

Részletes szakmai beszámoló a T46837 jelű, Humán és bakteriális hősokkfehérjék komplementaktiváló képességének összehasonlító vizsgálata c. OTKA pályázathoz

1. célkitűzés

Az anti-Hsp60-autoantitestek szintjét befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata

Bevezetés

Az anti-Hsp60-autoantitestek jellegzetességeit korábban komplex klinikai vizsgálatok során tanulmányoztuk (ld. 1-es táblázat). Vizsgálataink során két cardiovascularis betegséggel (coronariabetegség és stroke, vizsgált betegek/kontrollok száma 1101/949), egy fertőző betegséggel (HIV-fertőzés 74/217) és autoimmun patomechanizmusú, szisztémás betegségekkel foglalkoztunk (1-es típusú diabetes mellitus, szisztémás lupus erythematosus, nem differenciált kötőszöveti betegség, primer Raynaud-szindróma, szisztémás sclerosis, rheumatoid arthritis, dermatomyositis/polymyositis, gyulladásoos bélbetegség; vizsgált betegek/kontrollok száma 1276/934). Ezekben a korábbi vizsgálatokban kapott eredményeink megerősítik pályázatunk munkahipotézisét, hogy lényeges különbségek tapasztalhatók az anti-Hsp60-autoantitestek és az anti-Hsp65-antitestek között. A diabetes mellitusos gyermekekben tett megfigyeléseink megerősítették, hogy a többféle epitópspecifitású anti-Hsp60-autoantitest-„keveréken” belül két csoport között kimutathatók lényeges eltolódások akkor is, ha a két csoportban mért teljes IgG-anti-Hsp60-autoantitest-szintek azonosak. Más szavakkal: létezhetnek „patogén epitópok”, amelyek ellen szelektíven keletkezhetnek antitestek (és feltehetően sejtes immunválasz is). A p277 (9. epitóp) -ellenes proinflammatorikus immunválasz kioltásának, lecsendesítésének jelentős klinikai haszna mutatkozott egy klinikai vizsgálatban (Raz, 2001), így azok a vizsgálatok, amelyek az anti-Hsp-immunválasz regulációját genetikai és epitópszinten tanulmányozzák, lényeges új információval szolgálhatnak a jövőben. Ezekhez a vizsgálatokhoz sorakozott fel jelen pályázat munkatervének 1-es és 3-as célkitűzése.

1. táblázat. Az anti-Hsp60-autoantitestek szintjét befolyásoló tényezők megismerésére szervezett saját vizsgálataink áttekintése

Betegség	Vizsgáltak száma (beteg/kontroll)	Összefüggés	Megjegyzés	Referencia
HIV-fertőzés	74/217 132/140	Az anti-Hsp60- és anti-Hsp65-szintek nem emelkedtek HIV-fertőzöttekben. Az anti-Hsp-antitestek korrelációt mutatnak az anti-C1q-autoantitestekkel.	Az anti-Hsp-antitestek szintje csökken a betegség előrehaladtával. A két antitest között keresztreakció is kimutatható.	Prohászka, 1998 Prohászka 1999
Diabetes mellitus, 1-es típus	83/81	Az anti-Hsp60-autoantitestek nem emelkedtek, az anti-p277- (9. epitóp az 5. ábrán) antitestszintek emelkedtek diabetesben.	Még egy további epitóp (8. epitóp az 5. ábrán) ellen mutathatók ki antitestek emelkedett mennyiségben diabetesben.	Horváth L, 2002
Szisztémás autoimmun betegségek	272/192 198/349	Emelkedett anti-Hsp-antitestszintek szisztémás sclerosiban és nem differenciált kötőszöveti betegségben. Az anti-Hsp65-IgG-szintek kapcsolatot mutatnak az anti- <i>H. pylori</i> -IgG-antitestekkel, míg az anti-Hsp60-autoantitestek nem.	Az anti-Hsp65-antitestek nem differenciált kötőszöveti betegségben szenvedőkben keresztreakciót és korrelációt mutatnak az anti-C1q antitestekkel. A legmagasabb <i>H. pylori</i> szeroprevalencia a szisztémás sclerosis és nem differenciált kötőszöveti betegek csoportjában mutatkozott.	Horváth L, 2001 Kalabay, 2002
Gyulladásos bélbetegség	66/126 124/110	Mindkét vizsgálatban csökkent az antibakteriális Hsp65/GroEL antitestszintek a betegekben, az anti-Hsp60-autoantitestek nem mutatnak kapcsolatot.	A kapcsolat a Crohn-betegségben szenvedőkben erősebbnek mutatkozik, mint colitis ulcerosában.	Bene, 2002 Huszt, 2004
Egészséges finn véradó férfiak	176	Kapcsolat az IL-6 –174 promóterpolimorfizmussal. Kapcsolat az immunglobulin GM-allotípus-determinánssal. Epistaticus kölcsönhatás az IL-6 és Ig GM gének között.		Veres, 2002 Pandey, 2004
Egészséges magyar személyek	327	Kapcsolat az IL-6 –174 promóterpolimorfizmussal.		Jelen pályázat és Kizsel et al, 2006

Genetikai tényezők és az anti-Hsp-antitest-szintek kapcsolata

Pályázatunk 1-es célkitűzésében a Hsp60-autoantitest-szintek és egyes citokingén-polimorfizmusok összefüggéseit vizsgáltuk, amelyre Mikko Hurme-vel (University of Tampere, Finnország) indított kollaborációs munkánk adott lehetőséget. Korábban pro-, mind antiinflammatorikus citokineket tanulmányoztunk (Veres et al, 2002). Az antitesttermelés és

B-sejt-proliferáció alapvető szabályozói a citokinek, ezek között is igen fontos az interleukin-6 (IL-6), amelyet eredetileg mint B-sejt-növekedési faktort írtak le (Hirano, 1986). Vizsgálatunkat megpróbáltuk úgy felépíteni, hogy ne egy kiragadott citokint, hanem annak lehetséges „környezetét”, kapcsolatait is vizsgáljuk. Ezzel a stratégiával végül is az IL-1-alfa -511, IL-1-béta -889, az IL-6 -174 és az IL-10 -1082, -819, -592 és az IL-1 receptorantagonista (RA) polimorfizmusokat vizsgáltuk 173 középkorú, finn férfi véradó mintáiban. Ugyanezektől a személyektől szérumminta is rendelkezésünkre állt, amelyekben az anti-Hsp60-autoantitest-méréseket is elvégeztük. Eredményeink szerint erős kapcsolat mutatható ki az IL-6 -174 G>C polimorfizmus és az anti-Hsp60-IgG-szintek között. A legmagasabb antitestszint a vad allélt (G) homozigóta formában hordozó személyekben mutatkozott, a heterozigóta vagy csak ritka allélt hordozókban egyaránt szignifikánsan alacsonyabb antitestszinteket találtunk. További fontos megfigyelésünk volt, hogy az egészséges véradókban a nyugalmi szérum-IL-6-szintek és az IL-6 -174 polimorfizmus között nem volt kapcsolat, továbbá az antitestszintek nem mutattak összefüggést az IL-6-koncentrációkkal. A többi vizsgált citokin esetében nem tudtunk szignifikáns kapcsolatot kimutatni az autoantitest-koncentrációkkal akkor sem, ha együttes kiértékelésnek (allélikus variációk szimultán hordozása) vetettük alá adatainkat.

A finn véradók mintáival tett megfigyeléseink további vizsgálatára került sor jelen pályázatunk kereteiben. Egészséges magyar férfiak és nők DNS- és szérummintáival végezhetjük el a fenti mérésorozatot (Kiszkel et al, 2006). Vizsgálatunkban 320 egészséges, foglalkozás-egészségügyi szűrővizsgálaton megjelent személy vett részt tájékozott beleegyezést követően. Vizsgálatunk során az IL-6-genotípus-meghatározás és az antitestszintmérések a korábban is alkalmazott metodikák szerint történtek. A 2. táblázat a genotípus-megoszlásokat mutatja a finn és a magyar populációkban. A magyar populációban egyaránt rendelkezésünkre álltak minták nőktől és férfiaktól is, ezért a genetikai adatok értelmezéséhez beszereztük finn nők IL-6 -174-polimorfizmus adatait is. Megállapítható, hogy az IL-6 -174-polimorfizmus előfordulásában szignifikáns különbség mutatkozik a finn és a magyar populációk között. Az egészséges magyar népesség körében a vad, G allél előfordulása gyakoribb, mint a finn populációban, ez a különbség nők esetében kifejezettebb, mint férfiakban.

2. táblázat. Az interleukin-6 –174 promóterpolimorfizmus megoszlása egészséges magyar és finn populációban

Genotípus	Magyar nők, n=203	Magyar férfiak, n=124	Magyarok összesen, n=327	Finn nők, n=182	Finn férfiak, n=173	Finnek összesen, n=355
IL-6 –174 GG	73 (0,359)	39 (0,314)	112 (0,342)	46 (0,253)	39 (0,225)	85 (0,239)
IL-6 –174 GC	91 (0,448)	56 (0,451)	147 (0,449)	85 (0,467)	84 (0,485)	169 (0,476)
IL-6 –174 CC	39 (0,193)	29 (0,235)	68 (0,209)	51 (0,280)	50 (0,290)	101 (0,285)
IL-6 –174 G allél frekvencia	0,583	0,541	0,567	0,486	0,468	0,477
IL-6 –174 C allél frekvencia	0,417	0,459	0,433	0,514	0,532	0,523

p= 0,0024 (magyar nő vs. finn nő); 0,203 (magyar férfi vs. finn férfi); 0,005 (magyar vs. finn). A vizsgált genotípusok eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg szabálynak.

Az anti-Hsp60-autoantitest-szintek IL-6 –174 genotípus szerinti bemutatása a 3. táblázatban található. A magyar populációban is sikerült kimutatni az IL-6-polimorfizmus és az anti-Hsp60-autoantitestek közötti kapcsolatot. A legmagasabb antitestszintet ebben a csoportban a GC heterozigóták esetében mértük, velük csaknem azonos koncentrációkat találtunk a GG homozigótákban. A legalacsonyabb autoantitest-szint a magyar populációban is, hasonlóan a finnországihoz, a CC genotípust hordozókban volt. Férfiakban az antitestszintek megoszlása hasonló volt a teljes vizsgálati csoportéhoz, míg nők esetében nem volt különbség az autoantitest-szintekben a GG és a GC genotípust hordozó csoportok között. Az IL-6 genotípus és nem szerint felbontott csoportok között nincs szignifikáns különbség az antitestszintek vonatkozásában (p=0,402). A G allélt hordozó személyeket a teljes csoportban (vagy nemek szerint külön analizálva is) szignifikánsan magasabb anti-Hsp60-autoantitest-szint jellemezte. Az anti-Hsp65-antitestek szintje nem mutatott szignifikáns összefüggést mutatott az IL-6 genotípusokkal az egészséges magyar populációban.

3. táblázat. Az anti-Hsp60-autoantitest-szintek IL-6 -174 genotípus szerinti megoszlása egészséges magyar populációban

Genotípus	Összes személy, n=320		Férfiak, n=118		Nők, n=202	
	Anti-Hsp60-IgG	p-érték	Anti-Hsp60-IgG	p-érték	Anti-Hsp60-IgG	p-érték
IL-6 -174 GG	41,8 (23,3–82,1)	0,0026	37,5 (24,5–53,9)	0,0343	48,2 (23,6–112,9)	0,064
IL-6 -174 GC	46,4 (29,8–77,9)		44,9 (28,4–77,1)		47,6 (31,7–79,6)	
IL-6 -174 CC	30,0 (18,6–50,0)		27,7 (16,8–43,9)		38,6 (19,8–51,8)	
IL-6 -174 G hordozó	44,9 (28,4–78,8)	0,0013*	40,5 (27,4–69,6)	0,018	48,1 (28,7–88,2)	0,022

* IL-6 -174 GG+GC vs. CC

Genetikai tényezők és az autoantitestek termelésének szabályozása

Míg a Hsp65-antitestek jó markerei lehetnek a patogénekkal való terheltségből származó rizikónövekedésnek, addig az anti-Hsp60-autoantitestek ezektől részben elkülönülve, más szabályozó tényezőkkel kapcsolatban mutatnak összefüggést a fokozott rizikóval. Az immundefektusok között jelennek meg ennél fogva azok a genetikai tényezők, amelyek fokozott autoantitest-termeléssel mutatnak kapcsolatot. Ilyenek például a munkánkban bemutatott IL-6 allélikus variációk.

Az előbbieken ismertetett két független vizsgálat (finn véradó férfiak [Veres, 2002] és magyar egészséges populáció [jelen pályázat, Kiszél, 2006]) egybehangzó eredménye nagymértékben megerősíti az IL-6-gén-polimorfizmus és az anti-Hsp60-autoantitestek közötti kapcsolat jelentőségét.

Az interleukin-6 eredetileg mint B-sejt-differenciálódási faktor került leírásra (Hirano, 1986), de hamar felismerték multifunkcionális jellegét. Alapvető szerepet játszik az immunválasz szabályozásában, a haemopoesisben, az akut-fázis reakcióban és gyulladási folyamatokban (Hirano, 1998). Az IL-6 gén (*IL-6*) emberben a 7-es kromoszóma rövid karján található, öt exonból és négy intronból épül fel (Yasukawa, 1987). A gén komplex felépítésű regulátoros szakasza és promótere jelentősen hozzájárul az IL-6 sokoldalú viselkedéséhez. Az *IL-6* promóterét több transzkripciós faktor is bekapcsolja, míg a szteroidok és a retinoblastoma-kontrollelem gátolják működését. Az IL-6 biológiai hatásait befolyásolják génjének allélikus változatai. Több élettani és kóros állapottal kapcsolatban leírták egyes allélek eltérő előfordulását. Mind a promóter, mind a struktúrgén területén található polimorfizmusok, amelyek közül kettővel kapcsolatban igen gazdag az irodalom. A gén 3' végén található változó számú tandem szekvencia (VNTR) egy multiallélikus polimorfizmus, míg a promóter -174-es pozíciójában egy G>C báziscserét találhatunk (Fishman, 1998). Ez utóbbi polimorfizmus kapcsolatát több betegséggel is leírták, amelyek között található az Alzheimer-kór, cardiovascularis és daganatos betegségek, csontritkulás, 2-es típusú diabetes mellitus,

szepszis és rheumatoid arthritis (áttekintését l. Papassotiropoulos, 2001). A -174 G>C SNP funkcionális aktivitását is jellemezték: a G allél jelenlétében az IL-1 β - vagy endotoxinstimulációra adott transzkripciós válasz fokozott volt a C allélhez képest (Fishman, 1998). Ugyanakkor ellentmondásos eredmények születtek azokban a vizsgálatokban, amelyekben kapcsolatot próbáltak keresni a -174 G>C polimorfizmus és a plazma IL-6-szintek között. Abban konszenzus mutatkozik, hogy különféle stimulusok után mért indukált IL-6-szintek magasabbak G allél jelenlétében, mint a CC genotípus esetén (Benneromo, 2004). A nyugalmi helyzetben mért IL-6-szintek és a -174-es SNP között viszont nincs kapcsolat. Ezek az eredmények együttesen magyarázhatják a korábbi ellentmondó tapasztalatokat.

Mindezek az ismeretek arra utalnak, hogy az IL-6 -174 GG genotípust hordozó személyek megnövekedett antitesttermeléssel válaszolhatnak antigén-expozíció esetén, mivel a magasabb IL-6-szintek erősebb B-sejt-aktivációt és -proliferációt okozhatnak. Erre utal Kuwana és munkatársai megfigyelése (Kuwana, 2000), amely szerint az *in vitro* keletkezett IgG-antitopoizomeráz I autoantitestek mennyiségét a T-sejt-help határozta meg, ami az IL-6-szintekkel volt szoros összefüggésben. Ezt a hipotézist az is alátámasztja, hogy szisztémás sclerosisban szenvedő betegekben a poliklonális B-sejt-aktivációt magas IL-6-szintek kísérik (Sato, 2004). Ezzel teljesen összhangban saját vizsgálatunkban is hasonló eredményeket kaptunk: a poliszisztémás autoimmun betegségben szenvedők közül a szisztémás sclerosisban és a nem differenciált kötőszöveti betegségben szenvedőkben észleltünk emelkedett anti-Hsp60- és anti-Hsp65-antitest-szinteket (Horváth L, 2001). Ehhez hasonló eredményeket már a 90-es évek elején is közöltek szisztémás sclerosisban, és különösen annak progresszív formájában emelkedett anti-Hsp65-antitest-szinteket mértek olasz kutatók (Danieli, 1992). Ezeket az eredményeket összevetve igen valószínű, hogy a szisztémás sclerosis patogenezisében fontos szerepet játszanak az anti-Hsp65-antitestek, amelyek feltehetően kedvezőtlen genetikai tényezőket (például magas IL-6-termelésre hajlamosító IL-6 -174 GG genotípus) hordozó személyekben a krónikus bakteriális infekciók (légúti betegségek, *H. pylori*) fellépése nyomán jelennek meg. Nem lehet azonban kizárni azt sem, hogy az IL-6 gén -174-es polimorfizmusa része valamely nagyobb haplotípusnak, és az antitestek szintjét a haplotípus valamely más, ma ismeretlen tagja szabályozza.

2006-ig több, nem cardiovascularis betegségben is leírták, hogy az anti-Hsp60-autoantitestek vagy anti-Hsp65-antitestek emelkedett szinten fordulnak elő az adott állapotban. A 4. táblázatban összefoglalva láthatók ezek az eredmények. Az anti-Hsp60-autoantitestek szintjének összefüggése az IL-6 citokinnel irodalomkutatásra ösztönzött bennünket.

Megvizsgáltuk, hogy azokban a betegségekben, amelyekben emelkedett anti-Hsp60-antitest-szinteket közöltek, leírták-e az adott állapot összefüggését az IL-6-tal.

4. táblázat. Összefüggés egyes betegségek, anti-Hsp60-antitest-szintek és az interleukin-6-koncentráció között

Betegség	A betegség és emelkedett anti-Hsp60-antitest-szintek összefüggését bemutató munka	A betegség és az emelkedett IL-6-koncentráció kapcsolatát bemutató munka
<i>H. pylori</i> -val asszociált MALT lymphoma	Ishii, 2001 Takenaka, 2004	Hussell, 1993
Periodontitis	Tabeta, 2000	Okada, 1998
Guillan–Barré-szindróma	Yonekura, 2004	Aarli, 2003
Posztoperatív pitvarfibrilláció	Mandal, 2004	Gaudino, 2003
1-es típusú diabetes mellitus	Abulafia-Lapid, 2003 Weitgasser, 2003	Kristiansen, 2003
SLE, thromboticus szövődmények	Dieude, 2004	Cross, 1999
Zajártalom, hallásvesztés	Yang, 2004	–
Takayasu-arteritis	Kumar-Chauhan, 2004	Noris, 1999
Schizophrenia	Wang, 2003	Schwartz, 2000
Akut anterior uveitis	Cancino-Diaz, 2004a	Bardak, 2004
Psoriasis vulgaris	Cancino-Diaz, 2004b	Elkayam, 2000
Szisztémás sclerosis	Danieli, 1992	Scala, 2004
Behcet-kór	Tanaka, 1999	Adam, 2004

A 4. táblázatban bemutatott vizsgálatok és áttekintő cikkek tanúsága szerint a feltüntetett betegségek közös jellemzői az emelkedett anti-Hsp60-autoantitest-szintek és IL-6-koncentrációk. Két betegséggel kapcsolatban ismert az is, hogy a –174-es promóterpolimorfizmus összefüggésben van az adott állapottal: 1. a diabetes mellitus pubertásban megjelenő formájában a –174 GG genotípus gyakoribb előfordulását észlelték, ami magasabb IL-6-szinttel járhat; 2. motoros szív-műtétet követően a –174 GG-hordozókban magasabb IL-6-szintet, fokozott gyulladásozó válaszreakciót és gyakoribb pitvarfibrillációs szövődményt észleltek.

Ezek az eredmények és összefüggések teret engednek annak, hogy feltételezzük, általános jellegű összefüggés lehet az IL-6 –174-es polimorfizmus, stimulust/gyulladást követő emelkedett csúcs-IL-6-koncentrációk és a megnövekedett anti-Hsp60-autoantitest-szintek között. Feltételezésünk szerint a szervezetet ért károsodást követő gyulladásozó reakció során egy túlzott IL-6-válasz erős B-sejt-aktivációt és antitesttermelést okozhat. Ebben az esetben a természetes antitestek regulálólóhálózata felbomlik, ami lehetőséget ad autoagresszió kibontakozásának és a szervezet integritását visszaállító gyulladásozó folyamatok kisiklásának.

A munkatervben szerepelő koronária betegek, PTCA-n átesett személyekre és az anti-Hsp60 antitestek regulációjára vonatkozó vizsgálatainkat csak részben sikerült a pályázat időtartama alatt elvégezni. Lezárult a mintagyűjtés és feldolgozás, továbbá az anti-Hsp60 antitestek mérése. A genetikai polimorfizmus meghatározások azonban elhúzódtak, így eddig nem valósulhatott meg szabályozó szerepük vizsgálata. Ezek az analízisek jelenleg is folyamatban vannak.

2. célkitűzés

Emberi köldökzsinórvérben kimutathatók IgM-anti-Hsp60-autoantitestek

Az egészséges újszülöttek köldökzsinór-szérummintájában detektálható anti-Hsp60-autoantitestek vizsgálatára kollaborációs vizsgálatot szerveztünk a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársaival. Konszekutív módon, tájékozott beleegyezést követően 51 fiatalasszony vett részt a vizsgálatban, a vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. Az anyák életkora 28 (medián) év volt (tartomány 17–41), 45%-uk soha nem dohányzott, 42% korábban dohányzott, 13% a terhesség alatt is dohányzott. A vizsgálat résztvevői egészséges, érett újszülöttet (51% leány) hoztak világra komplikációmentes terhességet követően spontán hüvelyi szüléssel. Az 51 újszülöttől a születés után közvetlenül a köldökzsinórvénából történt a mintavétel, míg az édesanyáktól a szülést követő 12 órán belül standard vénás vérvétel történt. A szérummintákat közvetlenül a mintavétel után centrifugálással szeparáltuk és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

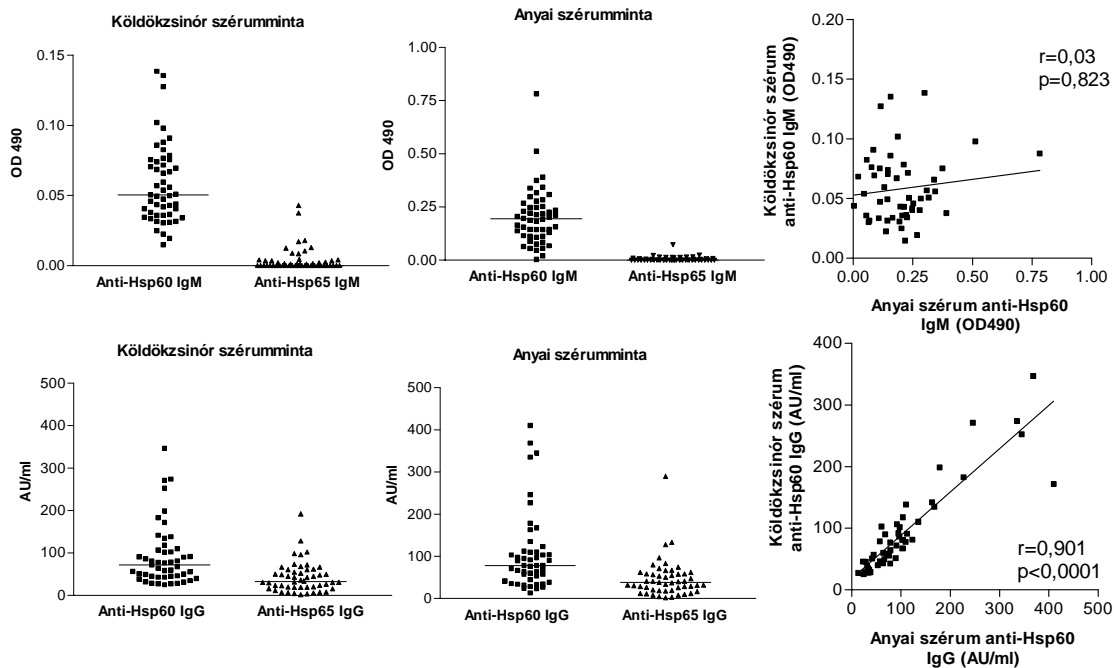
A szérummintákból össz-IgG- és -IgM-meghatározást végeztünk. Tekintettel arra, hogy a köldökzsinórvérben az IgG és IgM a hagyományos, felnőttkori értékekre beállított mérések szerint mérés határ alattiak mutatkoztak, saját ELISA-mérést állítottunk be. Ennek során az ELISA-lemezeket egér antihumán IgG-, illetve IgM-ellenanyagokkal fedtük, majd a mintával történt inkubáció után nyúl antihumán IgG-, illetve IgM-peroxidáz-konjugátumokkal hívtuk elő. Standardnak tisztított emberi IgG- és IgM-preparátumokat használtunk. Meghatároztuk továbbá az anti-Hsp60-, valamint az anti-Hsp65-IgG- és IgM-specifikus antitestszinteket ezekben a mintákban.

Az IgM-anti-Hsp60-méréseket $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Hsp60-nal fedett ELISA-lemezeken végeztük, a mintával való inkubáció $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történt, majd a lemezeket nyúl antihumán IgM-POX- és anti-nyúl-IgG-POX-konjugátumokkal hívtuk elő a specifikus jel felerősítése céljából. Az IgM-meghatározáshoz nem rendelkezünk standardként használható, magas titerű szérummintával, így ezeknek a méréseknek az eredményeit OD-értékben fejeztük ki. Az összes minta mérése

egy napon, két ELISA-lemezen történt, a két lemez között – az ismételt minták tanúsága szerint – nem volt különbség, így normalizálásra nem volt szükség.

Az anyai szérummintákban 8,17 g/l (6,7–9,54) össz-IgG-koncentrációt találtunk, míg a köldökzsinór-szérummintákban ez az érték 9,93 g/l (8,61–11,8) volt. Az össz-IgM vonatkozásában a következő értékeket kaptuk: anyai minták 1,56 g/l (0,86–2,2), köldökzsinórminták: 0,073 g/l (0,056–0,103). Ezek az adatok az ismert (életkor szerinti) fiziológiás értékeknek megfelelnek.

A 1. ábrán a specifikus, anti-Hsp60- és anti-Hsp65-antitest-szinteket tüntettük fel. Minden anyai és köldökzsinórmintában ki tudtunk mutatni IgM és IgG típusú anti-Hsp60-autoantitestet. Az IgG-anti-Hsp60-autoantitestek az anyai és köldökzsinórmintákban igen szoros korrelációt mutattak egymással, ami megfelel annak az irodalmi ismeretnek, hogy az anyai IgG a placentán átjutva megjelenik a magzat keringésében.



1. ábra. Az anti-Hsp60-autoantitestek és anti-Hsp65-antitestek előfordulása anyai és köldökzsinórvér-mintákban. Az ábrán párhuzamos mérések háttérrel korrigált átlagai vannak feltüntetve

Ezzel szemben az IgM nem jut át a placentán. Eredményeink, amelyek szerint nincs korreláció a magzati és anyai anti-Hsp60-IgM-szintek között, arra utalnak, hogy eltérő tényezők szabályozzák az anyában és a magzatban ezeknek az antitesteknek a mennyiségét. IgM-anti-Hsp65-antitestet az anyai szérummintákban nem találtunk, a köldökzsinórminták közül kilencben mértünk igen alacsony reaktivitást. Ezek az eredmények megfelelnek annak a vizsgálati kritériumunknak, hogy csak egészséges, fertőzésen aktuálisan át nem esett személyeket vontunk be. Nem találtunk szignifikáns korrelációt sem az anyai IgG-anti-Hsp60 és IgM-anti-Hsp60 között, sem a magzati IgG-anti-Hsp60 és IgM-anti-Hsp60 között.

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy egészséges újszülöttek köldökzsinórvérében kimutatható IgM-alsztályba tartozó anti-Hsp60-autoantitesteket. Az antitestek mennyisége független volt az anyai antitestek és az anti-Hsp65-antitestek mennyiségétől. Mindezek arra utalnak, hogy az anti-Hsp60 autoantitestek a természetes

autoantitest repertoárba tartozhatnak, idegen antigén stimuláció nélkül, veleszületett módon (természetes autoimmunitás) jellemzőek az adott egyénre.

Ezeket az eredményeinket a Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlésén és a 2005. évi Semmelweis Symposiumon előzetesen már bemutattuk, az eredményeket tartalmazó kéziratot azonban sajnálatosan több újság is visszautasította, így az eredmények nyomtatott formában még nem jelenhettek meg. A kézirat jelenleg a BMC Immunology c. laphoz van beküldve bírálatra.

3. célkitűzés

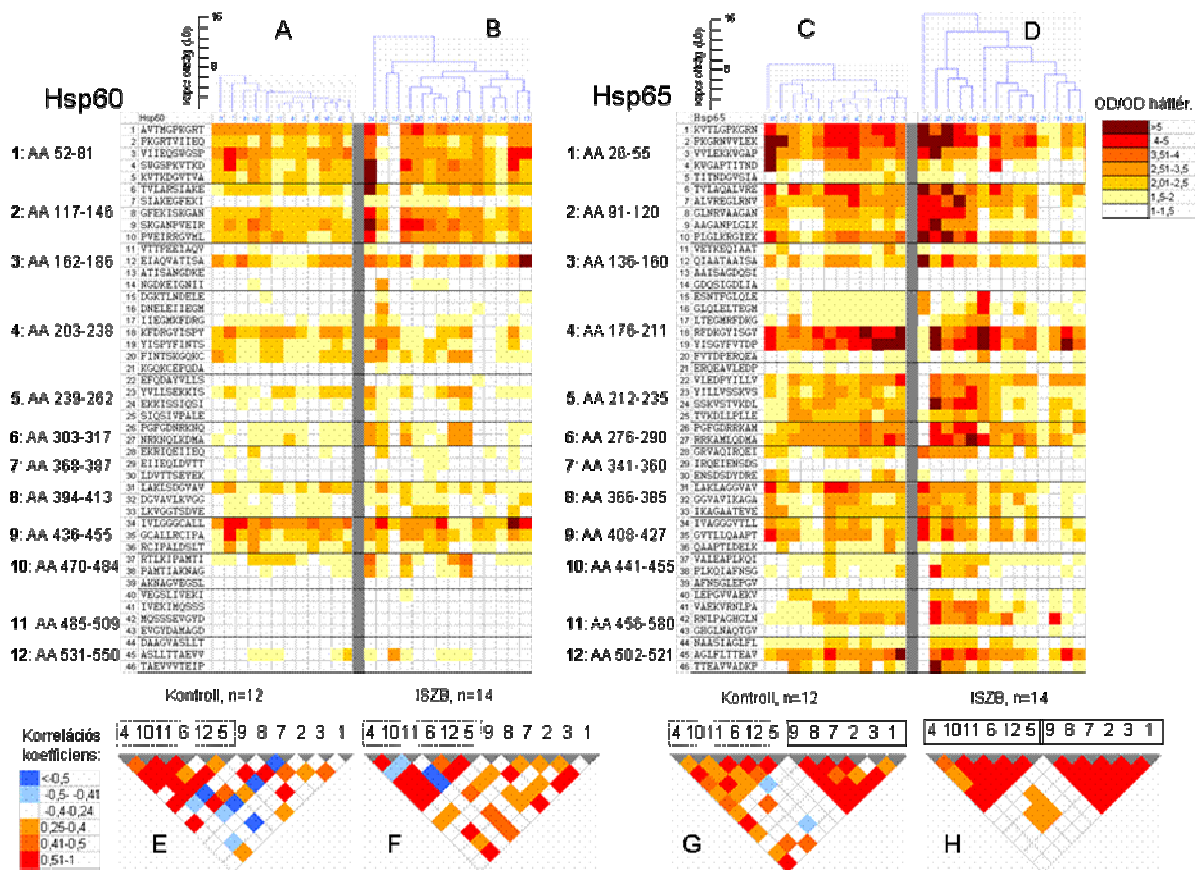
Az anti-*M. bovis*-Hsp65- és anti-humán Hsp60-autoantitestek közötti különbségek elemzése

Korábbi eredményeink megerősítették, hogy a Hsp60 elleni antitestek emelkedett szintje mutatható ki coronariabetegségben (Prohászka et al, 2001). A bakteriális és humán Hsp60 antigénnel reagáló antitestek – az irodalomban elsőként általunk elvégzett – összehasonlító vizsgálata azonban érdekes, további munkahipotézisünket megalapozó megfigyelést eredményezett. Az eredeti hipotézis (Wick 1995) ugyanis azt feltételezte, hogy a Hsp60-autoantitestek úgynevezett keresztreakáló antitestek, amelyek az élet során elszenvedett infekciók ellen védő immunválasz nyomaként maradnak vissza. A bakteriális és humán Hsp60-ellenes antitestek közötti gyenge korreláció és a Hsp60-autoantitestek *H. pylori*-fertőzéstől független előfordulása arra készítette bennünket, hogy alaposabb elemzésnek vessük alá ezeket az antigéneket és antitesteket.

Korábbi eredményeink szerint (Prohászka 1999) a Hsp60 képes a humán komplementrendszer a klasszikus reakcióúton aktiválni. Az aktiváció beindítói a Hsp60-IgG immunkomplexek, ugyanis nem tudtunk kimutatni komplementaktivációt agammaglobulinaemiás szérummintában, és a komplementaktiváció (C4b-kötődés) mértéke igen erős összefüggést mutatott az anti-Hsp60-IgG mennyiségével. Ezzel szemben a *M. bovis*-Hsp65 csak gyenge komplementaktivátornak bizonyult, és az anti-Hsp65-IgG-antitestek nem mutattak szoros összefüggést a komplementaktiváció mértékével. Jelen pályázatunk 3. célkitűzésében ezért megvizsgáltuk, hogy kimutathatók-e különbségek – a nagyfokú szekvenciaazonosság ellenére – a két molekula epitópstruktúrájában.

A humán és a *M. bovis* Hsp60 molekulák lineáris B-sejt-epitópjainak összehasonlító térképezését átfedő peptidsorozatok segítségével végeztük el. Az alkalmazott módszereket korábban kidolgoztuk (Uray et al, 2003). A két fehérje ismert aminosavsorrendjének megfelelően számítógépes modellezés segítségével elvégeztük a várhatóan B-sejt-epitópként viselkedő szakaszok predikcióját. Ezeket a szakaszokat béta-kanyar-struktúra és alacsony

hidrofobicitás jellemzi. A kiválasztott szakaszok szintetizálása polietilén tűhegyen zajló szilárd fázisú peptidszintézissel történt, amelynek során Fmoc/*t*Bu eljárást alkalmaztunk. 10-es hosszúságú, 5 aminosavval átfedő peptideket készítettünk el két blokkon (2×96 tűske), ami a kontrollok levonása után 46-46 iker peptidpárt jelent a Hsp60 és Hsp65 szekvenciájának megfelelően. A peptideket duplikátumként készítettük el, és mindig a két érték átlagával számoltunk. A peptidek elhelyezését a blokkokon (az esetleges szisztematikus hibát elkerülendő) úgy terveztük, hogy egymás mellé az „ikerpárok” kerültek. A Hsp60 és a Hsp65 összesen 10-10 szakaszt fedtük le az átfedő peptidekkel. Tekintettel arra, hogy a peptidek kovalens kötéssel kapcsolódnak a polietiléntűskékhez, azok ismételt használatára van lehetőség regenerálást követően. Tizenkét kontrollszemély (életkoruk 54,8 év, SD 2,9, négy nő) és 14 súlyos coronariabeteg (életkoruk 58,5 év, SD 7,3, három nő) mintáját vizsgáltuk meg a peptidsorozatok segítségével. A 2. *ábra* összehasonlításra alkalmas módon, részletesen taglalja az egészségesek és a coronariabetegek eredményeit. Az ábrán az egyre sötétebb színű mezők jelölik azokat a fehérjeszakaszokat, amelyek ellen antitestek fordulnak elő a vizsgált személyekben. A 10 összefüggő szakaszt lefedő peptidek legalább 12 olyan régiót tartalmaznak, amelyeket epitópoknak tekinthetünk. Ezeket az epitópokat arab számokkal jelöltük (1–12-ig), az aminosavszámozás feltüntetésé előtt.



2. ábra: Egészséges kontrollok és súlyos coronariabetegek anti-Hsp60 és anti-Hsp65 szérum-IgG-antitestjeinek B-sejt-epitóp-térképezése. Az ábra felső részén a kontrollok (A és C) és a betegek (B és D) antitestjeinek a 46 Hsp60-, illetve a 46 Hsp65-peptiddel mutatott reaktivitása van feltüntetve színskálán. A reaktivitást a következő módon számítottuk: a vizsgált peptid OD-ja osztva a legkisebb átlagos (háttér)reaktivitást mutató peptid OD-jával (a normalizálásra használt peptidek fehér vonalként jelennek meg az ábrán). Minden oszlop egy embert jelent, míg a sorokat az egymással átfedő peptidek jelölik. Mind a négy panel esetében (a könnyebb áttekinthetőség kedvéért) külön-külön vannak csoportosítva a vizsgált személyek klaszteranalízis segítségével. A kapcsoltság mértékét az LD (linkage distance) jelöli. Az ábra alsó részén az egyes epitópok reaktivitásának egymással mutatott korrelációja van feltüntetve. A színskódolás a korrelációs együtthatók értékének megfelelően történt, az $r > 0,5$ (és $r < -0,5$) minden esetben igen erős, szignifikáns összefüggés volt ($p < 0,0001$), míg a $0,4 < r < 0,5$ (és $-0,4 < r < -0,5$) esetekben mérsékelt ($0,01 < p < 0,05$) összefüggés mutatkozott. A korrelációs számítás a kontrollok (E és G) és betegek (F és H) esetében külön-külön tüntettük fel. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért klaszteranalízissel csoportosítva vannak a hasonló viselkedésű epitópok. A 12 antitest-reaktivitást mutató régió (epitóp) legerősebben reagáló peptidje került kiválasztásra a korrelációs számításhoz (ezek az 1., 9., 12., 18., 23., 26., 28., 31., 34., 37., 42., 45. peptidek voltak). A korrelációs számítás a „nyers” OD/OD háttérértékekkel történt, és olyan esetben is adhat erősen szignifikáns összefüggést, ha egy adott epitóphoz csak háttér körüli (1–1,5) reaktivitások tartoznak. Az ábra a melléklet végén is megtalálható.

Általában elmondható, hogy a Hsp65 peptidekkel erősebb reakciót mutatnak a szérumminták, mint a Hsp60-nal. A kontrollminták esetében az epitópok többségét keresztreakáló jellegűnek találtuk, azaz a Hsp65 peptidek és a homológ Hsp60 peptidek ellen is tartalmaznak a szérumok antitesteket (1, 2, 3, 4, 8, 9). Epitópoknak akkor tekintettünk egy régiót, ha tartalmazott egy peptidet, melynek a reaktivitása legalább kétszerese volt a háttér peptid reaktivitásának. Van öt olyan epitóp (5, 6, 7, 11, 12), amelyeket az egészséges szérumok lényegében csak a Hsp65 peptideken ismernek fel, a Hsp60-on nem, ezeket „Hsp65-specifikus” epitópoknak tekinthetjük. Mind a 11 régió esetében a Hsp65 peptidekkel erősebb reaktivitást mértünk, mint a Hsp60 peptidekkel. Egészségesekben a 10-es epitóp ellen nem mutathatók ki antitestek. A coronariabeteg csoportban ugyanezeket az epitópokat detektáltuk, mint keresztreakáló vagy „Hsp65-specifikus” epitópokat. A 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 8-as, 11-es és 12-es régiók esetében a minták erősebben reagáltak a Hsp65-, mint a Hsp60 peptidekkel.

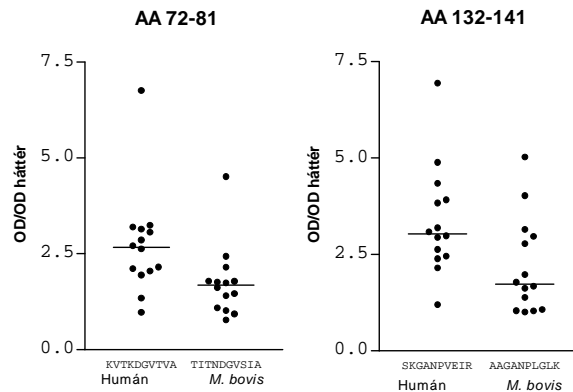
A kontrollminták és coronáriabetegek összehasonlítása esetén a Hsp60 1-es, 2-es és 3-as régiójában tapasztaltunk szignifikáns különbséget, ugyanakkor a teljes anti-Hsp60-IgG vonatkozásában igen erős különbség volt a két csoport között. A Hsp65 peptidek esetében az epitóp specifikus antitestek reaktivitása nem különbözött (kivétel a 7-es epitóp) a két csoport között. Ebben az esetben is lényeges, hogy a teljes anti-Hsp65-IgG mennyiségében nagy különbség volt kimutatható.

Az 2. ábra alsó részén az E és G panelek mutatják egészségesekben az egyes epitópokkal kapott reaktivitások korrelációit egymással, míg ugyanezt láthatjuk a coronariabetegek vonatkozásában az F és H paneleken. A piros és sötétnarancs színek jelölik a szignifikáns pozitív korrelációt, míg a sötétkék a szignifikáns negatívot. Az epitópok sorrendjének elrendezése, vagyis a hasonlóan viselkedő csoportok kialakítása klaszteranalízis segítségével történt. Az egyes klasztereknek megfelelő epitópok számai téglalappal vannak körbevéve. A legerősebb kapcsoltságot a H panel adatai esetében észleltük, az itt kialakított klaszterek szerint vannak bemutatva az E, F és G panel adatai.

A Hsp65 epitópok és a kontrollcsoport esetében két jól elkülönülő blokkot figyelhetünk meg (G panel). Az egyik a 9, 8, 7, 2, 3, 1 epitópokból áll, amelyek részben összefüggésben állnak a 4-es epitóppal. A másik blokk a 4-es, 10-es, 11-es, 6-os, 12-es és 5-ös epitópokból áll. Érdekes, hogy az első blokkban található a keresztreakáló, míg a másodikban a „Hsp65-specifikus” epitópok. A Hsp60 epitópoknál nem figyelhető meg blokkok kialakulása a kontrollminták esetében, az 5-ös, 6-os, 10-es, 11-es, 12-es epitópok ellen igen alacsony az antitestek szintje és az 1-es, 2-es, 3-as, 8-as, 9-es epitópok sem mutatnak egymással szoros kapcsolatot (E panel).

Ez a helyzet azonban megváltozik a súlyos coronariabetegek mintái esetében. A betegek szérumainak reaktivitása a Hsp65 peptideken még kifejezettebb (D panel), és az egyes epitópok közötti összefüggés is erősebbé válik (H panel). Jobban elkülönülnek a G panelen látható blokkok. A két blokk tagjai között csak gyenge kapcsolat mutatható ki (2-es, 7-es, 8-as és 6-os, 11-es között). Ezzel szemben a Hsp60 epitópok és a coronariabeteg csoport esetén erősödik a 4-es, 10-es, 6-os, 12-es és 5-ös epitópokból álló blokk tagjai között a kapcsolat a kontrollcsoporthoz képest (F panel). Ez a blokk viszont jelentős összefüggést mutat az 1-es, 2-es, 3-as epitópokkal (amelyek megerősödését láthattuk a Hsp65 esetén). Más szóval: a betegekben jellemzően együtt fordulnak elő ezek az antitestek. Ezt támasztja alá az is, hogy a Hsp60 1-es, 2-es, 3-as epitópokkal szemben szignifikánsan emelkedett az antitestek szintje a betegekben az egészségesekhez képest. Ugyanezek a keresztreakáló antitestek erősen kapcsolódnak a Hsp65 1-es, 2-es, 3-as epitópjaival is. Ezekkel szoros összefüggésben a Hsp65 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 10-es, 11-es és 12-es epitópok ellen is fokozott mértékben jelennek meg antitestek a betegekben.

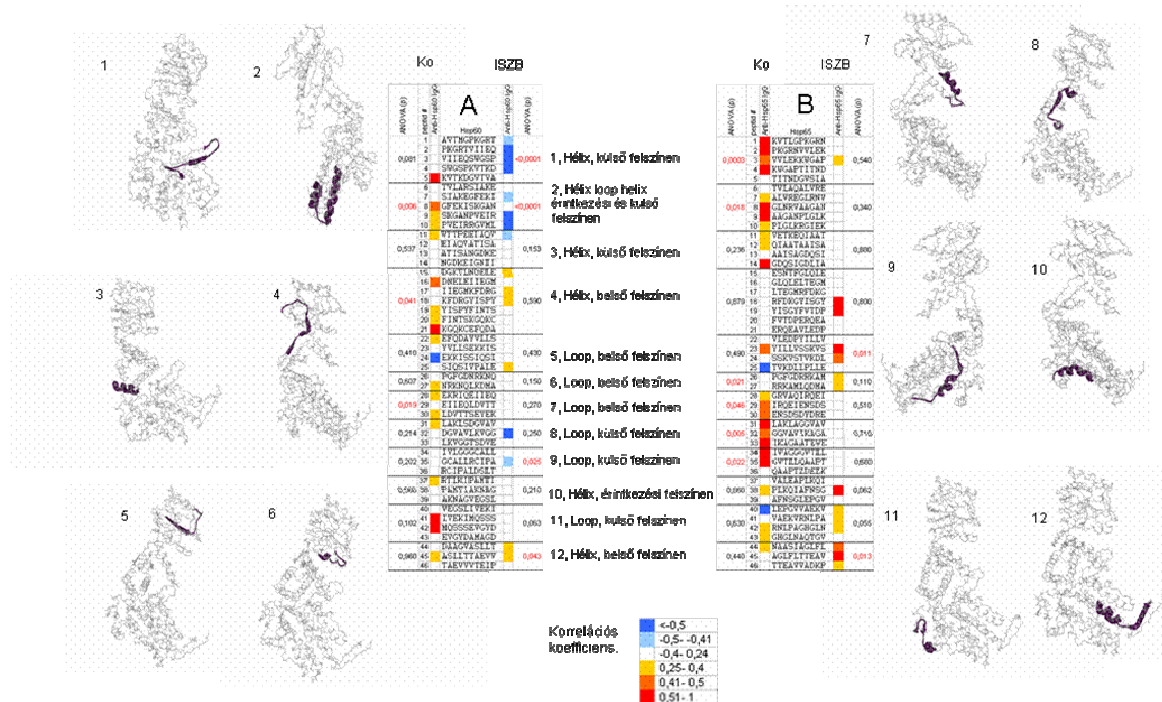
A keresztreakáló antitestek túlnyomó többségben vannak az egészségesekben és a betegekben is azon antitestekhez képest, amelyek erősebben („specifikusan”) reagálnak az ikerpeptidek humán megfelelőjével. Két olyan epitópot jellemeztünk az egészségesek mintáiban korábban, amelyek erősebben ismerik fel a humán epitópokat, mint a bakteriálisat [az 1-es és 2-es epitópok egy-egy részét (AA67-81 és 132-141 a Hsp60 molekulán)]. Megvizsgáltuk a két szakasz (és bakteriális homológjaik) ellen az antitestek szintjét coronariabetegekben is (3. *ábra*).



3. ábra. 14 coronariabeteg szérumantitestjeinek reaktivitása „humán specifikus” Hsp60 és Hsp65 epitópokkal. A bal oldali panelen az 1-es epitóra, míg a jobb oldalon a 2-es epitóra lokalizálódó peptid adatai láthatók ($p=0,0134$, illetve $0,0017$). Az adatok az 5. ábrán bemutatott eredmények részét képezik. Az antitestek kimutatása a tühegyekhez kötött peptidek segítségével történt

Eredményeink azt mutatják, hogy hasonlóan az egészségesek mintáihoz, a betegekben is jelen vannak azok az antitestek, amelyek a jelzett két régióban a peptidek közül a humán homológokat ismerik fel erősebben. Ezek az antitestek fokozott mértékben jelennek meg a betegekben. A két régió része egy-egy nagyobb szakasznak, amelyeken a fehérjék N-terminálisa felé elhelyezkedően keresztreakáló epitópokat találtunk.

Az epitóptérképezéshez felhasznált 12 kontroll és 14 beteg mintájában megmértük a teljes anti-Hsp60-IgG és anti-Hsp65-IgG mennyiséget is. A 4. ábra mutatja be, hogy az egyes epitópok esetében mért reaktivitások és a teljes fehérje esetén kapott AU/ml értékek milyen összefüggést (korrelációt) mutatnak.



4. ábra. Az anti-Hsp60-IgG- és anti-Hsp65-IgG-antitestek korrelációja az egyes epitóprégiókkal reagáló antitestekkel egészségesekben (n=12) és coronariabeteggekben (n=14). Az egymás melletti táblázatok a Hsp60 (A) és a Hsp65 (B) szekvenciájának megfelelően szintetizált peptidok adatait mutatják. A peptidok mellett bal oldalon a kontrollszemélyek (Ko), jobb oldalon az ischaemiás szívbetegek (ISZB) mintáinak korrelációs eredményei vannak feltüntetve színezéssel jelölt skálán. Az ANOVA eredménye (p-értékek) az alacsony (<medián) és magas (\geq medián) össz-anti-Hsp60-IgG és össz-anti-Hsp65-IgG szerint bontott csoportok (Ko és ISZB) összehasonlítására vonatkozik. A táblázatok mellett feltüntetésre került, hogy az adott epitópszakasz a teljes molekula térbeli modelljén hol helyezkedik el.

Lényeges különbségek figyelhetők meg az össz-anti-Hsp60- és össz-anti-Hsp65-antitestek epitópreaktivitásokkal mutatott korrelációs tulajdonságaiban. Egészségesekben az anti-Hsp60 autoantitestek csaknem minden epitóprégió valamely peptidjével mutatnak gyenge, pozitív összefüggést (legerősebben a 2-es, 4-es és 7-es régiókban). Sok esetben azonban nem tapasztalható összefüggés ott, ahol egyébként kimutatható epitópspecifikus antitest van. A betegekben ez a kép teljesen megváltozik, az 1-es, 2-es, 8-as és 9-es epitópoknak megfelelően negatív korrelációt észlelhetünk, míg gyenge pozitív összefüggés jelenik meg a 4-es, 5-ös és erősebb a 12-es epitópok területén.

A Hsp65 epitópok és az anti-Hsp65-IgG összefüggésében teljesen eltérő kép ábrázolódik. Egészségesekben a korábbiakban keresztregálónak jellemzett 1-es, 2-es, 3-as, 8-as, 9-es epitópok elleni antitestek és a teljes anti-Hsp65 között mutatható ki erős korreláció. Ezek az epitópok kivétel nélkül külső lokalizációban helyezkednek el a tetradecamer molekula térbeli modelljén. A coronariabeteggekben ezzel szemben a 4-es, 5-ös, 10-es, 12-es epitópokkal reagáló antitestek és az anti-Hsp65-IgG között mutatkozik erős pozitív összefüggés (és

gyengébb a 6-os és 11-es régió peptidjeivel). Ezek az epitópok (a 4-es kivételével) a korábban „bakteriális Hsp-specifikus” epitópokat tartalmazó blokkhoz tartoztak, és a 11-es kivételével, a tetradecamer molekula belső, a foldingban közvetlenül szerepet játszó üregének felszínén helyezkednek el.

Az epitóp vizsgálatokra vonatkozó eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük: A humán Hsp60 és *M. bovis*-Hsp65 összehasonlító B-sejt-epitóp-térképezése során 12 epitóprégiót lehetett jellemezni egészségesek mintáival. Az epitópok többsége mindkét molekulán megtalálható volt, azonban voltak olyan epitópok, amelyek csak a humán Hsp60-on, míg mások csak a Hsp65-ön voltak jellemezhetőek.

Egészségesekben domináltak az olyan epitópspecifitású antitestek, amelyek a tetradecamer molekula külső felszínét ismerik fel.

Coronariabetegekben a fokozott anti-Hsp60- és anti-Hsp65-antitest-válasz az epitópok szintjén is kimutatható. A Hsp65 molekula B-sejt-epitópjai vonatkozásában epitópspreading jelenséget észleltünk.

Coronariabetegekben az epitópspreading kiterjedt olyan antitestek megjelenésére, amelyet a tetradecamer molekula belső felszíne ellen irányulnak.

Ezen eredményeinket bemutattuk a Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlésén és az Semmelweis Symposiumon, a kézirat összeállítása jelenleg is tart, várható közlés 2008-ban.

4. Célkitűzés

A humán indukálható Hsp70, a konstitutív Hsc70, a Hsp70 N-, ill. C-terminálisát reprezentáló fragmensek és a M. bovis 70kD antigén komplementaktiváló képességének jellemzése összehasonlító módon.

Korábbi, 2002-ben publikált munkánk képezte alapját munkahipotézisünknek a Hsp70 fehérje komplementaktiváló képességének további vizsgálatához. Kísérleti stratégiánkat arra építettük, hogy a Hsp70 direkt C1q kötés révén képes aktiválni a klasszikus reakciút. A kísérletek megkezdése után észleltük, hogy a rekombináns úton előállított, és endotoxin mentesként árult Hsp70 készítmények kevés, de változó mennyiségű endotoxinszennyezést mégis tartalmaznak (<10 EU LPS/mg fehérje -92630 EU/mg tartomány). Ez a szennyezés nem volt elhanyagolható, sajnálatosan szoros összefüggést mutatott a készítmények C1q kötő képességével és a C1q-haemolitikus tesztben kimutatható gátló képességgel. A valóban endotoxin mentes Hsp70 fehérjének gyenge a C1q kötő képessége. Emiatt nagy valószínűséggel, ha a C1q-nak van is bármi szerepe is a

Hsp70 indukálta komplementaktivációban, annak biológiai jelentősége feltehetően csekély. A kevés biológiai konzekvenciával kecsegtető kísérletekkel ezért felhagytunk, és szabad energiánkat a Hsp70 klinikai jellegzetességeinek vizsgálatára fordítottuk. Beállítottunk egy szendvics ELISA mérést a solubilis, szérumban kimutathat Hsp70 mérésére, és ezt a mérést patológiás terhességben (preeclampsia és HELLP szindróma) és kontroll terhésekben elvégeztük. Eredményeink szerint (Molvarec et al, 2006 és Molvarec et al 2007a és 2007b) a Hsp70 szérum szintje jelentősen emelkedett preeclampsziában, HELLP szindrómában egészséges terhésekhez képest, míg a normál terhésekben a nem terhes nőkhöz képest csökkent szinteket mértünk. Eredményeink szerint a Hsp70 egyértelmű összefüggést mutat a sejtkárosodás és a szöveti stressz mértékével. A jelen pályázat kereteiben végzett vizsgálataink kiindulási alapot jelentenek további kísérletekhez, melyekben komplementaktivációs termékeket mérünk majd az eltett mintákban. Ezekkel a kísérletekkel újabb megvilágításba helyezhetjük a Hsp70 komplementaktivációban játszott szerepét, hiszen az *in vivo* tett klinikai összefüggéseket nem torzítják a mérési technikákból származó szennyeződések.

A komplementrendszer további vizsgálatára vonatkozó két *in vitro* eredményeken alapuló cikket is publikáltunk a pályázati periódus alatt (Udvarnoki et al, 2007 és Bíró et al, 2007), míg egy jelentősebb klinikai tanulmányban (Széplaki et al, 2007) komplement szabályozó fehérjék és komplement faktorok szintjének prediktív értékét állapítottuk meg carotis endarterectomia után. Ezek a vizsgálatok szintén értékes adatokat szolgáltatnak majd a Hsp70-komplementaktiváció kérdés további vizsgálatához.

Egyéb, a pályázatban eredetileg nem tervezett munka leírása

2006 folyamán a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Intézetének munkatársaival közösen egy *in silico* analízis adatait felhasználva a hősokkfehérjék immunológiai tulajdonságainak újszemléletű elemzését és bemutatását valósítottuk meg (Nardai et al, 2007). Bár ehhez a vizsgálathoz – tekintettel a kísérletes munka hiányára - konkrét anyagi támogatást a pályázat nem jelentett, azonban a pályázati támogatás tényét feltüntettük, mert tematikáját tekintve a tárgykörhöz (hősokkfehérjék immunológiai jellemzése) tartozó hipotézis és eredmények kerültek bemutatásra.

Irodalmi hivatkozások:

- Aarli JA. **2003**. Role of cytokines in neurological disorders. *Curr Med Chem* 10(19):1931-7.
- Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. **2003**. T cells and autoantibodies to human Hsp70 in type 1 diabetes in children. *J Autoimmun* 20:313-321.
- Adam B, Calikoglu E. **2004**. Serum interleukin-6, procalcitonin and C-reactive protein levels in subjects with active Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18(3):318-20.
- Bardak Y, Aridogan BC. **2004**. The demonstration of serum interleukin 6-8, tumor necrosis factor-alpha, complement, and immunoglobulin levels in Behcet's disease with ocular involvement. *Ocul Immunol Inflamm* 12(1):53-8.
- Bene L, Füst G, Huszti Z, Hernádi Zs, Fekete B, Mészáros M, Veres A, Kovács Á, Miklós K, Singh M, Romics L, Prohászka Z. **2002**. Impaired humoral immune response against mycobacterial 65 kDa heat shock protein (hsp65) in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 47(7):1432-1437.
- Benneromo M, Held C, Stemme S, Ericsson CG, Silveria A, Green F, Tornvall P. **2004**. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: Implications for a variety of major diseases? *Clin Chem* 50:2136-2140.
- Bíró A, Rovó Z, Papp D, Cervenak L, Varga L, Füst G, Thielens NM, Arlaud GJ, Prohászka Z. Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. *Immunology*. 2007; **121**(1): 40-50.
- Cancino-Diaz JC, Ruiz-Gonzalez V, Ramirez-Resendiz L et al. **2004b**. IgG class antibodies from psoriasis patients recognize the 60 kDa heat shock protein of *Streptococcus pyogenes*. *Int J Dermatol* 43:341-347.
- Cancino-Diaz JC, Vargas-Rodriguez L, Grinberg-Zylberbaum N et al. **2004a**. High levels of IgG class antibodies to recombinant HSP60 kDa of *Yersinia enterocolica* in sera of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 88:247-250.
- Cross JT, Benton HP. **1999**. The roles of interleukin-6 and interleukin-10 in B cell hyperactivity in systemic lupus erythematosus. *Inflamm Res* 48(5):255-61.
- Danieli MG, Candela M, Ricciati AM et al. **1992**. Antibodies to mycobacterial 65 kD heat shock protein in systemic sclerosis (scleroderma). *J Autoimm* 5:443-452.
- Dieude M, Senecal JL, Raymond Y. **2004**. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 50:3221-3231.
- Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Yaron M, Caspi D. **2000**. Serum levels of IL-10, IL-6, IL-1ra, and sIL-2R in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 19(3):101-5.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. **1998**. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-1376.
- Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R. **2003**. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation* 108(1Suppl):II 195-9.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T. **1986**. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
- Hirano T. **1998**. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284.
- Horváth L, Cervenak L, Fekete B, Jakab L, Prohászka Z, Romics L, Singh M, Doha MR, Füst G. **2001**. Levels of antibodies against C1q and 60 kD family of heat-shock proteins in the sera of patients with various autoimmune diseases. *Immunol Lett* 75:103-109.
- Horváth L, Cervenak L, Oroszlán M, Prohászka Z, Uray K, Hudecz F, Baranyi É, Madácsy L, Singh M, Romics L, Füst G, Pánczél P. **2002**. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunol Lett* 80(3):155-62.
- Hussell T, Isaacson PG, Spencer J. **1993**. Proliferation and differentiation of tumour cells from B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in vitro. *J Patol* 169(2):221-7.
- Huszti Z, Bene L, Kovács A, Fekete B, Füst G, Romics L, Singh M, Prohászka Z. **2004**. Low levels of antibodies against E. coli and mycobacterial 65 kDa heat shock proteins in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 53(10):551-5.
- Ishii E, Yokota K, Sugiyama T. **2001**. Immunoglobulin G1 antibody response to *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 is closely associated with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1056-1059.
- Kalabay L, Fekete B, Czirják L, Horváth L, Doha MR, Veres A, Fónyad G, Horváth A, Viczián Á, Singh M, Hoffer I, Füst G, Romics L, Prohászka Z. **2002**. *Helicobacter pylori* infection in connective tissue disorders

- is associated with high levels of antibodies to mycobacterial HSP65 but not to human human HSP60. *Helicobacter* 7(4):250-256.
- Kiszel P, Fust G, Pessi T, Hurme M, Prohászka Z. Associations between Interleukin-6 Genetic Polymorphisms and Levels of Autoantibodies to 60-kDa Heat-Shock Proteins. *Hum Hered.* 2006;**62**(2):77-83.
- Kristiansen OP, Nolsoe RL, Larsen L. **2003**. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet* 12(10):1101-10.
- Kumar-Chauhan S, Kumar-Tripathy N, Sinha N, Singh M, Nityanand S. **2004**. Cellular and humoral immune response to mycobacterial heat shock protein-65 and its human homologue in Takayasu's arteritis. *Clin Exp Immunol* 138:547-553.
- Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. **2000**. Analysis of soluble and cell surface factors regulating anti-DNA topoisomerase-I autoantibody production demonstrates synergy between Th1 and Th2 autoreactive T-cells. *J Immunol* 164:6138-6146.
- Mandal K, Jahangiri M, Mukhin M, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q. **2004**. Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 110:2588-2590.
- Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Fust G, Karadi I, Rigo J Jr. Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol.* 2007; **73**(2): 172-179.
- Molvarec A, Prohászka Z, Nagy B, Szalay J, Fust G, Karadi I, Rigo J Jr. Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens.* 2006 Oct;**20**(10):780-6.
- Molvarec A, Rigó J Jr, Nagy B, Walentin S, Szalay J, Füst G, Karádi I, Prohászka Z. Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2007; **74**(1-2): 163-169.
- Noris M, Daina E, Gamba S, Bonazzola S, Remuzzi G. **1999**. Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions? *Circulation* 100(1):55-60.
- Okada H, Murakami S. **1998**. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9(3):248-66.
- Pandey JP, Prohászka Z, Veres A, Füst G, Hurme M. **2004**. Epistatic effects of genes encoding immunoglobulin GM allotypes and interleukin-6 on the production of autoantibodies to 60-kDa and 65-kDa heat shock proteins. *Genes and Immunity* 5(1):68-71.
- Papassotiropoulos A, Hock C, Nitsch R. **2001**. Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:863-871.
- Prohászka Z, Bánhegyi D, Ujhelyi E, Karádi I, Füst G. **1998**. Antibodies against 60 kDa heat shock proteins in human immunodeficiency virus infection. In: Stress of Life from Molecules to Man. (ed.: P. Csermely) *Ann of NY Acad Sci* 851:94-98.
- Prohászka Z, Daha MR, Süsal C, Daniel V, Szlávik J, Bánhegyi D, Nagy K, Várkonyi V, Horváth A, Ujhelyi E, Tóth FD, Uray K, Hudecz F, Füst G. **1999**. C1q autoantibodies in HIV infection: Correlation to elevated levels of autoantibodies against 60 kDa heat-shock proteins. *Clin Immunol* 90(2):247-255.
- Prohászka Z, Duba J, Horváth L, Császár A, Karádi I, Szebeni A, Singh M, Fekete B, Romics L, Füst G. **2001**. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat-shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest* 31:285-292.
- Prohászka Z, Duba J, Lakos G, Kiss E, Varga L, Jánoskúti L, Császár A, Karádi I, Nagy K, Singh M, Romics L, Füst G. **1999**. Antibodies against human hsp60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement activating ability. *Int Immunol* 11:1363-1370.
- Prohászka Z, Duba J, Lakos G, Kiss E, Varga L, Jánoskúti L, Császár A, Karádi I, Nagy K, Singh M, Romics L, Füst G. **1999**. Antibodies against human hsp60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement activating ability. *Int Immunol* 11:1363-1370.
- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. **2001**. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358:1749-1753.
- Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. **2004**. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 41(12):1123-33.
- Scala E, Pallotta S, Frezzolini A. **2004**. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 138(3):540-6.
- Schwartz M, Silver H. **2000**. Lymphocytes, autoantibodies and psychosis-coincidence versus etiological factor: an update. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 37(1):32-6.

- Széplaki G, Varga L, Laki J, Dósa E, Rugonfalvi-Kiss S, Madsen HO, Prohászka Z, Kocsis A, Gál P, Szabó A, Acsády G, Karádi I, Selmei L, Garred P, Füst G, Entz L: Low c1-inhibitor levels predict early restenosis after eversion carotid endarterectomy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2756-62.
- Tabeta K, Yamazaki K, Hotokezaka H, Yoshie H, Hara K. **2000.** Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 120(2):285-93.
- Takenaka R, Yokota K, Mizuno M et al. **2004.** Serum antibodies to *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 correlate with the response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to eradication of *H. pylori*. *Helicobacter* 9:194-200.
- Tanaka T, Yamakawa N, Koike N. **1999** Behcet's disease and antibody titers to various heat-shock protein 60s. *Ocul Immunol Inflamm* 7(2):69-74.
- Udvarnoki K, Cervenak L, Uray K, Hudecz F, Kacs Kovics I, Spallek R, Singh M, Füst G, Prohászka Z. Antibodies against C-reactive protein cross-react with 60 kDa heat shock proteins. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(4): 335-341.
- Veres A, Prohászka Z, Kilpinen S, Singh M, Füst G, Mikko Hurme M. **2002.** The promoter polymorphism of the IL-6 gene is associated with levels of antibodies to 60 kDa heat-shock proteins. *Immunogenetics* 53:851-6.
- Wang XF, Wang D, Zhu W, Delrahim KK, Dolnak D, Rapaport MH. **2003.** Studies characterizing 60 kDa autoantibodies in subjects with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53:361-375.
- Weitgasser R, Lechleitner M, Koch T et al. **2003.** Antibodies to heat shock protein 65 and neopterin levels in patients with type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111:127-131.
- Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. **1995.** Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 16:27-33.
- Yang M, Zheng J, Yang Q et al. **2004.** Frequency-specific association of antibodies against heat shock proteins 60 and 70 with noise-induced hearing loss in Chinese workers. *Cell Stress Chaperones* 9:207-213.
- Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T. **1987.** Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* 6:2939-2945.
- Yonekura K, Yukota S, Tanaka S, Kubota H, Fujii N, Matsumoto H, Chiba S. **2004.** Prevalence of anti-heat shock protein antibodies in cerebrospinal fluids of patients with Guillan-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 156:204-209.