

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
PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**

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

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám fő célkitűzése egy szisztémás autoimmun betegségre, 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-asszociáltnak 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. A fág könyvtár alapú epitóp térképezési technika segítségével összehasonlítottuk a természetes és a patológiás autoantitestek által felismert epitóp mintázatokat. Azonosítottuk azt az epitópot (F4), amely ellen mind egészséges egyénekben, mind SSc-ben és szisztémás lupus erythematosus (SLE) esetén, valamint más szisztémás autoimmun betegségekben is autoantitestek mutathatóak ki. Ez a topo I molekulán belül egy 150 aminosav (AA) hosszúságú, genetikailag konzervált szakasz.

A fág display alapú epitóp térképezési technika segítségével bizonyítottuk, hogy ezen az immundomináns fragmensen 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 fragmens (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 ismerte 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

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, csírvonalban 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 sejtselemei 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.

Természetes antitestek és természetes autoantitestek

A természetes antitestek olyan immunglobulinok, amelyeket a B1 B-sejtek termelnek az antigénnel való előzetes immunizálás nélkül. Ezen antitestek genetikailag konzervált patogén szekvenciákat ismernek fel, így egy fertőzés során a védekezés első vonalában szerepelhetnek. A természetes autoantitestek viszont az evolúció során konzervált saját struktúrákat is felismernek és jelen vannak mind egészséges egyének, mind szisztémás autoimmun betegségben szenvedők szérumában.

Az autoreaktív repertoárok már az ontogenezis korai szakaszában, a magzati életben kiválasztódnak. A természetes autoantitestek többségét csírvonalbeli gének közvetlenül kódolják, elsősorban IgM vagy IgG izotípusúak, polireaktívak és széles spektrumú affinitást mutatnak a felismert epitópokhoz. A polireaktivitás nem jelenti azonban a specifikusság hiányát, azaz minden polireaktív természetes autoantitestet különböző epitópok csoportját ismeri fel és ilyen értelemben egyedi. Számos funkciót javasoltak már a természetes autoantitesteknek: immunológiai repertoárok szelekciójában vehetnek részt, szerepet játszhatnak az elsődleges immunválasz felgyorsításában, apoptotikus sejtek eltakarításában segédkezhetnek, gyulladás gátló hatással rendelkezhetnek, valamint hozzájárulhatnak az immunológiai homeosztázis fenntartásához. A természetes antitestek megkülönböztetése a természetes autoantitestektől kissé mesterkéltnek tűnhet, mivel a természetes antitestek

termelésének háttérében álló B1 immunglobulin gén készlet korlátozottsága, valamint a nagyszámú felismert antigén miatt valószínű, hogy jelen vannak saját és nem-saját keresztreakciót egyaránt mutató specificitások is.

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 előbbieknél vizsgálatára, mivel a sejtek fiziológias 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 fiziológias és patológias állapotokban (szisztémás autoimmun betegségeknél). Azt találtuk, hogy a citrát-szintázon felismert epitóp mintázat eltérést mutat egészséges egyéneknél és szisztémás autoimmun betegekben.

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.

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. 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).

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. 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.

Az anti-topo I antitest jelenlétéhez emelkedett mortalitás, tüdőfibrózis, muszkuloszkeletális és kardiális érintettség, valamint proteinuria társul. 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. Bár az anti-topo I autoantitesteket a dcSSc-re tartják jellemzőnek, jelenlétük nem korlátozódik teljes mértékben a dcSSc-re, mivel anti-topo I autoantitestek mutathatók ki az lcSSc-s betegek egy részében is. Bár az anti-topo I autoantitestek jelenléte SSc-re nagymértékben specifikusnak tartott, SSc mellett SLE-ben, illetve más – esetenként gyulladásoos betegségekben - is kimutatták.

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. Szintetikus peptidokkal végzett epitóp térképezés során négy fő epitópot azonosítottak, amelyek közül három a központi szubdomén I és II-ben egy pedig a központi szubdomén III-ban található. 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. Ugyanakkor 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. 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, ugyanakkor egy kisszámú szérummintán alapuló kísérlet során az anti-topo I antitestek által felismert régiók idővel változást mutattak. Bár az anti-topo I autoantitestek epitóp specificitását SSc-ben számos csoport vizsgálta, a dcSSc-ben, lcSSc-ben, 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 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. Az anti-topo I autoantitestek már az SSc nagyon korai stádiumában kimutathatóak. Jelenlétük általában a betegség súlyosabb formájához társul és ezen autoantitestek szérumszintje összefüggésben állhat a betegség aktivitásának mértékével. Mindazonáltal fontos lenne ezen klinikai szempontból meghatározó 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. 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, később azt találták, hogy a topo I molekula képes fibroblaszt sejtek felszínéhez kötődni és így kötődési helyet biztosítani az anti-topo I autoantitesteknek. 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, valamint a korai prognózis felállításában, ezáltal az adekvát terápiás stratégia kiválasztásában.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Egy lambda fág felszínen 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 szérumból izolált IgG izotípusú ellenanyagokkal.
3. A lambda fág felszínen megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója alapján kiválasztott szekvenciáknak megfelelő maltóz-kötő fehérje (MBP)-topo I fragmens fúziós fehérjék előállítása.
4. Nagyszámú dcSSc-s, lcSSc-s, SLE-s betegek és egészséges egyének szérummintáinak tesztelése az MBP-topo I fúziós fragmenseken 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 fragmensek klinikai jelentőségének meghatározása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált szérumminták

A rendelkezésünkre álló 293 SSc-s beteg közül 59 (34 dcSSc-s, 25 lcSSc-s), a vizsgált 265 SLE-s beteg közül 8 mutatott anti-topo I pozitivitást a rutin diagnosztikában használt konvencionális ELISA teszttel. 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 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 (11dcSSc-s, 40 lcSSc-s) beteg szérummintáját is és elemeztük klinikai adataikat. Kontrollként 63 magyar, 44 finn, 44 brit véradó és 65 idős egészséges egyén, 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 szérummintáit használtuk fel. A vizsgálatok elvégzéséhez az etikai engedélyt a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjának Etikai Bizottsága adta meg. Megfelelő tájékoztatást követően minden beteg és egészséges egyén beleegyező nyilatkozatot írt alá.

Topo I antigén fragmens könyvtár létrehozása

A teljes hosszú humán topo I-et kódoló cDNS-t PCR-el amplifikáltuk egy egészséges egyén perifériás véréből származó mononukleáris sejtekből izolált RNS reverz transzkripcióját követően, majd T/A plazmidba klónoztuk és szekvenálással ellenőriztük. SpeI és NotI helyeket tartalmazó random primerek, valamint templátként a fent említett plazmidból BamHI és EcoRI emésztéssel kivágott topo I cDNS felhasználásával véletlenszerű kezdőponttal és véletlenszerű hosszúsággal rendelkező topo I cDNS fragmenseket állítottunk elő, amelyeket a lambda-D-bio fág genomjának megfelelő helyére klónoztuk. In vitro csomagolást és E. coli amplifikációt követően a fágokat polyetilénlikollal koncentráltuk.

Topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója

Az 5 dcSSc-s, 6 lcSSc-s és 4 SLE-s beteg szérumából protein G oszlopon tisztított anti-topo I ellenanyagokat Nunc Maxisorp lemezhez kötöttük, a lemezt blokkolás után topo I-lambda fágokkal inkubáltuk. Mosás után a fágokkal E. coli-t fertőztünk, majd az így visszanyert fágokkal ismét elvégeztük a dúsítást. A harmadik dúsítás után független klónokat állítottunk elő, végül elvégeztük a fág genomok megfelelő szakaszának DNS szekvenálását.

MBP - topo I fragmens fúziós fehérjék előállítása

A lambda fág felszínen megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciója alapján 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 cDNS-eket PCR-el amplifikáltuk. Ehhez EcoRI és BamHI restriktációs helyeket tartalmazó

primereket használtunk, majd a kapott cDNS szakaszokat pMal-c2 vektorba klónoztuk. A konstrukciókat DNS szekvenálással ellenőriztük. A fúziós fehérjéket E. coli TB1-ben expresszáltattuk és amilóz gyantával tisztítottuk. A tisztított fehérjéket SDS- poliakrilamid gélelektroforézist (PAGE) követő Coomassie brilliant kék festéssel ellenőriztük.

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

Az ELISA vizsgálatok során 96 lyukú poliszitirén 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 szérum mintákat triplikátumokban 1 órán keresztül inkubáltuk. Végül a lemezeket tormaperoxidázzal (HRPO) jelölt anti-humán IgG vagy IgM másodlagos antitestekkel 1 órát inkubáltuk. A reakciót *o*-feniléndiaminnal hívtuk elő, majd 492 nm-en mértük az optikai denzitást.

Az ELISA-val kapott eredményeket Western blottal erősítettük meg. A 40 µg/ml koncentrációjú, SDS mintapufferrel 1:1 arányban hígított MBP fúziós topo I fragmenseket valamint az MBP-t 10 perc forralást követően SDS-PAGE során elválasztottuk majd nitrocellulóz membránokra blottoltuk. A nitrocellulóz membránokat 5% tejpor 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 szérum mintákkal inkubáltuk újabb 1 órán keresztül. Mosást követően HRPO-val jelölt anti-humán IgG-vel 1 órát inkubáltunk. Az MBP fúziós fehérjék kimutatásához elsődleges antitestnek nyúl anti-MBP antitestet, másodlagosnak HRPO-val jelölt kecske anti-nyúl antitestet használtunk. A membránokat kemilumineszcens szubsztráttal hívtuk elő majd röntgen filmre exponáltuk.

Topo I epitópok ellen termelődött antitestek reaktivitás longitudinális vizsgálata

A 34 dcSSc-s, 25 lcSSc-s és 8 SLE-s betegtől származó, betegenként 3 szérummintát teszteltünk ELISA-val. Az ELISA-val kapott eredményeket Western blottal támasztottuk alá 10 F1 pozitív, 10 random módon kiválasztott F4 pozitív és 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 klinikai adatok statisztikai analízise során a folytonos változókat Student-féle t próbával, a kategórikus adatokat Yates-féle korrekcióval módosított chi-négyzet teszttel és Fisher egzakt 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

1. A lambda fág felszínen 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. A dcSSc-s betegek szérumai elsősorban az N-terminális doménben, az SLE-s betegek szérumai a központi domén I-II területén, míg az lcSSc-s betegek szérummintái a topo I molekula teljes hosszában ismernek fel epitópokat.
2. A fág könyvtár szelekciójával kapott szekvenciáknak megfelelően előállítottunk kilenc MBP - topo I fragmens fúziós fehérjét (F1-F9). 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 az F4 (450-600 AA) fragmens ellen autoantitestek mutathatóak ki egészséges egyének szérumában. A többi topo I fragmenst (F1-3, F5-9) felismerő antitestek az egészséges egyének szérummintáiban nem voltak kimutathatóak.
3. A topo I F4 fragmensét mindegyik, konvencionális ELISA teszttel előzőleg anti-topo I pozitívnak bizonyult dcSSc-s, lcSSc-s és SLE-s beteg szérummintája felismerte.
4. SSc-től, illetve az SLE-től eltérő egyéb szisztémás autoimmun betegségben szenvedők szérummintáiban is kimutathatóak anti-F4 antitestek.
5. Mind az IgG mind az IgM izotípusú anti-F4 antitestek nem csak az SSc-s betegek szérumában 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. Lehetséges, hogy az F4 fragmens elleni autoantitestek a természetes autoantitestek közé tartoznak.
6. Az F1 fragmenst (5-30 AA) a konvencionális ELISA teszttel előzőleg anti-topo I pozitívnak bizonyult dcSSc-s betegek 26%-a ismerte fel.

7. Az F8 fragmens (350-400 AA) elleni antitestek a konvencionális ELISA teszttel előzőleg anti-topo I pozitívnak bizonyult SLE-s betegek 50%-ában voltak kimutathatóak.
8. A többi fragmens (F2, F3, F5-F7, F9) elleni antitestek 1-2 beteg szérumában voltak kimutathatóak, jelenlétüket egyéni különbségek magyarázhatják.
9. Longitudinális vizsgálatunk során az anti-F4 ellenanyagok jelenléte 94%-ban állandó volt, míg az F1 és F8 fragmens elleni reaktivitás mértéke idővel változott.
10. A klinikai adatok (bőrérzékenység kiterjedése, kézkontrakturák, azotémia és/vagy malignus hipertónia, szívérzékenység, artéria pulmonális hipertónia, nyelőcső szűkület/tágulat és diszmotilitás jelenléte, tüdőfibrózis kiterjedtsége, faszírozott vitál kapacitás értéke) statisztikai analízise során nem találtunk összefüggést az anti-topo I antitest epitóp specificitás és az SSc klinikai megjelenése között. Azonban szignifikáns különbség mutatkozott a dcSSc-s betegek F1 pozitív és F1 negatív csoportjai között a betegek életkorában és betegségük fennállásának időtartamában. 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 betegek 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 veseérzékenység hiánya).

MEGBESZÉLÉS

A közelmúltban leírt természetes immunrendszer evolúciós összekötő kapcsolatot jelent 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.

A természetes antitestek nagy része eleve autoreaktív, és genetikailag konzervált struktúrák ellen irányul. 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.

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. Mivel az immunrendszer egyik alapvető feladata annak megakadályozása, hogy saját antigének gyulladást provokáljanak, az autoantitestek jelenléte a cél antigénnel szemben kialakult B-sejtes tolerancia károsodásának következménye. 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.

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. A természetes immunitás komplex szerepét az autoimmun jelenségekben kiemeli az a tény, hogy ugyanazon komponens kétélű fegyverként védő vagy triggerelő szerepet játszhat a fennálló mikrokörnyezet, 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, de hátrányai közé tartoznak az *in silico* B-sejt epitóp predikcióval járó bizonytalanságok, 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. 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 mi is találtunk egy, mindegyik vizsgált beteg széruma által felismert fragmenst, amely a 450-600 AA régióban helyezkedik el. Továbbá dcSSc-s betegek széruma számos, az N-terminális doménben található rövid fragmenszen mutatott pozitívítást. 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. Ugyanakkor ennek ellenkezőjét is leírták, a teljes N-terminális domént lefedő fúziós fehérjét használva nem sikerült ezt a régiót felismerő anti-topo I antitesteket kimutatni. 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 20-30 AA hosszúak. Az F1 fragmens tartalmaz egy experimentálisan igazolt granzim B hasítási helyet. 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 háttérben 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 fehérjéket először

egészséges egyének szérummintáival teszteltük és azt találtuk, hogy az egészséges egyének jelentős része rendelkezik a topo I F4 fragmense 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 egyénekben. 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 szérumában 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 szérumában is. Ugyanakkor anti-topo I antitesteket mutattak ki glomerulonephritises betegek szérumában, krónikus graft versus host betegségben, krónikus hepatitis C vírus fertőzés okozta májbetegségben szenvedők szérumában és primer biliaris cirrhosis egyes eseteiben is. 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-s esetek egy részében alattomos kezdet után a betegség lefolyása során viszonylag gyorsan irreverzibilis, súlyos szervinolvációk alakulhatnak ki, amelyek néhány év alatt akár a beteg halálához vezethetnek. A prognózist alapvetően a folyamat aktivitása, és még inkább a már létrejött károsodások mértéke határozza meg. Következésképp kulcsfontosságú a korai diagnózis és a megfelelő terápia mielőbbi elkezdése. Mivel az anti-topo I antitest jelenlétéhez

emelkedett mortalitás, tüdőfibrózis, muszkuloszkeletális és kardiális érintettség és proteinuria társul, 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. Bár az anti-topo I autoantitesteket a dcSSc-re tartják jellemzőnek, 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. Az F4 fragmenszen a jelenleg rutin diagnosztikában alkalmazott anti-topo I ELISA vizsgálatban negatív eredménnyel rendelkező betegek is mutatnak pozitívítást. 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. 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 ősbibb, 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 epitópokat 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. 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. 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 betegek 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 patogenezise 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. 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 patogenikus 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. 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. 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.

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 betegek, Prof. Dr. Füst Györgynek és Dr. Prohászka Zoltánnak a finn és brit véradók szérummintáinak valamint Dr. Alessandra Luzzago-nak a lambda fág vektornak a 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.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézis alapját képező közlemények

Diána Simon, Tamás Czömpöly, Timea 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:3.403

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

Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis

Autoimmun Rev. 2009;8(8):692-6. IF:6.368

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, Timea 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:4.236 (A jelenleg elérhető [2009-es] impakt faktor adatok alapján).

Egyéb közlemények

Diána Simon, Alastair K. O. Denniston, Paul J. Tomlins, Graham R. Wallace, Saeaha 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