–186.
14. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003;422:164–169.
15. Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol* 2009;7(3):e54.

16. Treiner E, Lantz O. CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr Opin Immunol* 2006;18(5):519-26.
17. Park SH, Benlagha K, Lee D, Balish E, Bendelac A. Unaltered phenotype, tissue distribution and function of Valpha14(+) NKT cells in germ-free mice. *Eur J Immunol* 2000;30:620–625.
18. Kojo S, Seino K, Harada M, Watarai H, Wakao H, et al. Induction of regulatory properties in dendritic cells by Va14+ NKT cells. *J Immunol* 2005;175:3648-55.
19. Fujii S, Shimizu K, Hemmi H, Steinman RM. Innate Va14+ natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007;220:183.
20. Lynch L, O'Shea D, Winter DC, Geoghegan J, Doherty DG, O'Farrelly C. Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur J Immunol* 2009;39(7):1893-901.
21. Konigshofer Y, Chien YH. Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? *Curr Opin Immunol* 2006;18(5):527-33.
22. Jensen KD, Chien YH. Thymic maturation determines gammadelta T cell function, but not their antigen specificities. *Curr Opin Immunol* 2009;21(2):140-5.
23. Lambolez F, Arcangeli ML, Joret AM, Pasqualetto V, Cordier C, et al. The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs. *Nat Immunol* 2006;7:76–82.
24. Rocha B. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut. *Immunol Rev* 2007;215:166–177.
25. Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, et al. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* 2008;29:90-100.
26. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. Gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 2008;20:353-357.
27. Ledbetter JA, Herzenberg LA. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev* 1979;47:63–90.
28. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 1995;269:535–37.
29. Bikah G, Carey J, Ciallella JR, Tarakhovsky A, Bondada S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 1996;274(5294):1906-9.

30. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 2005;23(1):7-18.
31. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Ann Rev Immunol* 2002;20:252-230
32. Rothstein TL. Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunol* 2002;168:4257-61.
33. Kroese FG, Ammerlaan WA, Deenen GJ. Location and function of B-cell lineages *Ann NY Acad Sci* 1992;651:44-58.
34. Hayakawa K, Hardy RR. Normal, autoimmune, and malignant CD5<sup>+</sup> B cells: the Ly-1 B lineage? *Annu Rev Immunol* 1988;6:197-218.
35. Morris DL, Rothstein TL. Abnormal transcription factor induction through the surface immunoglobulin M receptor of B-1 lymphocytes. *J Exp Med* 1993;17:857-61.
36. Rothstein TL, Kolber DL. Peritoneal B cells respond to phorbol esters in the absence of co-mitogen. *J Immunol* 1998;140:2880-85.
37. Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA, Hillson JL. An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol* 1997;158:1175-86.
38. Forster I, Gu H, Rajewsky K. Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *EMBO J* 1988;7:3693-703.
39. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted, IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1184.
40. Cocca B.A, Seal SN, D'Agnillo P, Mueller YM, Katsikis PD, et al. Structural basis for autoantibody recognition of phosphatidylserine-beta 2 glycoprotein I and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13826.
41. Freitas AA, Viale AC, Sundblad A, Heusser C, Coutinho A. Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5640.
42. Marcos MA, Sundblad A, Malenchere E, Coutinho A. Peritoneal B cells regulate the numbers of allotype matched pre-B and B cells in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9944.
43. Sundblad A, Marcos M, Huetz F, Freitas A, Heusser C, et al. Normal serum immunoglobulins influence the number of bone marrow pre-B and B cells. *Eur J Immunol* 1991;21:1155-61.

44. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayouba A, Malanchère E, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 1998;216(1-2):117-37.
45. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001;14:617.
46. Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* 2002;195:771.
47. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(5):2250-5.
48. Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 1986;93:81–102.
49. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995;7:812
50. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 1999;286:2156
51. Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1991;12:105–10.
52. Chen C, Stenzel-Poore MP, Rittenberg MB. Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3. *J Immunol* 1991;147:2359.
53. Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, et al. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3839–43.
54. Avrameas S. Natural autoantibodies: from ‘horror autotoxicus’ to ‘gnothi seauton’. *Immunol Today* 1991;12:154.
55. Rossi F, Guilbert B, Tonnelle C, Ternynck T, Fumoux F, et al. Idiotypic interactions between normal human polyspecific IgG and natural IgM antibodies. *Eur J Immunol* 1990;20:2089-94.
56. Diaw L, Magnac C, Pritsch O, Buckle M, Alzari PM, Dighiero G. Structural and affinity studies of IgM polyreactive natural antibodies. *J Immunol* 1997;158:968.
57. Ternynck T, Avrameas S. Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol Rev* 1986;94:99.



58. Ehrenstein MR, O'Keefe TL, Davies SL, Neuberger MS. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10089-93.
59. Peng Y, Kowalewski R, Kim S, Elkon KB. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol* 2005;42:781-7.
60. Miletic VD, Hester CG, Frank MM. Regulation of complement activity by immunoglobulin. *J Immunol* 1996;156:749.
61. Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Spalter SH, Kaveri S, Kazatchkine MD. Immunoglobulins and the regulation of autoimmunity through the immune network. *Clin. Exp Rheumatol* 1996;14(15):S9-15.
62. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Nyárady Z, Pálkás L, et al. 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;43(11):1761-8.
63. Czömpöly T, Olasz K, Nyárady Z, Simon D, Bovári J, Németh P. Detailed analysis of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7(6):463-7.
64. Champoux JJ. Strand breakage by the DNA untwisting enzyme results in covalent attachment of the enzyme to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3800-4.
65. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 1998;279:1504-13.
66. Douvas AS, Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979;254:10514-22.
67. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986;231:737-40.
68. Hildebrandt S, Weiner E, Senecal JL, Noell S, Daniels L, et al. The IgG, IgM, and IgA isotypes of antitopoisomerase-1 and anticentromere autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1990;33:724-7.
69. Geyer M, Müller-Ladner U. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis Revisited. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
70. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557.

71. Denton CP, Black CM. Scleroderma—clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clinical Rheumatol* 2004;18:271–90.
72. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-205.
73. Johnson SR, Feldman BM, Hawker GA. Classification criteria for systemic sclerosis subsets. *J Rheumatol* 2007;34(9):1855-63.
74. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007;66:754-63.
75. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and disease activity in SSc. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363–1373.
76. Hanke K, Dahnrich C, Bruckner CS, Huscher D, Becker M, et al. Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R28.
77. Minier T, Nagy Z, Bálint Z, Farkas H, Radics J, et al. Construct validity evaluation of the European Scleroderma Study Group activity index, and investigation of possible new disease activity markers in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(6):1133-45.
78. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1998;31:196-203.
79. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75-83.
80. Reveille JD, Solomon DH, the American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70 and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;49:399–412.
81. Gussin HA, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:376.
82. Hamidou MA, Audrain MA, Masseau A, Agard C, Moreau A. Anti-topoisomerase I antibodies in systemic lupus erythematosus as a marker of severe nephritis. *Clin Rheumatol* 2006;25:542.

83. D'Arpa P, White-Cooper H, Cleveland DW, Rothfield NF, Earnshaw WC. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 1990;33:1501.
84. Verheijen R, Van Den Hoogen F, Beijer R, Richter A, Penner E, et al. A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990;80:38.
85. Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol* 1991;28:333.
86. Cram DS, Fisicaro N, McNeilage LJ, Coppel RL, Harrison LC. Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1993;151:6872.
87. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I: clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1406.
88. Seelig HP, Schroter H, Ehrfeld H, Renz, M. Autoantibodies against topoisomerase I detected with the natural enzyme and overlapping recombinant peptides. *J Immunol Methods* 1993;165:241.
89. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis. *J Immunol* 2004;173:2834-41.
90. Rizou C, Ioannidis JP, Panou-Pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, et al. B-Cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:344-51.
91. Meesters TM, Hoet M, Van Den Hoogen FH, Verheijen R, Habets WJ, Van Venrooij WJ. Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis. *Mol Biol Rep* 1992;16:117-23.
92. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1074.
93. Henry PA, Atamas SP, Yurovsky VV, Luzina I, Wigley, FM, White B. Diversity and plasticity of the anti-DNA topoisomerase I autoantibody response in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2000;43:2733.
94. Zuber JP, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2006;45:23-25

95. Douvas A. Does Scl-70 modulate collagen production in systemic sclerosis? *Lancet*. 1988;2(8609):475-7.
96. Douvas A, Lambie PB, Turman MA, Nitahara KS, Hammond L. Negative regulation of Scl-70/topoisomerase I by zinc and an endogenous macromolecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178(1):414-21.
97. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, Daniels L, Noell S, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease: a prospective study. *Arthritis Rheum* 1991;34:68-77.
98. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Luchetti M, Tonnini C, Avvedimento EV. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets. *Autoimmun Rev* 2007;7:121-6.
99. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:2667-76.
100. Hénault J, Tremblay M, Clément I, Raymond Y, Senécal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3265-74.
101. Hénault J, Robitaille G, Senécal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:963-73.
102. Czirják L, Kumánovics G, Varjú C, Nagy Z, Pákozdi A, et al. Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:59.
103. Ansuini H, Cicchini C, Nicosia A, Tripodi M, Cortese R, Luzzago A. 2002. Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands. *Nucleic Acids Res* 2002;30:78.
104. Santi E, Capone S, Mennuni C, Lahm A, Tramontano A. Bacteriophage lambda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics. *J Mol Biol* 2000;296(2):497-508.
105. Santini C, Brennan D, Mennuni C, Hoess RH, Nicosia A, et al. 1998. Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 1998;282:125.
106. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004;127:485-92.
107. Burek CL, TalorMV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun* 2009;33(3-4):183-9.

108. Dedeoglu F. Drug-induced autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:547–51.
109. Regener M, Lampert PH. Autoimmunity through infection or immunization? *Nat Immunol* 2001;2(3):185-8.
110. Wucherpfenning KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 2001;108(8):1097-104.
111. Horwitz MS, Sarvetnick N. Viruses host responses, and autoimmunity. *Immunol Rev* 1996;152:21-45
112. Di Rosa F, Barbara V. Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity. *Immunol Rev* 1998;164:17-27.
113. Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* 1996;152:21-45.
114. Kahan A, Menkes CJ, Amor B. Defective Epstein–Barr virus specific suppressor T cell function in progressive systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1986;45:553–560.
115. Zakrzewska K, Corcioli F, Carlsen KM, Giuggioli D, Fanci R, et al. Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients. *Intervirology* 2009;52:279–282.
116. Ohtsuka T, Yamazaki S. Increased prevalence of human parvovirus B19 DNA in systemic sclerosis skin. *Br J Dermatol* 2004;150:1091–1095.
117. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med* 2006;3:e2.
118. Kahaleh MB, LeRoy EC. Autoimmunity and vascular involvement in systemic sclerosis (SSc). *Autoimmunity* 1999;31(3):195-214.
119. Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer P, Cantor H. 1998. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 1998;230:1043–1051.
120. Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. 1999. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999;283:1335–1343.
121. Benoist C, Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for cell mimicry? *Nat Immunol* 2001;2:797–801.
122. Lang HLE, Jacobson H, Ikemizo S, Andersson C, Harla K, et al. A functional and structural basis for the cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002;3:940–943.

123. Shi F, Ljunggren HG, Sarvetnick N. Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends immunol* 2001;22(2):97-101.
124. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity — autoantibodies versus autoimmune disease *Autoimmun Rev* 2010;9(5):A259-66.
125. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 2000;37(18):1141-9.
126. Salvioli S, Capri M, Fumelli C, Lescai F, Monti D, Franceschi C. Pathological relevance of the natural immune system. In Bertók L, Chow DA. *Natural immunity (NeuroImmunBiology) Elsevier* 2005;(5):331-350.
127. Maeji NJ, Bray AM, Valerio RM, Wang W. Larger scale multipin peptide synthesis. *Pept Res* 1995;8:33-38.
128. Uray K, Hudecz F, Füst G, Prohászka Z. Comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors. *Int Immunol* 2003;15(10):1229-36.
129. Nyárady Z, Czömpöly T, Bősze S, Nagy G, Petrohai A, et al. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Mol Immunol* 2006;43(7):830-8.
130. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990;249:386-390.
131. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552.
132. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991;222:581.
133. Farilla L, Tiberti C, Luzzago A, Yu L, Eisenbarth GS, et al. Application of phage display peptide library to autoimmune diabetes: identification of IA-2/ICA512bdc dominant autoantigenic epitopes. *Eur J Immunol* 2002;32:1420-7.
134. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, et al. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1993;36:1580.
135. Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum* 1999;42:1179.
136. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* 1999;190:815.

137. Algiman M, Dietrich G, Nydegger U, Boieldieu D, Sultan Y, Kazatchkine MD. Natural antibodies to factor VIII<sub>2</sub> anti-hemophilic factor in healthy individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3795.
138. Bouanani M, Piechaczyk M, Pau B, Bastide M. Significance of the recognition of certain antigenic regions on the thyroglobulin molecule by natural autoantibodies from healthy subjects. *J Immunol* 1989;143:1129.
139. Sabbaga J, Pankewycz OG, Lufft V, Schwartz RS, Madaio MP. Cross-reactivity distinguishes serum and nephritogenic anti-DNA antibodies in human lupus from their natural counterparts in normal serum. *J Autoimmun* 1990;3:215.
140. Ronda N, Haury M, Nobrega A, Kaveri SV, Coutinho A, Kazatchkine MD. Analysis of natural and disease-associated autoantibody repertoires: anti-endothelial cell IgG autoantibody activity in the serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 1994;6:1651.
141. Vega Stieb J, Goecke Saavedra H, Méndez Olivieri G. Fever of unknown origin secondary to type I crescentic glomerulonephritis and anti-Scl 70 antibodies without clinical manifestations of systemic sclerosis. *Clin Exp Nephrol* 2008;12(5):388-92.
142. Bell SA, Faust H, Mittermüller J, Kolb HJ, Meurer M. Specificity of antinuclear antibodies in scleroderma-like chronic graft-versus-host disease: clinical correlation and histocompatibility locus antigen association. *Br J Dermatol* 1996;134(5):848-54.
143. Omagari K, Ohba K, Kadokawa Y, Hayashida K, Isomoto H, et al. Anti-extractable nuclear antigens (ENA) antibodies in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon. *Autoimmunity* 2003;(5):269-73.
144. Vogel W, Judmaier G, Dietze O, Bakos S, Penner E. Autoantibodies to topoisomerase I in primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1988;2(8623):1314-5.
145. Matucci-Cerinic M, Allanore Y, Czirják L, Tyndall A, Müller-Ladner U, et al. The challenge of early systemic sclerosis for the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) community. It is time to cut the Gordian knot and develop a prevention or rescue strategy. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(9):1377-80.
146. Czirják L, Kumánovics G, Varjú C. A systemás sclerosis klinikai jellemzői. *Magyar Reumatol*. 2005;46:135-43.
147. Matucci-Cerinic M, D'Angelo S, Denton CP, Vlachoyiannopoulos P, Silver R. Assessment of lung involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S19-23.
148. Steen V. The heart in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2004;6(2):137-40
149. Kahan A, Coghlan G, McLaughlin V. Cardiac complications of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(3):45-8.

150. Varjú C, Kumánovics G, Czirják L. A szisztémás sclerosis patológiai jellemzői. *LAM* 2007;17(1):19-25.
151. Denton CP, Lapadula G, Mouthon L, Müller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. *Rheumatology* 2009;48(3):32-5.
152. Penn H, Denton CP. Diagnosis, management and prevention of scleroderma renal disease. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20(6):692-6.
153. Czirják L. Practical approach to the therapy of systemic sclerosis. *Z Rheumatol* 2004;63:451-456.
154. Medsger TA, Bombardieri S, Czirják L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S42-46.
155. Matucci-Cerinic M, Steen V, Nash P, Hachulla E. The complexity of managing systemic sclerosis: screening and diagnosis. *Rheumatology* 2009;48(3):8-13.
156. Czirják L, Foeldvari I, Müller-Ladner U. Skin involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008;47(5):v44-5.
157. Krieg T, Takehara K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009;48(3):14-8.
158. Sütő G, Czirják L. Oesophageal involvement in scleroderma. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(54):2-4.
159. Jaovisidha K, Csuka ME, Almagro UA, Soergel KH. Severe gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: report of five cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34(4):689-702.
160. Clements PJ, Becvar R, Drosos AA, Ghattas L, Gabrielli A. Assessment of gastrointestinal involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S15-8.
161. Guiducci S, Giacomelli R, Cerinic MM. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev* 2007;6:520-3.
162. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol* 2005;86:137–157.
163. Zhang M, Carroll MC. Natural antibody mediated innate autoimmune response. *Mol Immunol* 2007;44:103–110.
164. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity* 2008;41(2):123–132.
165. Silverman GJ, Srikrishnan R, Germar K, Goodyear CS, Andrews KA, et al. Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol* 2008;153:102–116.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Czirják Lászlónak és Prof. Dr. Németh Péternek, hogy lehetővé tették számomra a Reumatológiai és Immunológiai Klinikán és az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben való munkát, valamint hogy mindvégig vezetőim voltak és támogattak.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Czömpöly Tamásnak útmutatásaiért és az egész munka során nyújtott szakmai segítségéért.

Szeretném megköszönni Farkas Ibolyának, Zentai Piroskának és Dr. Minier Tündének a segítséget, amivel hozzájárultak a vizsgált betegek szérummintáinak és klinikai adatainak eredményes elemzéséhez.

Köszönöm Tóth Eszternek a fáradhatatlan technikai segítséget, valamint Dr. Nyárády Zoltánnak a bioinformatikai segítséget.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Szűcs Gabriellának a debreceni és Prof. Dr. Marco Matucci-Cerinic-nek a firenzei betegek szérummintáinak rendelkezésünkre bocsátásáért, valamint Prof. Dr. Füst Györgynek és Dr. Prohászka Zoltánnak a finn és brit véradók szérummintáiért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Alessandra Luzzago-nak a lambda fág vektor rendelkezésünkre bocsátásáért.

Végül köszönöm a munkám során kapott segítséget és támogatást a Reumatológiai és Immunológiai Klinika valamint az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden kedves dolgozójának.

**MELLÉKLETEK**  
**(AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK)**

# Naturally occurring and disease-associated auto-antibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus

Diána Simon<sup>1</sup>, Tamás Czömpöly<sup>2</sup>, Tímea Berki<sup>2</sup>, Tünde Minier<sup>1</sup>, Attila Peti<sup>3</sup>, Eszter Tóth<sup>2</sup>, László Czirják<sup>1</sup> and Péter Németh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Rheumatology, University of Pécs, Akác u. 1.H-7632 Pécs, Hungary

<sup>2</sup>Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs and <sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, H-7643 Pécs, Szigeti út 12., Hungary

**Keywords:** naturally occurring auto-antibodies, phage display, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, topoisomerase I

## Abstract

**Auto-antibodies against topoisomerase I (topo I) are frequently detected in sera of systemic sclerosis (SSc) patients. Anti-topo I auto-antibodies are considered to be associated with the diffuse cutaneous form of systemic sclerosis (dcSSc). However, anti-topo I auto-antibodies are also detected in limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) and systemic lupus erythematosus (SLE). In this study, we compared the epitope specificity of anti-topo I auto-antibodies present in sera of dcSSc, lcSSc and SLE patients. We have constructed an antigen fragment library displayed on bacteriophage lambda and screened this library with IgG purified from patients' sera. Regions of topo I selected from the library were expressed as recombinant fusion proteins and were tested with ELISA and western blot. We unexpectedly found that antibodies against a fragment of topo I {fragment F4 [amino acid (AA)] 451–593} could be detected in sera of healthy individuals and patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE. Using sera of dcSSc, lcSSc and SLE patients, we showed that the pattern of recognized epitopes is different between these patient groups. Fragment F4 was recognized by all patients. Fragment F1 (AA 5–30) was recognized by 9 of 34 dcSSc patients. Fragment F8 (AA 350–400) was recognized by four of eight SLE patients. Analysis of clinical data revealed a significant difference between the F1-negative and F1-positive groups of SSc patients in age and in the duration of the disease. According to our results, the newly identified fragments F1 and F8 could represent characteristic epitopes for dcSSc and SLE, respectively.**

## Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a systemic autoimmune disorder characterized by immune activation, vascular injury, inflammation, fibrosis of the skin and various internal organs. Activation of the immune system leads to production of disease-specific auto-antibodies, lymphocyte activation and secretion of various cytokines (1). The vast majority of SSc patients has antinuclear antibodies, which predominantly recognize DNA topoisomerase I (topo I), RNA polymerases, centromere proteins and U3RNP (2). Anti-topo I auto-antibodies are considered to be associated with diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc), while anti-centromere auto-antibodies are generally detected in limited cutaneous

systemic sclerosis (lcSSc) (3, 4). However, the presence of anti-topo I auto-antibodies may not be entirely restricted to dcSSc. A subset of lcSSc patients were found to be positive for anti-topo I auto-antibody (3) and our findings are also similar.

Clinically, patients with SSc could be classified into two distinct subsets. dcSSc is characterized by extensive fibrosis of the skin, lungs and other internal organs, while in lcSSc vascular abnormalities are dominating and fibrosis is limited (5).

In addition to SSc, presence of anti-topo I antibodies has been demonstrated in systemic lupus erythematosus (SLE)

## 2 Natural and pathologic antibodies against topoisomerase I

patients showing no clinical signs and symptoms of SSc (6, 7). These findings suggest that the presence of anti-topo I antibodies could have heterogeneous clinical consequences. The role of anti-topo I antibodies in pathogenesis of SSc is not fully understood; however, immune response against topo I may differ among anti-topo I-positive patients leading to production of anti-topo I auto-antibodies with different epitope specificity.

Topo I is a 765 amino acid (AA) long DNA-relaxing enzyme which contains five distinct regions: the N-terminal domain (AA 1–215), core subdomains I–II (AA 216–435), core subdomain III (AA 436–636), the linker domain (637–713) and the C-terminal domain (AA 714–765) (8). Earlier studies using recombinant topo I fragments identified various epitopes in the central and C-terminal part of the molecule (9–14). On the basis of previously published reports, it seems that an immunodominant region of topo I spans AA 489–573 (9, 10, 12, 13). However, a study which used recombinant fusion proteins constructed on the basis of the domain structure of topo I demonstrated that the core subdomains I–II is recognized more frequently than core subdomain III (15). Longitudinal analysis of anti-topo I auto-antibodies revealed that reactivity against these regions is stable (15, 16), though a study using a limited number of sera showed that the regions recognized by anti-topo I auto-antibodies vary over time (17). While epitope specificity of anti-topo I auto-antibodies has been studied by a number of groups, there is no report of comparative epitope mapping in patients with dcSSc, lcSSc and SLE.

In this study, we have constructed an antigen fragment library of topo I displayed on bacteriophage lambda and screened this library with sera of dcSSc, lcSSc and SLE patients. Regions of topo I selected from the library were expressed as recombinant fusion proteins and were further tested with patients' sera. Longitudinal analysis of epitope specificities has been performed and compared with clinical findings.

### Materials and methods

#### *Patients and controls*

From the 293 patients in our total scleroderma cohort, 59 SSc cases were selected which showed anti-topoisomerase antibody positivity on a conventional ELISA test (Hycor, Vienna, Austria) (34 of these patients were classified as having dcSSc and 25 were diagnosed lcSSc). Out of 265 SLE patients tested for the presence of anti-topo I antibodies with a conventional ELISA kit, 8 showed positive reaction and were selected for the present study. One hundred and seventy-seven serum samples from 59 SSc patients (three from each patient) and 24 serum samples from 8 SLE patients were obtained between 2004 and 2007 at 6–12 months intervals. The patients' clinical data were encoded using our standard protocol (18).

For controls, 63 sera from Hungarian blood donors (from the Blood Transfusion Service of Baranya county; average age:  $36.8 \pm 12.1$  years; 32 women and 31 men), 44 sera from Finnish blood donors, 44 sera from British blood donors (by the courtesy of Prof. G. Füst and Z. Prohaszka, 3rd Department of Internal Medicine at the Semmelweis University,

Budapest) and 65 sera from Hungarian elderly healthy individuals (from the Immunology and Rheumatology Clinic, University of Pécs; average age:  $62.4 \pm 5.4$  years) were used. Furthermore, 110 sera from Hungarian elderly anti-topo I antibody-negative (measured by a conventional ELISA test) patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE (8 vasculitis, 40 seronegative spondylarthritis, 11 myositis, 11 Sjögren syndrome, 10 psoriatic arthritis, 20 rheumatoid arthritis, 10 polymyalgia rheumatica from the Immunology and Rheumatology Clinic, University of Pécs; average age:  $65.5 \pm 4.8$  years) were also investigated.

The study has been approved by the Ethical Committee of the Medical Center of the University of Pécs. Informed consent has been obtained from all patients and healthy individuals.

#### *Construction and affinity selection of topo I antigen fragment library*

The coding region of full-length human topo I was amplified by PCR from cDNA reverse transcribed from total RNA. The PCR product was cloned into a T/A vector using the InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania). The identity of insert was verified by sequencing the entire coding region of topo I on a Beckman Coulter CEQ 8800 instrument. Library construction was done using the lambdaD-bio phage display vector (19) with minor modifications as described previously (20). The primary topo I library contained  $2 \times 10^7$  insert bearing independent clones; titer of the amplified library was  $3 \times 10^{11} \text{ ml}^{-1}$ . Affinity selection of topo I antigen fragment library with five dcSSc, six lcSSc and four SLE patient-derived IgG purified on protein G sepharose (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) was performed essentially as described (21). After the third round of selection, individual clones were picked up for further propagation and DNA sequencing.

#### *Expression of recombinant topo I fusion proteins*

Selected fragments of topo I were expressed as recombinant maltose-binding protein (MBP) fusion proteins using the pMAL Protein Fusion and Purification system (New England Biolabs, Ipswich, UK). cDNAs coding for AA 5–30 (F1), 69–92 (F2), 87–145 (F3), 450–600 (F4), 640–705 (F5), 170–290 (F6), 295–350 (F7), 350–400 (F8) and 295–400 (F9) were amplified with PCR primers containing EcoRI and BamHI restriction sites and cloned into the pMal-c2 vector. The reading frame and sequence of inserts were verified by sequencing. Fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* TB1 and were purified from bacterial lysates with affinity chromatography on amylose resin according to the manufacturer's instruction (New England Biolabs). Integrity of purified proteins was verified by SDS-PAGE on a 10% gel followed by Coomassie brilliant blue staining.

#### *ELISA*

The 96-well polystyrene plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with recombinant topo I fragments or with MBP in PBS at a concentration of  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Plates were washed with wash buffer (PBS, 0.05% Tween 20) and blocked with 3% BSA in wash buffer for 1 h. Serum samples were incubated

in triplicates at 1:250 dilutions in wash buffer containing 2% BSA for 1 h. Finally, the plate was incubated with HRP-conjugated anti-human-IgG secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) for 60 min. The reaction was developed with  $\alpha$ -phenylenediamine (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary), and optical density (OD) was measured at 492 nm.

#### Immunoblots

Purified MBP fusion proteins or MBP ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) diluted 1:1 with SDS sample buffer were boiled for 10 min, separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% non-fat dry milk (Bio-Rad, Budapest, Hungary) in wash buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-base pH 7.4 and 0.1% Tween 20) for 1 h, membranes were incubated for 1 h with sera diluted 1:500 in 2% non-fat dry milk in wash buffer. After washing, HRP-conjugated anti-human-IgG diluted at 1:2000 was added for 1 h. For detection of MBP fusion proteins, membrane strips were first incubated with rabbit anti-maltose-binding protein antibody (New England Biolabs) (1:5000), followed by incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2000). Membranes were developed with SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce, Rockford, IL, USA) substrate and exposed to X-ray films.

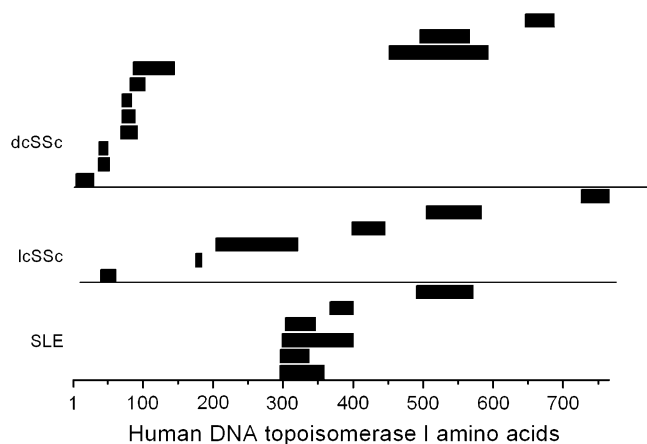
#### Statistical analysis

Categorical data were analyzed by the chi-square test. To investigate the possible differences between patient groups, frequency and mean values of continuous variables were tested by Student's *t* test. Spearman's rank correlation coefficient was used to examine the relationship between the values of OD and continuous variables. A *P* value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using SPSS statistical software package.

## Results

#### Epitope mapping of anti-topo I antibodies with phage displayed topo I library

For identification of epitopes recognized by anti-topo I antibodies, we have constructed a topo I antigen fragment library displayed on bacteriophage lambda and subsequently screened this library with individual IgGs purified from sera of anti-topo I-positive patients (five dcSSc, six lcSSc and four SLE patients). After the third round of affinity selection, inserts of 60 clones (30 from each patient group) were sequenced. Alignment of deduced AA sequences with human topo I showed that the pattern of recognized epitopes is different between dcSSc, lcSSc and SLE patients (Fig. 1). Among phage clones selected with IgG of dcSSc patients, 11 different clones were found repeatedly: eight partially overlapping phage clones displaying fragments covering AA 5–145 of the N-terminal domain, two overlapping clones covering AA 451–593 of core subdomain III and a single clone representing AA 640–705 of the linker domain. Selection with IgG of lcSSc patients resulted in six distinct phage clones: two clones covering AA 40–61 and 176–184 of the N-terminal domain, a single clone displaying AA 205–321 of core subdomain I–II, a clone representing AA 399–445 of the core subdomain



**Fig. 1.** The pattern of recognized topo I epitopes is different between dcSSc, lcSSc and SLE patients. Deduced AA sequences of phage clones selected with IgG purified from five dcSSc, six lcSSc and four SLE patients are plotted along the human topo I sequence.

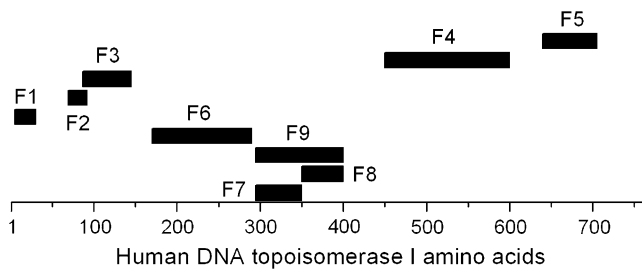
I–II—core subdomain III junction, a single clone with AA 505–583 of core subdomain III and a single clone covering AA 726–765 of the C-terminal domain. With selection using IgG from SLE patients, six distinct phage clones were obtained: five of these covered AA 296–400 of core subdomains I–II and single clone displayed AA 491–571 of core subdomain III.

On the basis of these results, it seems that sera of dcSSc patients recognize epitopes localized in the N-terminal domain, epitopes recognized by SLE patients' sera are found in core subdomains I–II, while epitopes recognized by lcSSc patients are scattered throughout the molecule. In addition to this, there is common region of topo I (AA 451–593) recognized by all three groups of sera.

#### A recombinant fragment of topo I is recognized by naturally occurring auto-antibodies

In order to verify results obtained by affinity selection of the topo I antigen fragment library, we have constructed recombinant topo I-MBP fusion proteins. On the basis of fragments identified by library selection, nine fusion proteins have been constructed and expressed (Fig. 2). To check the possible background reactivity of normal sera and to set up cut-off values for further measurements, recognition of these fusion proteins was first tested with sera of healthy individuals which were previously shown to be negative for anti-topo I antibody by a commercial ELISA test. To our surprise, 44% of sera derived from Hungarian blood donors contained antibodies which recognized fragment F4 (AA 450–600) of topo I. The other fragments (F1–F3, F5–F9) were not recognized by sera of healthy individuals. To further investigate this finding, we systematically examined 63 sera from Hungarian blood donors (average age:  $36.8 \pm 12.1$  years; 32 women and 31 men), 44 sera from Finnish blood donors, 44 sera from British blood donors, 65 sera from Hungarian elderly healthy controls (average age:  $62.4 \pm 5.4$  years), 110 sera from Hungarian elderly patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE

#### 4 Natural and pathologic antibodies against topoisomerase I



**Fig. 2.** Recombinant topo I-MBP fusion constructs used in this study.

(average age:  $65.5 \pm 4.8$  years) and 67 sera from anti-topo I antibody-positive (measured by a commercial ELISA test) SSc or SLE patients for the presence of antibodies against fragment F4. We have found that antibodies against fragment F4 with both IgM and IgG isotype are present in healthy individuals irrespective of the geographical regions and age groups tested (Table 1). In addition, antibodies against fragment F4 could be detected in sera of patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE. Comparison of average OD values indicate that anti-F4 antibodies with IgM isotype are present in the highest titer in sera of anti-topo I antibody-positive SSc or SLE patients. It is important to note that all 67 sera from anti-topo I antibody-positive SSc or SLE patients were found to be positive for anti-F4 antibodies with IgG isotype, and the titer of these antibodies was the highest in this group among all groups tested.

To obtain further support for these findings, we performed competition ELISA with each of the recombinant fragments (F1–F9) and MBP using sera showing the highest reactivity in each group (in total 48 sera were tested). Only fragment F4 was able to significantly inhibit the sera's reactivity against fragment F4 (mean anti-F4 IgM reactivity  $OD_{492}$ :  $0.58 \pm 0.18$  without competition;  $0.28 \pm 0.08$  in competition with  $10 \mu\text{g}$  fragment F4 and  $0.08 \pm 0.03$  in competition with  $50 \mu\text{g}$  fragment F4; mean anti-F4 IgG reactivity  $OD_{492}$ :  $0.48 \pm 0.15$  without competition;  $0.32 \pm 0.11$  in competition with  $10 \mu\text{g}$  fragment F4 and  $0.06 \pm 0.03$  in competition with  $50 \mu\text{g}$  fragment F4).

These findings indicate that the presence of antibodies with both IgM and IgG isotype against fragment F4 of topo I is not restricted to SSc, but could be detected in healthy individuals and in sera of patients with inflammatory rheu-

matic diseases other than SSc and SLE. Collectively, these data raise the possibility that antibodies against fragment F4 detected in healthy individuals belong to the pool of naturally occurring antibodies.

#### Recognition of recombinant topo I fusion proteins by SSc and SLE patients' sera

Next, we tested recognition of all nine fusion proteins with sera of 67 anti-topo I antibody-positive patients (34 dcSSc, 25 lcSSc and 8 SLE) by IgG isotype-specific ELISA. The results are summarized in Table 2.

Fragment F4 (AA 450–600) was recognized by all the 67 patients' sera. Fragment F1 (AA 5–30) was recognized by 9 of 34, 1 of 25 and 0 of 8 dcSSc, lcSSc and SLE patients, respectively. Fragment F8 (AA 350–400) was recognized by four of eight SLE patients and none of the SSc patients.

#### Longitudinal analysis of topo I epitope reactivity

To determine whether antibody responses against fragments F1, F4 and F8 remain constant over time, we measured antibody reactivity against these fragments by ELISA in three serial serum samples of each patient. Results of ELISA were confirmed by western blot in 10 F1-positive patients, 10 randomly chosen F4-positive patients and 4 F8-positive patients. Each serum sample was also examined by conventional anti-Sci-70 ELISA.

Longitudinal analysis showed that reactivity to fragment F4 was stable in 61 cases (94%). Eighteen out of the 67 patients had at least one serum sample with no antibody response against topo I measured by the conventional anti-Sci-70 ELISA. Results of ELISA with fragment F4 were confirmed by western blot, which showed that each sera positive for F4 reactivity in ELISA was also positive in western blot (Fig. 3A).

The reactivity to F1 fragment varied over time. In four cases, the earliest serum samples did not have any detectable antibodies against F1, but the immunoreaction became positive and stronger over time. In one case, reactivity against F1 appeared in the second sample but was absent in the following one. All serum samples of the remaining four dcSSc patients were positive for anti-F1 antibody. Results of ELISA were confirmed by western blot, which showed a perfect correlation of results obtained by the two methods (Fig. 3B).

Among the four SLE patients positive for antibody against F8, the reactivity was stable in one patient and changed in the remaining three patients. Fragment F8 was not

**Table 1.** Prevalence of topo I fragment F4 (AA 450–600)-specific antibodies in human sera

|  | Anti-F4 IgM               | Anti-F4 IgG                |
|--|---------------------------|----------------------------|
| Hungarian blood donors (63)                          | 37% ( $0.254 \pm 0.057$ ) | 44% ( $0.189 \pm 0.066$ )  |
| Finnish blood donors (44)                            | 52% ( $0.343 \pm 0.068$ ) | 9% ( $0.350 \pm 0.076$ )   |
| British blood donors (44)                            | 76% ( $0.265 \pm 0.047$ ) | 25% ( $0.190 \pm 0.043$ )  |
| Hungarian elderly healthy controls (65)              | 17% ( $0.205 \pm 0.065$ ) | 51% ( $0.359 \pm 0.083$ )  |
| Hungarian elderly systemic autoimmune patients (110) | 71% ( $0.456 \pm 0.092$ ) | 31% ( $0.217 \pm 0.052$ )  |
| Anti-topo I-positive SSc and SLE patients (67)       | 53% ( $0.726 \pm 0.512$ ) | 100% ( $0.735 \pm 0.212$ ) |

Sera were tested for anti-F4 reactivity with isotype-specific indirect ELISA. The cut-off value for positivity was set at  $OD_{450}$  0.100. Values in parentheses following description of the groups indicate the number of individual serum samples tested. Percentage values indicate percentage of positive sera. Numbers in parentheses following the percentage values indicate average OD.

recognized in western blot, indicating that the epitopes displayed by this fragment are conformational in nature.

*Clinical findings*

Statistical analyses of clinical data (extent of skin involvement, hand contractures, azotemia and/or malignant hypertension, cardiac involvement, dysmotility and stricture/dilatation of esophagus, extent of lung fibrosis and forced

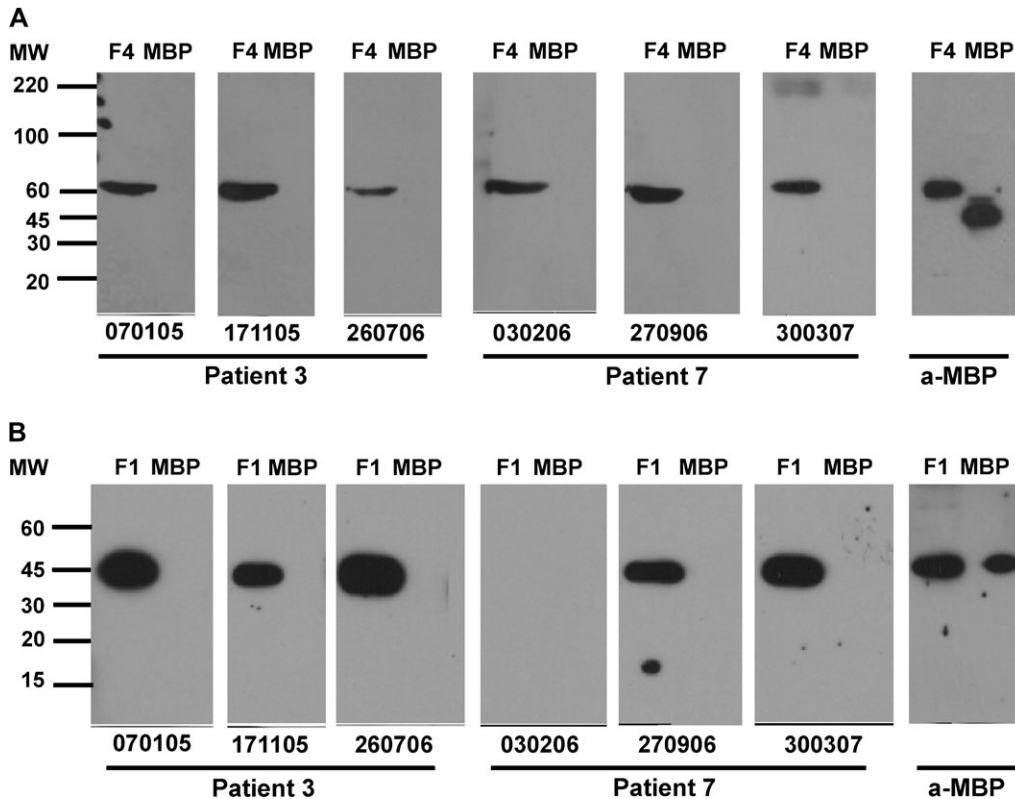
vital capacity) showed no association between anti-topo I antibody epitope specificity and clinical presentation of SSc. However, there was a significant difference between the F1-negative and F1-positive groups of SSc patients in average age [F1 negative (number of patients: 49):  $54.8 \pm 13.5$  years; F1 positive (number of patients: 10):  $63.9 \pm 9.4$  years;  $P = 0.048$ ] and the duration of the disease [F1 negative (number of patients: 49):  $10.0 \pm 7.3$  years; F1 positive (number of patients: 10):  $17.1 \pm 12.9$  years;  $P = 0.019$ ]. Moreover, average age of dcSSc patients possessing sera positive for F1 fragment was significantly higher compared with the patients showing no detectable levels of antibody against F1 [F1 negative (number of patients: 25):  $51.9 \pm 14.3$  years; F1 positive (number of patients: 9):  $63.7 \pm 10.0$  years;  $P = 0.03$ ].

**Table 2.** Recognition frequencies of recombinant topo I fragments determined by ELISA using anti-topo I antibody-positive patients' sera

| Topo I fragments (AAs) | dcSSc (n = 34) | lcSSc (n = 25) | SLE (n = 8) |
|------------------------|----------------|----------------|-------------|
| F1 (5–30)              | 9 (26%)        | 1 (4%)         | 0           |
| F2 (69–92)             | 1 (3%)         | 1 (4%)         | 0           |
| F3 (87–145)            | 1 (3%)         | 0              | 0           |
| F4 (450–600)           | 34 (100%)      | 25 (100%)      | 8 (100%)    |
| F5 (640–705)           | 2 (6%)         | 0              | 0           |
| F6 (170–290)           | 2 (6%)         | 2 (8%)         | 0           |
| F7 (295–400)           | 0              | 0              | 1 (12%)     |
| F8 (350–400)           | 0              | 0              | 4 (50%)     |
| F9 (295–350)           | 0              | 0              | 1 (12%)     |

Numbers indicate individual patients positive for the given fragments, numbers in parentheses indicate percentage of positive sera.

To investigate whether antibodies against peptide F1 were specific for SSc patients and the appearance of them is not merely a consequence of aging, sera from 65 age-matched (average age:  $62.4 \pm 5.4$  years) healthy controls were tested for antibodies against F1. Only one serum sample was found positive. To test whether the presence of antibodies against fragment F1 is specific for SSc, sera from 110 age-matched (average age:  $65.5 \pm 4.8$  years) patients with different connective tissue diseases were also tested and only four serum samples (two seronegative spondylarthritis, one myositis, one Sjögren syndrome) were found positive.



**Fig. 3.** Immunoblots using topo I fusion proteins F4 and F1 as antigens. Purified recombinant fusion proteins (panel A: F4, panel B: F1) or MBP were separated on a 10% SDS–polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were cut into strips and probed with serial serum samples (obtained at dates indicated) of patients or with an anti-maltose-binding protein antibody. MW, molecular weight marker (kDa).

Comparison of clinical data of the 4 F8-positive and the 261 F8-negative SLE patients suggested that SLE patients with antibody against fragment F8 have Raynaud's phenomenon and a milder presentation of the disease (lack of arthritis, central nervous system and kidney involvement).

## Discussion

In this study, we performed comparative epitope mapping of anti-topo I auto-antibodies present in sera of SSc and SLE patients. Our data clearly demonstrated that the pattern of recognized epitopes is different between dcSSc, lcSSc and SLE patients. In addition to an immunodominant part of topo I (fragment F4), we identified two new regions which were previously not shown to be targeted by anti-topo I antibodies. Fragment F1 was specifically recognized by a subset of dcSSc patients' sera, while fragment F8 was recognized by SLE patients. In addition, we demonstrated for the first time that the presence of antibodies with both IgM and IgG isotype against an immunodominant fragment of topo I (fragment F4) is not restricted to SSc, but could be detected in healthy individuals and in sera of patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE.

A number of research groups have studied the epitope specificity of anti-topo I antibodies in SSc patients. However, to date there is no report of epitope mapping of anti-topo I antibodies in SLE patients. Using molecular biology strategies, several studies have determined that anti-topo I antibodies of SSc patients recognize multiple epitopes on topo I, although the recombinant topo I fragments used varied in these reports. Verheijen *et al.* (10) verified three different epitope regions which are distributed over the entire protein. D'Arpa *et al.* (9) expressed six fragments of topo I and demonstrated that most of anti-topo I-positive sera recognize multiple epitopes. Kuwana *et al.* (13) found four epitope regions on topo I and reported that 86% of 43 anti-topo I-positive SSc sera reacted with a fusion protein containing AA 485–601 of topo I. Piccinini *et al.* (11) reported that AA 405–484 of topo I was recognized by all the anti-topo I-positive sera they examined but detected no epitopes between AA 485–765 which could be due to the small number of serum samples examined. Epitope mapping performed with synthetic peptides identified four major epitopes, three of them in core subdomains I and II (AA 207–441) and one in core subdomain III (AA 433–636) (22). Since each of these studies have implicated topo I fragments located in the region of AA 484–560, these findings strongly suggest that immunodominant B cell epitopes recognized by anti-topo I antibodies could be located within this region.

However, fragments used in these studies were designed either on the basis of topo I domain structure or antigenicity prediction, both of which could miss possible epitopes. With the exception of work performed by Meesters *et al.* (23), to date there is no report of epitope mapping on topo I with random antigen fragments. This early work used a size-selected random antigen fragment library constructed by limited deoxyribonuclease digestion and screened this library with serum of a single SSc patient. Therefore, we have revisited this issue and constructed an antigen fragment library of topo I displayed on bacteriophage lambda.

The library contains fragments of topo I with random starting point and length, consequently it overcomes the theoretical and technical limitations associated with pre-designed fragments or overlapping synthetic peptides.

With a phage display-based approach, we found a characteristic epitope pattern which seemed to be specific for the different disease groups. A common fragment recognized by all 15 patients' sera was located in the region of AA 451–593, which is in agreement with previously published results (9, 10, 12, 24, 25). In addition to this, sera of dcSSc patients recognized several short fragments (spanning AA 5–145) at the N-terminal part of the molecule. Previous studies performed with fusion proteins covering the N-terminal domain starting from AA 70 reported that this part of the molecule is recognized by anti-topo I antibodies (10, 13, 17). However, the opposite has also been reported by Hu *et al.* (15), who used a fusion protein covering the entire length (AA 1–213) of the N-terminal domain and showed that this part of the molecule is not targeted by anti-topo I antibodies. These seemingly contradictory results may be explained by the different methods and antigen constructs used, and most importantly by possible conformational factors which could influence the accessibility of short epitopes buried in the tertiary structure. It is important to note that the majority of new epitope-containing fragments we have identified at the N-terminal part spans only 20–30 AA. Fragment F1 (AA 5–30) contains an experimentally proven granzyme B cleavage site (26). Thus, it is possible that *in vivo* cleavage of topo I by granzyme B released during T cell-mediated cytotoxic responses results in the formation of a neo-antigenic determinant represented by fragment F1. *In vitro* assays using the full-length antigen or the full-length N-terminal domain may fail to detect antibodies recognizing these short epitopes suggesting strong conformational sensitivity.

On the basis of fragments selected from the phage displayed antigen fragment library, we expressed nine topo I-MBP fusion proteins. First, we tested recognition of these fusion proteins with sera of healthy individuals and found that a significant portion of healthy individuals possess antibodies with IgM and IgG isotype against fragment F4. Using a large number of sera, we showed that the presence of antibodies against fragment F4 is essentially independent of the age and geographical origin of healthy individuals. In addition, antibodies against fragment F4 could also be detected in sera of patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE. The fact that these sera were shown to be negative for anti-topo I antibody by a commercial ELISA test using the full-length antigen could indicate that the sequence represented by fragment F4 could be hidden in the three-dimensional structure of the full-length molecule. These findings raise the possibility that antibodies against fragment F4 present in sera of healthy individuals and patients with systemic autoimmune diseases could belong to the pool of naturally occurring antibodies. To our knowledge, these are the first results demonstrating that natural antibodies (nAbs) against topo I are present in human sera. The phenomena that nAbs could recognize self-antigens which are also targeted by antibodies in autoimmune diseases is not unprecedented. Several lines of evidence indicate that antibodies recognizing factor VIII, thyroglobulin,



DNA and endothelial cell membrane components are present in sera of both healthy individuals and patients with autoimmune diseases (27–30). Since fragment F4 represent a 142 AA long portion of topo I, it is possible that the fine epitope pattern recognized by nAbs and disease-associated auto-antibodies within this part of topo I is different.

With the use of sera of 67 anti-topo I antibody-positive patients, we showed that recognition of the majority of fragments (F2, F3, F5–F7 and F9) is characteristic for the individual patient sera used for library screening, instead of being characteristic for the given disease subgroup. This is in agreement with result of Henry *et al.* (17), who found both individual and longitudinal differences in the recognized topo I epitopes. However, antibodies recognizing the common F4 fragment (AA 451–593) were detected in all patient sera tested. Fragment F1 (AA 5–30) was specifically recognized by a subset of dcSSc patients' sera, and fragment F8 (350–400) was recognized by SLE patients, indicating that these fragments could represent characteristic epitopes for dcSSc and SLE, respectively.

Analysis of clinical data failed to demonstrate associations between anti-topo I antibody epitope specificity and clinical presentation of the disease. This is in agreement with results of Henry *et al.* (17), who also reported lack of clear association between changes in the anti-topo I antibody response and clinical parameters. The difference in the duration of disease between anti-F1 antibody-positive and -negative dcSSc patients, together with findings of our longitudinal analysis, may indicate that the anti-topo I immune response could be explained by a general recognition of the immunodominant part on the molecule (fragment F4), and the disease-associated auto-antibodies may target the N-terminal part later during the course of the disease. Thus, auto-antibodies against fragment F1 may represent a new marker of late-stage dcSSc. The mechanism of this 'epitope spreading' and factors which facilitate this in dcSSc remain to be further investigated.

In summary, we have demonstrated for the first time that antibodies against a fragment of topo I could be detected in healthy individuals and in sera of patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE. In addition to this immunodominant part of topo I, sera of patients with dcSSc, lcSSc and SLE recognize distinct topo I epitopes. We have shown that recognition of the majority of fragments is characteristic for the individual patient, instead of being characteristic for the given disease subgroup. However, fragment F1 (AA 5–30) was specifically recognized by a subset of dcSSc patients' sera, and fragment F8 (350–400) was recognized by SLE patients, indicating that fragment F1 and F8 could represent characteristic epitopes for dcSSc and SLE, respectively. Analysis of clinical data showed no significant association between anti-topo I antibody epitope specificity and clinical presentation of the disease. However, antibodies against fragment F1 may represent a new marker of late-stage dcSSc.

## Funding

National Health Foundation (ETT: 32/KO/2004); Hungarian Scientific Research Fund (OTKA 75912).

## Acknowledgements

T.C. is a recipient of the Bolyai János Postdoctoral Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

## Abbreviations

|        |                                      |
|--------|--------------------------------------|
| AA     | amino acids                          |
| dcSSc  | diffuse cutaneous systemic sclerosis |
| lcSSc  | limited cutaneous systemic sclerosis |
| MBP    | maltose-binding protein              |
| nab    | natural antibody                     |
| OD     | optical density                      |
| SLE    | systemic lupus erythematosus         |
| SSc    | systemic sclerosis                   |
| topo I | topoisomerase I                      |

## References

- Varga, J. and Abraham, D. 2007. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* 117:557.
- Okano, Y. 1996. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 22:709.
- Steen, V. D., Powell, D. L. and Medsger, T. A. Jr 1988. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 31:196.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Okano, Y., Tojo, T. and Homma, M. 1994. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 37:75.
- LeRoy, E. C., Black, C., Fleischmajer, R. *et al.* 1988. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 15:9202.
- Gussin, H. A., Ignat, G. P., Varga, J. and Teodorescu, M. 2001. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44:376.
- Hamidou, M. A., Audrain, M. A., Masseur, A., Agard, C. and Moreau, A. 2006. Anti-topoisomerase I antibodies in systemic lupus erythematosus as a marker of severe nephritis. *Clin. Rheumatol.* 25:542.
- Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J. and Hol, W. G. J. 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 279:1504.
- D'Arpa, P., White-Cooper, H., Cleveland, D. W., Rothfield, N. F. and Earnshaw, W. C. 1990. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* 33:1501.
- Verheijen, R., Van Den Hoogen, F., Beijer, R. *et al.* 1990. A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 80:38.
- Piccinini, G., Cardellini, E., Reimer, G., Arnett, F. C. and Durban, E. 1991. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol. Immunol.* 28:333.
- Cram, D. S., Fiscaro, N., McNeillage, L. J., Coppel, R. L. and Harrison, L. C. 1993. Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J. Immunol.* 151:6872.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Mimori, T., Tojo, T. and Homma, M. 1993. Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I: clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 36:1406.
- Seelig, H. P., Schroter, H., Ehrfeld, H. and Renz, M. 1993. Autoantibodies against topoisomerase I detected with the natural enzyme and overlapping recombinant peptides. *J. Immunol. Methods.* 165:241.
- Hu, P. Q., Fertig, N., Medsger, T. A. Jr and Wright, T. M. 2004. Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis. *J. Immunol.* 173:2834.

## 8 Natural and pathologic antibodies against topoisomerase I

- 16 Kuwana, M., Kaburaki, J., Mimori, T., Kawakami, Y. and Tojo, T. 2000. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43:1074.
- 17 Henry, P. A., Atamas, S. P., Yurovsky, V. V., Luzina, I., Wigley, F. M. and White, B. 2000. Diversity and plasticity of the anti-DNA topoisomerase I autoantibody response in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 43:2733.
- 18 Czirják, L., Kumánovics, G., Varjú, C. *et al.* 2008. Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 67:59.
- 19 Ansuini, H., Cicchini, C., Nicosia, A., Tripodi, M., Cortese, R. and Luzzago, A. 2002. Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands. *Nucleic Acids Res.* 30:78.
- 20 Czömpöly, T., Olasz, K., Simon, D. *et al.* 2006. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol. Immunol.* 43:1761.
- 21 Santini, C., Brennan, D., Mennuni, C. *et al.* 1998. Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 282:125.
- 22 Rizou, C., Ioannidis, J. P., Panou-Pomonis, E. *et al.* 2000. B-cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:344.
- 23 Meesters, T. M., Hoet, M., van den Hoogen, F. H., Verheijen, R., Habets, W. J. and Van Venrooij, W. J. 1992. Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis. *Mol. Biol. Rep.* 16:117.
- 24 Kato, T., Yamamoto, K., Takeuchi, H. *et al.* 1993. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 36:1580.
- 25 Kuwana, M., Kaburaki, J., Medsger, T. A. Jr and Wright, T. M. 1999. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum.* 42:1179.
- 26 Casciola-Rosen, L., Andrade, F., Ulanet, D., Wong, W. B. and Rosen, A. 1999. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 190:815.
- 27 Algiman, M., Dietrich, G., Nydegger, U., Boieldieu, D., Sultan, Y. and Kazatchkine, M. D. 1992. Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89:3795.
- 28 Bouanani, M., Plechaczyk, M., Pau, B. and Bastide, M. 1989. Significance of the recognition of certain antigenic regions on the thyroglobulin molecule by natural autoantibodies from healthy subjects. *J. Immunol.* 143:1129.
- 29 Sabbaga, J., Pankewycz, O. G., Lufft, V., Schwartz, R. S. and Madaio, M. P. 1990. Cross-reactivity distinguishes serum and nephritogenic anti-DNA antibodies in human lupus from their natural counterparts in normal serum. *J. Autoimmun.* 3:215.
- 30 Ronda, N., Haury, M., Nobrega, A., Kaveri, S. V., Coutinho, A. and Kazatchkine, M. D. 1994. Analysis of natural and disease-associated autoantibody repertoires: anti-endothelial cell IgG autoantibody activity in the serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 6:1651.



# Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis <sup>☆</sup>

Tamás Czömpöly <sup>a</sup>, Diána Simon <sup>b</sup>, László Czirják <sup>b</sup>, Péter Németh <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szizeti út 12., H-7643, Pécs, Hungary

<sup>b</sup> Department of Immunology and Rheumatology, University of Pécs, Akác u. 1., H-7632, Pécs, Hungary

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 January 2009

Accepted 10 February 2009

Available online 13 February 2009

### Keywords:

Systemic sclerosis

Autoantibodies

Anti-topoisomerase I

Epitope mapping

## ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by fibrosis of the skin, vascular abnormalities and activation of the immune system. The majority of SSc patients have autoantibodies against nuclear antigens. Among these antibodies against topoisomerase I (topo I) are frequently detected in sera of SSc patients. Since the discovery of these antibodies as immunoglobulins reacting with a 70 kDa nuclear protein (Scl-70), a massive body of clinical and experimental data has been generated. In this review we summarize accumulated evidence about anti-topo I autoantibodies in SSc, including results of epitope mapping studies and investigations on the possible pathogenic role of these antibodies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

|   |     |
|---|-----|
| 1. Introduction . . . . .   | 692 |
| 2. The family of topoisomerases . . . . .   | 693 |
| 3. Identification of antibodies against topoisomerases . . . . .  | 693 |
| 4. Anti-topoisomerase I autoantibodies: isotype, prevalence, and association with clinical parameters . . . . . | 693 |
| 5. Epitope mapping of anti-topoisomerase I antibodies . . . . .   | 694 |
| 6. Naturally occurring autoantibodies against a recombinant fragment of topoisomerase I . . . . .               | 694 |
| 7. Possible pathogenic roles of anti-topoisomerase I antibodies . . . . .                                       | 694 |
| 8. Conclusions . . . . .  | 695 |
| Take-home messages . . . . .  | 695 |
| References . . . . .  | 695 |

## 1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a systemic autoimmune disorder characterized by immune activation, vascular injury, inflammation, fibrosis of the skin and various internal organs.

Activation of the immune system leads to production of disease specific autoantibodies, lymphocyte activation and secretion of various cytokines [1]. Patients with SSc could be classified into two clinically distinct subsets. Diffuse cutaneous SSc (dcSSc) is characterized by rapid fibrosis of the skin, lungs and other organs, while in limited cutaneous SSc (lcSSc) vascular abnormalities are dominating and fibrosis is limited predominantly to the acral regions [2]. However, possible limitations of this two subset based classification system has been identified by a recent analysis of the EUSTAR database which indicated that a subset classification distinguishing anti-topoisomerase I and anti-centromere antibody positive subsets may even be clinically more relevant [3].

<sup>☆</sup> Supported by a Hungarian Scientific Research Fund grant (OTKA 75912). T.C. is a recipient of the Bolyai János Postdoctoral Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

\* Corresponding author. Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Faculty of Medicine, Szizeti út 12., Pécs, H-7643, Hungary. Tel.: +36 72 536290; fax: +36 72 536289.

E-mail address: [peter.nemeth@aok.pte.hu](mailto:peter.nemeth@aok.pte.hu) (P. Németh).

Moreover, introduction of additional subsets reflecting integrated clinical parameters has also been proposed (reviewed in [4]).

The vast majority of SSc patients have antinuclear antibodies, which predominantly recognize DNA topoisomerase I (topo I), RNA polymerases, centromere proteins, and Th/To [5,6]. In addition antibodies against several other structures (including U3RNP, PM/Scl, B23, Ku, snRNP, mitochondrial components, defined or undefined cell surface antigens present on endothelial cells and fibroblasts, and extracellular antigens) could also be detected in sera of SSc patients (reviewed in [7]). However, the role of these antibodies in the pathogenesis of SSc is not clearly demonstrated.

In this review we summarize accumulated evidence about anti-topo I autoantibodies in SSc, including results of epitope mapping studies and investigations on the possible pathogenic role of these antibodies.

## 2. The family of topoisomerases

Topoisomerases change the tertiary structure of the DNA molecule either by relaxing supercoiled DNA through breaking and rejoining one strand at a time (type I enzymes) or by catalyzing catenation/decatenation, knotting/unknottting of DNA rings through breaking and rejoining DNA in a double-stranded fashion (type II enzymes) [8,9]. Type I enzymes are further classified to type IA subfamily if the enzyme forms a covalent link with the 5' end of broken DNA, or type IB subfamily when the enzyme binds covalently to the 3' phosphate. Topoisomerase activity has been detected in a variety of species from bacteria through mammals. In humans six distinct topoisomerase enzymes have been identified: topoisomerase I (topo I) a type IB enzyme, topoisomerase II a type II enzyme with two isoforms (topo II $\alpha$  and topo II $\beta$ ), topoisomerase III a type IA enzyme with two isoforms (topo III $\alpha$  and topo III $\beta$ ), and mitochondrial topoisomerase I which is a type IB enzyme. Topo I has a significant homology with mitochondrial topoisomerase I (52% identity, 64% similarity),

while the other human topoisomerases have primary sequences showing no homology with topo I.

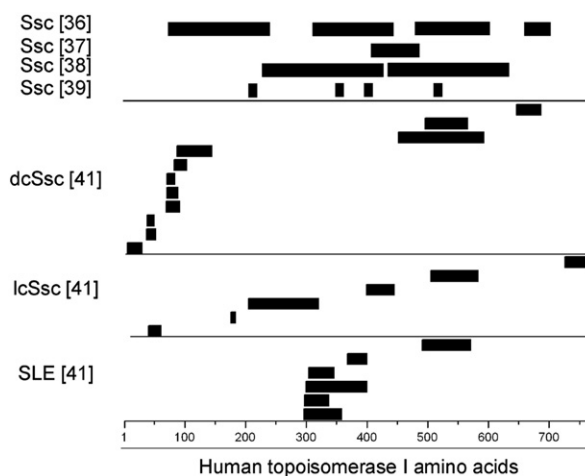
## 3. Identification of antibodies against topoisomerases

Anti-topo I autoantibodies were first identified by immunoblotting in sera of SSc patients as immunoglobulins reacting with a 70 kDa nuclear protein, and were termed anti-Scl-70 antibodies [10]. Since then it has been shown that Scl-70 is the breakdown product of topo I [11]. In addition to SSc the presence of anti-topo I antibodies has been demonstrated in systemic lupus erythematosus (SLE) patients showing no clinical signs and symptoms of systemic sclerosis [12,13].

While anti-topo I antibodies considered to be present almost exclusively in SSc, the presence of anti-topo II $\alpha$  autoantibodies has been demonstrated in a number of autoimmune disorders including SSc [14], localized scleroderma [15], idiopathic pulmonary fibrosis [16], systemic lupus erythematosus [17], juvenile rheumatoid arthritis [18], and insulin dependent diabetes mellitus [19]. To date the presence of autoantibodies against other members of the topoisomerase family has not been demonstrated. Since anti-topo I autoantibodies are considered to have a high specificity for SSc in further parts of this review we will address anti-topo I antibodies.

## 4. Anti-topoisomerase I autoantibodies: isotype, prevalence, and association with clinical parameters

Anti-topo I antibodies are most frequently detected with IgG isotype, although the presence of anti-topo I antibodies with IgA and IgM isotype has also been demonstrated [20]. The mean frequency of anti-topo I autoantibodies among SSc patients is around 20%, with a high specificity for SSc [21]. Anti-topo I autoantibodies are considered to be associated with dcSSc [22,23]. However, the presence of anti-topo I autoantibodies may not be entirely restricted to this subset, since a subgroup of lcSSc patients was also found to be positive [3,22]. Anti-topo I autoantibody is found to be associated with increased mortality, pulmonary fibrosis,



**Fig. 1.** Results of epitope mapping studies performed with topoisomerase I. Identified epitope regions are indicated by black boxes. Abbreviations on the left indicate the investigated diseases or disease subsets. SSc: systemic sclerosis, dcSSc: diffuse cutaneous systemic sclerosis, lcSSc: limited cutaneous systemic sclerosis, SLE: systemic lupus erythematosus. Numbers in square brackets indicate references cited.

musculoskeletal and cardiac involvement, and proteinuria [3]. The level of anti-topo I autoantibody correlates with the extent of fibrosis of the skin and internal organ involvement in dcSSc, and may serve as an activity marker of disease [24].

### 5. Epitope mapping of anti-topoisomerase I antibodies

Topo I is a 765 amino acid (AA) long enzyme which contains five distinct regions: the N-terminal domain (AA 1–215), core subdomains I–II (AA 216–435), core subdomain III (AA 436–636), the linker domain (637–713), and the C-terminal domain (AA 714–765) [25].

In search for immunodominant epitopes, or to survey changes in the pattern of recognized epitopes a number of research groups have studied the epitope specificity of anti-topo I antibodies in SSc patients. Using molecular biology strategies several studies have demonstrated that anti-topo I antibodies of SSc patients recognize multiple epitopes on topo I, although the recombinant topo I fragments used varied in these reports. Verheijen et al. verified three different epitope regions which are distributed over the entire protein [26]. D'Arpa et al. expressed six fragments of topo I and demonstrated that most of anti-topo I positive sera recognize multiple epitopes [27]. Kuwana et al. found four epitope regions on topo I and reported that 86% of 43 anti-topo I positive SSc sera reacted with a fusion protein containing AA 485–601 of topo I [28]. Piccinini et al. reported that AA 405–484 of topo I was recognized by all the anti-topo I positive sera they examined but detected no epitopes between AA 485 and 765 which could be due to the small number of serum samples examined [29]. Hu et al. reported a high reactivity against core subdomains I and II (AA 236–435), and core subdomain III (AA 436–636) [30]. Epitope mapping performed with synthetic peptides identified, four major epitopes, three of them in core subdomains I and II (AA 236–435), and one in core subdomain III (AA 436–636) [31]. Since some of these studies have implicated topo I fragments located in the region of AA 484–560, these findings strongly suggest that immunodominant B cell epitopes recognized by anti-topo I antibodies could be located within this region (Fig. 1).

However, fragments used in these studies were designed either on the basis of topo I domain structure or antigenicity prediction, both of which could miss possible epitopes. Until recently there was a single report of epitope mapping on topo I with random antigen fragments [32]. This early work used a size selected random antigen fragment library constructed by limited deoxyribonuclease digestion, and screened this library with serum of a single systemic sclerosis patient. They found a major epitope region spanning AA 653–704 of the linker domain. This region has been produced as a fusion protein and was recognized by 70% of anti-topo I positive sera used in subsequent testing.

Given the limited experimental data obtained by random antigen fragments we recently revisited this issue and constructed an antigen fragment library of topo I displayed on bacteriophage lambda [33]. The library contains fragments of topo I with random starting point and length, consequently it overcomes the theoretical and technical limitations associated with pre-designed fragments or overlapping synthetic peptides. We used this library to compare the epitope specificity of anti-topo I antibodies present in sera of dcSSc,

lcSSc and SLE patients. Our data demonstrated that the pattern of recognized epitopes is different between dcSSc, lcSSc and SLE patients (Fig. 1). On the basis of these results it seems that sera of dcSSc patients recognize epitopes localized in the N-terminal domain, epitopes recognized by SLE patients' sera are found in core subdomains I–II, while epitopes recognized by lcSSc patients are scattered throughout the molecule. In addition to this there is a common region of topo I (AA 450–600) recognized by all three groups of sera.

### 6. Naturally occurring autoantibodies against a recombinant fragment of topoisomerase I

On the basis of fragments identified by library selection we expressed fusion proteins and investigated recognition of these fragments using a large number of sera from healthy controls, patients with SSc, patients with SLE and patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE. We have unexpectedly found that the presence of antibodies with both IgM and IgG isotype against an immunodominant part of topo I (AA 450–600) is not restricted to SSc, but could be detected in healthy individuals and in sera of patients with inflammatory rheumatic diseases other than SSc and SLE. The fact that these sera were shown to be negative for anti-topo I antibody by a commercial ELISA test using the full length antigen could indicate that the sequence represented by AA 450–600 could be hidden in the three dimensional structure of the full length molecule. These findings raise the possibility that antibodies against this fragment present in sera of healthy individuals and patients with systemic autoimmune diseases could belong to the pool of naturally occurring antibodies. However, since this recombinant fragment of topo I represents a 150 AA long sequence, it is possible that the fine epitope pattern recognized by naturally occurring antibodies and disease associated autoantibodies within this part of topo I is different.

### 7. Possible pathogenic roles of anti-topoisomerase I antibodies

The pathogenic role of anti-topo I autoantibodies in SSc is not clearly demonstrated. However several lines of indirect evidence suggest that anti-topo I autoantibodies could contribute to the pathogenesis of SSc. Anti-topo I antibodies could be detected at a very early stage of the disease [34]. The presence of anti-topo I antibodies is suggested to be associated with a more severe subset of SSc [3], and the level of these antibodies seems to correlate with the activity of the disease [24]. However, these important clinical findings need to be substantiated by demonstration of the direct molecular and cellular mechanisms by which anti-topo I antibodies could play a role in pathogenesis of SSc.

The missing link seems to be in the connection between immunological abnormalities and fibrosis. In theory, the presence of SSc specific autoantibodies which would be capable to bind to the surface of fibroblasts and induce myofibroblast like phenotypic changes represents an attractive mechanism to form a connection between these processes. In fact the presence of stimulatory autoantibodies against the platelet derived growth factor receptor (PDGFR) in sera of SSc patients has been reported (reviewed in [35]).

These antibodies were shown to induce phosphorylation of PDGFR, and upregulation of alpha-smooth muscle actin and type collagen expression in fibroblasts [36]. However, confirmation of these results in an extended set of patients is not provided to date. Moreover a study where anti-PDGFR antibodies were measured by immunological methods and not by bioactivity assays, showed that the presence of anti-PDGFR antibodies is not restricted to SSc, but could also be detected in healthy individuals [37]. This study raise the possibility that antibodies against PDGFR belong to the pool of naturally occurring antibodies. Similarly to the possibility raised by our results obtained with a recombinant fragment of topo I, it is possible that the fine epitope pattern recognized by naturally occurring antibodies and disease associated autoantibodies within the PDGFR is different, which could explain the discrepancies obtained by bioactivity and immunological assays.

In case of the pathogenic role of antibodies directed against intracellular or nuclear antigens there is a general problem, namely how these antibodies are capable to bind to the cell surface and induce or sustain cellular damage. Binding of anti-topo I autoantibodies to the surface of fibroblasts has been demonstrated [38], later on the same group has shown that topo I is capable of binding to the surface of fibroblast cell lines, thus this fibroblast surface bound topo I provides a binding site for anti-topo I antibodies [39]. This group also showed that the presence of topo I–anti-topo I immunocomplexes on the surface of fibroblasts stimulates adhesion and activation of monocytes *in vitro*. However, the ligand which forms a binding site for topo I on the fibroblast surface is not yet identified, and topo I has been found to bind in comparable quantities to both normal and SSc derived fibroblasts. Together these findings though provide the first experimental evidence for cell surface binding of anti-topo I autoantibodies, neither explain why anti-topo I antibodies are formed almost exclusively in SSc, nor demonstrate a direct or indirect link between these antibodies and fibrosis.

## 8. Conclusions

The pathogenesis of SSc seems to be highly complex. Some ill defined initiator events could lead to vascular injury, inflammation, activation of both innate and adaptive immune system and fibrosis. The hierarchical order of these events, if there is such an order at all, is not yet been clearly established, however vascular injury seems to be an early and primary process [40]. Anti-topo I autoantibodies are certainly among the most frequently detected autoantibodies in SSc. However, antibodies against several other nuclear or cytoplasmic antigens are also present in SSc. A number of groups, including ours, examined the epitope specificity of anti-topo I autoantibodies. Though the methods used and patient populations examined vary among these studies, it seems that there is an immunodominant part of topo I in core subdomain III (between AA 450 and 600). The association of anti-topo I autoantibodies with dcSSc which is dominated by fibrosis could implicate either that anti-topo I autoantibodies play a causative role in fibrosis, or these antibodies are produced as a consequence of other events (vascular or cellular injury) and play no pathogenic role in SSc, but reflect only the activity of these events. The former scenario is

supported but not unequivocally proven by the demonstration of cell surface binding of anti-topo I antibodies on fibroblasts.

## Take-home messages

- Anti-topoisomerase I (topo I) autoantibodies are considered to be associated with diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc), however the presence of anti-topo I autoantibodies may not be entirely restricted to this subset, since a subgroup of patients with limited cutaneous SSc were also found to be positive.
- The presence of anti-topo I antibodies has also been demonstrated in systemic lupus erythematosus (SLE) patients showing no clinical signs and symptoms of systemic sclerosis.
- On the basis of epitope mapping studies it seems that there is an immunodominant part of topo I located in core subdomain III (amino acids 436–636).
- Antibodies against a recombinant immunodominant fragment (amino acids 450–600) of topo I could also be detected in sera of healthy individuals, these antibodies possibly belong to the pool of naturally occurring autoantibodies.
- Indirect clinical evidence suggest that anti-topo I autoantibodies could contribute to the pathomechanism of SSc, which is supported by the demonstration of cell surface binding of anti-topo I antibodies on fibroblasts.

## References

- [1] Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557–67.
- [2] LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger Jr TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202–5.
- [3] Walker UA, Tyndall A, Czirájk L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007;66:754–63.
- [4] Johnson SR, Feldman BM, Hawker GA. Classification criteria for systemic sclerosis subsets. *J Rheumatol* 2007;34:1855–63.
- [5] Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:709–35.
- [6] Koenig M, Dieudé M, Senécal JL. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7:588–93.
- [7] Walker JG, Fritzler MJ. Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:580–91.
- [8] Champoux JJ. Strand breakage by the DNA untwisting enzyme results in covalent attachment of the enzyme to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:3800–4.
- [9] Liu LF, Liu CC, Alberts BM. Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* 1980;19:697–707.
- [10] Douvas AS, Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979;254:10514–22.
- [11] Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986;231:737–40.
- [12] Gussin HA, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:376–83.
- [13] Hamidou MA, Audrain MA, Masseur A, Agard C, Moreau A. Anti-topoisomerase I antibodies in systemic lupus erythematosus as a marker of severe nephritis. *Clin Rheumatol* 2006;25:542–3.
- [14] Grigolo B, Mazzetti I, Meliconi R, Bazzi S, Scorza R, Candela M, et al. Anti-topoisomerase II autoantibodies in systemic sclerosis: association with

- pulmonary hypertension and HLA-B35. *Clin Exp Immunol* 2000;121:539–43.
- [15] Hayakawa I, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Anti-DNA topoisomerase II $\alpha$  autoantibodies in localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004;50:227–32.
- [16] Meliconi R, Bestagno M, Sturani C, Negri C, Galavotti V, Sala C, et al. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in cryptogenic fibrosing alveolitis and connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1989;76:184–9.
- [17] Hoffmann A, Heck MM, Bordwell BJ, Rothfield NF, Earnshaw WC. Human autoantibody to topoisomerase II. *Exp Cell Res* 1989;180:409–18.
- [18] Zuklys KL, Szer IS, Szer W. Autoantibodies to DNA topoisomerase II in juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1991;84:245–9.
- [19] Chang YH, Hwang J, Shang HF, Tsai ST. Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM. *Diabetes* 1996;45:408–14.
- [20] Hildebrandt S, Weiner E, Senecal JL, Noell S, Daniels L, Earnshaw WC, et al. The IgG, IgM, and IgA isotypes of antitopoisomerase-1 and anticentromere autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1990;33:724–7.
- [21] Reveille JD, Solomon DH, the American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70 and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;49:399–412.
- [22] Steen VD, Powell DL, Medsger Jr TA. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31:196–203.
- [23] Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75–83.
- [24] Hu PQ, Fertig N, Medsger Jr TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and disease activity in SSc. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363–73.
- [25] Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 1998;279:1504–13.
- [26] Verheijen R, Van Den Hoogen F, Beijer R, Richter A, Penner E, Habets WJ, et al. A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990;80:38–43.
- [27] D'Arpa P, White-Cooper H, Cleveland DW, Rothfield NF, Earnshaw WC. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 1990;33:1501–11.
- [28] Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I: clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1406–13.
- [29] Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol* 1991;28:333–9.
- [30] Hu PQ, Fertig N, Medsger Jr TA, Wright TM. Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis. *J Immunol* 2004;173:2834–41.
- [31] Rizou C, Ioannidis JP, Panou-Pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM, et al. B-cell epitope mapping of DNA topoisomerase I defines epitopes strongly associated with pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:344–51.
- [32] Meesters TM, Hoet M, Van Den Hoogen FH, Verheijen R, Habets WJ, Van Venrooij WJ. Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis. *Mol Biol Rep* 1992;16:117–23.
- [33] Simon D, Czömpöly T, Berki T, Minier T, Peti A, Toth E, Czirják L, Nemeth P. Naturally occurring and disease associated autoantibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 2009 (Accepted for publication).
- [34] Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease: a prospective study. *Arthritis Rheum* 1991;34:68–77.
- [35] Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Luchetti M, Tonnini C, Avvedimento EV. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets. *Autoimmun Rev* 2007;7:121–6.
- [36] Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:2667–76.
- [37] Balada E, Simeón-Aznar CP, Ordi-Ros J, Rosa-Leyva M, Selva-O'Callaghan A, Pardo-Gea J, et al. Anti-PDGFR- $\alpha$  antibodies measured by non-bioactivity assays are not specific for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1027–9.
- [38] Hénault J, Tremblay M, Clément I, Raymond Y, Sénécal JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3265–74.
- [39] Hénault J, Robitaille G, Sénécal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2006;54:963–73.
- [40] Guiducci S, Giacomelli R, Cerinic MM. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev* 2007;6:520–3.

### Study of functional variants of the BANK1 gene in rheumatoid arthritis

BANK1 gene variants have previously been identified as systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility markers; however it has not been tested whether they are associated with rheumatoid arthritis (RA) as well. In a recent study intended to investigate one functional (rs17266594) and two potentially functional (rs10516487 and rs3733197) gene variants, Orozco G, et al. (*Arthritis Rheum* 2009;60:372–379) enrolled four different cohorts: 1,080 RA patients and 1,368 healthy controls from Spain, 278 RA patients and 568 healthy controls from Sweden, 288 RA patients and 287 healthy controls from Argentina, and 288 RA patients and 288 healthy controls from Mexico. Samples were genotyped for BANK1 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) using a TaqMan 5'-allele discrimination assay. Statistical analysis comparing allele and genotype distributions was performed with the chi-square test. They did not find a significant association between RA and the rs10516487 and rs17266594 BANK1 polymorphisms. However, there was an increase in the major alleles among RA patients. Similarly, for rs3733197, there was an increase in the major allele among patients in every cohort. Nevertheless, this skewing reached statistical significance in the Spanish ( $P=0.01$ , odds ratio [OR] 1.17 [95% confidence interval (95% CI) 1.03–1.32]) and Argentinean ( $P=0.04$ , OR 1.31 [95% CI 1.00–1.72]) populations. They found a significant association of rs10516487 ( $P=0.005$ , OR 1.15 [95% CI 1.04–1.28]) and rs3733197 ( $P=0.0009$ , OR 1.17 [95% CI 1.07–1.29]) with RA in the pooled analysis. In a 3-SNP haplotype analysis, they found that the major TGG haplotype was significantly associated with RA ( $P=0.005$ , OR 1.14 [95% CI 1.04–1.25]). In addition, they found a common CAA haplotype that was protective against RA ( $P=0.0004$ , OR 0.82 [95% CI 0.74–0.92]). Such results suggest that BANK1 SNPs and haplotypes may contribute to RA susceptibility with a low risk.

# Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies

Tamás Czömpöly, Katalin Olasz, Zoltán Nyárády,  
Diána Simon, Judit Bovári, Péter Németh\*

*Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szigeti út 12., H-7633, Pécs, Hungary*

Received 15 January 2008; accepted 12 March 2008

Available online 9 April 2008

## Abstract

Because of their endosymbiotic evolutionary origin, proteins compartmentalized into mitochondria represent an interesting transition from prokaryotic foreign to essential self molecules. We investigated the presence of naturally occurring antibodies (nAbs) recognizing mitochondrial inner membrane enzymes. Epitope mapping analysis of a mitochondrial inner membrane enzyme, citrate synthase (CS) by synthetic overlapping peptides and phage display libraries using sera from healthy individuals and from patients having systemic autoimmune disease revealed CS recognizing nAbs with IgM isotype. We analyzed cross-reactive epitopes on human CS, bacterial CS, and various standard autoantigens. We have found that the fine epitope pattern on CS is different under physiological and pathological conditions. Moreover sera affinity purified on CS cross reacts with nucleosome antigen, which cross-reactivity could be mapped to a short epitope on human CS. These data indicate that in theory, nAbs “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. Thus, at the level of recognized epitopes there is a possible link between the innate like part and the adaptive-autoimmune arm of the humoral immune system.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Naturally occurring antibodies; Mitochondrial inner membrane enzyme; Epitope mapping

## Contents

|   |     |
|---|-----|
| 1. Introduction . . . . .   | 464 |
| 2. Presence of antibodies recognizing mammalian mitochondrial enzymes in human sera . . . . . | 464 |
| 3. Isotype of nAbs and nAb producing cells . . . . .  | 464 |
| 4. Anti-CS antibodies with IgG isotype appear after heart transplantation . . . . .           | 465 |
| 5. Polyreactivity of affinity purified anti-CS antibodies . . . . .                           | 465 |

\* Corresponding author. Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Faculty of Medicine, Szigeti út 12., Pécs, H-7633, Hungary. Tel.: +36 72 536290; fax: +36 72 536289.

*E-mail address:* [peter.nemeth@aok.pte.hu](mailto:peter.nemeth@aok.pte.hu) (P. Németh).



|   |     |
|---|-----|
| 6. Epitope mapping of antibodies against human citrate synthase . . . . .     | 465 |
| 7. Epitope mapping of antibodies against bacterial citrate synthase . . . . . | 465 |
| 8. Structural basis of polyreactivity . . . . .                               | 466 |
| Take-home messages . . . . .  | 466 |
| References . . . . .  | 466 |

## 1. Introduction

Molecular recognition and molecular discrimination are of key importance for proper function of the immune system. Due to the high diversity encoded in immunoglobulin genes and because of sophisticated clonal selection mechanisms, antibodies of the adaptive immune system theoretically could make precisely this distinction. However, natural (auto)antibodies seem to be exceptions to this rule. Naturally occurring antibodies (nAbs) are immunoglobulins mostly of IgM isotype with low affinity, and are secreted without immunization with antigen [1,2]. These antibodies can recognize genetically conserved sequences of wild range of pathogens and may serve in the first line of immune defense during an infection [3]. High affinity hapten recognition is characteristic for the adaptive style immune response; however, natural antibodies exhibit a “pattern recognition” like feature. Naturally occurring 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 [4]. Most nAAbs belong to the IgM or IgG isotype [5,6], and show polyreactivity with a broad range of affinities for the recognized epitopes [7]. Discrimination of nAbs from nAAbs is somewhat artificial, since given the limited immunoglobulin gene repertoire driving natural antibody production and the numerous distinct antigens recognized, it is highly probable that specificities with self non-self cross-reactivity exist.

Because of their endosymbiotic evolutionary origin, proteins compartmentalized into mitochondria represent an interesting transition from prokaryotic foreign to essential self molecules. The structural and functional conservation of mitochondrial components makes them candidate antigens for detailed analysis of antibodies with possible self non-self cross-reactivity. No classical mitochondrion targeted autoimmune disease — with the exception of 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 immunoreactivity against them, since they are in continuous connection with both innate and adaptive components of the immune system during physiologic turnover of cells.

In our previous work we have performed epitope mapping on human citrate synthase (hCS) to develop a model for comparative analysis of the predicted and the immunoserologically verified epitopes of circulating autoantibodies [8]. In this review we summarize accumulated evidence about the immunological recognition of mammalian mitochondrial citrate synthase, compare these evidences with data obtained by work on bacterial citrate synthase, and discuss our findings in context of recent developments in the field of natural antibodies.

## 2. Presence of antibodies recognizing mammalian mitochondrial enzymes in human sera

We have screened a large number of sera from healthy blood donors with different geographical background (Hungary, United Kingdom, and Finland) for antibodies against mammalian mitochondrial inner membrane enzymes (citrate synthase (CS), pyruvate decarboxylase complex (PDC), and malate dehydrogenase (MDH)). We have found that sera of approximately 10% of healthy individuals contain IgM antibodies recognizing CS, PDC and MDH. The prevalence of CS, PDC or MDH recognizing antibodies with IgG isotype was approximately 4%. Among sera of patients with various systemic autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus (SLE), IgM antibodies against CS and MDH were found in 24%, and 16% of sera tested, respectively. We demonstrated presence of these antibodies in infants and followed the titer of anti-CS antibodies in healthy adults over a five year period. We have shown that titer of anti-CS antibodies with IgM isotype is constant over time and characteristic for the given individual, while titer of anti-CS antibodies with IgG isotype is low and fluctuating. On the basis of this evidence we hypothesize that anti-CS antibodies with IgM isotype of healthy individuals and patients with systemic autoimmune disease could belong to the pool of nAAbs, while the presence of those with IgG isotype could be result of the adaptive immune response [9].

## 3. Isotype of nAbs and nAb producing cells

On the basis of data obtained from mice nAbs were initially considered to be mainly of IgM isotype [10,11],

however, since then it has been demonstrated that in addition to IgM, nAbs with IgG and IgA isotype are also present in human sera [5,12]. Moreover it seems that the majority of nAbs in human sera belongs to the IgG isotype [5,7].

Cellular and molecular mechanisms behind the isotype switch of nAbs from IgM to IgG are poorly understood. However, it has been reported recently that the majority of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in humans also express dual TCRs [13]. Since data on the possible interaction of regulatory T cells and nAb producing B cells (B1 B cells and marginal zone B cells in mice) is very limited, the significance of this finding in regulation of human nAb production remains unclear.

#### **4. Anti-CS antibodies with IgG isotype appear after heart transplantation**

The sporadic and transient appearance of anti-CS IgG could be the result of adaptive immune response triggered by either foreign antigens or release of CS into the circulation from internal organs as heart and liver during pathological conditions. We screened sera of heart transplant patients for anti-CS antibodies. We sought that CS is released during post-transplantation vasculopathy, and this could elicit an adaptive type immune response. Indeed we have found that the frequency of high titer anti-CS IgG in sera of heart transplant patients is significantly higher than in healthy individuals (20% vs. 4%) [14]. The presence of induced anti-CS IgG in heart transplant patients raise the question whether these antibodies are produced as a result of isotype switch from nAbs with IgM isotype or produced against different epitopes originally not recognized by nAbs. Epitope mapping of anti-CS IgGs suggested an altered epitope pattern compared to healthy individuals [14].

#### **5. Polyreactivity of affinity purified anti-CS antibodies**

Polyreactivity is a generally accepted feature of nAbs [7], with examples including cross-reactivity between proteins, carbohydrates and nucleic acids. [15,16]. In order to adequately characterize the anti-CS antibodies detected in human sera, we attempted affinity purification of these antibodies from sera of healthy individuals and patients with systemic autoimmune diseases. The eluted anti-CS antibodies were exclusively with IgM isotype. We tested cross-reactivity of these anti-CS IgMs on MDH, PDC and target antigens of various autoimmune diseases. We observed no cross-reactivity with mitochondrial inner membrane enzymes; however to our

surprise anti-CS IgM affinity purified from sera of SLE patients recognized the nucleosome antigen. We have extensively verified this cross-reactivity with the use of competition experiments and immunocytochemistry [9]. It is important to note that the anti-CS IgM showing nucleosome cross-reactivity has been affinity purified from sera of SLE patients, and the immunoglobulin gene repertoire coding for light chains in SLE patients has been demonstrated to resemble the repertoire of nAb producing CD5<sup>+</sup> adult and fetal B cells [17].

#### **6. Epitope mapping of antibodies against human citrate synthase**

We performed detailed epitope mapping analysis of anti-CS antibodies with the use of overlapping synthetic peptides, phage displayed CS antigen fragment or random peptide libraries. We carried out comparative epitope mapping of anti-CS IgM and IgG from healthy individuals and heart transplant patients. According to our results the appearance of anti-CS IgG in heart transplant patients seems to be the result of isotype switch from IgM, since the majority of recognized epitopes is identical when anti-CS IgM is compared to anti-CS IgG, but we detected some linear epitopes which differ from healthy individuals [14].

To investigate the molecular mechanism behind CS–nucleosome cross-reactivity on a CS antigen fragment library displayed on phage lambda we carried out comparative epitope mapping analysis of anti-CS IgM affinity purified from sera of healthy individuals and SLE patients. We have shown that, while there is no favored region of the hCS molecule recognized exclusively either by healthy individuals or patients with SLE, the fine epitope pattern is different in the two groups examined [9].

We have isolated a phage clone from a random peptide library corresponding to amino acids 145–150. of hCS, and performed competition ELISA for CS and nucleosome antigen. This phage clone inhibited the CS reactivity of anti-CS IgM affinity purified from sera of SLE patients but not from sera of healthy individuals. Moreover it also inhibited the nucleosome reactivity of anti-CS IgM affinity purified from sera of SLE patients. These results indicate that the CS–nucleosome cross-reactivity at least in part is caused by antibodies recognizing the hCS epitope (amino acids 145–150.) mimicked by this particular phage clone.

#### **7. Epitope mapping of antibodies against bacterial citrate synthase**

Since a number of studies demonstrated that nAbs play an important role in first line defense mechanisms

of the humoral immune response [18,19], we analyzed the possible overlap in epitopes recognized on hCS and bCS. We have used anti-CS IgM affinity purified on mammalian CS for epitope mapping on bCS. Three cross-reactive epitopes were identified on bCS, which interestingly show only a limited homology with hCS. On the basis of comparative epitope mapping with sera from healthy individuals, patients with systemic autoimmune diseases and heart transplant patients epitopes recognized on bCS could be grouped into the following categories: epitopes recognized by sera of all individuals, epitopes recognized only by sera of healthy individuals, and epitopes recognized only by sera of patients with systemic autoimmune diseases and heart transplant patients. There were no differences in the epitope pattern among autoimmune patients and heart transplant patients.

## 8. Structural basis of polyreactivity

Our affinity purified anti-CS IgM antibodies are essentially polyclonal, however the fact that their nucleosome cross-reactivity could be linked to a short epitope on hCS (amino acids 145–150.) indicates that the pool of CS–nucleosome cross-reactive antibodies is oligoclonal. By analyzing the primary sequence we have not found any significant homology between the cross-reactive epitope identified on hCS and protein components of the nucleosome. Several lines of evidence indicate that homologies in the primary sequence of distinct molecules are not sufficient to explain cross-recognition of them by the same antibodies. It has recently been suggested that the concept of molecular mimicry should be fine tuned to structural mimicry, which explains cross-recognition with similarities in the three dimensional molecular shape of the epitope instead of analyzing primary sequence [20].

Structural data about the other side of the coin, the paratope of a germline monoclonal Ab, has recently been published by Sethi et. al., which in our opinion could have general implications on polyspecificity of nAbs [21]. Authors of this paper have reported crystallographic data about the paratope both in antigen-free and peptide-bound state. They showed that the paratope of this germline antibody exhibits conformational variability in the antigen-free state, but surprisingly it is locked in one common conformation when bound to three structurally unrelated peptides with totally different primary sequence. The three structurally independent peptides utilized different parts of the paratope for binding, but interaction with two tyrosine residues were found to be conserved among them. Interestingly mutated amino

acids in the affinity matured form of the germline Ab were found to be distant from the key contact residues, and none of the peptides were recognized by the affinity matured Ab. Thus affinity maturation also resulted in narrowed specificity without changing amino acids in key contact positions. Although these data were obtained with a hapten “specific” germline Ab and affinity matured form of it, given the germline sequence usage of nAbs this mechanism could explain the polyreactivity of the anti-CS antibodies.

In summary hCS recognizing antibodies are present in human sera. Anti-hCS antibodies with IgM isotype seem to belong to the pool of nAAbs. The fine epitope pattern on CS is different under physiological and pathological (SLE) conditions. Sera affinity purified on CS cross reacts with nucleosome antigen. This cross-reactivity could be mapped to a short epitope on hCS. There are cross-reactive epitopes on human and bacterial CS. 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. Thus, at the level of recognized epitopes there is a possible link between the innate like part and the adaptive-autoimmune arm of the humoral immune system.

### Take-home messages

- Human citrate synthase (hCS) recognizing antibodies are present in human sera.
- Anti-hCS antibodies with IgM isotype seem to belong to the pool of naturally occurring antibodies.
- The fine epitope pattern on CS is different under physiological and pathological (SLE) conditions.
- Sera affinity purified on CS cross reacts with bacterial CS and nucleosome antigen.
- In theory, naturally occurring antibodies “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.

### References

- [1] Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2494–8.
- [2] Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995;7:812.
- [3] Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 1999;286:2156.

- [4] Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1991;12:105–10.
- [5] Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 1991;12:154.
- [6] Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, et al. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3839–43.
- [7] Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchere E, Coutinho A, et al. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 1998;216:117–37.
- [8] Nyarady Z, Czömpöly T, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, Pal J, et al. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Mol Immunol* 2006;43:830–8.
- [9] Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Nyárady Z, Pálkás L, Czirják L, et al. 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;43:1761–8.
- [10] Holmberg D, Freitas AA, Portnoi D, Jacquemart F, Avrameas S, Coutinho A. Antibody repertoires of normal BALB/c mice: B lymphocyte populations defined by state of activation. *Immunol Rev* 1986;93:147.
- [11] Kearney J, Vakil M. Idiotype-directed interactions during ontogeny play a major role in the establishment of the adult B cell repertoire. *Immunol Rev* 1986;94:39.
- [12] Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *J Immunol* 1995;154:5769–78.
- [13] Tuovinen H, Salminen JT, Arstila TP. Most human thymic and peripheral-blood CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells express 2 T-cell receptors. *Blood* 2006;108:4063–70.
- [14] Petrohai A, Nagy G, Bosze S, Hudecz F, Zsiros E, Paragh G, et al. Detection of citrate synthase-reacting autoantibodies after heart transplantation: an epitope mapping study. *Transpl Int* 2005;17:834–40.
- [15] Satapathy AK, Ravindran B. Naturally occurring alpha-galactosyl antibodies in human sera display polyreactivity. *Immunol Lett* 1999;69:347–51.
- [16] Fu M, Fan PS, Li W, Li CX, Xing Y, An JG, et al. Identification of poly-reactive natural IgM antibody that recognizes late apoptotic cells and promotes phagocytosis of the cells. *Apoptosis* 2007;12:355–62.
- [17] Lee J, Cho YJ, Lipsky PE. The V(lambda)–J(lambda) repertoire of patients with systemic lupus erythematosus manifests characteristics of the natural antibody repertoire. *Arthritis Rheum* 2004;50:2604–14.
- [18] Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001;14:617.
- [19] Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* 2002;195:771.
- [20] Westall FC. Molecular mimicry or structural mimicry? *Mol Immunol* 2006;43:1062–4.
- [21] Sethi DK, Agarwal A, Manivel V, Rao KV, Salunke DM. Differential epitope positioning within the germline antibody paratope enhances promiscuity in the primary immune response. *Immunity* 2006;24:429–38.

### ***Is the heart affected in Primary Sjogren syndrome? an echocardiographic study***

Sjogren syndrome is a chronic autoimmune exocrinopathy disease leading to xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. Sjogren syndrome may present as primary disease or secondary to other autoimmune diseases. Lymphoproliferative malignancies are the most serious complication of Sjogren syndrome. Cardiac involvement is prevalent in many autoimmune diseases; the association of this complication with primary Sjogren syndrome is not well established. Recently Vassiliou et al (*Clinical and Experimental Rheumatology* 2008; 26:109–112) studied ecocardiographic abnormalities in 107 consecutive patients with primary Sjogren and no apparent heart disease compared with 112 healthy controls. Mitral, Aortic and Tricuspid regurgitation were more prevalent among Sjogren patients, so were pericardial effusion, Left ventricular mass index and pulmonary hypertension. The presence of palpable purpura, low complement levels, cryoglobulins and anti Ro antibodies were associated with different heart abnormalities. The authors concluded that silent cardiac involvement is relatively common in primary Sjogren syndrome. Although the clinical impact of these finding is unclear echocardiographic studies, especially for Sjogren patients with palpable purpura, low complement and autoantibody reactivity, should be considered.

# A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network?

Tamás Czömpöly<sup>a</sup>, Katalin Olasz<sup>a</sup>, Diána Simon<sup>b</sup>, Zoltán Nyárády<sup>a,c</sup>, László Pálincás<sup>a</sup>,  
László Czirják<sup>b</sup>, Tímea Berki<sup>a</sup>, Péter Németh<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Szigei út 12., Pécs H-7643, Hungary

<sup>b</sup> Department of Immunology and Rheumatology, Hungarian Brothers of St. John of God and University of Pécs, Irgalmasok u. 1., Pécs H-7621, Hungary

<sup>c</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Pécs, Dischka Gy. u. 5., H-7621 Pécs, Hungary

Received 19 September 2005; received in revised form 14 November 2005; accepted 16 November 2005

Available online 20 December 2005

## Abstract

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. We investigated the possible overlap in recognized epitopes of innate and self-reactive nAbs and surveyed changes in physiological autoreactivity under pathological autoimmune conditions. Epitope mapping analysis of a 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 patients having systemic autoimmune disease revealed CS recognizing nAAbs with IgM isotype. We analyzed cross reactive epitopes on human CS, bacterial CS, and various standard autoantigens. 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.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Natural antibody; Mitochondrial inner membrane enzyme; Epitope mapping; Phage display; Multi-pin ELISA; Systemic lupus erythematosus; Autoimmunity

## 1. Introduction

Several lines of evidence indicate that natural antibody producing B-1 B cells represent an intermediate stage of evolution between innate and adaptive immunity. In fact they play an important role during the early phases of immune responses (Martin et al., 2001; Wardemann et al., 2002; Baumgarth et al., 1999). While they need to be under control and regulation because of their autoreactivity, these innate B cells themselves

play an important role in controlling autoimmunity (Boes et al., 2000; Cocca et al., 2001).

Natural antibodies (nAbs) are immunoglobulins that are produced without immunization with antigen (Coutinho et al., 1995). These molecules can recognize foreign targets and may serve in the first line of immune defense during an infection (Ochsenbein et al., 1999). In contrast, natural autoantibodies (nAAbs) present in the serum of both healthy humans and patients suffering from systemic autoimmune diseases recognize a set of self-structures that have been conserved during evolution (Cohen and Young, 1991). Most nAAbs belong to the IgM or IgG isotype (Mouthon et al., 1995; Avrameas, 1991) and show polyreactivity with a broad range of affinities for the

\* Corresponding author. Tel.: +36 72 536290; fax: +36 72 536289.  
E-mail address: [peter.nemeth@aok.pte.hu](mailto:peter.nemeth@aok.pte.hu) (P. Németh).

recognized epitopes (Lacroix-Desmazes et al., 1998). 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 (Ehrenstein et al., 1998), aid the clearance of apoptotic cells (Peng et al., 2005), possess anti-inflammatory effects (Miletic et al., 1996) and contribute to the maintenance of immune homeostasis (Lacroix-Desmazes et al., 1996).

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 a limited number of epitope mapping analyses performed on human antigens recognized by nAAbs. In particular little is known about the possible overlap in recognized epitopes of innate and self-reactive nAbs. Moreover, the possible changes in physiological autoreactivity under pathological autoimmune conditions remain unclear.

To address these problems we have chosen a mitochondrial inner membrane enzyme, citrate synthase (CS) (EC 2.3.3.1) for epitope mapping using sera of healthy individuals and patients having systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, undifferentiated connective tissue disease, polymyositis/dermatomyositis, systemic sclerosis, Raynaud syndrome and Sjögren syndrome). We investigated the presence of CS recognizing nAAbs both in healthy and autoimmune patients. The molecular recognition pattern on CS was analyzed and compared under physiological and pathological (autoimmune) conditions. We analyzed cross reactive epitopes on human CS, bacterial CS, and various standard autoantigens. Our data indicate that the anti-CS nAAbs have an individually characteristic fine epitope pattern which is independent from the actual condition of the immune system by participating in the nAb network.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and control sera

Serum samples from healthy individuals: 63 Hungarian blood donors from the Blood Transfusion Service of Baranya county, Pécs (age:  $36.8 \pm 17.1$  years; 32 women, 31 men); a standardized panel from 51 British blood donors and 176 Finnish blood donors (by the courtesy of professor G. Füst and Z. Prohaszka, 3rd Department of Internal Medicine at the Semmelweis University, Budapest); 44 serum samples from healthy infants from the Pediatrics Clinic, University of Pécs (age:  $11.5 \pm 4.5$  months; 26 females, 18 males) 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 (age:  $44.2 \pm 14.1$  years; 284 women, 42 men) were used in this work with the permit of the Ethical Committee of the Medical Center of the University of Pécs.

### 2.2. Detection of mitochondrial enzyme specific autoantibodies by ELISA

Ninety-six well polystyrene plates (NUNC) were coated with CS, malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) and pyruvate dehydrogenase (PDH; EC 1.2.4.1) from porcine heart (Sigma) in 0.1 M bicarbonate buffer, pH 9.6. Following the saturation of non-specific binding sites with 0.5% gelatin (Sigma) in PBS (pH 7.3), serum samples were incubated in triplicates at 1:100 dilutions in washing buffer (PBS, 0.05% Tween 20) for 60 min. Finally, the plate was incubated with HRPO conjugated anti-human-IgA, or -IgG or -IgM specific secondary antibody (Dako) for 60 min. The reaction was developed with *o*-phenylenediamine (Sigma), and measured on an iEMS MF microphotometer (ThermoLabsystem) at 492 nm. Cut-off values of each groups examined were calculated from the average of measured OD492 data. Sera having higher O.D. value than average + 2SD were considered positive. All measurements were standardized with a monoclonal anti-citrate synthase antibody (Clone 4H3-E5) we produced previously (Nemeth et al., 1991).

### 2.3. Affinity purification of sera on CS

CS from porcine heart was coupled to cyanogen-bromide activated sepharose 4B (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Fifteen millilitres 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 (Dako).

### 2.4. 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 (Sigma) as antigens.

Reactivity with *E. coli* CS was tested with pin-bound overlapping decapeptides as described previously (Petrohai et al., 2004; Nyarady et al., 2005).

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 (Orgentech) and Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70, Jo-1, CCP, thyroglobulin, glomerular basal membrane (Hycor) specific autoantibodies.

### 2.5. Construction of a CS antigen fragment library

Total RNA was isolated using TriReagent (Sigma) from  $3 \times 10^6$  mononuclear cells obtained by Ficoll Paque (Amer-

shamPharmacia) gradient centrifugation from peripheral blood of a healthy blood donor. Five micrograms of total RNA was reverse transcribed with Superscript II RT (Invitrogen) 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'-TTACCCTGACTTAGAGTCCAC-3'. The PCR reaction contained 300 mM of each dNTP, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 μM of each primer, 5 μl cDNA and 5 units of ProofStart DNA polymerase (Qiagen) in a 100 μl final volume, cycling was done with the following profile: 95 °C 5 min, 35 cycles of 95 °C 1 min, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min, final extension at 72 °C for 10 min. The PCR product was separated on a 1.5% agarose gel and purified using the Quiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Following A-addition it was cloned into a T/A vector using the InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas). The identity of insert was verified by sequencing on an ABI3100 Avant genetic analyzer.

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 (Ansuini et al., 2002). In brief, inserts were produced by tagged random primed elongation and amplification using SpeI and NotI tagged random primers (Santi et al., 2000) and CS cDNA as template excised with BamHI and EcoRI (Promega) digestion from the plasmid mentioned above. Following purification with the Quiaquick PCR purification kit (Qiagen) and size selection on Wizard columns (Promega) inserts were digested with SpeI and NotI (Promega). Twenty ligations were set up containing 1 μg of SpeI/NotI digested lambdaD-bio DNA, 25 ng of SpeI/NotI digested insert, 30U of T4 DNA ligase (Fermentas) in a final volume of 5 μl and incubated 48 h at 4 °C. The ligation mixture was phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated and packaged with the Ready To Go Lambda Packaging Kit (AmershamPharmacia). Phage were amplified by infecting log phase *E. coli* BB4 cells and plating them on LB agar plates. After plaque formation phage were eluted by an overnight incubation in SM buffer (100 mM NaCl, 8.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7.5), concentrated with polyethylene glycol precipitation and resuspended in SM buffer supplemented with Complete EDTA Free Proteasae Inhibitor Cocktail (Roche).

### 2.6. Affinity selection of CS antigen fragment library

Affinity selection of CS antigen fragment library with CS affinity purified sera was performed essentially as described (Santini et al., 1998). Briefly, microtiter plates were coated with affinity purified anti-CS sera or anti-CS monoclonal antibody (mAb) 4H3E5 (developed in our lab) at 10 μg/ml in coating buffer. After blocking 10<sup>10</sup> 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.

### 2.7. 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 (Felici et al., 1991). Affinity selection of phages with CS affinity purified sera from SLE patients was performed using the biopanning technique (Parmley and Smith, 1988). In brief, microtiter plates were coated with affinity purified anti-CS sera (40 μg/ml during the first and 4 μg/ml during the second and third rounds of panning). After washing with PBS/0.05% Tween-20 and blocking with a solution containing PBS/3% BSA, 10<sup>10</sup> ampicillin transducing unit (ATU) phage (blocked with PBS/1% BSA) was added and incubated for 2 h at room temperature. The plate was washed with PBS/Tween-20 (0.05% in the first or 0.5% in the second and third round of panning) and the bound phage were eluted with 1 mg/ml BSA/0.1 M glycine pH 2.2. Following neutralization with 2 M Tris, 10 ml XL1-Blue (O.D.<sub>600</sub>:0.5) was infected and plated on LB agar plates containing 50 μg/ml ampicillin. The next day the colonies were scrapped off the plates, were resuspended in 10 ml LB and were superinfected with 10<sup>11</sup> plaque forming unit (PFU) M13KO7 helper phage. After an overnight incubation at 37 °C, phage were precipitated with 16.7% PEG8000/3.3 M NaCl twice and resuspended in TBS. 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.

## 3. Results

### 3.1. 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 both in the sera of 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 that of IgG or IgA isotypes (Table 1). 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 because 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 three times during a 5-year period. We have found that the CS reactivity of individual sera remained permanently constant over this time period (Fig. 1).

Table 1  
Prevalence of mitochondrial inner membrane enzyme specific antibodies in human sera

|                                    | CS IgA (%) | CS IgG (%) | CS IgM (%) | MDH IgA (%) | MDH IgG (%) | MDH IgM (%) | PDC IgA (%) | PDC IgG (%) | PDC IgM (%) |
|------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Hungarian blood-donors (63)        | 4          | 3          | 10         | 3           | 2           | 8           | 3           | 3           | 10          |
| British blood-donors (51)          | 5          | 4          | 12         | 3           | 3           | 9           | 3           | 4           | 10          |
| Finnish blood-donors (176)         | 5          | 3          | 9          | 2           | 2           | 8           | 3           | 5           | 10          |
| Healthy infants (44)               | 2          | 2          | 7          | 4           | 4           | 9           | 2           | 4           | 9           |
| Systemic autoimmune patients (326) | 5          | 3          | 24         | 4           | 4           | 16          | 4           | 4           | 6           |

Sera were tested for citrate synthase (CS), malate dehydrogenase (MDH) and pyruvate dehydrogenase (PDH) reactivity with isotype specific indirect ELISA. Values in parentheses indicate the number of individual serum samples tested.

### 3.2. 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) when the actual serum had extraordinary high ( $OD_{492} > 1.5$ ) anti-CS reactivity. The eluted anti-CS antibodies were exclusively with IgM isotypes (data not shown).

Cross reactivity of 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 have not recognized these enzymes (data not shown).

Subsequently, we applied a synthetic peptide fragment library in multi-pin ELISA to test whether antibodies affinity purified on CS from porcine heart (identity with human CS: 96%) would be able to recognize epitopes on bacterial CS from *E. coli* (identity with human CS: 25%). 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%).

In order to examine the cross reactivity of affinity purified anti-CS sera on autoantigens having a role in various autoimmune diseases, we performed several indirect ELISAs with commercially available autoantibody kits. The affinity purified anti-CS sera from two SLE patients recognized nucleosome antigen (Fig. 2A). To exclude the possibility of CS contamination in the nucleosome antigen preparation we used our anti-citrate synthase mAb (Nemeth et al., 1991) in the same ELISA system. For further verification of our results we carried out competition ELISA experiments using CS from porcine heart as competitor (Fig. 2B).

In order to obtain further support for these findings we screened 46 additional 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 (mean nucleosome reactivity O.D. (450):  $0.38 \pm 0.15$  without competition;  $0.21 \pm 0.09$  in competition with  $10 \mu\text{g}$  CS and  $0.08 \pm 0.03$  in competition with  $50 \mu\text{g}$  CS). In addition we performed fluorescent immunocytochemistry on Hep-2 cells using a commercially available kit from Diasorin. All of the CS affinity purified SLE patients' sera resulted a low-intermediate staining intensity in the nucleus – and the nucleoli of the nuclei were consequently negative – characteristic for the recognition of nucleosomes. We found an intermediate-high staining intensity in the cytoplasm, characteristic for the recognition of CS (data not shown). Our results show that there is indeed a cross reactivity of anti-CS antibodies from SLE patients with nucleosome antigen.

### 3.3. CS antigen fragment library construction

For analysis of fine epitope structure of anti-CS autoantibodies we constructed a CS antigen fragment library displayed on bacteriophage lambda. The library contains approximately  $10^7$  insert bearing independent clones. First we tested the library by performing an affinity selection with an anti-CS mAb. After the

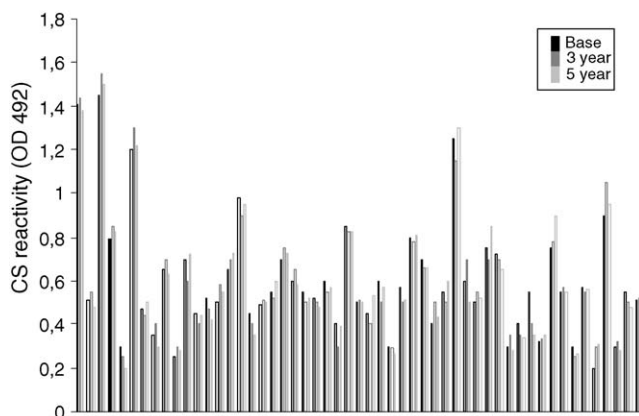


Fig. 1. CS reactivity in healthy individuals over a 5-year period. CS reactivity of sera from 53 healthy individuals was followed up during a 5-year period with IgM isotype specific indirect ELISA.



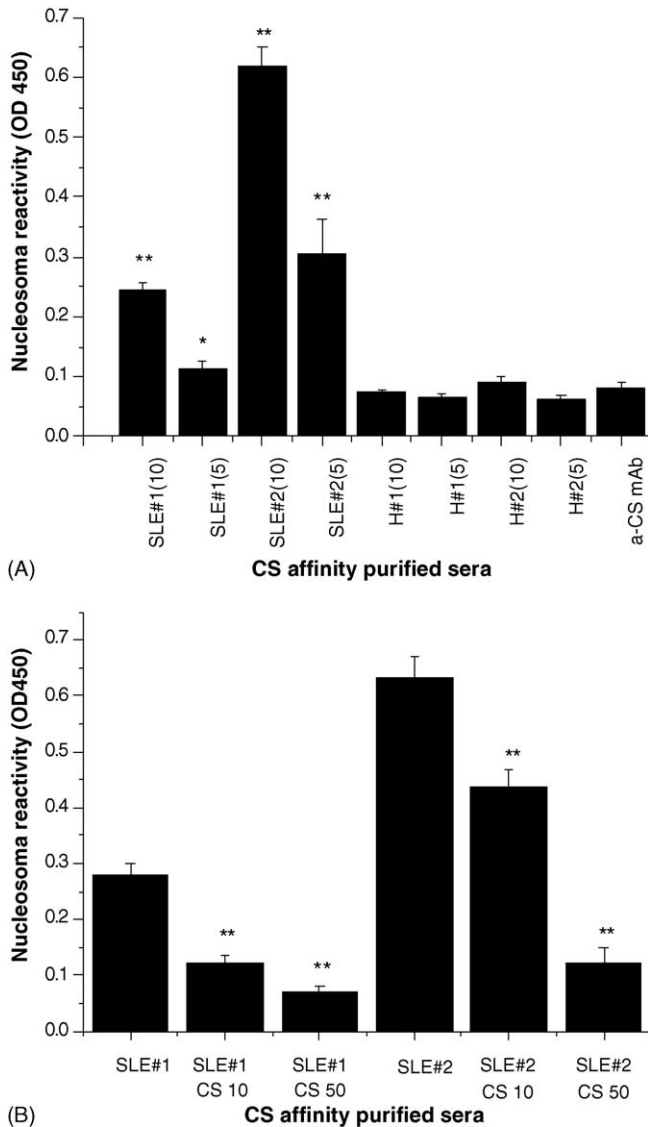


Fig. 2. Anti-CS antibodies from SLE patients recognize nucleosoma antigen. (A) Affinity purified anti-CS sera from two SLE patients (SLE) and two healthy (H) individuals were tested for nucleosoma reactivity. Numbers in parentheses indicate the protein concentration in  $\mu\text{g/ml}$ . CS contamination of the nucleosoma antigen was controlled with an anti-CS mAb 4H3E5 (a-CS mAb). (B) Competitive ELISA with CS: Affinity purified anti-CS sera from two SLE patients (10  $\mu\text{g/ml}$ ) were preincubated with the indicated amount of CS ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) for 1 h then reactivity for nucleosoma antigen was tested. All measurements were performed in triplicates and were repeated in three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

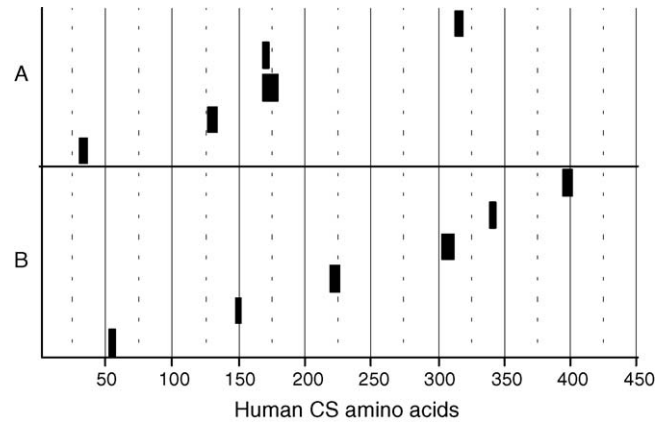


Fig. 3. Alignment of anti-CS sera selected phage clones with human CS. Deduced amino acid sequences of phage clones selected with affinity purified anti-CS sera prepared from healthy individuals (A) and patients with SLE (B) are plotted along the human CS sequence.

second round of affinity selection 30 clones were chosen for DNA sequencing. Among them four distinct sequences were found repeatedly (Table 2). 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.

### 3.4. Affinity selection of CS antigen fragment library with CS purified sera

After the effectiveness of our phage displayed CS antigen fragment library for epitope mapping was demonstrated, we moved forward 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 be also aligned to human CS (Fig. 3). These short sequences are scattered through the human CS sequence and it seems that practically the same regions of the molecule are recognized by the two groups of sera. However, it is important to note that the fine epitope pattern is different in the two groups examined.

### 3.5. Random peptide library screening with CS purified sera

To get additional data about the basis of CS-nucleosoma cross reactivity we screened a nine amino acid random peptide library with CS affinity purified sera from two patients with SLE. The

Table 2  
Alignment of anti-CS mAb selected phage clones with human CS

| Number of independent isolations | Deduced amino acid sequence                                  |
|----------------------------------|--|
| 5                                | AARLLGTKNASCLVLAARHASASSTNLKDILADLIPKEQARIKTFRQQHGKTVVGGQITV |
| 8                                | TNLKDILADLIPKEQARIKTFRQQHGKTV                                |
| 9                                | ASCLVLAARHASASSTNLKDILADLIPKEQARIKTFRQQHGKTVVGG              |
| 6                                | ASCLVLAARHASASSTNLKDILADLIPKEQARIKTFRQQHGKTV                 |
| huCS                             | AARLLGTKNASCLVLAARHASASSTNLKDILADLIPKEQARIKTFRQQHGKTVVGGQITV |

The number of independent isolations refers to the clones sequenced and found identical for the four distinct inserts. huCS indicates amino acids 7–65 of human CS.

Table 3  
Alignment of CS affinity purified sera selected random peptides with human CS

| Number of independent isolations | Deduced amino acid sequence |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 2                                | APASPYQCG                   |
| 1                                | APASPYQSG                   |
| 5                                | EAASPYQSH                   |
| 5                                | YAAPSSQSH                   |
| 9                                | YAAPSRQSH                   |
| 18                               | YAAPSHQSH                   |
| huCS 145–150                     | AALPSH                      |

The number of independent isolations refers to the clones sequenced and found identical for the given peptide. huCS indicates amino acids 145–150 of human CS.

40 sequenced clones carry similar peptides which show partial homology with human CS (Table 3). We performed competition ELISA with the phage clone most resembling CS (YAAPSHQSH, phage#5) both for CS and nucleosome antigen (Fig. 4). 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 at least in part is caused by antibodies recognizing the CS epitope (amino acids 145–150) mimicked by phage#5.

#### 4. Discussion

In this study we demonstrated the presence of natural antibodies recognizing CS both in healthy individuals and in patients with systemic autoimmune disease. Our finding that the majority of these antibodies have IgM isotype, their presence in infants and the long term stability of serum titers in adults indicates that these specificities belong to the nAAb repertoire established early in postnatal life (Mouthon et al., 1995; Stahl et al., 2000).

Since CS has not been implicated as target antigen in any autoimmune disease we investigated, it seems to be an appropriate model protein to examine potential changes in physiological autoreactivity under conditions of systemic autoimmune disease. In our previous study (Petrohai et al., 2004) we performed comparative epitope mapping on human CS with sera from healthy individuals and heart-transplanted patients using overlapping synthetic peptides. We detected similar recognition patterns in healthy group as in the present study, but in heart-transplanted patients both epitope pattern and the isotype of the anti-CS autoantibodies were different: strong dominance of IgGs was found with altered fine epitope specificities in strong relationship with the clinical stage (graft rejection).

Epitope mapping with overlapping synthetic peptides is a widely used technique (Maeji et al., 1995; Uray et al., 2003), but its constraints include the *in silico* B-cell epitope prediction used for selection of antigenic regions (Nyarady et al., 2005), the partial coverage of primary sequence by synthetic peptides and the possible loss of all unpredicted or conformational epitopes. Since these effects could have influenced our results, we performed the epitope mapping using a basically

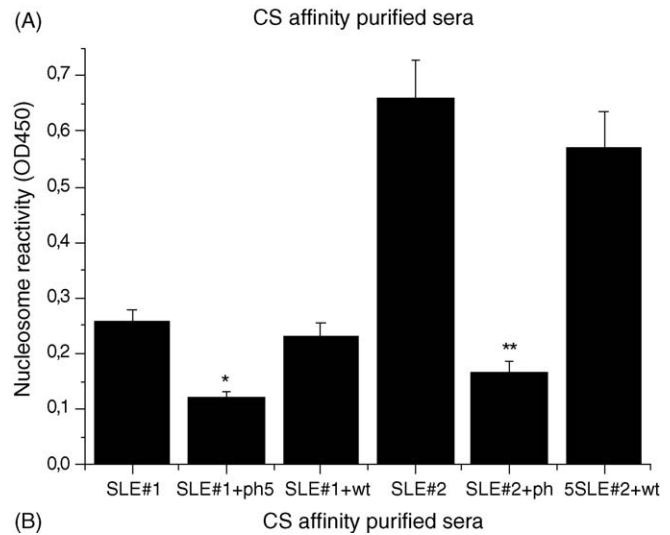
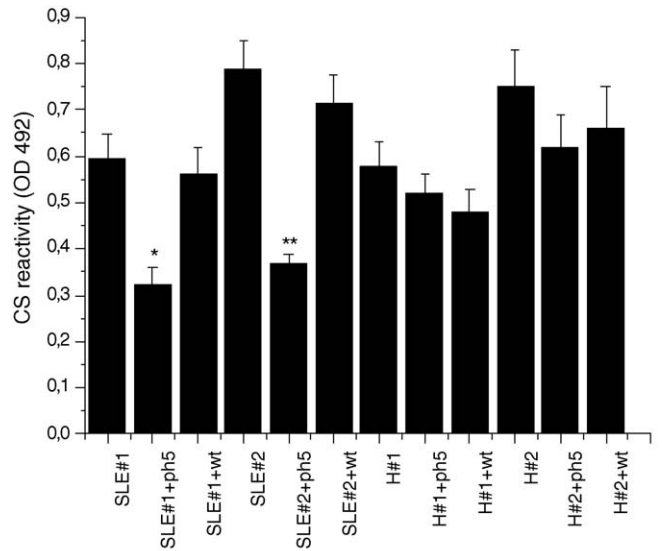


Fig. 4. Competition for CS and nucleosome antigen with a phage clone selected from a random peptide library. We performed competition ELISA with phage#5 (YAAPSHQSH), selected with CS affinity purified SLE patients' sera from a random peptide library. (A) CS affinity purified sera from patients with SLE or healthy individuals (SLE#1, #2 and H#1, #2 at 1  $\mu$ g/ml) were preincubated with  $10^{10}$  phage#5 (ph5) or wild type (wt) particles for 1 h at 4 °C, then reactivity for CS was measured by indirect ELISA. (B) CS affinity purified sera from patients with SLE (SLE#1, and #2 at 10  $\mu$ g/ml) were preincubated with  $10^{10}$  phage#5 (ph5) or wild type (wt) particles for 1 h at 4 °C, then reactivity for nucleosome antigen was measured by indirect ELISA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ .

different technique: bacteriophage surface display of peptides is an extensively used technique for a variety of applications (Scott and Smith, 1990; McCafferty et al., 1990; Marks et al., 1991; Farilla et al., 2002). 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 CS antigen fragment library. The library contains fragments of CS with random starting point and length; consequently it overcomes the theoretical and technical limitations associated with the overlapping synthetic peptide approach. 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.

Since previous studies suggested that natural antibodies play an important role in the innate like component of the humoral immune response (Martin et al., 2001; Wardemann et al., 2002; Baumgarth et al., 1999), 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 nAAb's 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. The three recognized sequence shows a limited homology with human CS, 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 (Novick et al., 1992; Pashov et al., 2002). 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, indicating that they represent the same antigenic region.

We tested whether CS affinity purified nAAb's cross react with other self-antigens implicated in various autoimmune diseases. The surprising 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 random peptide library displayed on filamentous phage. In this system random peptides are presented at high copy number, making the identification of low affinity interactions easier. We isolated a phage clone (phage#5) which carries a peptide corresponding to amino acids 145–150 of human CS, and while it has no effect on sera from healthy individuals, it is capable of inhibiting both the CS and nucleosome reactivity of CS affinity purified SLE patients' sera. Reviewing our data obtained by phage displayed CS antigen fragment library revealed that a lambda phage clone, carrying practically the same part of the CS molecule as the filamentous phage clone #5, was isolated with the SLE patients' sera. Therefore, on the basis of evidence substantiated by the random peptide and CS antigen fragment library methods, we conclude that this CS epitope (145–150) is preferentially recognized by the SLE patients' sera. 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 nAAb's. 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 able to induce similar immunoreactivity as the also strongly hydropho-

bic nucleosome sequences. Our data call the attention for the general changes in self-recognition network under pathological conditions resulting changes on cross-reacting epitope patterns.

In conclusion, we demonstrated the presence of CS recognizing nAAb's. We 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, nAAb's "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. 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.

### Acknowledgements

We thank Prof. Edwin Cooper for critical reviewing of this manuscript. The technical assistance of Gergely Nagy is greatly acknowledged. We also thank Prof. Béla Melegh for helping us in DNA sequencing. This work was supported by a National Health Foundation grant (ETT 32/KO/2004).

### References

- Ansuini, H., Cicchini, C., Nicosia, A., Tripodi, M., Cortese, R., Luzzago, A., 2002. Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands. *Nucleic Acids Res.* 30 (15), e78.
- Avrameas, S., 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol. Today* 12, 154.
- Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L., Herzenberg, L.A., 1999. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (5), 2250–2255.
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A., Chen, J., 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted, IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1184.
- Cocca, B.A., Seal, S.N., D'Agnillo, P., Mueller, Y.M., Katsikis, P.D., Rauch, J., Weigert, M., Radic, M.Z., 2001. Structural basis for autoantibody recognition of phosphatidylserine-beta 2 glycoprotein I and apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13826.
- Cohen, I.R., Young, D.B., 1991. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* 12, 105–110.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S., 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 812.
- Ehrenstein, M.R., O'Keefe, T.L., Davies, S.L., Neuberger, M.S., 1998. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10089–10093.
- Farilla, L., Tiberti, C., Luzzago, A., Yu, L., Eisenbarth, G.S., Cortese, R., Dotta, F., Di Mario, U., 2002. Application of phage display peptide library to autoimmune diabetes: identification of IA-2/ICA512bdc dominant autoantigenic epitopes. *Eur. J. Immunol.* 32, 1420–1427.
- Felici, F., Castagnoli, L., Mussacchio, A., Jappelli, R., Cesareni, G., 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222, 301–310.
- Lacroix-Desmazes, S., Mouthon, L., Spalter, S.H., Kaveri, S., Kazatchkine, M.D., 1996. Immunoglobulins and the regulation of autoimmunity through the immune network. *Clin. Exp. Rheumatol.* 14 (Suppl. 15), S9–S15.

- Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., 1998. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J. Immunol. Methods* 216, 117–137.
- Maeji, N.J., Bray, A.M., Valerio, R.M., Wang, W., 1995. Larger scale multipin peptide synthesis. *Pept. Res.* 8, 33–38.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581.
- Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552.
- Miletic, V.D., Hester, C.G., Frank, M.M., 1996. Regulation of complement activity by immunoglobulin. *J. Immunol.* 156, 749.
- Mouthon, L., Nobrega, A., Nicolas, N., Kaveri, S.V., Barreau, C., Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., 1995. Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3839–3843.
- Nemeth, P., Small, W.C., Evans, C.T., Zhi, W., Persson, L.O., Srere, P.A., 1991. Immunological mapping of fine molecular surface structures of citrate synthase enzymes from different cell types. *J. Mol. Recognit.* 4 (2–3), 77–83.
- Novick, K.E., Fasy, T.M., Losman, M.J., Monestier, M., 1992. Polyreactive IgM antibodies generated from autoimmune mice and selected for histone-binding activity. *Int. Immunol.* 4 (10), 1103–1111.
- Nyarady, Z., Czömpöly, T., Bosze, S., Nagy, G., Petrohai, A., Pal, J., Hudecz, F., Berki, T., Nemeth, P., 2005. Validation of *in silico* prediction by *in vitro* immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Mol. Immunol.* [Epub ahead of print].
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286, 2156.
- Parmley, S.F., Smith, G.P., 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73 (2), 305–318.
- Pashov, A., Kenderov, A., Kyurkchiev, S., Kehayov, I., Hristova, S., Lacroix-Desmazes, S., Giltiay, N., Varamballi, S., Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V., 2002. Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. *Int. Immunol.* 14 (5), 453–461.
- Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S., Elkon, K.B., 2005. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* 42, 781–787.
- Petrohai, A., Nagy, G., Bosze, S., Hudecz, F., Zsiros, E., Paragh, G., Nyarady, Z., Nemeth, P., Berki, T., 2004. Detection of citrate synthase-reacting autoantibodies after heart transplantation: an epitope mapping study. *Transpl. Int.* 17 (12), 834–840.
- Santi, E., Capone, S., Mennuni, C., Lahm, A., Tramontano, A., Luzzago, A., Nicosia, A., 2000. Bacteriophage lambda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics. *J. Mol. Biol.* 296 (2), 497–508.
- Santini, C., Brennan, D., Mennuni, C., Hoess, R.H., Nicosia, A., Cortese, R., Luzzago, A., 1998. Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 282 (1), 125–135.
- Scott, J.K., Smith, G.P., 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386–390.
- Stahl, D., Lacroix-Desmazes, S., Mouthon, L., Kaveri, S.V., Kazatchkine, M.D., 2000. Analysis of human self-reactive antibody repertoires by quantitative immunoblotting. *J. Immunol. Methods* 240 (1–2), 1–14.
- Uray, K., Hudecz, F., Fust, G., Prohaszka, Z., 2003. Comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors. *Int. Immunol.* 15 (10), 1229–1236.
- Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N., Carsetti, R., 2002. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J. Exp. Med.* 195, 771.

## Original article

# Construct validity evaluation of the European Scleroderma Study Group activity index, and investigation of possible new disease activity markers in systemic sclerosis

Tünde Minier<sup>1</sup>, Zoltán Nagy<sup>2</sup>, Zsófia Bálint<sup>1</sup>, Helka Farkas<sup>1</sup>, Judit Radics<sup>1</sup>, Gábor Kumánovics<sup>1</sup>, Tamás Czömpöly<sup>3</sup>, Diána Simon<sup>1</sup>, Cecília Varjú<sup>1</sup>, Péter Németh<sup>3</sup> and László Czirják<sup>1</sup>

## Abstract

**Objectives.** To evaluate the construct validity of the European Scleroderma Study Group (EScSG) activity index and to propose modifications if necessary.

**Methods.** One hundred and thirty-one consecutive patients were investigated and re-evaluated 1 year later. Modified Rodnan skin score (MRSS), skin ulcers and joint contracture numbers, hand anatomic index (HAI), BMI, spirometry, carbon monoxide diffusing capacity (DL<sub>CO</sub>), left ventricular ejection fraction, pulmonary arterial hypertension, HAQ Disability Index (HAQ-DI), patient skin self-assessment questionnaire and several biomarkers were recorded, in addition to the data required for the EScSG activity index. Statistical analysis was performed by categorical principal component analysis (CATPCA).

**Results.** The EScSG activity index appeared in the same dimension as the HAQ-DI, ulcer score and joint contractures, MRSS, patient-reported skin score and HAI by CATPCA. Parameters of lung involvement appeared in another dimension. We constructed a 12-point activity index that was equally associated with both dimensions, by adding the forced vital capacity/DL<sub>CO</sub>, change in DL<sub>CO</sub>, change in the ulcer scores, HAQ-DI and patient-reported skin score. Biomarkers including vascular endothelial growth factor, soluble P-selectin glycoprotein ligand-1, CRP and albumin were related to both the EScSG and the 12-point index, though they did not improve the total variance of the model.

**Conclusion.** The construct validity of the EScSG activity index is good, though the lung-related disease activity may not be sufficiently represented. Further validation steps may be required for both the EScSG and our 12-point activity index.

**Key words:** Systemic sclerosis, Scleroderma, Disease activity, Systemic sclerosis activity index, Self-assessment questionnaire, Biomarkers, Skin ulcers, Categorical principal component analysis.

## Introduction

SSc is a multisystem autoimmune disease, with complex pathogenesis resulting in obliterative vasculopathy, tissue injury, fibrosis, remodelling and atrophy. The European Scleroderma Study Group (EScSG) developed preliminary disease activity indices to be used with SSc patients [1–4]. The EScSG activity index is a simple and feasible instrument that evaluates both clinical items and certain laboratory values, including the modified Rodnan skin score (MRSS), carbon monoxide diffusing capacity (DL<sub>CO</sub>),

<sup>1</sup>Department of Immunology and Rheumatology, Clinic Center, University of Pécs, Pécs, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Szatmár-Bereg Hospital and Medical Bath, Fehérgyarmat and <sup>3</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Clinic Center, University of Pécs, Pécs, Hungary

Submitted 28 September 2009; revised version accepted 12 January 2010.

Correspondence to: László Czirják, Department of Immunology and Rheumatology, Clinic Center, University of Pécs, Akác u. 1, H-7632 Pécs, Hungary. E-mail: laszlo.czirjak@aok.pte.hu

presence of sclerodema, digital ulcers, arthritis, ESR, hypocomplementaemia, and patient-reported worsening of skin, vascular and cardiopulmonary symptoms [3, 4]. However, these criteria await further validation, as construct validity has only been confirmed on a small cohort of 30 SSc patients, and further work is also requested to prove the responsiveness of the index. Additional clinical parameters that could indicate the activation of the disease might be the appearance or worsening of ulcers; worsening in the musculoskeletal, gastrointestinal or renal symptoms of the patients; and signs of interstitial or vascular pulmonary involvement.

The key points in the disease process are endothelial cell injury, inflammation, immune activation and collagen deposition by activated fibroblasts. Theoretically, disease activity assessment should reflect all these important factors, and also their impact on the function of different organ systems.

Several biomarkers of immune activation, ongoing fibrosis and vascular injury have been published as potential indicators of disease activity in SSc [5, 6]. The endothelial cell activation marker, von Willebrand factor antigen (vWFAG), seems to correlate with the extent of internal organ involvement [7, 8]. P- and E-selectin contribute to the adhesion and activation of leucocytes. The level of the soluble form of E-selectin (sE-selectin) was found to be elevated in SSc [9]. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a high-affinity ligand for P-selectin; its soluble form acts as an antagonist for selectins. In SSc, the elevated serum levels of soluble PSGL-1 (sPSGL-1) were found to be associated with a lower frequency and severity of lung fibrosis [10]. The angiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF), is permanently up-regulated in SSc, and this could be essential in a paradox manner to the decreased angiogenic activity that characterizes this particular disease [11].

With regard to markers of fibrosis, procollagen Type I N-terminal propeptide (PINP) level correlated with changes in the MRSS [12]. The cross-linked collagen I carboxy-terminal telopeptide (serum cross-laps; CTX-1), a marker of collagen degradation was found to be correlated with the extent of skin involvement (MRSS), acute-phase protein levels and indicators of decreased pulmonary function ( $DL_{CO} < 75\%$ ) [13]. The serum level of procollagen Type III N-terminal propeptide (PIIINP) correlated with the extension of skin involvement and also indicated the prognosis of the disease. PIIINP was found to correlate positively with MRSS and inversely with  $DL_{CO}$  [14].

Markers of inflammation include elevated ESR and CRP level, which may be signs of increased disease activity and unfavourable prognosis [14–16]. Several studies including our own [14–16] showed that the value of ESR was significantly higher in patients with dcSSc than in those with lcSSc.

Markers of pulmonary fibrosis/involvement include Krebs von Lungren 6 antigen (KL-6), which is a mucin-like protein produced by Type II alveolar epithelial cells. Circulating KL-6 concentration strongly correlated with

the severity of interstitial lung disease (ILD), and also with disease activity in one study [17–20]. Type II alveolar epithelial cells also produce surfactant proteins, including surfactant proteins A and D (SP-A and -D), which are raised in scleroderma-associated ILD. The levels of SP-A and -D correlated with the activity of the disease [18, 21].

Markers of immune activation include the B-cell activation factor (BAFF). A recent study demonstrated elevated BAFF level and correlation of BAFF level with skin fibrosis in patients with SSc [22]. The proliferation-inducing ligand (APRIL) is a TNF superfamily member with close homology to BAFF. In a recent study, serum APRIL levels tended to be higher in patients with dcSSc when compared with those with lcSSc, and SSc patients with elevated APRIL levels had significantly higher incidence of pulmonary fibrosis and decreased vital capacity [23].

The soluble CD40 ligand (sCD40L) is released from activated  $CD4^+$  T cells. CD40–CD40L interactions activate B cells, up-regulate endothelial adhesion molecules and induce fibrosis. A recent study showed that patients with dcSSc exhibited relatively persistent elevations of sCD40L concentration, whereas temporary elevations were observed in lcSSc patients during follow-up [24]. Another study reported the association of plasma sCD40L concentrations with the presence of digital ulcers in SSc patients. Concentrations of plasma sCD40L were also significantly higher in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) [25]. With regard to the anti-topo I autoantibody, higher titres of it were found in patients with very active disease (based on clinical evaluation) compared with those with inactive disease, and a recent study also found that anti-topo I levels correlated with disease activity, MRSS, forced vital capacity (FVC) and  $DL_{CO}$  [26, 27].

In this study, we further confirmed the content and construct validity of the EScSG activity index in a large cohort of SSc patients, and we have explored possible new activity markers. Additionally, we also made attempts to improve the existing activity index by adding some new disease activity-related items, in spite of the fact that the numerous biomarkers that were studied showed somewhat controversial results.

## Patients and methods

### Study groups

In our prospective study, 131 consecutive, unselected patients with SSc were included and re-investigated 12 (1.3) months later. A further 3-year re-investigation is also planned. Diagnosis of scleroderma and classification into dcSSc or lcSSc subgroups were performed at entry based on the criteria proposed by LeRoy *et al.* [28]. The female/male ratio was 9.9:1 (17:1 in lcSSc group and 4.8:1 in dcSSc group, respectively), mean (s.d.) age at entry into the study was 55.9 (11.6) years [57.4 (10.3) years in the lcSSc group and 52.6 (13.8) years in the dcSSc group, respectively]. Disease duration was defined as the period of time in years, from the date of onset of the first non-RP symptom until the patient's first and second

investigation during the study. The mean (s.d.) disease duration was 8.1 (7.2) years [8.6 (7.5) years in the lcSSc group and 7.0 (6.3) years in the dcSSc group, respectively]. One hundred and twenty-three patients appeared for the 1-year re-investigation, five patients died during those 12 months and three were lost to follow-up.

Demographical, clinical and laboratory items were recorded by our standard protocol [14, 16]. Patients underwent echocardiography, spirometry, DL<sub>CO</sub> measurement and high-resolution CT, if necessary. PAH was defined by right heart catheterization [29, 30]. Oesophageal involvement was established with barium swallow or oesophago-gastroscopy. Scleroderma renal crisis was recorded as kidney involvement. Musculoskeletal involvement (flexion contractures on hands, arthralgia, arthritis, symmetrical muscle weakness/bilateral quadriceps muscle strength  $\leq 3$  on a 1–5 scale) and presence of myositis were also evaluated.

MRSS was assessed according to the standard method [31]. Three investigators, unaware of the clinical presentation of the particular patients, performed a parallel investigation of each case. Previously, the examiners [Z.B., H.F., G.K., C.V. and L.C.] underwent an MRSS assessment validation process [29, 32]. The presence and severity of skin ulcers on the whole body surface was encoded on a 0–3 scale (0: no ulcer; 3: extended ulcer or presence of gangrene) and summarized in the 'ulcer score' variable. Patients also filled out our newly developed and validated skin self-assessment questionnaire [33]. This particular questionnaire contained questions about skin thickness (in regions identical with those evaluated by MRSS), which were summarized in the '17-area thickness score' variable.

The Hungarian validated version of the Scleroderma HAQ was used [34], and the HAQ Disability Index (HAQ-DI) was calculated, corrected with aids and devices. Medsger Disease Severity Scale [35] and EScSG activity index [3, 4] were also evaluated. For the hand function assessment, the hand anatomic index (HAI) was used (measure of open hand span minus closed hand span divided by the maximal lateral height of the hand) [36]. The presence of joint contractures was blindly evaluated by an experienced physical therapist [Z.B. or H.F.]. The 'number of contractures' variable was counted as the sum of contractures of the following bilateral joints (by summarizing the presence of contractures in all joint axes): shoulder, elbow, wrist, the MCP joint of the second and third fingers, the PIP joint of the second and third fingers, hip, knee and ankle (range 0–30). Joint contracture was defined as a decrease of >25% of the normal range of motion in at least one joint axis.

Laboratory tests included blood cell counts, ESR, CRP, haemoglobin, haematocrit, serum creatinine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), total protein, serum albumin and complement (C3, C4). Clinical data of the enrolled patients are depicted in Table 1. More detailed data about these patients were previously published elsewhere [33].

## ELISA and RIA

The serum concentrations of VEGF and BAFF (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany), SP-D (AntibodyShop, Gentofte, Denmark), CTX-1 (Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark), anti-topo I antibody titre (Hycor Biomedical GmbH, Kassel, Germany), APRIL and sCD40L (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) were measured using commercial ELISA kits, the evaluation of KL-6 using an ELISA kit (Sanko-Junyaku, Tokyo, Japan) was determined as described [37]. Levels of sE-selectin, sPSGL-1 (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria), vWF (United States Biological, Swampscott, MA, USA), were determined from plasma samples, using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Serum PIIINP and PINP concentrations were determined by RIA using RIA kits from Orion Diagnostica (Espoo, Finland).

As controls for these particular tests, the sera of 51 patients with primary RP (PRP) and 30 healthy volunteers were used. Informed consent was obtained from all patients and control subjects participating in the study. The project was approved by the local Research Ethics Committee of the University of Pécs, Hungary (Approval No. 2720/2006).

## Statistical analysis

The normality of distribution for the laboratory and clinical parameters was investigated by the Kolmogorov–Smirnov test. As the majority of these parameters had non-normal distribution, median values were determined and non-parametric tests (Mann–Whitney U-test and Wilcoxon test, respectively) were used to compare patient and control subgroups, or baseline and 1-year re-investigation data.

As the clinical laboratory data contained dichotomous, fractional and continuous variables, we used categorical principal component analysis (CATPCA) to evaluate the relationship of these particular items to the EScSG activity index. CATPCA analysis determines the direction and magnitude of correlations between numerous pairs of differently scaled variables in a simple (i.e. 2D) space. In CATPCA, the relationships between the variables (represented by their correlations with the principal components) are graphically displayed by depicting the variables as vectors. The position of the particular vectors with respect to the axes of the graph indicates the component loadings. The angles between the vectors represent the correlations between the variables. Variables forming an angle of  $<45^\circ$  with the vector of the reference variable (namely, the EScSG activity index) are considered related to it [38]. In the case of two principal components, the visual inspection and interpretation of the graphical representation of the relationships is feasible. Parallel vectors indicate a direct correlation, projections with opposite slopes indicate inverse correlation, whereas perpendiculars indicate no correlation.

For the study of association between the clinical parameters and the EScSG activity index, the number of

**TABLE 1** Clinical parameters of the 131 SSc patients enrolled into the follow-up study

|   | Total<br>(baseline) | Total<br>(first year) | lcSSc<br>(baseline) | lcSSc<br>(first year) | dcSSc<br>(baseline) | dcSSc<br>(first year) |
|---|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| No. of patients   | 131                 | 123                   | 90                  |                       | 41                  |                       |
| Female: male ratio                                      | 9.9:1               | 9.2:1                 | 17:1                |                       | 4.8:1               |                       |
| Age, mean (s.d.), years                                 | 55.9 (11.7)         | 57.2 (11.4)           | 57.4 (10.3)         |                       | 52.6 (13.8)         |                       |
| Disease duration, mean (s.d.), years                    | 8.1 (7.2)           | 9.1 (7.3)             | 8.6 (7.5)           |                       | 7.0 (6.3)           |                       |
| Clinical data   |                     |                       |                     |                       |                     |                       |
| RP, <i>n</i> (%)  | 131 (100)           | 123 (100)             | 90 (100)            | 87 (100)              | 41 (100)            | 36 (100)              |
| MRSS, mean (s.d.)                                       | 3.6 (3.9)           | 2.5 (3.2)             | 2.3 (2.3)           | 1.7 (1.7)             | 6.4 (5.0)           | 4.4 (4.8)             |
| Lung involvement  |                     |                       |                     |                       |                     |                       |
| Bibasilar fibrosis <sup>a</sup> , <i>n</i> (%)          | 46 (35.1)           | 38 (30.9)             | 32 (35.6)           | 26 (29.9)             | 14 (34.1)           | 12 (33.3)             |
| Diffuse fibrosis <sup>a</sup> , <i>n</i> (%)            | 23 (17.6)           | 33 (26.8)             | 11 (12.2)           | 20 (23.0)             | 12 (29.3)           | 11 (30.6)             |
| Honeycombing <sup>a</sup> , <i>n</i> (%)                | 17 (13.0)           | 17 (13.8)             | 10 (11.1)           | 7 (8.0)               | 7 (17.1)            | 10 (27.8)             |
| FVC, mean (s.d.)  | 96.5 (19.7)         | 96.6 (19.8)           | 100.0 (17.9)        | 99.6 (18.5)           | 88.7 (21.4)         | 89.3 (21.1)           |
| DL <sub>CO</sub> , mean (s.d.)                          | 64.5 (17.5)         | 62.7 (18.1)           | 67.6 (16.2)         | 65.2 (16.7)           | 57.8 (18.5)         | 56.5 (20.2)           |
| PAH, <i>n</i> (%)                                       | 10 (7.6)            | 11 (8.9)              | 8 (8.9)             | 9 (10.3)              | 2 (4.8)             | 2 (5.6)               |
| Cardiac involvement                                     |                     |                       |                     |                       |                     |                       |
| LVEF < 50%, <i>n</i> (%)                                | 4 (3.1)             | 3 (2.4)               | 3 (3.3)             | 3 (3.4)               | 1 (2.4)             | 0 (0.0)               |
| Diastolic dysfunction, <i>n</i> (%)                     | 68 (51.9)           | 68 (55.3)             | 49 (54.4)           | 50 (57.5)             | 19 (46.3)           | 18 (50)               |
| Oesophageal involvement <sup>b</sup> , <i>n</i> (%)     | 76 (58)             | 78 (63.4)             | 45 (50)             | 50 (57.5)             | 31 (75.6)           | 28 (77.8)             |
| Gastrointestinal symptoms <sup>c</sup> , <i>n</i> (%)   | 96 (73.2)           | 94 (76.4)             | 64 (71.1)           | 64 (73.6)             | 32 (78)             | 30 (83.3)             |
| Muskuloskeletal involvement <sup>d</sup> , <i>n</i> (%) | 117 (89.3)          | 86 (69.9)             | 78 (86.7)           | 59 (67.8)             | 39 (95.1)           | 27 (75)               |
| Renal involvement, <i>n</i> (%)                         | 2 (1.5)             | 1 (0.8)               | 1 (1.1)             | 1 (1.1)               | 1 (2.4)             | 0 (0.0)               |

<sup>a</sup>Findings on HRCT; <sup>b</sup>signs of oesophageal involvement on barium swallow or oesophago-gastroscopy; <sup>c</sup>defined by heartburn, dysphagia, bloating, diarrhoea or faecal incontinence during last month; <sup>d</sup>defined by muscular weakness (strength of quadriceps  $\leq 3$  on a 1–5 scale), myositis, peripheral arthralgia or arthritis or hand contracture (presence of contracture on physical examination in at least one of the PIP joints, MCP joints or wrists). For details, see 'Patients and methods' section.

dimensions was determined depending on the percentage of variance contained by the axes of dimensions. When no remarkable increase in the total variance was detected by the introduction of an additional dimension, the optimal number of dimensions was reached.

We also attempted to generate a new index that reflected disease activity better than the original EScSG index; therefore, we introduced variables considered to be relevant in the assessment of disease activity one by one into the modified index. The relationship of the generated index to the basic clinical parameters was tested each time with CATPCA. The final version was reached when the new index was associated with both dimensions (i.e. was placed at equal distance from both dimension axes). The SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) program was used for all analyses.

## Results

### Clinical characteristics and biomarker results in the SSc patients

The clinical parameters of the patients are depicted in Table 1. As we compared the median values of biomarker levels of the SSc patient group with healthy controls and patients with PRP, PINP, CTX-1, SP-D and KL-6 were found to be significantly higher in the SSc group, both at baseline and 1-year re-investigation compared with both control groups ( $P < 0.01$ ). The sCD40L titre in the SSc

group was elevated only compared with the PRP patients. On the contrary, the levels of sPSGL-1 were significantly lower in the scleroderma patients in comparison with the two control groups. Interestingly, the sE-selectin level was higher in the PRP group compared with the SSc patients and healthy controls (Table 2).

Comparing the lcSSc and dcSSc subsets, CTX-1, SP-D and KL-6 also differed significantly between the two SSc subsets at baseline investigation, with higher median values in dcSSc patients. At 1-year re-investigation, the SP-D and KL-6 values also differed significantly between the lcSSc and dcSSc patients; however, the difference between the CTX-1 values in the two SSc subsets disappeared (Table 3).

When the changes in the median biomarker levels at 1-year follow-up were studied, PIINP and BAFF levels increased significantly in the SSc group. Their levels at the time of re-investigation were significantly higher in comparison with the two control groups (difference not seen at baseline investigation). sPSGL-1 levels also increased significantly at 1-year follow-up. In contrast, APRIL and sCD40L levels decreased significantly during the follow-up period (Table 2).

### Relationship of the EScSG activity index to the clinical parameters

We evaluated the relationship between the EScSG activity index and certain clinical parameters including MRSS, 17-area thickness score, disease duration, HAQ-DI,



**TABLE 2** Median (percentiles) values of the investigated laboratory parameters in SSc patients, patients with PRP and healthy controls

|                                  | SSc baseline (n = 131)             | SSc 1 year (n = 123)               | Healthy controls (n = 30) | PRP (n = 51)        |
|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| PIIINP <sup>§§</sup> , µg/l      | 3.8 (3.1–4.5)                      | <b>4.3*</b> †† (3.8–5.2)           | 4.0 (3.7–4.4)             | 3.6 (3.4–4.2)       |
| PINP, µg/l                       | <b>45.0**</b> †† (34–65)           | <b>44.5*</b> †† (30–60.1)          | 33.5 (28.3–44.5)          | 33.0 (25.7–37.8)    |
| CTX-1, ng/ml                     | <b>0.4**</b> †† (0.2–0.6)          | <b>0.3**</b> †† (0.2–0.6)          | 0.2 (0.2–0.3)             | 0.2 (0.1–0.3)       |
| SPD, ng/ml                       | <b>1997.4**</b> †† (1367.1–3736.8) | <b>1961.4**</b> †† (1218.8–3709.2) | 1238.9 (648.6–1445.5)     | 1199.6 (734–1727.3) |
| vWF <sup>§§</sup> , µg/ml        | <b>30.0</b> †† (21.9–38.6)         | 33.4 (25.8–41.3)                   | 28.6 (22.6–40)            | 37.8 (28.1–48.8)    |
| sPSGL-1 <sup>§§</sup> , U/ml     | <b>241.8**</b> †† (170.6–298.4)    | <b>262.3**</b> †† (214–314.3)      | 324.2 (273.6–361.8)       | 322.9 (288.5–388.5) |
| VEGF, pg/ml                      | 122.1 (80.2–192.5)                 | 129.2 (88.7–201.8)                 | 93.8 (60–164.2)           | 111.7 (78.4–227.9)  |
| sE-selectin <sup>§</sup> , ng/ml | <b>34.4</b> †† (25.5–46)           | <b>34.4</b> †† (24.7–47.8)         | 32.1 (21.3–41.3)          | 89.2 (34.7–226.7)   |
| KL-6, U/ml                       | <b>802.2**</b> †† (534.3–1246.7)   | <b>935.3**</b> †† (583.8–1323.3)   | 516.3 (316.5–644.4)       | 625.7 (387.7–744.8) |
| BAFF <sup>§§</sup> , pg/ml       | 413 (338.2–561.3)                  | <b>556.9**</b> †† (439–690.4)      | 383.7 (327.5–435.4)       | 440.4 (385.1–564.7) |
| APRIL <sup>§§</sup> , U/ml       | <b>9.8**</b> †† (7.2–11.5)         | 3.2 (1.5–6.9)                      | 2.9 (2.2–4.8)             | 4 (2.1–7.7)         |
| sCD40L <sup>§§</sup> , U/ml      | <b>2.0*</b> †† (1.4–2.6)           | <b>1.7</b> †† (1.3–2.2)            | 1.4 (1–2.3)               | 1.1 (0.6–1.7)       |

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  between the SSc and healthy control groups; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  between the SSc patients and those with PRP; § $P < 0.05$ , §§ $P < 0.01$  between the baseline and 1-year follow-up levels of laboratory parameters in SSc patients. Bold characters represent significant differences between the subgroups.

**TABLE 3** Median (percentiles) values of the laboratory parameters in the SSc subsets during the baseline and 1-year re-investigation

|                    | lcSSc baseline (n = 90)       | dcSSc baseline (n = 41)      | lcSSc 1 year (n = 87)         | dcSSc 1 year (n = 36)         |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| PIIINP, µg/l       | 3.8 (3.2–4.5)                 | 3.7 (2.9–5)                  | 4.3 (3.8–5.1)                 | 4.2 (3.7–6.5)                 |
| PINP, µg/l         | 45.2 (36.2–67.3)              | 41 (31.1–64.5)               | 45.5 (31.4–59.3)              | 42.1 (28.3–63)                |
| CTX-1*, ng/ml      | <b>0.4</b> (0.2–0.5)          | <b>0.5</b> (0.3–0.7)         | 0.3 (0.2–0.6)                 | 0.3 (0.2–0.5)                 |
| SPD**, ††, ng/ml   | <b>1829.6</b> (1198.6–3175.6) | <b>2899</b> (1762.8–5123.1)  | <b>1737.2</b> (1089.4–3277.7) | <b>2799.7</b> (1815.4–5763.4) |
| vWF, µg/ml         | 29.1 (22.6–36.3)              | 32.7 (19.3–43.1)             | 33.2 (25.5–39.8)              | 35 (27.6–50.1)                |
| sPSGL-1, U/ml      | 239.0 (172.9–297.7)           | 250.7 (164.8–303.4)          | 271.4 (213.4–317)             | 248.3 (216–294.3)             |
| VEGF, pg/ml        | 118.1 (80–190.6)              | 144.0 (81.7–225.7)           | 124.7 (87–197.8)              | 142.6 (93.1–231.7)            |
| sE-selectin, ng/ml | 33.2 (24.9–45.8)              | 37.0 (26.1–51)               | 36.2 (24–50.4)                | 33.9 (25.6–44.7)              |
| KL-6**, ††, U/ml   | <b>760.2</b> (464.7–1076)     | <b>1045.5</b> (676.4–1884.4) | <b>844.2</b> (533–1190.2)     | <b>1176.3</b> (690.3–2345.7)  |
| BAFF, pg/ml        | 413.2 (344.9–510.8)           | 413.0 (311.4–691.4)          | 569.3 (465.9–711.2)           | 545.7 (424–683.2)             |
| APRIL, U/ml        | 9.6 (7–11.6)                  | 9.8 (8.6–11.1)               | <b>3.8</b> (2.1–10)           | <b>2.5</b> (0.8–5.9)          |
| sCD40L, U/ml       | 2. (1.5–2.5)                  | 1.9 (1.3–2.8)                | 1.8 (1.3–2.4)                 | 1.7 (1.2–2)                   |

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  between the lcSSc and dcSSc subgroups at baseline evaluation; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  between the lcSSc and dcSSc subgroups at 1-year re-investigation. Bold characters represent significant differences between the subgroups.

FVC, FVC/DL<sub>CO</sub>, left ventricular ejection fraction (LVEF), presence of PAH, HAI of the dominant side, BMI, ulcer score and number of joint contractures and age at entry into the study. The disease activity-related clinical parameters were distributed into two dimensions by CATPCA, explaining 32.9% of the total variance. The introduction of a third dimension led to an increase of ~10% in total variance; however, only the age of patients was placed into this additional dimension. Therefore, we decided to continue the examination of data with the 2D model.

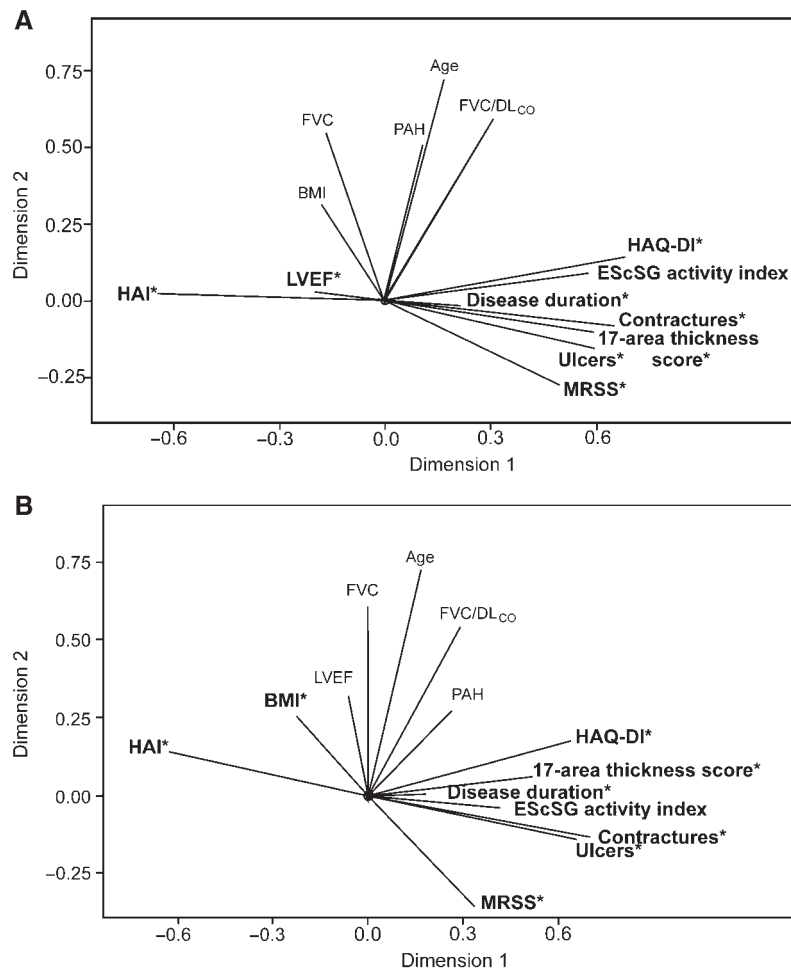
The EScSG activity index loaded in the first dimension and showed association with the HAQ-DI, ulcer score, MRSS, 17-area thickness score and number of contractures, and showed inverse correlation with the HAI (decrease in HAI meaning the worsening of hand function).

The parameters of pulmonary involvement (FVC, FVC/DL<sub>CO</sub>) loaded in the second dimension and the 1-year follow-up data showed the same settings (Fig. 1).

#### Development of a new 12-point activity index

As the lung-related parameters were independent of the EScSG activity index (Fig. 1), we generated a new index that reflects lung-related disease activity somewhat better. The selection of variables was based on clinical judgement and not by a statistical iterative method. We considered that two independent parallel methods for the assessment of a particular organ involvement may lead to a more appropriate result; therefore, we introduced the patient skin self-assessment, skin ulcer score, HAQ-DI,

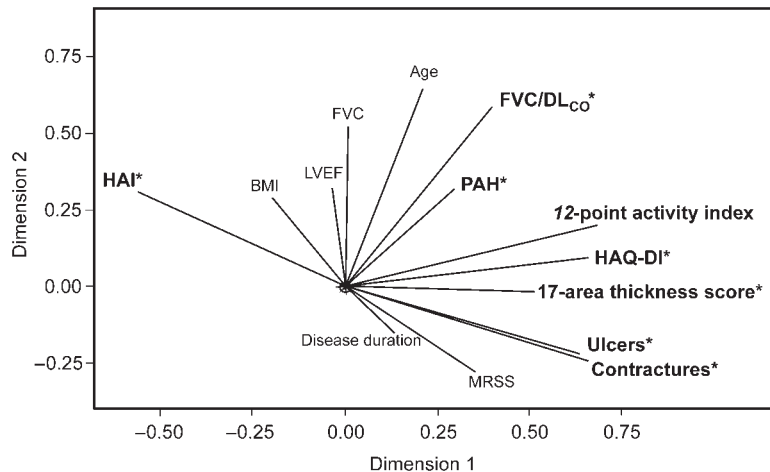
**Fig. 1** CATPCA with the clinical data and the EScSG activity index in systemic sclerosis patients. **(A)** Baseline data of 131 consecutive SSc patients. **(B)** 1-year follow-up data of 123 consecutive SSc patients. Contractures: number of contractures, Ulcers: ulcer score. Parameters found to be correlated with the EScSG activity index by CATPCA are indicated by bold type and marked with an asterisk. For details, see 'Patients and methods' section.



change in DL<sub>CO</sub> and FVC/DL<sub>CO</sub> ratio. We decided to use the 'minimal clinically relevant treatment effect' values as threshold limits ( $\Delta$ MRSS: 3–7.5 points based on the baseline MRSS values,  $\Delta$ DL<sub>CO</sub>: 9–10%,  $\Delta$ HAQ-DI: 0.2–0.25) defined on a Delphi exercise [39]. In general, these values are higher compared with the 'minimally important difference' values ( $\Delta$ MRSS: 3.2–5.3 and  $\Delta$ HAQ-DI: 0.1–0.14) [40].

We tested the model by CATPCA each time after each new introduced item. The final version was reached when the newly generated activity index was at approximately equal distance from both dimensions (Fig. 2). Although the total variance of the newly generated 12-point index was not significantly higher than that of the EScSG activity index (32 vs 30%), it belonged equally to both dimensions by CATPCA (Fig. 2). The newly constructed activity index contained the following new variables: the change in DL<sub>CO</sub>  $\geq$  9% [39] over 1 year with 0.5 point value and

FVC/DL<sub>CO</sub> > 1.8 [41] with 1 point value were introduced as new objective parameters of heart/lung involvement. The patient-reported worsening in 'heart/lung component' counted for only 1 point in the new index and the patient-reported change in skin thickness was also scored at half of the original weight (0.5 point). As an objectively measurable parameter of change in skin status, we introduced the change in MRSS  $\geq$  3–7.5 points at 1-year follow-up (based on the minimal clinically relevant treatment effect defined by a Delphi exercise, depending on the baseline MRSS score) [39]. Additionally, we introduced the 'change in ulcer score' variable, which scored the appearance of new ulcers on patients who had none at baseline investigation and also the increase in the ulcer score at 1-year follow-up. This variable counted as an additional 0.5 point. Another half a point was added to the index if the HAQ-DI  $\geq$  1 (which means moderate or severe disability that may be caused

**Fig. 2** CATPCA with the 1-year follow-up clinical data and the 12-point activity index of 123 consecutive SSc patients.**TABLE 4** The differences between the structure of the EScSG activity index and the newly generated 12-point activity index in SSc

| EScSG activity index |  |       | 12-point activity index |  |       |
|----------------------|--|-------|-------------------------|--|-------|
| Domain               | Item                                       | Point | Domain                  | Item   | Point |
| Skin                 | MRSS > 14                                  | 1.0   | Skin                    | MRSS > 14  | 0.5   |
|                      | Scleredema                                 | 0.5   |                         | 17-area patient score > 14 <sup>a</sup>          | 0.5   |
|                      | $\Delta$ Skin <sup>b</sup> (patient)       | 2.0   |                         | Scleredema                                       | 0.5   |
| Vascular             | Digital ulcers                             | 0.5   | Vascular                | $\Delta$ Skin <sup>b</sup> (patient)             | 1.0   |
|                      | $\Delta$ Vascular <sup>d</sup> (patient)   | 0.5   |                         | $\Delta$ MRSS $\geq$ 3–7.5 <sup>c</sup>          | 1.0   |
|                      |  |       |                         | Digital ulcers                                   | 0.5   |
| Joints               | Arthritis                                  | 0.5   | Joints                  | $\Delta$ Vascular <sup>d</sup> (patient)         | 0.5   |
|                      |  |       |                         | $\Delta$ Ulcer score <sup>e</sup>                | 0.5   |
|                      |  |       |                         | Arthritis  | 0.5   |
| Lung/heart           | DL <sub>CO</sub> < 80%                     | 0.5   | Lung/heart              | HAQ-DI $\geq$ 1                                  | 0.5   |
|                      | $\Delta$ Lung/heart <sup>g</sup> (patient) | 2.0   |                         | $\Delta$ HAQ-DI $\geq$ 0.2 <sup>f</sup>          | 0.5   |
|                      |  |       |                         | DL <sub>CO</sub> < 80%                           | 0.5   |
|                      |  |       |                         | $\Delta$ Lung/heart <sup>g</sup> (patient)       | 1.0   |
| Laboratory           | ESR > 30 mm/h                              | 1.5   | Laboratory              | $\Delta$ DL <sub>CO</sub> $\geq$ 9% <sup>h</sup> | 0.5   |
|                      | Hypocomplementaemia <sup>i</sup>           | 1.0   |                         | FVC/DL <sub>CO</sub> > 1.8                       | 1.0   |
|                      |  |       |                         | ESR > 30 mm/h                                    | 1.5   |
| Total score          |  | 10.0  |                         | Hypocomplementaemia <sup>i</sup>                 | 1.0   |
|                      |  |       |                         |  | 12.0  |

<sup>a</sup>Change in patient-reported 17-area thickness score over 1 year; <sup>b</sup>change in skin symptoms during last month; <sup>c</sup>change in MRSS over 1 year; <sup>d</sup>change in vascular symptoms during last month; <sup>e</sup>appearance of ulcers or increase in severity of ulcers over 1-year re-investigation; <sup>f</sup>change in HAQ-DI over 1 year; <sup>g</sup>change in cardiopulmonary symptoms; <sup>h</sup>change in DL<sub>CO</sub> during 1 year. (patient): reported by the patients; <sup>i</sup>C3, C4 or total complement decreased. For details, see 'Patients and methods' section,

by extensive skin involvement, characteristic of early diffuse scleroderma) and change in HAQ-DI  $\geq$  0.2 point at 1-year assessment was also scored with 0.5 point. Thus, the total score of the newly generated activity index was 12.0 points (Table 4).

The relationship of the 12-point activity index to the clinical parameters of 1-year re-investigation was also

examined by CATPCA. The disease activity-related clinical parameters were distributed into two dimensions, identical to those seen in the previous CATPCAs (Fig. 2). However, the 12-point activity index was equally associated with both dimensions, as it appeared at almost equal distance between the axes of the two dimensions indicating that pulmonary involvement, and vascular

and fibrotic processes (predominantly characterized in dimension 1) were equally represented in this new index. The total variance was 32% in the CATPCA.

**Relationship of the investigated biomarkers to the EScSG and 12-point activity index**

Another aim of the study was to investigate the possible correlation of laboratory parameters and biomarkers with

the EScSG activity index. A series of laboratory parameters were introduced in the CATPCA analysis, and those markers were considered to be related to the activity index, having been associated with it both at baseline and at 1-year re-investigation (Fig. 3). Serum albumin, VEGF, vWF, sPSGL-1 and CRP were found to be in consistent correlation with the EScSG activity index at both investigations.

**Fig. 3** Relationships between the EScSG activity index, clinical data and various laboratory parameters in SSc patients using CATPCA. **(A)** Baseline data of 131 consecutive SSc patients. **(B)** 1-year follow-up data of 123 consecutive SSc patients. Parameters that were found to be correlated with the EScSG activity index by CATPCA are indicated in bold type marked by an asterisk. For details, see 'Patients and methods' section.

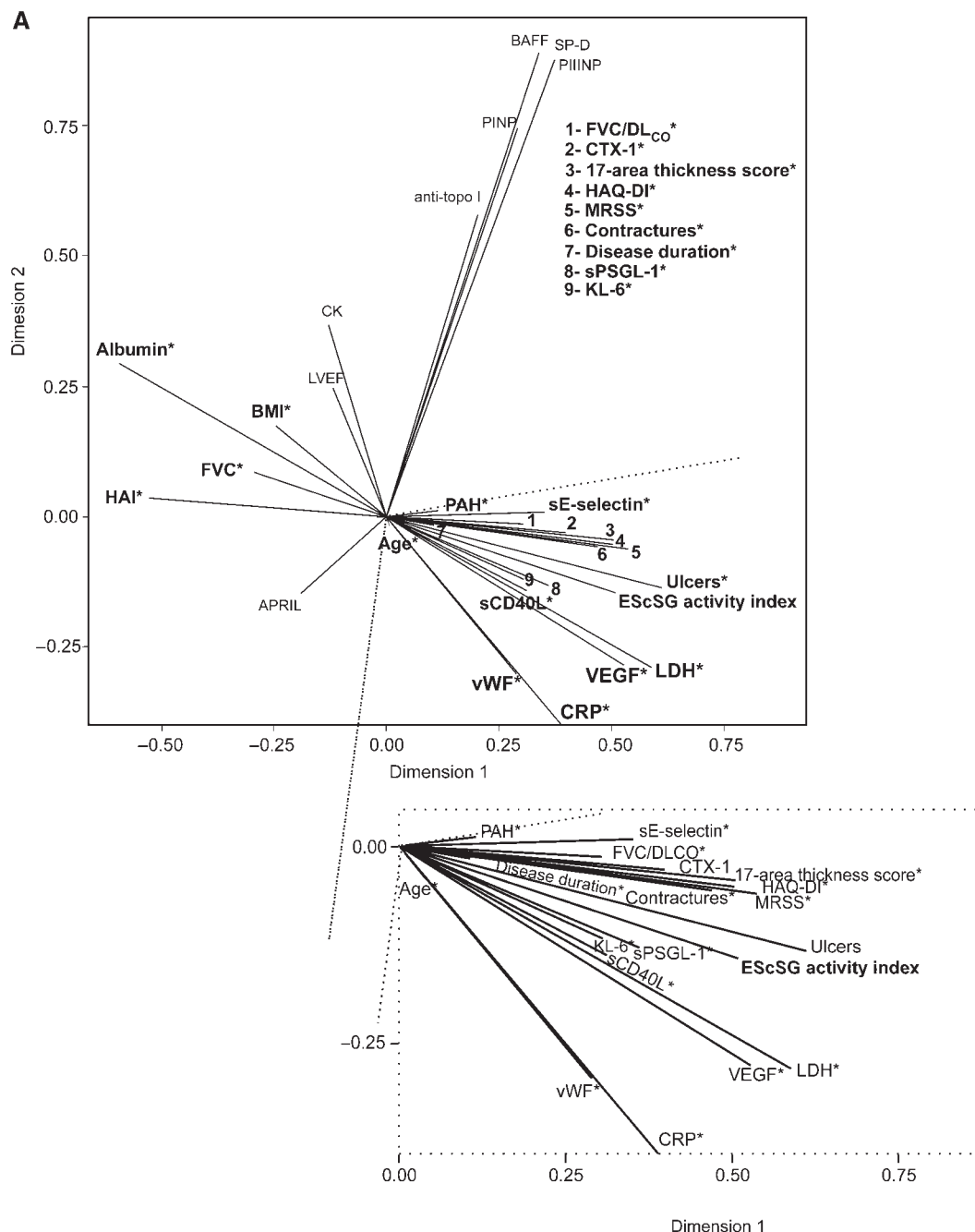
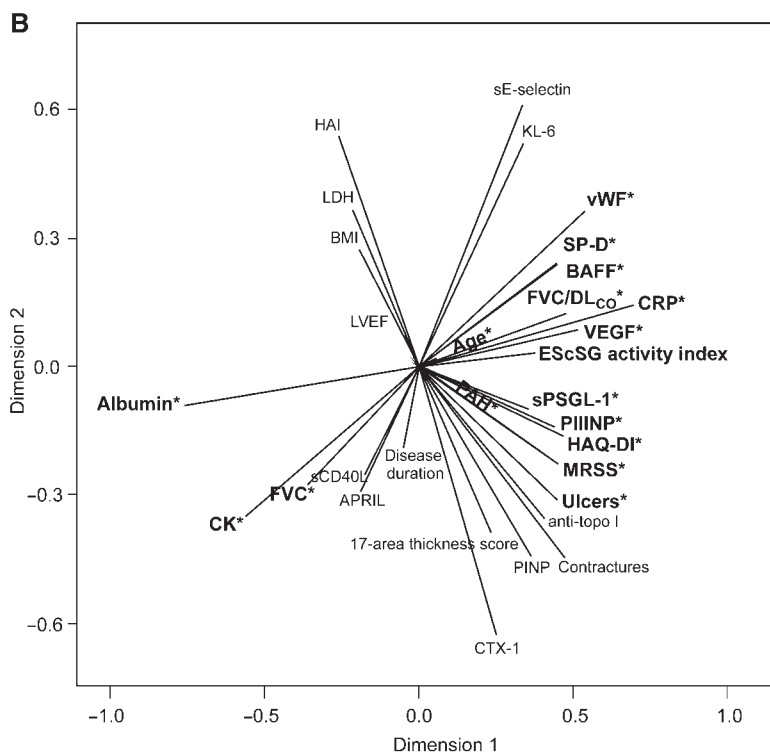


Fig. 3 Continued.



We also examined the relationship between these laboratory parameters and the 12-point activity index. VEGF, albumin, sPSGL-1 and CRP were related to the EScSG activity index and also our 12-point activity index. Furthermore, our modified index was associated with the anti-topo I titre, KL-6, SP-D, PINP and PIIINP (Fig. 4). The total variance of this model was similar to the original (28 vs 26.1% in the original EScSG model).

As the 12-point activity index proposed by our research team cannot be used at the first visit of the patient to the physician's office, in a further step we studied the simplified activity index, omitting the parameters of change ( $\Delta$ MRSS,  $\Delta$ ulcer score,  $\Delta$ HAQ-DI,  $\Delta$ DLCO), without modifying the weight of the remaining variables. Thus, in comparison with the EScSG activity index, this 8.5-point activity index contained the 17-area thickness score reported by the patient, the moderate to severe disability reflected by the HAQ-DI and pulmonary vascular involvement characterized by the FVC/DLCO ratio. This particular index showed a good correlation with the EScSG activity index both at baseline and 1-year re-investigation (Spearman's  $\rho=0.911$ ,  $P<0.001$  and  $\rho=0.831$ ,  $P<0.001$ , respectively), and furthermore, the total variance of the 8.5-point activity index was also similar to the EScSG activity index (34.6 vs 32.9% at baseline investigation and 32.2 vs 30% at 1-year follow-up, respectively) (data not shown). The distribution of the variables was very similar to that seen with the EScSG activity index.

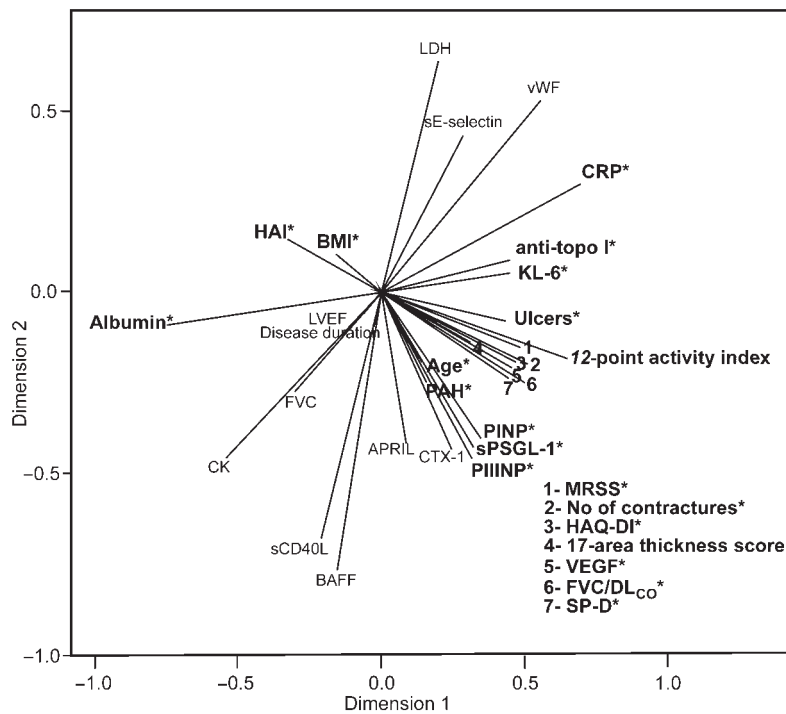
The 8.5-point activity index also showed the same correlations with the biomarkers as seen with the EScSG activity index at baseline and with the 12-point activity index at the 1-year re-investigation (data not shown).

## Conclusions

The EScSG activity index developed in a European multi-centre study is the only available instrument for the assessment of disease activity in SSc. Its validity has only been tested on a relatively small unselected patient cohort [3]. A recent study examined a simple preliminary model of eight variables. Similar to our findings, in this particular model, the authors also included musculoskeletal symptoms and an additional variable of pulmonary involvement (exertional dyspnoea) besides scleredema, MRSS, fatigue, DLCO, ESR and digital ulcer. This model was found to perform similarly to the existing EScSG disease activity score in early and late SSc [42].

MRSS assessment plays a central role in disease activity assessment in patients with early dcSSc, because these patients are potential candidates for therapeutic trials. However, a new subgroup of patients with low MRSS, but severe internal organ involvement comparable with high MRSS patients was also identified recently [43]. Still, the majority of SSc patients have relatively long disease duration and a low MRSS. We therefore think that

**Fig. 4** Relationships between the 12-point activity index, clinical data and various laboratory parameters of 123 consecutive SSc patients by CATPCA (1-year follow-up data).



the evaluation of ongoing obliterative vasculopathy, inflammatory phenomena and organ-specific activity markers might be appropriate tools for the assessment of disease activity in unselected SSc patients in clinical practice.

The EScSG activity index is a very useful and appropriate tool to assess disease activity in SSc, although some domains of this particular index may still be a topic of debate [44, 45]. In our present study, we evaluated the EScSG activity index on a large, unselected, consecutive SSc cohort, containing both lcSSc and dcSSc patients, as seen in the multicentre study performed by the EScSG [1–4]. We confirmed that the construct validity of the EScSG activity index is good. Additionally, we have found that two feasible physical examinations, namely the ulcer score and number of contractures, were also strongly correlated with the EScSG activity index (Fig. 1). Therefore, we recommend that the usefulness of these two clinical parameters as disease activity markers should also be evaluated in forthcoming studies. We previously assumed that patients could also provide valid and reliable data regarding their skin involvement; therefore, we have recently developed and validated a skin self-assessment questionnaire. This particular patient-reported ‘17-area thickness score’ correlated with the MRSS and also with the EScSG activity index [33]. Furthermore, our CATPCA analysis revealed that the EScSG activity index might not reflect sufficiently the pulmonary interstitial and vascular involvement of the disease, as the lung-related

parameters were sorted into a separate dimension by CATPCA analysis (Fig. 1).

The 12-point index constructed by us includes some new, feasible parameters like patient-reported 17-area thickness score, HAQ-DI, change in MRSS, HAQ-DI and DL<sub>CO</sub> at 1-year follow-up, the change in ulcer score and the FVC/DL<sub>CO</sub> ratio. Like the EScSG activity index, our newly developed index also does not sufficiently include gastrointestinal and kidney involvement of scleroderma patients.

This particular new index appropriately reflects the pulmonary interstitial and vascular involvement of the disease, but the total variance of this newly generated instrument was not significantly higher than that of the EScSG activity index (32 vs 30%).

In our attempt to enhance the information referring to objectively measurable change in organ involvement, we introduced some parameters of change (e.g. in DL<sub>CO</sub>, MRSS, HAQ-DI and ulcer score). Further studies and validation steps will be required to clarify the usefulness of the 12-point activity index for the follow-up of SSc patients. A further 3-year re-investigation of our cohort is also planned.

At the first examination of the patient these particular changes cannot be assessed. Omitting the new parameters for assessing the changes, 8.5 points remain which sufficiently reflect disease activity. The 8.5-point activity index is highly correlated with the original EScSG activity index and may be used for the first investigation.

There is a need to find biomarkers that can reliably reflect either the overall or the organ-specific disease activity, as in many cases there is a lack of evident clinical signs and symptoms in the progression of a certain organ involvement. Numerous biomarkers have been studied, but the results seem to be somewhat controversial. We have selected several promising biomarkers to test their usefulness on our large consecutive patient cohort. We found increased median values of the level of PINP, and Type I collagen degradation marker, the CTX-1 was also increased in our SSc patients compared with controls, as also seen in other clinical investigations [13]. We also confirmed that SP-D and KL-6 may be useful diagnostic markers and indicators of disease activity and also damage in patients with pulmonary interstitial diseases [17, 46]. On the contrary, lower serum levels of sPSGL-1 were found in the SSc patients compared with the healthy controls and PRP patients, potentially indicating a protective role against pulmonary involvement [10].

A previous study found higher vWF levels in patients with RP and SSc compared with healthy controls [47], and the levels in the Raynaud group were slightly higher than in scleroderma patients [48]. The elevated levels of vWF and sE-selectin levels in our PRP patients might reflect that the endothelial cell activity in these patients with shorter disease duration might be more pronounced compared with the SSc group with relatively longer disease duration (mean 8 years).

The CATPCA, performed both with the baseline and 1-year re-investigation data, revealed the relationship of five markers, namely CRP, albumin, VEGF, sPSGL-1 and vWF to the EScSG activity index. Our group has already found that the increase in CRP influenced the prognosis of scleroderma [13]. The quantification of gastrointestinal involvement in SSc is difficult because every part of it can be involved. The relationship of albumin with both activity indices might be a reflection of the malabsorption associated with a more active stage of disease, thus may reflect additional organ involvement. The decrease in albumin can also be considered as a sign of inflammation. The elevated markers of endothelial cell activation (vWF) and angiogenesis (VEGF) have also previously been found to be signs of an ongoing pathological disease process [8, 49, 50]. Endothelial cell activation is one of the primary events in the pathogenesis. Moreover, the altered angiogenesis and tissue hypoxia cause many of the characteristic symptoms of the disease (e.g. presence of digital ulcers, capillary abnormalities, telangiectasia). sPSGL-1 was identified in a study as a possible protective marker against pulmonary fibrosis; its role in disease activity should be further evaluated.

Four out of these aforementioned five laboratory markers (VEGF, albumin, CRP, sPSGL-1), identified by CATPCA, were found to be associated with both the EScSG activity index and the 12-point index (Figs 3 and 4). The 12-point index also reflected the pulmonary involvement as well as the vascular and fibrotic component of disease activation. Therefore, those laboratory markers that were related to the 12-point activity index

may also be potential candidates for further investigations in the search for further valuable activity markers in scleroderma. These are the anti-topo I titre, KL-6, SP-D, PINP and PIIINP, which might reflect pathological processes that were under-represented in the original index.

In summary, our findings confirm that the EScSG activity index is a good composite index with good construct validity. Its face, content and construct validity have been previously proved, but demonstration of responsiveness is still lacking. However, our results also indicated that this index may not represent sufficiently the ongoing pulmonary interstitial and vascular involvement; therefore, further validation steps are required in the future. In spite of the fact that the biomarkers investigated in this study did not perform adequately to our expectations in the CATPCA model, we identified some clinical assessment tools and laboratory markers that deserve further attention in future studies, and we also constructed a new 12-point activity index that may better represent the interstitial and vascular lung activity of the disease.

The evaluation of skin ulcers and contractures, CRP, serum albumin level, VEGF, vWF and sPSGL-1 are potential candidates for future studies. If the 12-point activity index proves to be a reliable, more sensitive index of disease activity, the role of KL-6, SP-D, anti-topo I antibody, PINP and PIIINP would also be worth considering for further evaluation.

#### Rheumatology key messages

- The construct validity of the EScSG scleroderma activity index is good.
- The newly introduced 12-point activity index encompasses lung-related disease activity in SSc better.

#### Acknowledgements

The authors thank Ibolya Farkas and Piroska Zentai for their technical help in the laboratory investigations. We also appreciate the valuable advices of István Ratkó in the statistical evaluation.

**Funding:** This work was supported by the Hungarian Scientific Research Funds [46701, 75912 to L.C., 48694 to G.K.]; and Ministry of Health Research Grant [312/2006 to L.C.].

**Disclosure statement:** The authors have declared no conflicts of interest.

#### References

- 1 Della Rossa A, Valentini G, Bombardieri S *et al.* European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. I. Clinical and epidemiological features of 290 patients from 19 centres. *Ann Rheum Dis* 2001;60: 585–91.
- 2 Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S *et al.* European multicentre study to define disease activity criteria for

- systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001;60:592–8.
- 3 Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S *et al.* European scleroderma study group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Ann Rheum Dis* 2003;62:901–3.
  - 4 Valentini G, D'Angelo S, Della Rossa A, Bencivelli W, Bombardieri S. European scleroderma study group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. IV. Assessment of skin thickening by modified Rodnan skin score. *Ann Rheum Dis* 2003;62:904–5.
  - 5 Valentini G, Silman AJ, Veale D. Assessment of disease activity. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S39–41.
  - 6 Doran JP, Veale DJ. Biomarkers in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008;47(Suppl. 5):v36–8.
  - 7 Greaves M, Malia RG, Milford Ward A *et al.* Elevated von Willebrand factor antigen in systemic sclerosis: relationship to visceral disease. *Br J Rheumatol* 1988;27:281–5.
  - 8 Matucci-Cerinic M, Pignone A, Iannone F *et al.* Clinical correlations of plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity in systemic sclerosis: a longitudinal study of plasma ACE level, endothelial injury and lung involvement. *Respir Med* 1990;84:283–7.
  - 9 Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Takehara K, Tamaki K. Increased serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998;37:1188–92.
  - 10 Yanaba K, Takehara K, Sato S. Serum concentrations of soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:583–7.
  - 11 Distler O, Distler JH, Scheid A *et al.* Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2004;95:109–16.
  - 12 Denton CP, Merkel PA, Furst DE *et al.* Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum* 2007;56:323–33.
  - 13 Allanore Y, Borderie D, Lemarechal H, Cherruau B, Ekindjian OG, Kahan A. Correlation of serum collagen I carboxyterminal telopeptide concentrations with cutaneous and pulmonary involvement in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003;30:68–73.
  - 14 Nagy Z, Czirjak L. Increased levels of amino terminal propeptide of type III procollagen are an unfavourable predictor of survival in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:165–72.
  - 15 Alekperov RT, Baranov AA, Abaitova NE. Associacii urovna C-reaktivnogo belka s kliniceskimi proavleniami pri sistemnoi sklerodermii [Clinical associations of C-reactive protein in systemic sclerosis]. *Ter Arkh* 2006;78:30–5.
  - 16 Czirjak L, Kumanovics G, Varju C *et al.* Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:59–63.
  - 17 Yanaba K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the activity of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:429–36.
  - 18 Asano Y, Ihn H, Yamane K *et al.* Clinical significance of surfactant protein D as a serum marker for evaluating pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1363–9.
  - 19 Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Nishijima C, Takehara K. Elevated serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the severity of pulmonary fibrosis. *Dermatology* 2000;200:196–201.
  - 20 Kumanovics G, Minier T, Radics J, Palinkas L, Berki T, Czirjak L. Comprehensive investigation of novel serum markers of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:414–20.
  - 21 Maeda M, Ichiki Y, Aoyama Y, Kitajima Y. Surfactant protein D (SP-D) and systemic scleroderma (SSc). *J Dermatol* 2001;28:467–74.
  - 22 Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54:192–201.
  - 23 Matsushita T, Fujimoto M, Hasegawa M *et al.* Elevated serum APRIL levels in patients with systemic sclerosis: distinct profiles of systemic sclerosis categorized by APRIL and BAFF. *J Rheumatol* 2007;34:2056–62.
  - 24 Komura K, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Elevated circulating CD40L concentrations in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:514–9.
  - 25 Allanore Y, Borderie D, Meune C *et al.* Increased plasma soluble CD40 ligand concentrations in systemic sclerosis and association with pulmonary arterial hypertension and digital ulcers. *Ann Rheum Dis* 2005;64:481–3.
  - 26 Hanke K, Dahnrich C, Bruckner CS *et al.* Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R28.
  - 27 Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363–73.
  - 28 LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202–5.
  - 29 Komocsi A, Pinter T, Faludi R *et al.* Overlap of coronary disease and pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:202–5.
  - 30 Furst DE. Measuring outcomes in PAH: the gap between the measures that are used and their validity. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:410–6.
  - 31 Clements P, Lachenbruch P, Siebold J *et al.* Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995;22:1281–5.
  - 32 Czirjak L, Nagy Z, Aringer M, Riemekasten G, Matucci-Cerinic M, Furst DE. The EUSTAR model for teaching and implementing the modified Rodnan skin score in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:966–9.



- 33 Nagy Z, Balint Z, Farkas H *et al.* Establishment and partial validation of a patient skin self-assessment questionnaire in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009;48:309–14.
- 34 Nagy Z, Bálint Z, Farkas H *et al.* A szisztémás sclerosisos betegek számára készült módosított HAQ kérdőív hazai adaptációja és validálása [The adaptation and validation of scleroderma Health Assessment Questionnaire for the Hungarian systemic sclerosis patients]. *Magyar Reumatológia* 2007;48:208–18.
- 35 Medsger TA Jr. Assessment of damage and activity in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:545–8.
- 36 Roberts-Thomson AJ, Massy-Westropp N, Smith MD, Ahern MJ, Highton J, Roberts-Thomson PJ. The use of the hand anatomic index to assess deformity and impaired function in systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2006;26:439–44.
- 37 Funauchi M, Shimadzu H, Tamaki C *et al.* Role of endothelial damage in the pathogenesis of interstitial pneumonitis in patients with polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol* 2006;33:903–6.
- 38 Linting M, Meulman JJ, Groenen PJ, van der Kooij AJ. Nonlinear principal components analysis: introduction and application. *Psychol Methods* 2007;12:336–58.
- 39 Gazi H, Pope JE, Clements P *et al.* Outcome measurements in scleroderma: results from a Delphi exercise. *J Rheumatol* 2007;34:501–9.
- 40 Khanna D, Furst DE, Hays RD *et al.* Minimally important difference in diffuse systemic sclerosis: results from the D-penicillamine study. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1325–9.
- 41 Steen V, Medsger TA Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48:516–22.
- 42 Diaconu D, Fransen J, Vonk MC *et al.* Disease activity criteria for patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:275.
- 43 Hanitsch LG, Burmester GR, Witt C *et al.* Skin sclerosis is only of limited value to identify SSc patients with severe manifestations—an analysis of a distinct patient subgroup of the German Systemic Sclerosis Network (DNSS) register. *Rheumatology* 2009;48:70–3.
- 44 Hudson M, Steele R, Baron M. Update on indices of disease activity in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2007;37:93–8.
- 45 Della Rossa A, Bombardieri S, Valentini G. Comment on: disease activity criteria in scleroderma. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37:271–2.
- 46 Yanaba K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Comparative study of serum surfactant protein-D and KL-6 concentrations in patients with systemic sclerosis as markers for monitoring the activity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2004;31:1112–20.
- 47 Kahaleh MB, Osborn I, LeRoy EC. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and in Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med* 1981;94:482–4.
- 48 Lau CS, McLaren M, Belch JJ. Factor VIII von Willebrand factor antigen levels correlate with symptom severity in patients with Raynaud's phenomenon. *Br J Rheumatol* 1991;30:433–6.
- 49 Scheja A, Akesson A, Geborek P *et al.* Von Willebrand factor propeptide as a marker of disease activity in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Res* 2001;3:178–82.
- 50 Choi JJ, Min DJ, Cho ML *et al.* Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003;30:1529–33.