

HORVÁTI KATA

***Mycobacterium tuberculosis* immundomináns fehérjéből származtatható mesterséges peptidantigének, valamint antituberkulotikum konjugátumok szintézise és *in vitro* aktivitásuk vizsgálata**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Témavezető:

Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Dr. Horváth István Tamás egyetemi tanár

Budapest, 2009

Köszönetnyilvánítás

Doktori munkámat az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végeztem. Elsőként témavezetőmnek, Dr. Bősze Szilviának szeretnék köszönetet mondani áldozatos munkájáért. Ő ismertette meg velem a kémiai és biológiai módszereket és a tudományos munkán túl emberileg is példaképpemmé vált az elmúlt évek során.

Hálásan köszönöm Dr. Medzihradzky-Schweiger Hedvig értékes segítségét, akitől elsajátíthattam az analitikus gondolkodást és kritikai észrevételeivel mindvégig segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel, és tanácsaival fáradhatatlanul segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Hudecz Ferenc egyetemi tanárnak, hogy részt vehettem a kutatócsoport munkájában, továbbá azért, mert munkámat figyelemmel kísérte és támogatta.

Köszönöm a kutatócsoport minden tagjának, hogy az elmúlt évek alatt segítették munkámat. Köszönetet mondok Bacsa Bernadettnek és Bartos Ádámnak. Köszönöm továbbá Kiskó Máriának, hogy a kísérleti munkában segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Hollósi Miklós és Dr. Perczel András tanszékvezetőknek, hogy lehetővé tették számomra, hogy munkámat az ELTE Szerveskémia Tanszéken végezhessem.

Szeretném megköszönni az Alapítvány a Magyar Peptid és Fehérjekutatásért és a Richter Gedeon Centenárium Alapítvány anyagi támogatását, mellyel lehetővé tették, hogy munkámat nemzetközi konferenciákon is bemutathassam. Ezúton köszönöm az NKTH Magyar - Olasz és Magyar - Dél-Afrika Kormányközi Tudományos és Technológiai Együttműködés támogatását. Ennek keretében ismerhettem meg a Dr. Francesco Dieli (Department of Biopathology and Biomedical Methodologies, University of Palermo, Olaszország) vezette kutatócsoport munkáját és Dél-Afrikában Dr. Robert Wilkinson (Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town) kutatócsoportját.

Köszönöm végül családomnak és Dr. Brenner Barnabásnak, hogy mindvégig mellettem álltak és biztosították számomra a nyugodt hátteret.

Rövidítésjegyzék

A dolgozatban szereplő kémiai elnevezések helyesírásában az 1998-ban kiadott „Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához” című kiadvány ajánlásait követtem [1]. Az új szabályozás szerint az egyik legfontosabb változtatás a szerves kémiai nevek tagolásának egyszerűsítése (pl. „benzil-oxi-karbonil-amino-” helyett a „benziloxikarbonilamino-” alakot használjuk). Az aminosavak jelölésére az egy- és hárombetűs rövidítéseket egyaránt használtam. A peptidkémiai használatos rövidítéseket a Journal of Peptide Science kiadvány ajánlása [2] szerint alkalmaztam. A szövegben leggyakrabban alkalmazott rövidítések az alábbiak voltak:

2bzl	propinoil-CoA karboxiláz (EC 6.4.1.3)
Ag	antigén
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, szerzett immunhiányos tünetegyüttes
APC	antigene presenting cell, antigénprezentáló sejt
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette-Guèrin (vakcina)
BSA	bovine serum albumin, marha szérum albumin
Boc	benziloxikarbonil
Bzl (Bn)	benzil
CFP10	culture filtrate protein-10
CF-SE	5(6)-karboxifluoreszcein-diacetát <i>N</i> -szukcinimid-észter
CFU	colony forming unit, telepszám
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM	diklórmétán
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N'</i> -diizopropiletilamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid

DosR	dormancy regulon, dormanciáért felelős gének
DTH	delayed type hypersensitivity, késői típusú túlérzékenységi reakció
DUTPáz	deoxiuridin 5'-trifoszfát nukleotidohidroláz (EC 3.6.1.23)
EAK	poli[Lys(Glu _r -DL-Ala _m)] (ahol $m \approx 3,5$ és $i \leq 1$)
EC	enzyme classification, enzim osztályozás
EDT	etánditiol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzimmötött immunesszé
ELISpot	enzyme-linked immunospot, enzimmötött immunospot
EMB	etambutol
ESAT6	early secretory protein-6
ESI	electrospray ionizáció
EtOH	etanol
FACS	fluorescent-activated cell sorter, áramlási citométer
FCS	foetal calf serum, magzati borjú savó
FITC	fluorescein-5-isothiocyanate, fluorescein-5-izotiocianát (zöld)
Fmoc	9-fluorenilmetiloxikarbonil
HF	hidrogén-fluorid
HIV	human immunodeficiency virus, humán immundeficiencia vírus
HLA	humán leukocita antigén
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HPLC	high performance liquid chromatography, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration; koncentrációérték, amely a sejtek 50%-ának pusztulását okozza
IFN- γ	interferon-gamma
IgG	immunoglobulin G
IGRA	interferon-gamma release assay, termelt IFN- γ meghatározásán alapuló teszt
IL	interleukin
INH	izoniazid
KLH	keyhole limpet hemocyanin, mélytengeri csiga hemocianinja
M _{av}	átlag molekulatömeg

M _{mo}	monoizotópos molekulatömeg
MAP	multiple antigenic peptide
MBHA	4-metilbenzhidrilamin
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor, makrofág kolóniastimuláló faktor
MDR-TB	multi-drug resistant tuberculosis, multirezisztens tuberkulózis
MeOH	metanol
MHC	major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex
MIC	minimal inhibitory concentration, minimális inhibíciós koncentráció
MS	mass spectrometry, tömegspektrometria
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazolium) bromid (kolorimetriás teszt)
MWCO	molecular weight cut off, molekulatömeg szerinti áteresztőképesség
NEM	<i>N</i> -etilmaleimid
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidon
Op	olvadáspont
OT10	[TKPKG] ₂ , dituftsin
OT20	[TKPKG] ₄ , tetratuftsin
OVA	ovalbumin
PAS	<i>p</i> -aminoszalicilsav
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejtek
PBS	phosphate buffered saline, foszfát puffer fiziológiás sóoldat
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PDB	protein data bank, fehérje adat bank
PE	phycoerythrin, fikoeritrin (kromoprotein, vörös)
PHA	phytohaemagglutinin, fitohemagglutinin
PMA	phorbol-12-miristate-13-acetate, forbol-12-mirisztát-13-acetát
PP	peptide pool, peptidkeverék
PPD	purified protein derivative, <i>M. tuberculosis</i> szűrletéből származó tisztított fehérjekeverék
PriA	phosphoribosyl isomerase, foszforibozil izomeráz (EC 5.3.1.16)
PZA	pirazinamid

PZC, POA	pyrazinoic acid, pirazinkarbonsav
RP	reverse phase, fordított fázisú
R _t	retention time, retenciósi idő
RD	region of difference, különbségért felelős gének régiója
RIF	rifampicin
SAK	poli[Lys(Ser _i -DL-Ala _m)] (ahol $m \approx 3,5$ és $i \leq 1$)
SFC	spot forming colony, „pöttyformáló” kolónia
SFC/M	1 millió sejtre vonatkoztatott „pöttyformáló” kolóniák
SOC	sequential oligopeptide carrier, szekvenciális oligopeptid hordozó Ac-[Lys-Aib-Gly] ₄
STM	sztreptomycin
TB	tuberkulózis
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butil
TCR	T-cell receptor, T-sejt receptor
TFA	trifluoecetsav
TNF- α	tumor nekrozis faktor-alfa
Tos	tozil
TRIS	2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol
Trt	tritol
TST	tuberculin skin test, tuberkulin bőrpróba
TT	tetanus toxoid
WHO	World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	-2-
Rövidítésjegyzék	-3-
1. Bevezetés	-10-
2. Irodalmi áttekintés	-11-
2.1. A tuberkulózis és a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kórokozó	-11-
2.2. A tuberkulózis diagnosztikája és a kórokozó azonosítása	-17-
2.3. A tuberkulózis immundiagnóza	-18-
2.3.1. IFN- γ mérésén alapuló tesztek	-20-
2.3.2. Potenciális antigének a tuberkulózis immundiagnózisában	-22-
2.3.3. Az antigénbemutató és az antigénfeldolgozás folyamata	-26-
2.3.4. Szintetikus peptidok T-sejt választ indukáló aktivitása	-28-
2.3.5. Polimer és oligomer hordozók	-29-
2.4. A tuberkulózis kemoterápiája	-30-
2.5. A hatóanyagok irányított célbajuttatása	-33-
3. Célkitűzések	-36-
4. Eredmények	-38-
4.1. T-sejt epitópot tartalmazó peptidok és származékok előállítása és jellemzése a tuberkulózis fertőzés korai kimutatására	-38-
4.1.1. A 16kDa fehérjéből származó T-sejt epitóp peptidok és konjugátumok szintézise, analitikai jellemzése és antigenitásuk vizsgálata	-38-
4.1.2. Az Rv2654 immundomináns fehérje epitópszerkezetének feltérképezése	-46-
4.1.3. Az Rv1733c immundomináns fehérje epitópszerkezetének feltérképezése	-51-
4.2. Peptidok cisztein tartalmának meghatározása <i>N</i> -etilmaleimiddel	-55-
4.3. Antituberkulotikumot tartalmazó konjugátumok előállítása és <i>in vitro</i> funkcionális vizsgálata	-59-

4.4. <i>In silico</i> azonosított hatóanyagok antituberkulotikus aktivitása, citotoxicitása és sejtfelvételének vizsgálata	-66-
4.4.1. <i>In silico</i> azonosított DUT69 és DUT44 hatóanyagok peptidkonjugátumainak előállítása, jellemzése és antibakteriális hatása	-71-
5. Kísérleti rész	-73-
5.1. Kémiai kísérletek	-73-
5.1.1. A szintetikus munka során használt vegyszerek, műszerek	-73-
5.1.2. Peptidek szintézise Fmoc/ <i>t</i> Bu módszerrel	-75-
5.1.3. Peptidek szintézise Boc/Bzl módszerrel	-77-
5.1.4. Tuftsin-származékok szintézise	-78-
5.1.5. Tioéterkötést tartalmazó peptidkonjugátumok szintézise	-78-
5.1.5.1. Klóracetilezett hordozó molekulák szintézise	-78-
5.1.5.2. Cisztein tartalmú peptidek konjugációs reakciót megelőző dimerizációs vizsgálata	-79-
5.1.5.3. A tioéterkötés kialakítása	-80-
5.1.6. Antituberkulotikum – peptidkonjugátumok szintézise	-81-
5.1.6.1. Izoniazid (INH) – peptidkonjugátumok szintézise	-81-
5.1.6.2. <i>p</i> -Aminoszalicilsav (PAS) – peptidkonjugátumok szintézise	-82-
5.1.6.3. Pirazinamid (PZA) – peptidkonjugátumok szintézise	-82-
5.1.6.4. DUT69 – peptidkonjugátumok szintézise	-82-
5.1.6.5. DUT44 – peptidkonjugátumok szintézise	-83-
5.1.7. Peptidek és peptidszármazékok tisztítása	-84-
5.1.8. Peptidek, peptidkonjugátumok és hatóanyagok analitikai jellemzése	-84-
5.1.8.1. Analitikai RP-HPLC vizsgálatok	-84-
5.1.8.2. Aminosavanalízis	-84-
5.1.8.3. Peptidek cisztein tartalmának meghatározása <i>N</i> -etilmaleimiddel	-85-
5.1.8.4. Tömegspektrometria	-85-
5.1.8.5. Elemanalízis	-85-

5.1.8.6. Olvadáspont meghatározás	-85-
5.1.8.7. Spektrofluorimetria	-86-
5.2. <i>In vitro</i> kísérletek	-87-
5.2.1. Az <i>in vitro</i> kísérletek során használt vegyszerek, eszközök, műszerek	-87-
5.2.2. Sejtek izolálása, sejtvonalak fenntartása	-89-
5.2.2.1. PBMC (perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejtek) izolálása	-89-
5.2.2.2. Egér csontvelői sejtek preparálása és differenciáltatása	-89-
5.2.2.3. HepG2 – humán hepatoma sejtvonal fenntartása	-90-
5.2.2.4. MonoMac6 – monocita sejtvonal fenntartása	-90-
5.2.3. Az izolált PBMC sejtek stimulálása epitóp peptidekkel és konjugátumokkal	-91-
5.2.4. PBMC sejtek által termelt IFN- γ meghatározása ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel	-91-
5.2.5. PBMC sejtek által termelt IFN- γ meghatározása ELISpot (enzyme-linked immunospot) teszttel	-92-
5.2.6. PBMC sejtek stimulálása és az intracelluláris IFN- γ meghatározása áramlási citometriával	-93-
5.2.7. T-sejt proliferáció vizsgálata áramlási citometriával	-93-
5.2.8. T-sejt stimuláció vizsgálata CD25 korai aktivációs marker jelölésével	-94-
5.2.9. Minimális inhibíciós koncentráció (MIC) és telepszám (CFU) meghatározása <i>M. tuberculosis</i> és <i>M. kansasii</i> tenyészetben	-95-
5.2.10. Citotoxicitás és citosztatikus hatás vizsgálata kolorimetriás tetrazólium (MTT) teszt alkalmazásával	-96-
5.2.11. DUT44 hatóanyag sejtfelvételének vizsgálata MonoMac6 monocita sejtvonalon áramlási citometriával	-97-
Irodalomjegyzék	-98-
Összefoglalás	-117-
Summary	-118-

1. Bevezetés

A Föld lakosságának egyharmada fertőzött *Mycobacterium tuberculosis* baktériummal, mely az egyik legelterjedtebb fertőző betegséget, a tuberkulózist okozza. A betegség megfelelő kontroll alatt tartásában fontos a fertőzés korai diagnózisa. A legrégebben használt vizsgálat a tuberkulin (PPD, purified protein derivative) bőrpróba nem alkalmas arra, hogy különbséget mutasson ki a kórokozóval való fertőzöttség és a BCG oltás következtében kialakuló pozitív válasz között. Legyengült immunrendszerű páciensek esetében a PPD bőrpróba gyakran hamis negatív választ ad. Mindezen tapasztalatok miatt szükségessé vált egy új immundiagnosztikum kifejlesztése, amely lehetővé teszi a szenzitizáltság okának specifikus és érzékeny detektálását. A *M. tuberculosis* fertőzés kimutatása történhet immunreakción alapuló módszerek segítségével. A tesztek érzékenysége és specificitása a stimuláláshoz használt antigénektől függ. Antigénként immundomináns fehérjék, T-sejt epitóp peptidok és azok konjugátumai alkalmazhatóak.

A rezisztens baktériumtörzsek terjedése miatt egyre nagyobb szükség van új típusú antibiotikumokra. Új hatóanyagok keresésére alkalmas az ún. *in silico* módszer, mely során számítógép segítségével ismert szerkezetű bakteriális fehérjékhez milliós nagyságrendben dokkolnak kismolekulákat. A molekulák kiválasztásának feltétele a fehérje – ligandum közti kötődés erőssége.

A tuberkulózis kezelése minimum hat hónapot vesz igénybe és az alkalmazott antituberkulotikumoknak számos mellékhatása ismert. A hatóanyagok többsége csak kismértékben hat az intracelluláris (dormans) baktériumok ellen. A fertőzött makrofágokba történő bejutás túlnyomóan diffúzió révén történik, meglehetősen korlátozott mértékben. A fertőzött makrofágok hatóanyagfelvételének növelésével kisebb napi dózisra és rövidebb terápiára lenne szükség, amely nagymértékben lecsökkentené a mellékhatásokat és a kezelés költségét. Az antituberkulotikumok hatóanyagfelvétele irodalmi adatok alapján növelhető célbajuttató rendszerek segítségével.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A tuberkulózis és a *Mycobacterium tuberculosis* kórokozó

A tuberkulózis (tbc, gümőkór) az egyik legrégebben ismert fertőző betegség, mely az emberiséget sújtja. Egyiptomi múmiákban tuberkulózisra utaló egyértelmű jeleket találtak, melyek bizonyítják, hogy a betegség már évezredek óta velünk van. Időszámításunk előtt 460 körül Hippocrates a tüdővést („phthisis”) tartotta kora leggyakoribb betegségének, ami legtöbbször halálos kimenetelű volt. Az első pontos patológiai és anatómiai leírást a XVII. században Franciscus de Le Boë Sylvius (1614-1672) Opera Medica című írásában jelentette meg [3]. 1720-ban Benjamin Marten angol orvos vetette fel először hogy a tüdővész okozói apró „teremtények” lehetnek („wonderfully minute living creatures”) [4]. Marten állításait másfél évszázaddal később Robert Koch igazolta, aki 1882-ben felfedezte a tuberkulózis kórokozóját [5]. Robert Koch idejében a tuberkulózisnak évente 7 millió halálos áldozata volt. A betegség elleni küzdelemben az első nagy áttörést Albert Calmette francia bakteriológus érte el, aki kollégájával Camille Guèrinnel elsőként fejlesztett ki legyengített *Mycobacterium bovis* baktériumot tartalmazó vakcinát (I. ábra). A BCG (Bacillus Calmette-Guèrin) oltáshoz használt vakcinatörzset 13 éven át tartó *in vitro* passzázzal gyengítették le és először 1921-ben próbálták ki emberen.



Robert Koch (1843-1910)



Albert Calmette (1863-1933)



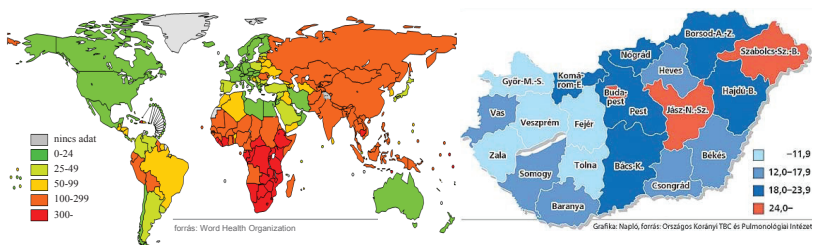
Camille Guèrin (1872-1961)

I. ábra. A tuberkulózis elleni küzdelem nagy alakjai.

A XX. század elején a bakteriális betegségek gyógyítására használt penicillin és szulfonamid a tuberkulózis kórokozójára hatástalan volt. Ezért 1914-től Selman Waksman laboratóriumában szisztematikusan keresték a tbc ellenszerét. 1943-ban találták meg a sztreptomocint, az első hatékony antibiotikumot, amely humán terápiában alkalmazható volt.

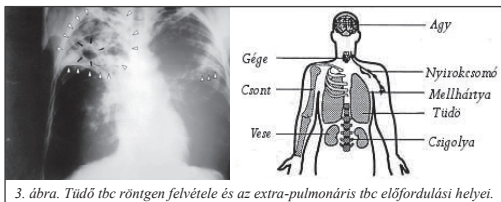
Több mint 60 év elteltével azonban a tuberkulózis még mindig egyike a legtöbb áldozattal járó fertőző betegségeknek. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health

Organization, WHO) jelentése szerint a Föld lakosságának egyharmada fertőzött a tuberkulózis kórokozójával. 2006-ban 9,2 millió új esetet regisztráltak és a tuberkulózishoz köthető halálesetek száma évente több mint 1,7 millió [6]. A betegség előfordulása nagy mértékű földrajzi eltérést mutat, a tbc-s betegek 95%-át a fejlődő országokban regisztrálták (2. ábra). Hazánkban 2005-ben 2042 új esetet jelentettek a tüdőgondozó intézetek. Budapesten, Jász-Nagykun-Szolnok megyében és Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében tartósan a legmagasabb az új megbetegedések aránya (incidencia). Országos szinten ugyan évente csökken a betegek száma, de a lazuló szűrési fegyelem és a kockázati tényezők miatt ma sem elhanyagolható a tuberkulózis kockázata [7].



2. ábra. A tbc előfordulása a Földön és Magyarországon (2005-ben, százezrelék).

Napjainkra tehát a tuberkulózis problémája korántsem megoldott és még mindig kihívást jelent a kutatók számára. Ennek egyik oka, hogy a BCG oltás nem nyújt egész életen át tartó védeltséget a betegséggel szemben, leginkább a gyermekkori mycobacteriumok okozta meningitis ellen hatékony. Napjainkra emiatt számos országban megszüntették már a kötelező BCG oltást. A tuberkulózis kezelése során már az első években megfigyelték, hogy a hatóanyagokkal szemben igen gyorsan kialakul rezisztencia. A rezisztens baktériumok által okozott tuberkulózis elterjedése miatt újabb hatóanyagokat kellett bevonni a terápiába és a kezelés költsége, időtartama nagymértékben megnőtt. Az 1980-as évektől kezdve az AIDS és a HIV fertőzés megjelenése is hozzájárult a tuberkulózis újbóli elterjedéséhez. A HIV fertőzöttek körében háromszor gyakrabban fordul elő a tbc és ez a leggyakoribb halálok az AIDS betegeknek [8]. Az immunrendszer legyengülése miatt a kórokozó könnyebben megfertőzheti a szervezetet és a fertőzés után sokkal gyorsabban kialakul a betegség. HIV fertőzöttek esetében környezeti mycobacteriumok (pl. *M. avium*, *M. kansasii*) is okozhatnak fertőzést.

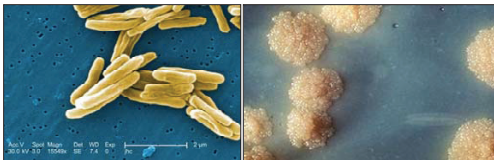


3. ábra. Tüdő tbc röntgen felvétele és az extra-pulmonáris tbc előfordulási helyei.

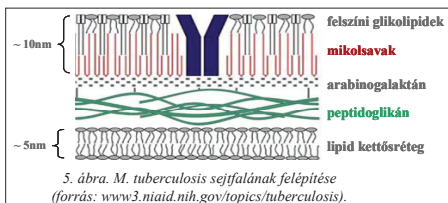
A tuberkulózis a *M. tuberculosis* okozta fertőzés eredményeképp kialakuló kórkép, amely leggyakrabban a tüdőt támadja (pulmonáris tbc), de emellett előfordulhat más szervekben is (extra-pulmonáris tbc) (3. ábra). A tuberkulózis leggyakrabban por- és cseppfertőzést követően alakul ki. A pulmonáris tbc során a következő tünetek jelentkeznek: hosszú ideig tartó, gyakran véres köpettel járó köhögés; mellkasi fájdalom; súlyvesztés; étvágytalanság; fáradtság; láz, hőemelkedés; éjszakai izzadás.

A tuberkulózis esetében fontos megemlíteni, hogy a *M. tuberculosis* fertőzés nem mindig jár együtt az aktív tünetek megjelenésével. Igen gyakori, hogy a baktérium évtizedekig is megtalálható a szervezetben, de a betegség tünetei egyáltalán nem jelentkeznek. Ebben az esetben látens fertőzöttségről beszélünk. A látens fertőzöttek (a Föld lakosságának egyharmada ide sorolható [6]) körében fokozott a tuberkulózis megbetegedés kockázata és közel 10%-nál kialakul az aktív betegség. A veszélyeztetett populációba tartoznak az idősek, újszülöttek, legyengült immunrendszerűek (pl. immunszuppresszált transzplantáltak, HIV fertőzöttek), rossz higiéniai viszonyok közt élők, alkoholisták illetve azok, akiknek a környezetében tbc-s beteg előfordult. Ezekben az esetekben a tuberkulózis kockázatát preventív antituberkulotikus terápiával lehet csökkenteni.

A *Mycobacterium tuberculosis* kórokozó 1-2 μ m hosszú, 0,2 μ m átmérőjű, pálcika alakú baktérium (4. ábra). Más baktériumokhoz képest igen lassan szaporodik, osztódása 12-24 óra alatt megy végbe (*E. coli*: 20-30 perc). A *M. tuberculosis* szilárd táptalajon 4-8 hét alatt alkot telepeket. A leggyakrabban alkalmazott szilárd táptalaj a tojás alapú Löwenstein-Jensen (LJ) [9, 10] és az agar alapú Middlebrook 7H10 táptalaj [11]. Folyékony táptalajok közül a mycobacteriumok tenyésztésére legtöbbször Sula [12, 13] és BACTEC TB médiumot használnak. A baktérium növekedése szempontjából az optimális pH 5,8 és 6,5 között van.



4. ábra. *Mycobacterium tuberculosis* baktérium és a telepek fénymikroszkóp alatt.
Forrás: Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Public Health Image Library.



A *M. tuberculosis* sejtfala komplexebb, mint a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumoké. A sejtfalban a peptidoglikánvázhoz a D-arabinozon és a D-galaktózon keresztül kovalens kötéssel mikolsavak kapcsolódnak (5.

ábra). A mikolsavak alkotják a sejtfal 50%-át és vastag hidrofób burkot képeznek a baktérium körül. Egy másik sejtfal lipid, a 6,6'-dimikoliltrehalóz, az ún. „cord-faktor” felelős a baktériumok egymás mellé rendeződéséért, amely az *M. tuberculosis* virulens törzseire jellemző. A sejtfal külső rétegeinek peptidláncai képezik a sejtfal tömegének 15%-át és a biológiailag fontos antigének is itt találhatóak. Ezek felelősek a celluláris immunválasz kiváltásáért. A komplex sejtfalnak köszönhető, hogy a baktérium extrém körülmények között is létképes, számos antibiotikumnak ellenáll és gyakran kivédi a gazdaszervezet saját eliminációs mechanizmusait [14-16]. A különleges sejtfal védi meg a baktériumot a kationos antibakteriális fehérjéktől (pl. granulizin, NK-lizin) és az oxigén gyököktől.

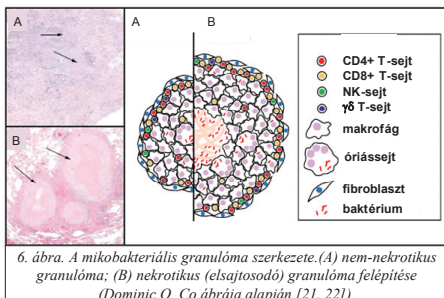
A *M. tuberculosis* intracelluláris patogén. A szervezetbe kerülve a makrofágok illetve a dendritikus sejtek bekebelezik a baktériumot. A fagocitózis specifikus receptorokon keresztül történik (pl. mannóz receptor, scavenger receptor). A fagocitózis azonban nem minden esetben vezet a kórokozó eltávolításához. A *M. tuberculosis* számos ponton képes gátolni a gazdasajt működését és így megakadályozza az immunrendszer által irányított eliminációt:

- gátolja a fagoszóma érését
- gátolja a fagoszóma – lizoszóma fúziót
- ammónia termelésével semlegesíti a lizoszóma kémhatását, így csökkentve a lizoszomális enzimek aktivitását
- anyagcseretermékei hatástalanítják a reaktív intermediereket
- gátolja a makrofág aktivációt

A fertőzött makrofágokban a *M. tuberculosis* ún. dormans állapotban igen hosszú ideig életképes. A dormans fázisban az alacsony oxigenizáció mellett a baktérium csökkentett mértékű anyagcserét folytat. A vizsgálatok során a baktérium genomjában azonosították a DosR régiót (dormancy regulon), mely 48 gént tartalmaz. A DosR régióban található gének által kódolt fehérjéket dormans állapotban nagyobb mértékben expresszálja a baktérium [17-

19]. Ezek a fehérjék feltehetően a dormans állapot létrehozásában és fenntartásában játszanak fontos szerepet.

A szervezet védekező folyamatainak sajátos krónikus következményeként a tüdőben granulóma (gümő) alakul ki [20]. A granulóma szerkezetét mutatja be a 6. ábra. A granulóma



6. ábra. A mikobakteriális granulóma szerkezete. (A) nem-nekrotikus granulóma; (B) nekrotikus (elsajtosodó) granulóma felépítése (Dominic O. Co ábrája alapján [21, 22]).

az immunrendszer számára „láthatatlan”, mert a fertőzött makrofágokat intakt T-sejtek veszik körül. A nekrotizáló granulóma belsejében ún. elsajtosodó szövettörmelék található [21, 22]. A granulóma gyógyulása hegesedéssel és/vagy meszesedéssel történik, ezek a góccok a röntgenfelvételen is láthatóak

(3. ábra). A gyógyult granulómákban hosszú ideig életképesek a baktériumok, melyek az immunrendszer legyengülése esetén újra megfertőzhetik a szervezetet.

Stewart Cole és munkatársai 1998-ban közzölték a *M. tuberculosis* H₃₇Rv virulens baktériumtörzs teljes genomjának szekvenciáját [23]. A projekt során kapott információkat az interneten hozzáférhető TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) adatbázisban gyűjtik. A frissített adatok szerint [24, 25] a teljes genom ~4,4 millió bázispárból áll és összesen 4066 gént tartalmaz. Ebből 4009 fehérje kódoló gén, 57 gén RNS-t kódol. A fehérjéket kódoló gének elnevezése Rv kóddal kezdődik (pl. Rv2654), ami a H₃₇Rv törzsre utal.

Emberi fertőzés és kórképek megjelenéséért atípusos illetve környezeti mycobacteriumok is felelősek lehetnek (1. táblázat). A legmodernebb molekuláris technikák alkalmazásával jelenleg közel 200 mycobacterium genushoz tartozó fajt definiáltak. A legtöbb faj a felszíni vizek és a talaj hasznos és nélkülözhetetlen, többségében szaprofita mikroorganizmusa, melyeknek nitrogénkötő aktivitásuk és más mikroszervezetek tápanyag szükségleteit kielégítő szervesanyag bontó képességük van. Néhány mycobacterium faj azonban az evolúció során kórokozóvá vált. Ezek között megkülönböztethetünk obligát és fakultatív (opportunistá, alkalmi) patogéneket. A legjelentősebbek a *Mycobacterium tuberculosis* complexhez tartozó *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin,

M. africanum, *M. microti*, *M. canetti* és *M. caprae*. A fajok között virulenciájukat, valamint a gazdaszervezetet illetően számottevő különbségek vannak (1. táblázat).

1. táblázat. Emberi fertőzést okozó mycobacteriumok és kórképek (Pusztai Rozália nyomán [26]).

Patogenitás	Faj	Rezervoár	Betegség
patogén	<i>M. tuberculosis</i>	ember	tüdő-, csont-, izület-, vese-, agyhártya- és miliáris tbc
	<i>M. bovis</i>	ember, szarvasmarha	gastrointestinális és miliáris tbc
	<i>M. leprae</i>	ember	lepra
potenciálisan patogén	<i>M. avium-intracellulare complex</i>	talaj, víz, madár, sertés, szarvasmarha	disszeminált és tüdő tbc, gyakori AIDS betegekben és immunszuppresszáltakban
	<i>M. kansasii</i>	víz, szarvasmarha	tüdő tbc
	<i>M. marinum</i>	hal, víz	subcután tályogok, csomók, bőrfekély
	<i>M. ulcerans</i>	ember, környezet	granulomás és cervicalis lymphadenitis
	<i>M. scrofulaceum</i>	talaj, víz	subcután tályogok, csomók
	<i>M. fortuitum-chelonaei complex</i>	talaj, víz, állat	subcután tályogok, disszeminált fertőzések

A *M. tuberculosis* complexhez tartozó fajok genetikailag igen magas hasonlóságot mutatnak. 1998 óta több mycobacterium faj genomjának szekvenciáját publikálták és számos olyan közlemény jelent meg, amelyben DNS szinten izolálták a kórokozót:

- *M. bovis* teljes genomja [27]. A kórokozó főleg szarvasmarhákban fordul elő, de embert is megfertőzhet és főleg gastrointestinális tuberkulózist okoz.
- a BCG oltáshoz használt *M. bovis* BCG baktériumtörzs összehasonlító proteomikai analízise [28]. A kutatások során azonosították azokat a fehérjéket, melyek megtalálhatóak a virulens *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsben, de hiányoznak a legyengített *M. bovis* BCG vakcinatörzsből [29].
- *M. avium* subspecies *paratuberculosis* teljes genomja [30]. A Crohn betegséggel hozták összefüggésbe [31, 32] és bizonyították, hogy antimikobakteriális szerek segítségével gyógyítható a Crohn betegség [33, 34].
- *M. kansasii* fertőzés kimutatása genetikai módszerekkel [35-37]. A *M. kansasii* környezeti mycobacterium, ami csapvízben is előfordulhat [38] és pulmonáris tbc-t okozhat.
- *M. marinum* teljes genomja [39]. A kórokozó embereket, halakat, kétélűeket támad és a fertőzés granulóma kialakulásával jár.
- *M. smegmatis* nem patogén. A patogén *M. tuberculosis* modelljeként szokták alkalmazni a laboratóriumi kísérletek során [40, 41].

2.2. A tuberkulózis diagnosztikája és a kórokozó azonosítása

A klinikai tünetek megléte és a radiológiai kép (mellkas röntgen, esetleg CT) alapján felállítható a tuberkulózis előzetes diagnózisa. A tbc azonban csak akkor tekinthető bizonyítottnak, ha a kórokozó jelenlétét a beteg testnedveiből (pl. köpet, vizelet, hörgőből öblített folyadék) sikerült bakteriológiai vizsgálattal igazolni [42]. Mikroszkópos vizsgálattal kimutatható saválló baktérium igazolja a tuberkulózist. A bakteriológiai vizsgálatok közül ez a legegyszerűbb, legolcsóbb és leggyorsabb módszer. A mikroszkópos diagnózis legnagyobb hátránya, hogy nem megfelelően érzékeny módszer. A pozitív kenethez igen magas baktériumszám szükséges. A vizsgálat szenzitivitása és specificitása nagymértékben növelhető a kórokozó folyékony és/vagy szilárd táptalajon való tenyésztésével [43]. Ennek hátránya, hogy a baktérium lassú replikációja miatt a tesztek hosszú időt vesznek igénybe (4-8 hét) és nem minden esetben lehet megfelelően izolálni/tenyészteni a kórokozót.

A direkt nukleinsav amplifikációs módszerek (DNAM) előnye, hogy a lassan tenyészthető vagy nehezen izolálható mycobacteriumok esetén is gyors (24 órán belüli) kimutatást biztosítanak. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztek (pl. Amplicor PCR teszt (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA), a transzkripció mediált amplifikáción alapuló AMTD teszt (amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test, Gen-Probe Inc. San Diego, CA, USA), a szál áthelyező amplifikáción alapuló BDProbeTec (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)) rutinszerű alkalmazása finanszírozási problémák miatt csak limitált számban oldható meg. A hazai előírások akkor javasolják a DNAM alkalmazását, ha atípusos vagy környezeti mycobacteriumok okozta tuberkulózis gyanúja merül fel (pl. HIV fertőzöttek, transzpantáltak) illetve, ha a diagnózis rendkívüli sürgősséget igényel.

A tuberkulózis bizonyításán túl a diagnózis fontos része a kórokozó pontos azonosítása. A hagyományos identifikálási módszerek (niacin, nitrát redukáz és hőstabil kataláz teszt) mellett egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a DNS hibridizáción alapuló módszerek, a DNS szekvenálás, a PCR restrikciós-enzim analízis (PRA) és a mikolsav analízis.

- A DNS hibridizációs módszeren alapuló AccuProbe (Gen-Probe Inc., San-Diego, CA, USA) segítségével kimutatható a *M. tuberculosis* complex, a *M. avium* complex, a *M. goodnae*, és a *M. kansasii* törzsek jelenléte. Mivel a teszt nem alkalmaz amplifikációs lépést és az azonosításhoz magas baktériumszám szükséges, a vizsgálatot folyékony vagy szilárd táptalajon való tenyésztés előzi meg [44].

- A DNS szekvenálás automatizálhatósága miatt a mycobacteriumok azonosításának leggyorsabb és legpontosabb módszere. Az egyes törzsek azonosításán kívül információval szolgál az egyes fajok filogenetikájáról és rokonsági fokáról is [45, 46].
- A PRA során a hsp65 gént PCR segítségével amplifikálják, majd a megsokszorozott génállományt restrikciós enzimek segítségével megemésztik. Gélelektroforézis után a restrikciós mintázatot az interneten hozzáférhető adatbázissal (<http://www.hospvcd.ch:8005>) vetik össze. Ezzel a módszerrel jelenleg 54 faj azonosítható [47-49].
- A mikolsavak a mycobacteriumok sejtfalának fajonként változó és specifikus összetevői. A mikolsavak kimutatására alkalmas a vékonyréteg kromatográfia [50]. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazása a mycobacteriumok azonosításának olcsó és gyors megoldását biztosítja [51]. A standardizált HPLC analízis során kapott kromatogramokat az interneten hozzáférhető adatokkal (www.cdc.gov/tb/Laboratory_Services/maps_tagged.pdf) egyeztetve végezhetjük az azonosítást.

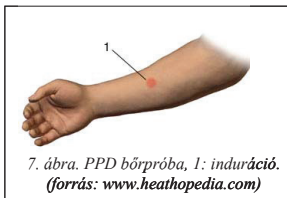
Pozitív mikrobiológiai teszt esetén az izolált baktériumot rezisztencia vizsgálatnak vetik alá, ami nagyban hozzájárulhat a terápia hatékonyságához. A rezisztencia vizsgálatot általában az öt elsővonalbeli antibiotikummal szemben végzik. Újabban bevezetésre kerültek az automatizálható ún. BACTEC 460 TB (radiometriás), BACTEC 960 TB (kolorimetriás) (BD Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md. USA) rendszerek és a Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT; BBL BD Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA), melyek segítségével a vizsgálatok kb. 4-6 nap alatt elvégezhetőek.

2.3. A tuberkulózis immundiagnóza

A *M. tuberculosis* fertőzés kimutatására immunreakción alapuló módszerek is alkalmazhatóak. Humorális (B-sejtes) immunválaszon alapuló módszerekről számos publikáció jelent meg az elmúlt évtizedekben. A vizsgálat során *M. tuberculosis*-ből származó immundomináns fehérjékre specifikus antitestek kimutatásával bizonyítható a baktériummal való fertőzés [52]. A leggyakrabban használt immundomináns fehérje a 38kDa (Ag5, Rv0934)

protein [53-55]. A B-sejt válaszon alapuló szerológiai tesztek érzékenysége azonban nem kielégítő, ezért diagnosztikumként való alkalmazásuk limitált.

A legrégebben használt vizsgálat a tuberkulin bőrpróba (tuberculin skin test, TST). A teszt során az alkar alsó részén a bőr alá fecskendeznek *M. tuberculosis* szűrletéből származó



7. ábra. PPD bőrpróba, 1: induráció.
(forrás: www.heathopedia.com)

tisztított fehérjekeveréket (purified protein derivative, PPD). 48-72 óra elteltével leolvasható az induráció (gyulladás) átmérője (7. ábra). Az eredmény megadása mm-ben történik [56]. A befecskendezés módja szerint különböztetjük meg a Mantoux és Heaf teszteket. A bakteriológiai vizsgálatokkal ellentétben a PPD bőrpróba

látens fertőzöttek és BCG oltott személyek esetében is pozitív választ ad. Emiatt a szenzitizáltság mérésére is alkalmazzák pl. általános iskolás gyerekekénél, ahol a teszt segítségével eldönthető, hogy szükség van-e ismétlődő oltásra. A PPD bőrpróba esetében fontos hangsúlyozni, hogy a teszt nem alkalmas arra, hogy különbséget mutasson ki a kórokozóval való fertőzöttség és a BCG oltás következtében kialakuló pozitív válasz között. HIV fertőzöttek esetében a PPD bőrpróba gyakran hamis negatív választ ad (*M. tuberculosis* fertőzés ellenére sem tapasztalható induráció az immunrendszer hiányos működése miatt). Mivel a PPD tartalmaz olyan fehérjéket is, melyeket atípusos illetve környezeti mycobacteriumok is termelnek, a bőrpróba alapján nem dönthető el, hogy pontosan melyik mycobacteriummal fertőzött a vizsgált szervezet.

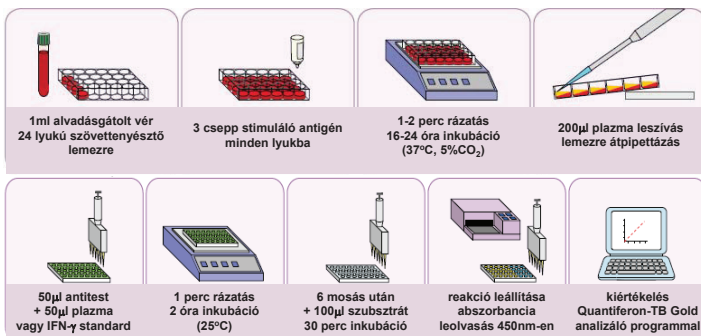
A *M. tuberculosis* fertőzés jelentős celluláris immunválaszt indukál, mely során CD4+ és CD8+ T-sejtek aktiválódnak. Számos specifikus antigén stimulálja a T-sejteket. A stimulus mértéke különböző módszerekkel mérhető, melyek segítségével egyszerű, érzékeny és specifikus diagnózis valósítható meg. A T-sejt válasz mérésén alapuló *in vitro* tesztek teljes vért vagy perifériás vérből izolált monomorfonukleáris sejteket (peripheral blood monomonuclear cells, PBMC) használnak. A sejtek *in vitro* stimulálását végezhetjük PPD fehérjekeverékkel vagy specifikus *M. tuberculosis*-ből származó immundomináns fehérjékkel, peptidekkel. Az antigének által kiváltott immunválasz jellemzésére a termelt citokinek mennyiségének meghatározása alkalmazható. A citokinek az immunrendszer „kommunikációs” molekulái, melyek nagy affinitással kötődnek saját receptoraikhoz [20]. A citokinek közül leggyakrabban az IFN- γ (interferon-gamma) mennyiségének mérését

végezzük a tesztek során. Emellett TNF- α (tumor nekrozis faktor-alfa), IL-2 (interleukin-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 citokinek mérésének lehet diagnosztikus jelentősége. A kísérletek során vagy a kibocsátott citokinek mennyiségét mérjük vagy a citokint termelő sejtek arányát áramlási citométerrel (fluorescent-activated cell sorter, FACS). Az áramlási citometriás vizsgálatok során a sejten belül fluoreszcens festékkel konjugált specifikus antitesttel jelöljük az adott citokint és a kiértékelés során meghatározzuk a citokint termelő sejtpopulációk százalékos arányát. Sejtfelszíni markerek jelölésével a citokint termelő sejtek típusa is meghatározható (pl. CD4+, CD8+ T-sejtek). Áramlási citometriás mérések segítségével T-sejt proliferáció vizsgálata is lehetséges [57, 58].

2.3.1. IFN- γ mérésén alapuló tesztek

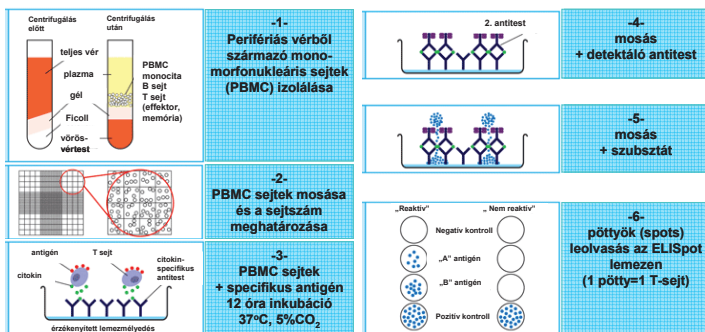
A vizsgálandó páciens alvadásgátolt perifériás véréből végezhető el a termelt IFN- γ mennyiségének mérésén alapuló tesztek (interferon-gamma release assay, IGRA). Az IFN- γ mennyisége meghatározható ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel. Ebben a tesztben a stimulált sejtek felülúszóját használjuk a kísérlethez és IFN- γ standard alkalmazásával kapunk kvantitatív adatokat. Az ELISpot (enzyme-linked immunospot) módszerben a „pöttyformáló kolóniák” (spot forming colony, SFC) számát határoztuk meg. A lemezen a színes pöttyök megjelenése IFN- γ termelő T-sejtek jelenlétét mutatja. Ma a kereskedelmi forgalomban két IFN- γ meghatározásán alapuló teszt kapható.

A QuantiFERON[®]-TB Gold és egyszerűsített változata a QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (Cellestis Ltd. Victoria, Ausztrália) tesztek *in vitro* diagnosztikumként való alkalmazását 2005 óta engedélyezi az FDA (Food and Drug Administration, USA). A teszt látens fertőzés és aktív tuberkulózis esetében is használható. Specifikus antigénként ESAT6 (early secretory antigenic target 6) és CFP10 (culture filtrate protein 10) fehérjéket tartalmaz. A QuantiFERON-TB Gold In-Tube ezeken felül a Tb7.7(p4) kódú peptidet is tartalmazza, mely az Rv2654 (Tb7.7) immundomináns fehérje 38-55 szekvenciájának felel meg. A vizsgálat ELISA módszeren alapul. A termelt IFN- γ mennyiségének meghatározása 16-24 óra stimulálás után a felülúszóból történik specifikus anti-humán IFN- γ antitest segítségével. A teszt menetét a 8. ábra mutatja be.



8. ábra. *QuantiFERON[®]-TB Gold* test menete (Cellestis - Assay Quick Reference Guide ábra alapján).

A másik kereskedelmi forgalomban kapható teszt a T-SPOT[®].TB (Oxford Immunotec Ltd. Oxford, Anglia). Ez a teszt nem teljes vért alkalmaz, a vizsgálat első lépése a PBMC sejtek izolálása (9. ábra). A sejteket ezután megfelelő számban felvisszük az ELISpot lemezre. A lemez cellulóz bázisú alja specifikus anti-humán IFN- γ antitesttel van érzékenyítve. A PBMC sejtek stimulálása ESAT6 és CFP10 fehérjékkel történik. A stimulálás után a detektáló antitest és a szubsztrát hozzáadásával meghatározhatjuk a pöttyök számát (SFC). Az SFC az aktivált, IFN- γ termelő T-sejtek számával arányos. A teszt *in vitro* diagnosztikumként való alkalmazását 2004-ben engedélyezték Európában.

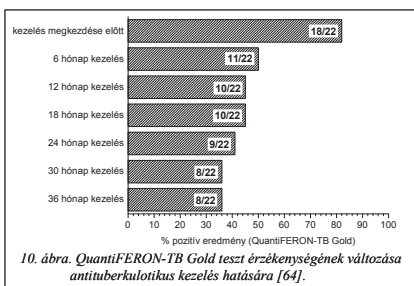


9. ábra. *T-SPOT.TB* test menete (Oxford Immunotec – How to use T-SPOT.TB ábrája alapján).

A QuantiFERON-TB Gold, QuantiFERON-TB Gold In-Tube és T-SPOT.TB tesztek specificitását és szenzitivitását vizsgálták különböző donorcsoportokon. Összesítve az

adatokat megállapítható, hogy az IGRA tesztek specificitása látens fertőzöttek esetében 93% fölött van. BCG oltott donorok körében a PPD bőrpróba eredménye igen heterogén, a tesztek 46-73%-ban adnak hamis pozitív választ. Ezzel szemben az IGRA tesztek e donorcsoportban is 90% fölötti specificitással rendelkeznek [59]. A QuantiFERON-TB és T-SPOT.TB tesztek érzékenysége azonban donorcsoportonként igen változó (55-98%). HIV fertőzöttek esetében a tesztek érzékenysége nagymértékben csökken [60-63]. A HIV fertőzés magas kockázati tényező a tuberkulózis kialakulásában, ezért e donorcsoportban kiemelkedően fontos a tuberkulotikus fertőzés érzékeny kimutatása.

Aktív tuberkulózisban szenvedő betegek a terápia során kapott antibiotikumok hatására kevésbé érzékenyen reagálnak az IGRA tesztekre. A 10. ábrán bemutatott eredményeket



Kobashi és munkatársai közölték 2008-ban [64]. A kísérlet során vizsgálták, hogy a QuantiFERON-TB Gold teszt érzékenysége hogyan változik az antituberkulotikus kezelés hatására. A kezelés 6 hónapig tartott elsővonalbeli hatóanyagok alkalmazásával. Az antituberkulotikus kezelés megkezdése előtt a teszt

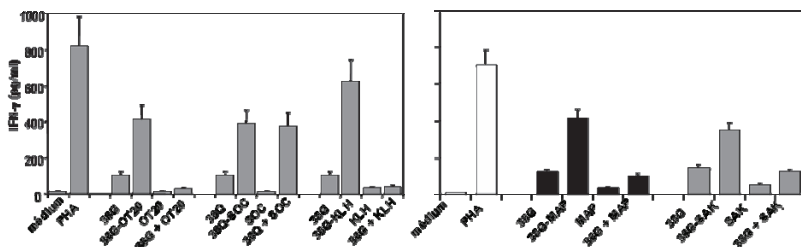
érzékenysége 82% volt. A kezelés hatására azonban a teszt érzékenysége csökkent, a páciensek 36-50%-a adott pozitív választ.

2.3.2. Potenciális antigének a tuberkulózis immundiagnózisában

Az IFN- γ mérésén alapuló tesztek érzékenysége és specificitása függ a stimuláláshoz használt antigénektől. Antigénként immundomináns fehérjék, T-sejt epitóp peptidek és azok konjugátumai alkalmazhatóak.

A 38kDa fehérje (Ag5, Ag78, protein antigen B, PstS1, Rv0934) az egyik legfontosabb és legtöbbet vizsgált antigén. A 38kDa fehérje egy foszfát-kötő lipoprotein, melyet a *M. tuberculosis* szekretál [65]. Háromdimenziós szerkezete ismert [66]; PDB (protein data bank) kódja: 1pc3. Humorális és celluláris immunválaszt vált ki, T-sejt proliferatív hatása van és késői típusú túlérzékenységi reakciót (delayed type hypersensitivity, DTH) indukál [67]. A 374 aminosavat tartalmazó fehérjén belül több T-sejt epitóp régiót lokalizáltak [68-71]. Az

epitópszervezet felderítését ún. PEPSCAN módszerrel végezték, mely során polietilén tühegyeken állították elő az átfedő peptidfragmenseket és tühegyekről történő hasítás nélkül ELISA rendszerben vizsgálták a peptidek antigenitását [72, 73]. A szintetikus átlapoló peptidek 20 aminosavat tartalmaztak. A következőkben a leghatékonyabb peptidek *N*- és *C*-terminális felőli rövidített analógiáit állították elő és a funkcionális vizsgálatok segítségével azonosították azt a legkisebb peptidet, mely még fehérjespecifikus immunválaszt indukál. Az így kapott 38G (350-359) szintetikus peptid a PPD pozitív egészséges donorok 90%-ánál váltott ki T-sejt stimulációt [69]. Kutatócsoportunkban a 38G T-sejt epitópot különböző típusú hordozó molekulához konjugálták, így az epitóp peptid T-sejtes immunválaszt kiváltó hatása nagymértékben növelhető volt (11. ábra).



11. ábra. 38G epitóp peptidkonjugátumainak T-sejtes immunválaszt indukáló hatása PPD pozitív egészséges donorok véréből preparált PBMC sejteken (ELISA) [74].

A konjugálás során $^{350}\text{DQVHFQPLPPAVV}^{362}\text{-C}$ peptidet kovalensen kapcsolták (i) természetes eredetű hordozóhoz (KLH); (ii) szintetikus polipeptidhez (SAK); (iii) szekvenciális oligopeptidekhez (SOC, OT20) és (iv) lizin dendrimerhez (MAP). A konjugátumok antigenitását PPD pozitív, egészséges donorok véréből izolált PBMC sejteken vizsgálták. A termelt IFN- γ mennyiségét ELISA teszt alkalmazásával határozták meg. Minden konjugátum esetében nagyobb IFN- γ termelést mértek, mint a 38G peptid esetében, tehát a konjugátumok nagyobb mértékben stimulálták a PBMC sejteket [74].

A 16kDa fehérje (korábban 14kDa protein, Hsp16.3, acr1, Rv2031c) az α -krisztallinok családjába tartozó hőszokk fehérje [75, 76]. Háromdimenziós szerkezete ismert [77], (PDB kódja: 2byu). Dajkafehérjeként (chaperon) fontos szerepet játszik a baktérium túlélésében, a látens fertőzés kialakulásában és a kórokozó intracelluláris szaporodásában [78-80]. Dormans állapotban, alacsony oxigenizáció mellett a 16kDa fehérje a legnagyobb mennyiségben

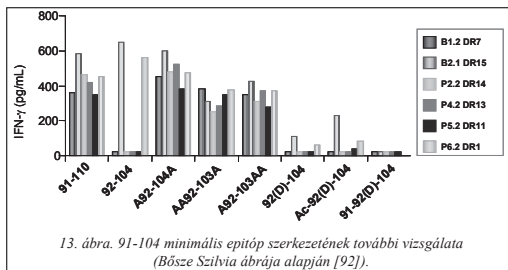
p91-110	SEFAYGFSVRTVSLPVGAD E	S ¹¹ → A	A EFAYGFSVRTVSL
p92-110	EFAYGFSVRTVSLPVGAD E	E ¹² → A	S AFAYGFSVRTVSL
p93-110	FAYGFSVRTVSLPVGAD E	F ¹³ → A	S EAAYGFSVRTVSL
p94-110	AYGFSVRTVSLPVGAD E	A ¹⁴ → S	S EFAYGFSVRTVSL
p95-110	YGFSVRTVSLPVGAD E	Y ¹⁵ → A	S SEFAAGFSVRTVSL
p91-104	SEFAYGFSVRTVSL	G ¹⁶ → A	S SEFAYASVRTVSL
p91-103	SEFAYGFSVRTVSL	S ¹⁷ → A	S SEFAYGAFVRTVSL
p91-102	SEFAYGFSVRTV	V ¹⁸ → A	S SEFAYGSAVRTVSL
p91-101	SEFAYGFSVRT	R ¹⁹ → A	S SEFAYGSAVRTVSL
p91-100	SEFAYGFSVR	T ²⁰ → A	S SEFAYGSAVRTVSL
p92-104	EFAYGFSVRTVSL	V ¹²² → A	S SEFAYGSAVRTVSL
p93-104	FAYGFSVRTVSL	R ¹²³ → A	S SEFAYGSAVRTVSL
p94-104	AYGFSVRTVSL	T ¹²⁴ → A	S SEFAYGSAVRTVSL
p93-101	FAYGFSVRT	V ¹²² → A	S SEFAYGSAVRTVSL
		S ¹²² → A	S SEFAYGSAVRTVSL
		L ¹²¹ → A	S SEFAYGSAVRTVSL

Clone	HLA restriction	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9											
P6.2	DR1	S	E	F	A	Y	G	S	F	V	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
B2.1	DR15	S	E	F	A	Y	G	S	F	V	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
P5.2	DR11	S	E	F	A	Y	G	S	F	V	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
P4.2	DR13	S	E	F	A	Y	G	S	F	V	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
B1.2	DR7	S	E	F	A	Y	G	S	F	V	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E

12. ábra. 91-110 peptid epitópszerkezete. □: TCR kötő régió; ■: HLA kötő régió; E: TCR kötő aminosav; F: HLA kötő aminosav. (Nadia Caccamo ábrája alapján [91]).

expresszált protein [81]. A fehérjét kódoló gén része a DosR (dormancy regulon) régióinak [82]. A fehérje immunogenitását bizonyítja, hogy specifikus antitestek jelenléte mutatható ki tüdő tbc, gyermekkori tbc és *M. tuberculosis* okozta meningitis esetében [83-85]. A 16kDa fehérje *in vivo* T-sejt proliferációt és késői típusú túlérzékenységet indukál egerekben és tengerimalacokban [86]. A fehérje 144 aminosavat tartalmaz.

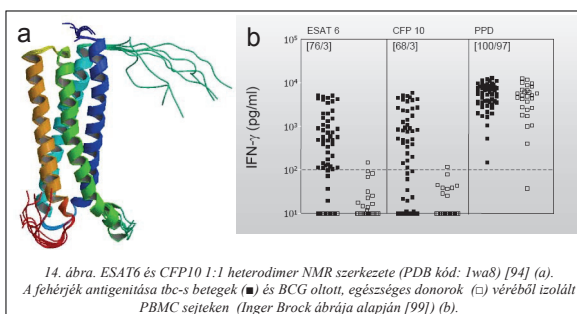
A szekvencián belül lokalizáltak B-sejt [87] és T-sejt epitópokat [88]. Húszt aminosavat tartalmazó átlapoló peptidek segítségével megállapították, hogy a 91-110 epitóp peptid PPD pozitív, egészséges donorok 67%-nál, aktív tbc-s betegek 50%-nál indukál specifikus T-sejt választ [89]. Kutatócsoportunk Francesco Dieli (Department of Biopathology and Biomedical Methodologies, University of Palermo, Olaszország) csoportjával együttműködésben vizsgálta a 91-110 epitóp finomszerkezetét. Öt különböző HLA-DR allél esetében vizsgálták a HLA molekulához és a T-sejt receptorhoz (TCR) való kötődést [90, 91]. Az N- és C-terminális felől szisztematikusan rövidítették a ⁹¹SEFAYGFSVRTVSLPVGAD E¹¹⁰ peptidet, így meghatározták a legkisebb HLA és TCR kötő régiót a szekvencián belül. Ala-scan (a



szekvenciában lévő aminosavak alanin cseréje) segítségével azonosították a kötésben résztvevő aminosavakat mind a HLA, mind pedig a TCR esetében (12. ábra). A kísérletek alapján megállapítható, hogy HLA-DR allél függő a minimális

epitóp hossza (91/92-103/104). Vizsgálták a glutaminsav oldalláncának szerepét a 92. pozícióban: aszparaginra vagy alaninra cserélve a peptid elveszti *in vitro* aktivitását. A 92-104 peptid *N*- és *C*-terminálisát alanin lebegő régiókkal hosszabbítva az összes HLA-DR allél esetében visszakapjuk a biológiai hatást [92, 93] (13. ábra).

A QuantiFERON-TB és T-SPOT.*TB* tesztekben alkalmazott ESAT6 és CFP10 fehérjék a *M. tuberculosis* virulenciájában fontos szerepet játszanak. Natív formában 1:1 heterodimert alkotnak [94] (14/a. ábra). Megtalálhatóak a *M. tuberculosis* complex, *M. bovis* és *M. africanum* törzsekben és három további környezeti mycobacteriumban (*M. marinum*, *M.*



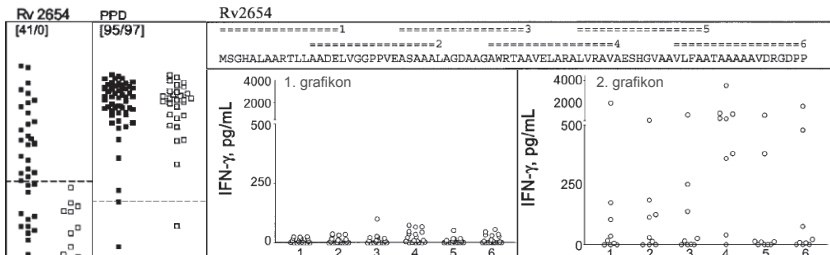
szulgai és *M. kansasii*).

Az ESAT6 és CFP10 fehérjéket kódoló gének hiányoznak a BCG vakcinatörzs genomjából [95]. A BCG törzsből hiányzó fehérjéket kódoló kb. 100 gén 12 régióban helyezkedik el

(region of difference, RD) [96, 97]. Az ESAT6 és CFP10 fehérjék az RD1 régióban találhatóak. Diagnosztikumként való alkalmazásukkal ezért kiküszöbölhető a BCG oltás miatti hamis pozitív válasz [98, 99] (14/b. ábra).

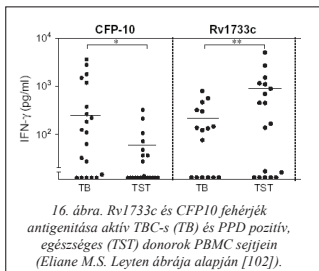
Az Rv2654 (Tb7.7) fehérje hiányzik a BCG vakcinatörzsből, kódoló génje az RD11 régióban helyezkedik el. Az ESAT6 és CFP10 fehérjékkel ellentétben az Rv2654 hiányzik a *M. bovis* és nagy valószínűséggel a környezeti mycobacteriumok genomjából [100]. A fehérje 81 aminosavat tartalmaz (UniProt kód: P71951), 3D szerkezete még nem ismert. *M. tuberculosis* complexre specifikus, szenzitív antigén, mely jelentős immunválaszt vált ki. *In vivo* késői típusú túlérzékenységet indukál tengerimalacokban. Pulmonáris és extrapulmonáris tbc-s betegek esetében jelentős T-sejt stimulációt mértek [100]. Az Rv2546 fehérje BCG oltott donorok esetében nem vált ki immunválaszt. Aktív tbc-s betegeknél magas IFN- γ szint detektálható (15. ábra). Vizsgálták az Rv2654 fehérje szekvenciája alapján szintetizált átlapoló peptidek T-sejtes immunválaszt indukáló hatását [100]. A peptidek 18 aminosavat tartalmaztak, az átfedő régióban 5-6 aminosav volt. Ebben a kísérletben a leghatékonyabb a p4

(38-55) peptid volt, 9-ből 7 beteg esetében mértek magas IFN- γ választ (15. ábra). Az eredmények alapján javasolták, hogy az ESAT6 és CFP10 fehérjék mellett a (Tb7.7)p4 peptidet is alkalmazzák a QuantiFERON-TB Gold In-Tube tesztben.



15. ábra Rv2654 fehérje antigenitása *tbc-s* betegek (■) és BCG oltott, egészséges donorok (□) véréből izolált PBMC sejteken (Inger Brock ábrája alapján [99]). Atlapoló peptidiek (p1-p6) peptidiek (○) antigenitása BCG oltott, egészséges donorok (1. grafikon) és *tbc-s* betegek (2. grafikon) PBMC sejtjein (Claus Aagaard ábrája alapján [100]).

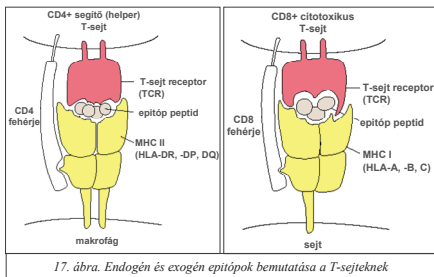
Az Rv1733c megtalálható a *M. tuberculosis* és *M. bovis* genomjában, de hiányzik a környezeti mycobacteriumokból. Az Rv1733c egy transzmembrán fehérje, mely 210 aminosavat tartalmaz (UniProt kód: P71991), 3D szerkezete nem ismert. A fehérjét kódoló gén a DosR régióban található [101]. Látens fertőzés esetében az Rv1733c fehérje immunogenitása jelentős, ezért ún. látens antigénnek tekinthető. PPD pozitív, egészséges donorok 61%-ánál mértek fehérje specifikus immunválaszt PBMC sejteken. A CFP10 fehérjével összehasonlítva az Rv1733c fehérje látens fertőzöttek esetében nagyobb T-sejt választ indukál (16. ábra) [102].



16. ábra. Rv1733c és CFP10 fehérjék antigenitása aktív TBC-s (TB) és PPD pozitív, egészséges (TST) donorok PBMC sejtjein (Eltane M.S. Leyten ábrája alapján [102]).

2.3.3. Az antigénbemutató és az antigénfeldolgozás folyamata

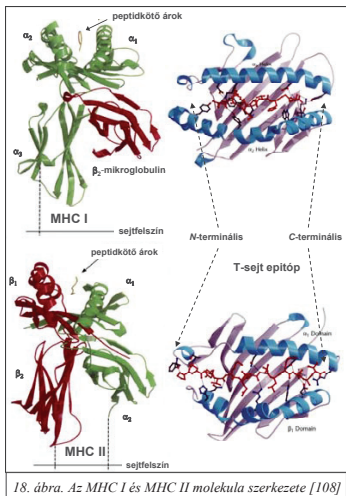
Egy fehérjén belül az antigénspecifikus immunválasz kiváltásáért az epitóp (antigéndetermináns) régiók felelősek. A B-sejt epitópok lehetnek összefüggő peptidszakaszok (szekvenciális epitóp) vagy térben stabilizált struktúrák (folytonos vagy nem-folytonos konformációs epitóp). A T-sejtek esetében csak folytonos, egymást követő aminosavakból álló epitópokat írtak le. Egy fehérjén belül több epitóp régió is lehetséges. A celluláris



immunválaszban antigénprezentáló sejtek (APC) és T-sejtek vesznek részt. Az immundomináns fehérjék intracelluláris feldolgozása során keletkező peptidek a fő hisztokompatibilitási komplexhez (major histocompatibility complex, MHC; emberben humán leukocita antigén, HLA) kötötten jelennek meg. Az MHC-peptid komplex kötődik a T-sejt receptorhoz (T-cell receptor, TCR), mely feltétele a T-sejt aktivációjának. Endogén antigének MHC I (emberben HLA-A, -B, -C) fehérjéhez kötődnek. MHC I osztályú molekulák minden magvas sejt felszínén megtalálhatók. Az endogén epitópok az MHC I molekulával együtt főként a CD8+ citotoxikus T-sejteket aktiválják. Az exogén antigének (vírusok, baktériumok, stb. fehérjéinek peptidfragmensei) az MHC II (emberben HLA-DR, -DP, -DQ) molekulához kötődnek. MHC II csak bizonyos immunsejtek (makrofágok, dendritikus sejtek, B-sejtek, stb.) felszínén mutathatók ki. Az antigénprezentáló sejt felszínén bemutatott peptid-MHC II komplexek elsősorban a CD4+ segítő (helper) T-sejteket aktiválják [20]. A *M. tuberculosis* fertőzés esetében CD4+ és CD8+ T-sejt válasz is lehetséges. Fontos megemlíteni, hogy

gyakorlatilag mindegyik MHC molekula szolubilis (nem sejthez kötött) formában is előfordulhat és ezek immunmoduláló hatással rendelkeznek. Szintetikus peptidek szolubilis MHC molekulákhoz is kötődhetnek. Az antigénprezentáció alternatív módon történhet sejt felszíni MHC molekulán való peptid kicserélődéssel [103-107].

Az MHC I és MHC II molekulák szerkezete eltér egymástól. Az MHC I molekula polimorf α -láncból és egy konstans fehérjéből (β_2 -mikroglobulin) áll. Az MHC II molekula két polimorf (α , β) láncból áll. Mindkét molekula esetében a peptidkötő árkot egy nyolc hajlatból álló β -réteg és két antiparalel α -hélix alkotja. Az MHC I molekula esetében a peptidkötő



árok viszonylag zárt, $25 \times 10 \times 11 \text{ \AA}$ méretű, melybe 8-10 aminosav hosszúságú peptid illeszkedhet. Az MHC II molekula peptidkötő árka nyitottabb szerkezetű, 13-20 aminosav hosszúságú peptidet tud kötni (*18. ábra*) [108]. Ez az oka annak, hogy a CD4+ T-sejt epitópok hosszabbak, mint a CD8+ T-sejt epitópok. A peptidkötő árok az MHC molekulák legnagyobb polimorfizmust mutató része. Ezek az egyes allotípusokat meghatározó aminosavszakaszok felelnek azért, hogy az MHC molekulák milyen erősséggel kötnek meg egy adott peptidet. Részben ez a kötési erősség határozza meg az egyes antigénekre adott immunreakció mértékét.

2.3.4. Szintetikus peptidok T-sejt választ indukáló aktivitása

A rekombináns technikával előállított fehérjékkel szemben a szintetikus peptidok diagnosztikai felhasználásának számos előnye lehet. A fehérjék génexpressziós előállítása ugyan viszonylag egyszerű és gazdaságos, de sok esetben komoly nehézségekbe ütközik. Génexpresszióval D-aminosavak, nem-természetes aminosavak, elágazások, ciklusok, fluoreszcens jelzőanyagok, stb. nem építhetők be a molekulába. A szintetikus peptidok és peptidszarmazékok stabil, kémiaiailag jól jellemezhető és reprodukálható molekulák. Számos fehérjével szemben a peptidok oldhatósága és eltarthatósága jobb.

Az antigéndetermináns régiók felderítése történhet a fehérje teljes hosszát lefedő, átlapoló peptidok segítségével (pl. PEPSCAN módszer). A peptidok hossza és az átfedő aminosavak száma függ attól, hogy CD4+ vagy CD8+ T-sejt epitópokat keresünk. Előfordulhat, hogy a talált régió kevert epitóp: CD4+ és CD8+ T-sejteket is aktivál [109]. A szintetikus peptidok funkcionális aktivitását többféle megközelítéssel vizsgálhatjuk: (i) izolált HLA fehérje - peptid kötődési tesztek; (ii) citokintermelés mérése (pl. ELISA, ELISpot), *in vitro* T-sejt proliferációs tesztek; (iii) *in vivo* kísérletek (pl. DTH mérés). Az epitóp régiók számítógépes predikációs módszerekkel is jósolhatók (pl. ProPred analízis [110]). Az *in silico* módszerek előnye, hogy gyorsabbak és olcsóbbak, mint a peptidszintézis, de a kapott eredményeket kritikával kell értékeljük.

A minimális epitópot reprezentáló szintetikus peptidok általában nem képesek optimális immunválaszt indukálni. Kisméretű, lineáris peptidok T-sejt választ indukáló aktivitásának fokozására számos eljárást dolgoztak ki. Az antigénfelismerés növelhető lebegő régiókkal (flanking region, a minimális epitóp N- és C-terminálisát követő aminosavak). A lebegő régió lehet natív (a szekvencia szerinti aminosavakból álló) vagy nem a szekvencia szerinti vagy

nem-fehérjealkotó aminosavakból álló. Lebegő régiókkal fokozott immunválaszt mértek többek között 38kDa T-sejt epitóp peptideknél [111], mucin peptideknél [112] és β -amiloid plakk-specifikus epitópok esetében [113].

2.3.5. Polimer és oligomer hordozók

Hordozó molekulákhoz való konjugálással az epitóp peptidek halmozott bevitelre valósítható meg. A konjugálás hatására nőhet az APC sejtfelevétel mértéke és a T-sejt aktiváció [114]. A hordozó molekula lehet természetes eredetű vagy szintetikus. Természetes eredetű hordozóként leggyakrabban alkalmazott makromolekulák a marha szérum albumin (BSA), a keyhole limpet hemocyanin (KLH), az ovalbumin (OVA) és a tetanus toxoid (TT). A természetes eredetű hordozók alkalmazásakor azonban előfordulhat hordozó-specifikus immunválasz. A szintetikus hordozók lehetnek polimerek vagy diszkrét molekulatömeeggel rendelkező vegyületek.

Kutatócsoportunkban régóta alkalmazunk polilizin gerincű, elágazó láncú szintetikus polipeptideket hordozóként [115-118]. A poli[Lys(X_i -DL-Ala $_m$)] (ahol $m \approx 3,5$ és $i \leq 1$) (XAK) vegyületcsoportban a polilizin gerinchez racém alaninokból álló oldallánc kapcsolódik és az oldallánc végén egy optikailag aktív aminosav van. Az XAK polipeptidekkel végzett kísérletek azt bizonyították, hogy az oldallánc végén (az X pozícióban) lévő aminosav jelentősen befolyásolja a molekula fiziko-kémiai illetve *in vitro* és *in vivo* tulajdonságait. Az EAK (X=Glu) polipeptid amfoter molekula, melynek vérből való kiürülése meglehetősen lassú. A SAK (X=Ser) polikationos makromolekula, melynek polihidroxil jellege miatt vízdékonysága igen nagy és szintén hosszabb ideig megtalálható a véráramban, mint más polikationos polimerek. A SAK és EAK molekulákra egyaránt jellemző, hogy citotoxikus hatásuk nincs vagy nagyon elenyésző [119-121].

Diszkrét molekulatömeeggel rendelkező hordozók előnye, hogy kémiaiailag jól jellemezhetőek és reprodukálhatóak. Ide sorolhatóak a lizin dendrimerek (pl. multiple antigenic peptide, MAP [122-124]) és a szekvenciális oligopeptidek (pl. sequential oligopeptide carrier, SOC [125, 126]). A jól jellemezhető diszkrét hordozók csoportjába tartoznak az ismétlődő tuftsin szekvenciát tartalmazó molekulák. A tuftsin (TKPR, humán; TKPK, kutya) az immunoglobulin G (IgG) Fc nehéz láncának fragmense (289-292). A fagocitózist stimuláló tetrapeptidet Victor A. Najjar és munkatársai izolálták [127-132].

Kutatócsoportunkban a kutyában előforduló tuftsin szekvenciája alapján tervezett [TKPKG]_n (n = 2, 4, 6, 8) típusú molekulák hordozóként való alkalmazását Mező Gábor vezette be [133, 134]. A természetes tuftsinhoz hasonlóan immunstimuláló és kemotaktikus aktivitásuk van. Humán sejteken vizsgálva nem mutattak citotoxikus hatást. A szekvenciában található lizin oldalláncokra lépésenkénti szintézissel vagy kémiai ligációval vihetők fel az epitóp peptidek. Az OT20 ([TKPKG]₄) hordozóhoz való konjugálás számos esetben növelte az epitóp peptidek antigenitását (pl. *Herpes simplex* vírus epitópoknál [135], β -amiloid epitópoknál [136, 137], 38kDa T-sejt epitópoknál [74]).

A hordozó megválasztásán túl, az epitóp peptid orientációja és kapcsolásának módja is befolyásolhatja a kiváltott immunválasz mértékét. Amidkötés kialakítását általában a lépésenkénti szintézis során alkalmazzák. Diszulfidhídon keresztül való kapcsoláshoz nemvédett peptidszármazékok is használhatók, de a konjugátumok stabilitása nem minden esetben megfelelő. Tioéterkötés kialakításával kemoszelektív ligációra van lehetőség. Így kémiailag stabilabb konjugátum állítható elő és a kapcsoláshoz nem kell védett peptideket alkalmazni. A tioéterkötést tartalmazó konjugátumok szintézise során az epitóp peptidet ciszteinnel hosszabbítjuk és ezt oldatban reagáltatjuk a hordozón kialakított klóracetilezett aminocsoporttal [138].

2.4. A tuberkulózis kemoterápiája

A tuberkulózis kezelésére elsőként sztreptomincint (STM) alkalmaztak, amit 1952-ben az izoniazid (INH) bevezetése követett [139]. Az 1960-as évekre a tbc-s betegek 90%-át gyógyították meg izoniazid – sztreptomycin - *p*-aminosalicilsav (PAS) kombinációjával. A kezelési idő azonban igen hosszú volt (24 hónap) és súlyos mellékhatások jelentektek a terápia során. Az etambutol (EMB) a nehezen tolerálható PAS helyett kezdtek el alkalmazni. 1971-ben bevezették a rifampicint (RIF) [140], melynek segítségével a kezelés időtartama a felére csökkent. Az intracelluláris baktérium ellen is hatékony pirazinamid (PZA) használatával a 80-as évekre a kezelést 6 hónapban határozták meg [141]. Napjainkban az antituberkulotikus terápia előírása a következő: INH, RIF és PZA 2 hónapon keresztül, majd INH és RIF a következő 4 hónapban [6].

A HIV fertőzés és a rezisztens baktériumtörzsek elterjedése miatt napjainkra a tuberkulózis komoly népegészségügyi probléma. Az Egészségügyi Világszervezet a tbc

megfekezésére 2006-ban meghirdette a „Stop TB Strategy”-t [142], melyben világméretű összefogás keretében keresik a választ az új kihívásokra. HIV fertőzötteknél környezeti illetve atípusos mycobacteriumok is okozhatnak tüneteket és látens *M. tuberculosis* fertőzés is gyakrabban betegíti meg a szervezetet. Ezekben az esetekben az antiretrovirális kezelés mellett preventív antituberkulotikus kezelést alkalmaznak.

A rezisztens baktériumok egy vagy több antibiotikummal szemben ellenállóak. Definíció szerint akkor beszélünk multirezisztens tuberkulózisról (MDR-TB, multi-drug resistant TB), ha a kórokozó rezisztens legalább a két leggyakrabban alkalmazott RIF és INH hatóanyagokra. Az XDR-TB (extensively drug resistant tuberculosis) esetében a baktérium rezisztens legalább izoniazidra, rifampicinre, a fluorokinolon-típusú hatóanyagokra és a másodvonalbeli antituberkulotikumok közül kanamicin, kapreomicin vagy amikacin valamelyikére [143, 144]. A rezisztencia általában a hatóanyag aktiválásáért felelős génekben kialakuló véletlen pontmutációk miatt alakul ki. Ismertünk olyan rezisztenciát okozó mechanizmust is, ahol a hatóanyag inaktív származékának előállítását katalizálja egy bakteriális enzim. Rezisztencia az összes elsővonalbeli szernél (INH, RIF, PZA, EMB, STM) felismerésre került. A rezisztencia leggyakrabban a beteg együttműködésének hiánya, a kontroll hiánya, a nem megfelelő gyógyszer kombináció és dózis miatt alakul ki.

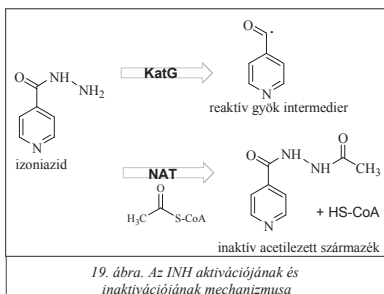
A rezisztens törzsek terjedése miatt egyre nagyobb szükség van új típusú antibiotikumokra. Új hatóanyagok keresése történhet ún. *in silico* módszerek segítségével. A baktérium anyagcseréjében létfontosságú enzimekhez való kötődést dokkolóalgoritmusok alkalmazásával lehet jósolni. A dokkoláshoz több millió vegyületet tartalmazó adatbázisok (pl. Zinc adatbázis [145]) használhatóak. Az így talált molekulák *in vitro* antibakteriális hatását különböző tesztekben vizsgálhatjuk. A legjobb találatok (hits) ezután optimalizási lépések sorozatával gyógyszer-jelölt molekulává alakíthatók.

Az antibiotikumok hatásának kvantitatív jellemzésére a minimális gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration, MIC) és a minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározása szolgál. A MIC az a legkisebb hatóanyag mennyiség, amely 1ml térfogatban gátolja a baktériumtörzs szaporodását. Mértékegysége $\mu\text{g/ml}$, mg/l . A MIC érték meghatározását folyékony táptalajban ún. hígítási leves módszerrel végezzük, ahol az adott antibiotikumra nézve csökkenő koncentrációjú csöveket befertőzzük a baktérium megfelelő sűrűségű szuszpenziójával. A MIC az antibiotikumnak az a legkisebb mennyisége, ahol a

vizsgált törzs nem nő [146]. A leolvasást követően a baktériumnövekedést nem mutató csövekből szilárd táptalajra való kioltással meghatározható a telepszám (colony forming unit, CFU).

Doktori munkám során INH, PZA és PAS hatóanyagok és konjugátumaik vizsgálatával foglalkoztam:

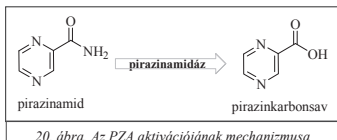
Az izoniazid elsővonalbeli antituberkulotikum, mely a sejtfal szintézisét gátolja. Az INH önmagában inaktív molekula, a baktérium KatG kataláz/peroxidáz hatású enzime aktiválja



[147-149]. Önmagában alkalmazva az izoniaziddal szemben rövid időn belül rezisztencia alakul ki [150]. A rezisztenciáért az *N*-aciltranszferáz (NAT) enzim felel, mely acetilezi az INH molekulát. Az INH acetyl származékát nem képes aktiválni a KatG enzim [151]. Az INH passzív diffúzióval jut át a sejtfalon [152]. Az INH a *M. tuberculosis*ra

baktericid hatású. Az INH minimális inhibíciós koncentrációja *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsön 0,02–0,2μg/ml között van [153]. Magyarországon Isonicid néven, 100mg tableta formában kerül forgalomba (gyártó: PannonPharma Kft.). Szokásos adagja felnőtteknek átlag 300mg naponta. Az izoniazidnak számos mellékhatása ismert (pl. hepatotoxicitás, idegrendszeri és vérképzőrendszeri zavarok), ezért szedése közben a májfunkciót, veseműködést és vérképet rendszeresen ellenőrizni kell. Az Isonicid gyorsan felszívódik, a maximális szérumszint 1-2 órán belül kialakul, felezési ideje 2-3 óra. A májban metabolizálódik, metabolitjainak 90%-a 24 órán belül a vizelettel ürül.

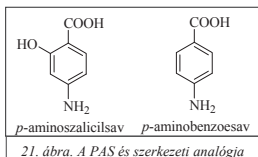
A pirazinamid elsővonalbeli antituberkulotikum, mely az intracelluláris baktériumok ellen is hatékony [154]. A pirazinamid önmagában inaktív molekula, bakteriális pirazinamidáz/nikotinamidáz enzim aktiválja [155]. Az enzimet kódoló *pnz A* gén mutációja a baktériumban PZA rezisztenciát okoz [156-159]. Az aktív származék, a pirazinkarbonsav



(PZC vagy POA), pH-függő baktericid hatást mutat. A PZA passzív diffúzióval jut be a sejtbe; a citoplazmában a pirazinamidáz enzim hidrolizálja. Az intracellulárisan ionos formában jelen lévő PZC

nem baktericid hatású. A feltételezett mechanizmus szerint az ionos PZC efflux segítségével kilép a sejtől. Ha a sejten kívül savas (pH~5,5) környezet van (pl. fertőzött makrofág fagolizoszómája) a PZC részben protonálódik. A protonált PZC lipofilebb molekula és könnyen átjut a sejt falon, ahol valószínűleg számos ponton gátolja a baktérium működését (pl. savasítja a citoplazmát) [160, 161]. A PZA *in vitro* hatását csak speciális körülmények között lehet mérni, mert a vegyület csak savas pH-n aktív, ahol viszont a baktérium növekedése lassú [162, 163]. Lehetőség van humán makrofág sejteken belül mérni a hatóanyag gátló hatását [164]. A pirazinamid Magyarországon Pyrazinamid 0,5g tableta formájában kerül forgalomba (gyártó: Extractum-Pharma Zrt.). Átlagos napi adagja felnőtteknek 1,5-2g. Önálló szerként való alkalmazása nem javasolt, mert rövid idő alatt rezisztencia alakul ki vele szemben. Főként májkárosító hatása ismert. A PZA gyorsan felszívódik, felezési ideje 9-10 óra.

A *p*-aminosalicilsav bakteriosztatikus hatását 1946-ban fedezték fel azon megfigyelést követően, hogy a szalicilsav stimulálta a baktérium oxigénfelvételt [165]. Gastrointestinális



mellékhatása miatt ma már csak másodvonalbeli antituberkulotikumként alkalmazzák. A PAS hatásának mechanizmusa nem minden részletre kiterjedően tisztázott, de szerepe a folsav-bioszintézisben valószínűsített. Kötődik a mikobakteriális dihidrofolát redukáz enzimhez és így gátolja a

DNS szintézist és sejtállalhoz vezet. A PAS antituberkulotikus aktivitása antagonizálható a szerkezetileg rokon *p*-aminobenzoésavval. A PAS rezisztencia kialakulásának mechanizmusa is tisztázatlan. A timidilát szintáz enzim (*thyA* géntermék) mutációja PAS rezisztenciához vezet [166, 167]. Minimális gátló koncentrációja 0,5–2µg/ml között van. A hatóanyag új formulálásával az emésztőrendszeri mellékhatások is valamelyest csökkenthetőek lettek [168]. A rezisztens és multirezisztens baktériumtörzsek megjelenése és elterjedése miatt újabban az elsővonalbeli hatóanyagok alternatívájaként alkalmazzák [169, 170]. A PAS napi adagja nagyon magas: 10-12g. Főként a májban, metabolizálódik és a vizelettel ürül.

2.5. A hatóanyagok irányított célbajuttatása

A tuberkulózis kezelése során alkalmazott hatóanyagok többsége csak kismértékben hat az intracelluláris (dormans) baktériumok ellen. Az antituberkulotikumok fertőzött makrofágokba történő bejutása túlnyomóan diffúzió révén történik, meglehetősen korlátozott mértékben. A fertőzött makrofágok hatóanyagfelvételének növelésével kisebb napi dózusra és

rövidebb terápiára lenne szükség, amely nagymértékben lecsökkentené a mellékhatásokat és a kezelés költségét.

Makrofágok hatóanyagfelvétele növelhető, ha az antituberkulotikumot liposzómákba vagy mikrorészecskékbe „csomagoljuk”. Biokompatibilis polimerekből álló mikrogömb (microsphere) technológia alkalmazásával a rifampicint nagyobb mértékben vették fel a MonoMac6 és J774 monocita sejtek [171]. Fertőzött állatokon végzett *in vivo* kísérletek bizonyították, hogy liposzómába zárt sztreptomycin [172], amikacin [173], gentamicin [174] illetve rifampicin [175] hatásosabb volt. A tüdő tbc kezelésében jelentős szerepet kaphatnak az antituberkulotikumot tartalmazó inhalálható származékok. Az asztma kezelésében már régóta alkalmazott technológiát [176] antituberkulotikumok esetében is vizsgálják. Rolee Sharma és munkatársai rifampicin-izonikotinoil hidrazon származékát poli(DL-tejsav) alapú mikrorészecskékbe zárták. *In vitro* és *in vivo* állat kísérletekben bizonyították, hogy a szabad hatóanyagokhoz képest nőtt a fagocitózis és az antituberkulotikus hatás mértéke [177]. A tüdőspecifikus ún. rejtőzködő liposzómák (stealth liposomes) módosított felülettel rendelkeznek (pl. polietilén-glikol, PEG). *In vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy a rejtőzködő liposzómákba zárt izoniazid+rifampicin hatóanyagok a tüdőben akkumulálódnak és lassú, kontrollált felszabadulás mellett fejtik ki antibakteriális hatásukat [178, 179]. A liposzómákkal illetve mikrorészecskékkel történő célbajuttatás során az egyik legnagyobb probléma az, hogy az előállítás során nehezen szabályozható és reprodukálható a hatóanyagtartalom.

A hatóanyagok szelektív sejtbejuttatása történhet receptor mediált endocitózis segítségével. A hatóanyag molekulát olyan célbajuttató egységhez kapcsoljuk, amely specifikusan a makrofágok sejt felszínén található struktúrához kötődik. A kötődés után internalizáció és lizoszómális degradáció következik be. Kutatócsoportunkban a makrofágok mintázatfelismerő scavenger receptorán keresztül történő fokozott sejt felvételt mértek anionos polilizin gerincű elágazó lánccú molekulák esetében (poli[Lys(Succ-Glu-DL-Ala_m)], poli[Lys(Mal-Glu-DL-Ala_m)] [180]. Szintén a makrofágokban élősködő *Leishmania donovani* kórokozó hatékonyabb gátlását érték el metotrexát poly[Lys(DL-Ala_m-Leu_i)] konjugátumával *in vitro* és *in vivo* kísérletekben [181]. Sadhana Majumdar és munkatársai *p*-aminoszalicilsavat maleilált marha szérum albuminhoz (mal-BSA) kapcsolták. A konjugátumot scavenger receptor mediált endocitózissal vették fel a makrofágok és a PAS-hoz képes jóval hatékonyabb volt *M. tuberculosis* fertőzött tengeri malacokon [182, 183].

Fehérjékkel és polimerekkel ellentétben oligopeptid típusú molekulák alkalmazásának számos előnye van az irányított terápiában. A kovalens kötést tartalmazó hatóanyag-peptid konjugátumok előállítása jól reprodukálható és a termék kémiaiilag pontosan jellemezhető. A konjugálás ezen kívül kedvezően befolyásolhatja a vegyület fiziko-kémiai tulajdonságát (pl. vízdoldékonyság) és biológiai sajátságait (pl. biodisztribúció). A makrofágokon/monocitákon megtalálható tuftsin receptor is alkalmas hatóanyagok célzott sejtbejuttatására [133, 184-186]. HIV fertőzött makrofágok esetében kb 30-szor nagyobb hatóanyagfelvételt mérték tuftsin-konjugált antiretrovirális szer (efavirenz) esetében a szabad hatóanyaghoz képest [187]. Chhitar M. Gupta és munkatársai olyan rifampicin tartalmú liposzómát állítottak elő, mely a felszínén tuftsin (TKPR) tetrapeptidet tartalmazott. Fertőzött állatokon végzett *in vivo* tesztekben a rifampicin tartalmú liposzómákhoz képest hatékonyabb gátlást tapasztaltak. Antituberkulotikumok szelektív célbajuttatása alternatív módon történhet immundomináns fehérjék T-sejt epitóp peptidekkel, melyek a makrofágokon lévő MHC II molekulához kötődhetnek [103, 107].

A hatóanyag - célbajuttató molekula közti kötés illetve a távtartó egység (spacer, linker) is befolyásolja a konjugátum biológiai tulajdonságait. A konjugátumból a hatóanyag felszabadulhat hidrolízis, enzimatis degradáció vagy pH kontrollált reakcióval. Hidrolízissel észter-, uretán-, amidkötést tartalmazó molekulák szabadulhatnak fel igen eltérő reakcióidővel [188]. Enzimlabilis távtartó egységek beépítésével specifikus felszabadulás mehet végbe. Katepszin-B enzimre specifikus tetrapeptid (GFLG) alkalmazásával tumorelles szerek konjugátumait állították elő. A konjugátumból a hatóanyag a lizoszómában szabadult fel [186, 189-191]. Specifikus hatóanyag felszabadulás érhető el pH kontrollált reakciókkal is. A hatóanyag ilyenkor egy olyan kémiai kötésen keresztül kapcsolódik a célbajuttató egységhez, amely semleges pH-n viszonylag stabil, savas pH-n (~5,5) labilis. Olyan daunomicin konjugátumoknál, melyek *cisz*-akonitilcsoportot tartalmaztak pH-függő felszabadulást mértek (pH=6 → $t_{1/2}$ =96 óra; pH=4 → $t_{1/2}$ =3 óra). Biodisztribúciós vizsgálatok bizonyították, hogy a konjugátum a véráramban hosszabb ideig van jelen és a sejten belül szabadul fel a hatóanyag [118, 192, 193]. Tam és munkatársai hidrazon-, tiazolidin és oximkötést tartalmazó peptid dendrimerek stabilitásának pH függését vizsgálták. A tiazolidinkötésű vegyület stabil volt pH=3-9 oldatban; az oximkötésű származék savas és semleges pH-n stabil volt; a hidrazon kötésű konjugátum savas (pH=3) és lúgos (pH=9) oldatban disszociálódott [123].

3. Célkítűzések

Doktori munkám célja *M. tuberculosis* immundomináns fehérjék építőszerkezetének térképezése, mesterséges peptidantigének szintézise és a vegyületek *in vitro* funkcionális vizsgálata. Célom továbbá antituberkulotikum konjugátumok előállítására és jellemzése.

T-sejt epitópot tartalmazó peptidszarmazékok immundiagnosztikumként való alkalmazása lehetővé tenné a fertőzöttség érzékeny és specifikus detektálását. A munka során olyan peptidok és peptidkonjugátumok előállítását terveztem, melyek optimális T-sejt választ indukálnak és ezért jól alkalmazhatók lehetnek IFN- γ mennyiségének meghatározásán alapuló teljes vért igénylő tesztekben. Ezen belül a következőket tűztem ki célul:

- 16kDa immundomináns fehérje ismert funkcionális T-sejt epitóp (91-104) peptid szarmazékainak előállítására és jellemzése;
- A 91-106 peptid C-terminálison ciszteinnel hosszabbított (⁹¹SEFAYGGSFVRTVSLPV¹⁰⁶-C) szarmazékának konjugálása oligotuftsinnel és polimer típusú hordozó molekulákhoz. A peptidok és konjugátumok *in vitro* funkcionális vizsgálata különböző donorcsoportokon;
- Két új potenciális antigén, az Rv2654 és Rv1733c fehérjék T-sejt építőszerkezetének felderítése átlapoló szintetikus peptidok alkalmazásával. A peptidok *in vitro* funkcionális vizsgálata PPD pozitív egészséges és aktív tbc-s betegek véréből izolált PBMC sejteken.

A konjugálási reakciókhoz előállított ciszteinnel tartalmú peptidok analízise során számos nehézséggel találoztunk a ciszteinnel oxidációs hajlama miatt. Szükségessé vált ezért egy olyan analitikai módszer kidolgozása, mely alkalmas a szintetikus peptidok ciszteinnel tartalmának kvantitatív meghatározására.

A tuberkulózis kezelésében alkalmazott antituberkulotikumok hatékonysága irodalmi adatok alapján növelhető célbajuttató rendszerek segítségével. Célunk a hatóanyagok biológiailag aktív és molekulárisan jól jellemezhető peptid alapú konjugátumainak előállítására és vizsgálata:

- izoniazid, *p*-aminoszalicilsav és pirazinamid hatóanyagok peptidokhoz kapcsolása (elsősorban szilárd fázisú szintézis utak kidolgozása) és a konjugátumok jellemzése;

-
- a hatóanyag-peptidkonjugátumok antituberkulotikus hatásának meghatározása *M. tuberculosis* tenyészetén;
 - antituberkulotikus hatást mutató konjugátumok szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálata.

A rezisztens baktériumok terjedése miatt nagy szükség van új antituberkulotikumokra. Az ELTE Számítógéptudományi Tanszékén, Dr. Grolmusz Vince kutatócsoportjában kifejlesztett dokkoló algoritmus segítségével a baktérium anyagcseréjében létfontosságú enzimekhez kötődő molekulákat azonosítottak. Az *in silico* azonosított vegyületekkel a következő kísérleteket terveztem:

- a vegyületek antituberkulotikus hatásának vizsgálata *M. tuberculosis* és *M. kansasii* tenyészeteken;
- *in vitro* antituberkulotikus hatást mutató vegyületek citotoxicitásának és citosztatikus hatásának vizsgálata MonoMac6 monocita sejtvonalon, HepG2 humán hepatoma sejtvonalon, preparált humán PBMC sejteken és egér csontvelői makrofágokon;
- Konjugálásra alkalmas származékok előállítása és a vegyületek kapcsolása oligopeptid típusú hordozóhoz.

4. Eredmények

4.1. T-sejt epitópot tartalmazó peptidek és származékok előállítása és jellemzése a tuberkulózis fertőzés korai kimutatására

Munkánk során *Mycobacterium tuberculosis* immundomináns fehérjéinek (16kDa, ESAT6, CFP10) T-sejt epitópjait és azok származékait állítottuk elő. Két fehérje esetében (Rv2654, Rv1733c) az epitópszerkezet feltérképezése volt a célunk. Különböző donorcsoportokon vizsgáltuk a peptidek, peptidszármazékok és konjugátumok T-sejtes immunválaszt indukáló *in vitro* hatását perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejteken (PBMC) áramlási citometria, ELISA és ELISpot tesztek segítségével. A vizsgált csoportok a következők voltak: (i) PPD negatív, egészséges donorok (a látens fertőzés vagy a tuberkulózis kizárható); (ii) PPD pozitív, egészséges donorok (tuberkulózis megbetegedés kizárható, BCG oltás miatti szenzitizáltság vagy látens fertőzés valószínűsíthető); (iii) aktív tbc-s betegek (radiológiai és bakteriológiai vizsgálatokkal igazolt kórkép).

Célunk az volt, hogy a T-sejt válasz alapján (melyre a termelt IFN- γ mennyisége alapján következtethetünk) meg tudjuk különböztetni a BCG oltott és/vagy fertőzött páciensek immunválaszát a tuberkulózis korai és előrehaladott stádiumában is. A következő fejezetekben ismertetem a peptidek és peptidszármazékok előállítását, analitikai jellemzését és az *in vitro* funkcionális vizsgálatok eredményeit.

4.1.1. A 16kDa fehérjéből származó T-sejt epitóp peptidek és konjugátumok szintézise, analitikai jellemzése és antigenitásuk vizsgálata

Dormans állapotban az egyik legnagyobb mennyiségben expresszált fehérje a 16kDa hőszokk protein (Hsp16.3, acr, Rv2031c) [75, 194]. Csoportunk előzetes eredményei alapján ismert, hogy a 16kDa immundomináns fehérje funkcionális T-sejt epitópjai a 91-104 szekvenciának megfelelő peptid. Ezen régió belül ismerjük azokat a kulcsfontosságú aminosavakat, melyek a T-sejt receptorhoz, illetve az MHC fehérjéhez kötődnek [90-92, 195]. A funkcionális T-sejt epitóp további vizsgálatára és a peptidek T-sejtes immunválaszt indukáló hatásának növelése céljából a 2. táblázatban látható peptideket állítottuk elő.

A 16kDa T-sejt epitóp peptidek szintézisét Fmoc/tBu és Boc/Bzl stratégiával végeztük szilárd fázison az 5.1.2. fejezetben ismertett módszerek szerint. A hasítás során kapott nyersterméket RP-HPLC segítségével tisztítottuk, majd liofilizálással izoláltuk. A tisztított

peptideket analitikai RP-HPLC, tömegspektrometria és aminosavanalízis segítségével jellemeztük. Az aminosavanalízis eredménye minden esetben jó egyezést mutatott a vizsgált peptid aminosavösszetételével. A peptidek analitikai jellemzését a 2. táblázat foglalja össze. A peptidek C-terminálisát minden esetben amid formában állítottuk elő, az N-terminális szabad aminosav volt.

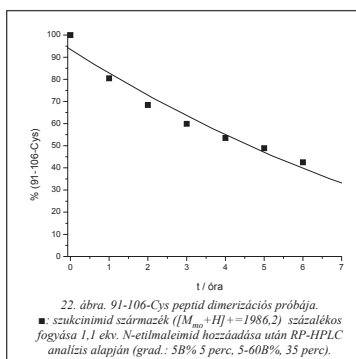
2. táblázat. 16kDa fehérje 91-110 régiójának szekvenciája alapján szintetizált peptidek analitikai jellemzése.

kód	szekvencia	M _{mo} számított	M _{mo} ^a mért	R _t ^b [perc]
91-102	⁹¹ SEFAYGSFVRTV ¹⁰²	1360,7	1360,8	29,0
91-104	⁹¹ SEFAYGSFVRTVSL ¹⁰⁴	1560,8	1561,0	31,3
92-104(D)	⁹² DFAYGSFVRTVSL ¹⁰⁴	1459,7	1460,2	31,0
91-106	⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶	1756,9	1757,2	32,0
91-110	⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPVGAD ¹¹⁰	2129,0	2129,2	29,2
91-110(D)	⁹¹ SDFAYGSFVRTVSLPVGAD ¹¹⁰	2115,0	2115,0	29,2
Ala-Ala	A ⁹² EFAYGSFVRTVSL ¹⁰⁴ A	1615,8	1616,3	31,0
AA-AA	AA ⁹² EFAYGSFVRTVSL ¹⁰³ A	1573,8	1574,2	28,5
A-A	A ⁹² EFAYGSFVRTVSL ¹⁰³ AA	1573,8	1574,2	28,5
β-Ala	βA-βA ⁹² EFAYGSFVRTVSL ¹⁰⁴ βA-βA	1757,9	1757,8	30,4
AGA	⁹¹ SEFAGAGFVRAGAL ¹⁰⁴	1350,7	1350,7	28,0
91-106-Cys	⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶ C	1859,9	1860,0	32,8
Ser-91-106	S ⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶	1843,9	1844,0	31,5

^a monoizotópos molekulatömeg: Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5µm, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc

A 16kDa fehérje T-sejt építő peptidek T-sejtes immunválaszt indukáló hatása növelhető hordozó molekulákhoz való konjugálással. A konjugáláshoz a 91-106 peptid C-terminálisát



ciszteinnel hosszabbítottuk (⁹¹SEFAYGSFVRTVSLPV¹⁰⁶-C) és tioéterkötés kialakításával konjugáltuk klóracetilezett oligotufsin és polimer típusú (SAK, EAK) hordozó molekulákhoz (5.1.5. fejezet).

Mivel lúgos közegben a levegő oxidáló hatására ciszteint tartalmazó peptid diszulfidhidon keresztül dimert alkot, ezért a konjugálási reakció előtt dimerizációs próbát végeztünk 0,1M TRIS-pufferben (pH=8,3) (5.1.5.2. fejezet). A

peptidkoncentráció 1mg/ml volt. A reakcióelegyből óránként mintát vettünk a és *N*-etilmaleimid hozzáadása után RP-HPLC analízist végeztünk. A csúcás alatti terület alapján ábrázoltuk az *N*-etilmaleimiddel reagáló 91-106-Cys peptid százalékos fogyását (22. ábra). A dimerizációs próba eredménye alapján megállapítható, hogy 6 óra elteltével a peptid 60%-a dimer formában van jelen. A konjugáció során a peptid ezért csak alacsony koncentrációban lehet jelen a hordozóhoz képest, különben a diszulfidhíd kialakulása kerül előtérbe.

A ⁹¹SEFAYGSFVRTVSLPV¹⁰⁶-C (91-106-Cys) peptidet klóracetilezett SAK, EAK polilizin gerincű, elágazó lánccú polimerekhez és OT20 oligotufsin származékhoz konjugáltuk. A hordozók klóracetilézését és a konjugálást az 5.1.5.1. és 5.1.5.3. fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük.

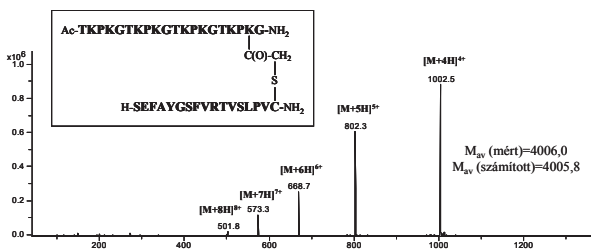
Az OT20 (oligotufsin) hordozó molekulát szilárd fázison klóracetiléztük, majd hasítás és tisztítás után oldatban reagáltattuk a 91-106-Cys epitóp peptiddel. Az OT20(91-106) konjugátum analitikai jellemzését tömegspektrometriával, aminosavanalízissel és RP-HPLC analízissel végeztük (3. táblázat). A konjugátum szerkezetét és tömegspektrumát a 23. ábra mutatja be.

3. táblázat Oligotufsin származékok és a konjugátum analitikai jellemzése.

kód	szekvencia	M _{av} ^a számított	M _{av} ^a mért	R _f ^b [perc]
OT20	Ac-TKPKGTKPKGTPKPKGTPKPG-NH ₂	2105,5	2105,5	24,0*
OT20(CIAc)	Ac-TKPKGTKPKGTPKPKGTPKPK(CIAc)G-NH ₂	2182,0	2181,6	22,9
OT20(91-106)	Ac-TKPKGTKPKGTPKPKGTPKPK(91-106)G-NH ₂	4005,8	4006,0	26,2

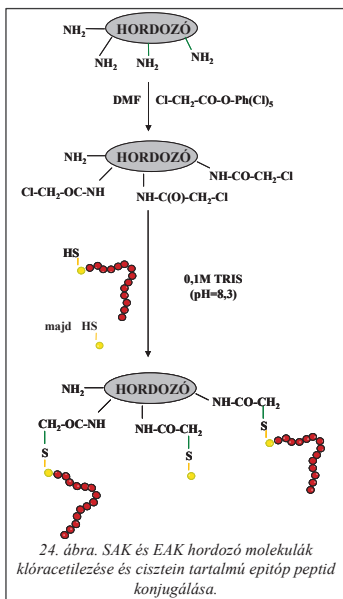
^a átlag molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5µm, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B% 35 perc
*grad.: 0B% 5 perc, 0-40B% 35 perc



23. ábra. OT20(91-106) konjugátum szerkezete és ESI-MS tömegspektruma.

A polilizin gerincű, elágazó lánccú polimer hordozók (SAK, EAK) aminosavösszetételét aminosavanalízissel határoztuk meg. SAK esetében S : A : K = 0,9 : 3,5 : 1,0 összetételt mértünk, EAK esetében ez E : A : K = 1,0 : 3,5 : 1,0 aránynak felelt meg.



A SAK és EAK polimerek klóracetilézését és a konjugálás menetét a 24. ábra foglalja össze. A klóracetilézést követően módosított Schöniger égetéses módszer alapján [196] meghatároztuk a polimerek klórtartalmát. A SAK esetében a klórtartalomból számolt szubsztitúciófok 21% volt, míg az EAK esetében 15% adódott. A klóracetilezett hordozó molekulákat 0,1M TRIS-pufferben (pH=8,3) oldottuk és kis részletekben adagoltuk hozzá a 91-106-Cys peptidet a klórtartalomra számított 20%-os feleslegben. A SAK és EAK polimerek esetében a konjugálást követően ciszteint adtunk feleslegben, hogy az elreagálatlan klóracetilcsoportokat blokkoljuk. A cisztein az esetleg képződött dimer peptideket is redukálhatja, így még további peptidek kapcsolódhatnak a polimerhez. A beépülő cisztein szabad amino- és

karboxilcsoportja növeli a polimer poláris karakterét, ezáltal a polimer oldékonysága javul. A SAK(91-106) és EAK(91-106) konjugátumok szubsztitúciófokát aminosavanalízissel határoztuk meg (4. táblázat).

4. táblázat. SAK és EAK konjugátumok jellemzése aminosavanalízis alapján.

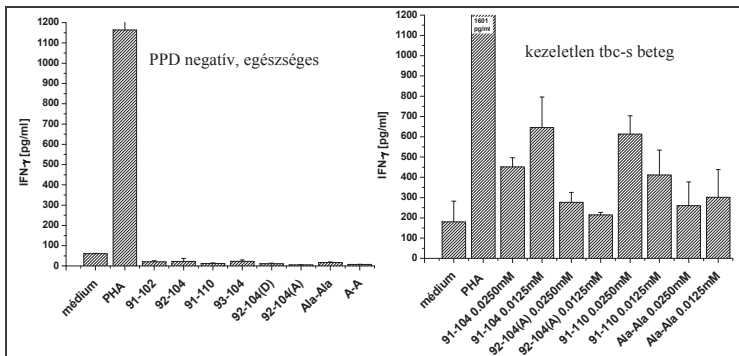
kód	szekvencia	szubsztitúciófok
SAK (91-106)	poly[Lys(91-106) _{0,15} -Ser _{0,9} -DL-Ala _{3,5}]	15%
EAK (91-106)	poly[Lys(91-106) _{0,12} -Glu _{1,0} -DL-Ala _{3,5}]	12%

SYKAM S-433 aminosavanalizátor, 6M HCl, 110°C, 24 ora hidrolízist követően

A peptidek és konjugátumok T-sejtes immunválaszt indukáló hatását PPD negatív egészséges, valamint radiológiailag és mikrobiológiailag diagnosztizált tbc-s betegek vérében vizsgáltuk. A tbc-s betegek között különbséget tettünk aszerint, hogy a vérvétel előtt kaptak-e antituberkulotikum kezelést. A donorok véréből preparált PBMC sejteket 24 órán át stimuláltuk a peptidekkel, konjugátumokkal, illetve a pozitív kontrollal (PHA, amely IFN- γ termelést kiváltó specifikus stimulátor), majd a felülírszóból ELISA tesztben meghatároztuk a

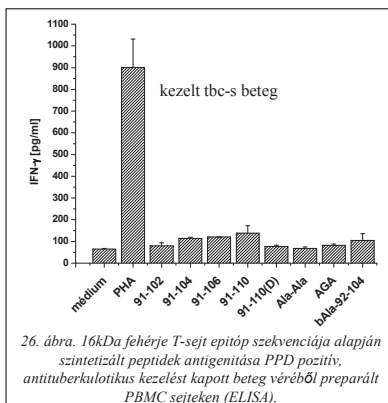
termelt IFN- γ mennyiségét (5.2.4. fejezet). A termelt IFN- γ mennyisége jellemzi a peptidek, illetve konjugátumok T-sejtekre gyakorolt stimulációjának mértékét.

PPD negatív, egészséges donor vérből preparált PBMC sejtek a peptidek hatására nem termeltek a negatív kontrollnál nagyobb mennyiségű IFN- γ citokint (25. ábra). PPD pozitív, radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok alapján diagnosztizált tbc-s beteg PBMC sejtjeinél azonban jelentős mértékű volt az IFN- γ termelés (25. ábra).



25. ábra. 16kDa fehérje T-sejt epitóp szekvenciája alapján szintetizált peptidek T-sejtes immunválaszt indukáló hatása PPD negatív, egészséges és PPD pozitív, kezeletlen beteg vérből preparált PBMC sejteken (ELISA).

Mindegyik peptid hatására (91-104, 92-104(A), 91-110, Ala-Ala) nagyobb T-sejt választ detektáltunk a PPD pozitív páciensnél. A peptidek antigenitását két különböző

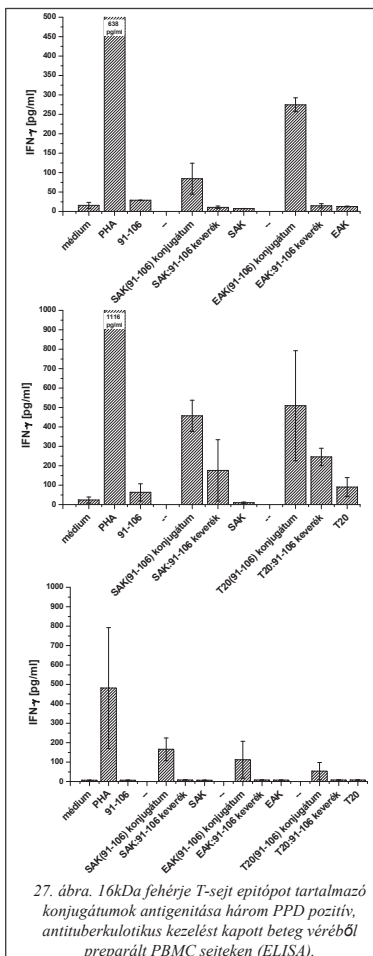


26. ábra. 16kDa fehérje T-sejt epitóp szekvenciája alapján szintetizált peptidek antigenitása PPD pozitív, antituberkulotikus kezelést kapott beteg vérből preparált PBMC sejteken (ELISA).

koncentrációban ($c=12,5$ és $25\mu\text{M}$) vizsgáltuk (25. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az IFN- γ termelés a peptidekre nézve nem mutat koncentrációfüggést és az alacsonyabb $12,5\mu\text{M}$ koncentráció is elegendő a sejtek stimulálásához [197].

Az antituberkulotikus kezelés hatására a T-sejt válasz mértéke csökkent, kisebb IFN- γ termelést mértünk az epitóp peptidekkel való kezelést követően (26. ábra). A kísérlet során mért IFN- γ mennyisége azonban nagyobb, mint

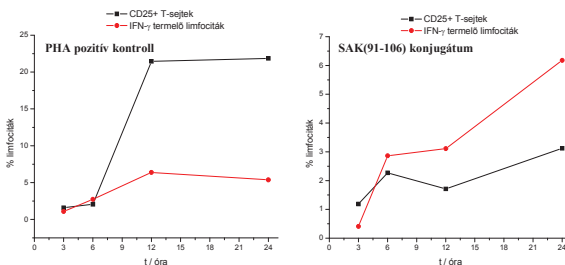
a PPD negatív donor esetében. Eredményeink alapján, melyet irodalmi adatok is alátámasztanak, megállapítható, hogy a terápia során alkalmazott antibakteriális szerek mellékhatásaként csökkenhet az immunválasz mértéke [64]. Eddigi kísérleteink során továbbá azt is tapasztaltuk, hogy a kezelésen átesett betegek véréből kevesebb PBMC sejtet tudunk izolálni, mint az egészséges donorok esetében.



Az előállított SAK(91-106), EAK(91-106) és OT20(91-106) konjugátumok T-sejtes immunválaszt indukáló hatását három PPD pozitív, radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok alapján diagnosztizált tbc-s beteg véréből preparált PBMC sejteken vizsgáltuk. Mindhárom páciens esetében a vérvétel 4 hónap antituberkulotikus kezelés után történt. A PBMC sejteket kezeltük a konjugátumokkal. Kontrollként 91-106 peptidet, szabad hordozókat és a konjugátumok szubsztitúciófokának megfelelő összetételű keverékeket vizsgáltuk. A felülészóából ezután ELISA tesztben meghatároztuk a termelt IFN- γ mennyiségét (27. ábra). Mindhárom páciens esetében a konjugátumokkal való kezelés hatására a mért IFN- γ mennyisége nagyobb volt, mint a 91-106 peptidnél. A szabad hordozó molekulák (SAK, EAK, OT20) nem stimulálták jelentős mértékben a T-sejteket. A szubsztitúciófoknak megfelelő keverékek minden esetben kisebb IFN- γ termelést eredményeztek, mint a kovalens kötésű konjugátumok. A konjugáció tehát nagymértékben növelte a 91-106 epitóp peptid antigenitását. Az antituberkulotikus kezelésen átesett páciensek esetében is jól mérhető T-sejt

választ detektáltunk [197]. Bár a T-sejt stimuláció mechanizmusát nem vizsgáltuk, kutatócsoportunk előző eredményei alapján arra következtettünk, hogy a konjugálással nagy valószínűséggel nő az epitóp peptid sejtbejutásának mértéke. Feltételezhető, hogy az antigénbemutató során a *de novo* szintetizálódott peptid nagyobb valószínűséggel kötődik az MHC molekulához [114].

BCG oltott, egészséges donor vérből izolált PBMC sejteket SAK(91-106) konjugátummal és OT20 hordozóval stimuláltuk. A T-sejt aktiváció kinetikájának tanulmányozására [198-200] fluoreszcens ellenanyag-konjugátummal jelöltük a sejtfelszíni CD25 markert és az intracellulárisan termelődött IFN- γ citokint (5.2.8. fejezet). A sejteket 3, 6, 12 és 24 óra elteltével áramlási citométerrel analizáltuk (28. ábra).

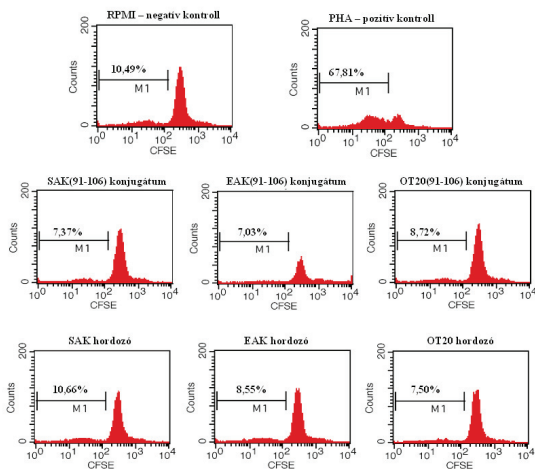


28. ábra. A T-sejt stimuláció időfüggése PHA (pozitív kontroll) és SAK(91-106) konjugátum hatására.

A vizsgált BCG oltott, egészséges donor esetében a CD25+ T-sejtek 12 óra stimuláció után aktiválódnak és adataink alapján legalább ennyi idő kell ahhoz is, hogy az intracelluláris IFN- γ termelés optimális mértékű legyen. A PHA mitogén anyag, mely aspecifikus stimulációt vált ki. A konjugátum esetében a kovalensen kötött epitóp peptid miatt feltételezhetjük a specifikus stimulációt. A 28. ábrán összefoglalt eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a SAK(91-106) konjugátummal kezelt sejteknél időben eltolódott az aktiválódás a PHA-hoz képest. Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a továbbiakban az intracelluláris IFN- γ mérése során 12, illetve 24 óra kezelést követően végezzük az áramlási citometriás analíziseket.

Vizsgáltuk a 16kDa fehérje T-sejt epitópját (91-106) tartalmazó konjugátumok proliferációs hatását PPD pozitív, egészséges donor vérből preparált PBMC sejteken. A kísérlet során a sejteket CF-SE fluoreszcens vegyülettel reagáltattuk [57, 58]. A jelölés után a

sejtekhez SAK(91-106), EAK(91-106) és OT20(91-106) konjugátumokat, valamint SAK, EAK és OT20 szabad hordozókat adtunk 25 μ M koncentrációban. A sejtpopulációt 6 nap elteltével áramlási citométerrel analizáltuk az 5.2.7. fejezetben leírtaknak megfelelően (29. ábra). A pozitív kontrollként alkalmazott PHA hatására 6 nap alatt a PBMC sejtek 68%-a osztódott. Ha a sejtekhez csak RPMI médiumot adtunk (negatív kontroll) a proliferáció mértéke 10% volt. A vizsgált konjugátumok és a szabad hordozók egyike sem indukált proliferációt PBMC sejteken az általunk alkalmazott módszerrel történt meghatározás alapján.



29. ábra. A konjugátumok és szabad hordozók proliferációs hatása PBMC sejteken.

4.1.2. Az Rv2654 immundomináns fehérje építőszerkezetének feltérképezése

Az Rv2654 (Tb7.7) fehérje egy specifikus antigén, mely hiányzik a BCG vakcinatörzs lizátumból [100]. A fehérje építőszerkezetének felderítésére a szekvenciának megfelelő, 20 aminosavat tartalmazó átlapoló peptideket szintetizáltunk (az átlapoló aminosavak száma 10 volt). A peptideket Fmoc/tBu stratégia alkalmazásával, szilárd fázison, automata peptidszintetizátorban állítottuk elő (5.1.2. fejezet). A hasítás után a peptideket tisztítottuk, majd analitikai RP-HPLC, tömegspektrometria és aminosavanalízis segítségével jellemeztük. Az aminosavanalízis eredménye minden esetben jó egyezést mutatott a vizsgált peptid várt aminosavösszetételével. A peptidek szekvenciáját és analitikai jellemzését az 5. táblázat tartalmazza. A peptidek C-terminálisát minden esetben amid formában állítottuk elő, az N-terminális szabad amin volt.

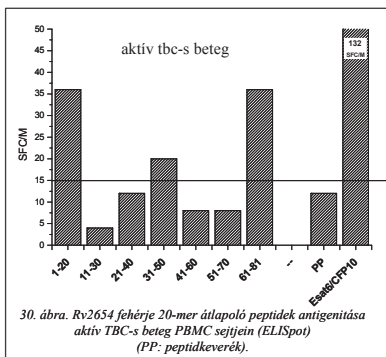
5. táblázat. Rv2654 fehérje szekvenciája alapján szintetizált átlapoló peptidek analitikai jellemzése.

kód	szekvencia	M_{av}	M_{av}^a	R_f^b
		számított	mért	[perc]
1-20	MSGHALAARTLLAAADELVG	1966,3	1966,1	31,7
11-30	LLAAADELVGGPPVEASAAA	1821,1	1821,0	25,8
21-40	GPPVEASAAALAGDAAGAWR	1837,0	1837,0	27,5
31-50	LAGDAAGAWRTAAVELARAL	1982,3	1982,1	34,4
41-60	TAAVELARALVRVAESHGV	2019,3	2019,2	33,3
51-70	VRVAESHGVAAVLFAATAA	1910,2	1909,8	32,0
61-81	AAVLFAATAAAAAVDRGDPP	1925,2	1925,1	30,5

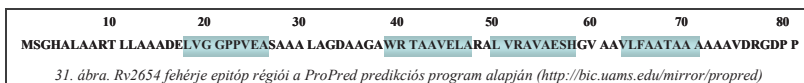
^a átlag molekulatömeg: Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5 μ m, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5perc, 5-60B%, 35 perc

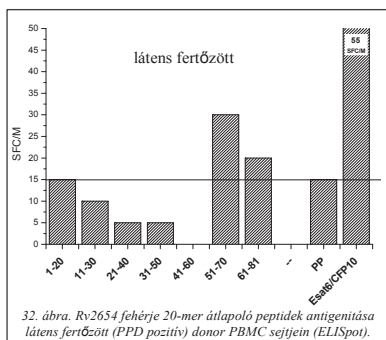
Az Rv2654 fehérje 81 aminosavat tartalmaz, ennek megfelelően összesen hét darab átlapoló peptidet szintetizáltunk (5. táblázat). A peptidek immunválaszt indukáló hatását ELISpot kísérletben vizsgáltuk PPD pozitív látens fertőzöttek és aktív (radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok alapján diagnosztizált, kezelést nem kapott) tbc-s betegek PBMC sejtjein. BCG oltott, nagy valószínűséggel nem fertőzött donor vérén is teszteltük a peptideket annak eldöntésére, hogy azok nem indukálnak hamis negatív immunválaszt. Az ELISpot kísérleteket MABTECH Human Interferon- γ ELISpot^{PRO} (Nacka Strand, Svédország) készlet segítségével végeztük (ld. 5.2.5. fejezet). A PBMC sejteket 16 órán át stimuláltuk a peptidekkel, peptidkeverékkel (PP) és ESAT6+CFP10 fehérjekeverékkel. A peptidkeverék (peptide pool, PP) azonos koncentrációban tartalmazta a hét átlapoló peptidet. Az ELISpot lemez leolvasását követően meghatároztuk az IFN- γ jelenlétére utaló „pöttyformáló kolóniák” (spot forming



alaján szintetizált átlapoló peptidokra (30. ábra). A peptidkeverékre (PP) kisebb T-sejt választ kaptunk, mint egyenként a peptidokra. A fehérjén belül 3 epitóp régiót feltételezhetünk: N-terminális régió, 31-50 régió és C-terminális régió. ProPred T-sejt epitóp predikációs program [110] segítségével analizálva a fehérjét a kísérleti adatokkal jó egyezést mutató eredményt kaptunk (31. ábra).



Az interneten hozzáférhető ProPred predikációs program (ProPred. MHC Class-II Binding Peptide Prediction Server, <http://bic.uams.edu/mirror/propred>) egy fehérjén belül lokalizálja a T-sejt epitópokat. A predikció a HLA-DR allélekhez való kötődés alapján történik.

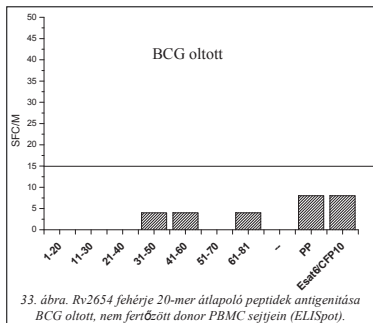


colony, SFC) számát. Ebből levontuk a negatív kontrollt és 1 millió sejtre vonatkoztatva grafikonon ábrázoltuk a kapott SFC/M értékeket. Pozitív válaszként az összes vizsgált negatív kontroll átlagának háromszorosánál nagyobb értéket fogadtuk el, mely ebben a kísérlet sorozatban 15 SFC/M volt. Antituberkulotikus kezelést nem kapott, aktiv tbc-s beteg esetében jól mérhető immunválaszt detektáltunk az Rv2654 fehérje szekvenciája

Eredményként nonamer peptidokat kapunk, bár az MHC II fehérjéhez való kötődésben hosszabb peptidok vesznek részt (13-20 aminosav). A kapott adatokat ezért kritikával kell értékelnünk. Az Rv2654 fehérje esetében a predikció alapján, a kísérleti eredményekhez hasonlóan, 3 epitóp régiót lokalizáltunk.

Az átlapoló peptidok immunválaszt indukáló hatását látens fertőzött (klinikai tüneteket nem mutató PPD pozitív) donork

vérén is vizsgáltuk (32. ábra). Látens fertőzött donoroknál összességében kisebb SFC/M értékeket mértünk. A fehérje C-terminális régiója azonban itt is nagyobb T-sejt választ indukált az ELISpot kísérletben.

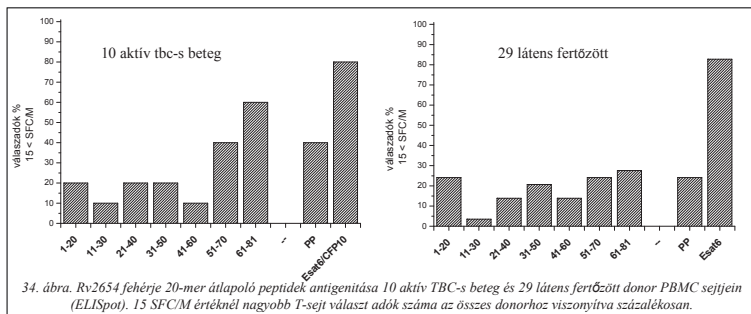


33. ábra. Rv2654 fehérje 20-mer átlapoló peptidok antigenitása BCG oltott, nem fertőzött donor PBMC sejtjein (ELISpot).

A teszrendszer és az átlapoló peptidok specificitásának ellenőrzésére egy BCG oltott, *M. tuberculosis* baktériummal nem fertőzött donor PBMC sejtjein is elvégeztük az ELISpot kísérletet (33. ábra). *M. tuberculosis* fertőzés esetén (látens fertőzöttség, aktív tbc) az ESAT6 és CFP10 fehérjék ellen jelentős immunválaszt mérünk (ld. 30. és 32. ábra). A 33. ábrán bemutatott BCG oltott donor esetében az

Esat6/CFP10 fehérjék azonban nem indukáltak T-sejt választ, ami alapján feltételezhetjük, hogy a donor nem fertőzött. Az Rv2654 fehérje alapján szintetizált átlapoló peptidok egyikénél sem kaptunk 15 SFC/M értéknél nagyobb eredményt. A kísérlet alapján megállapíthatjuk tehát, hogy a peptidok és a peptidkeverék (PP) nem stimulálták aspecifikusan a PBMC sejtet.

Az Rv2654 átlapoló peptidokat összesen 10 tbc-s beteg és 29 látens fertőzött donor PBMC sejtjein teszteltük. A 34. ábrán százalékosan ábrázoltuk a peptidokra 15 SFC/M értéknél nagyobb T-sejt választ adó donorok számát.



34. ábra. Rv2654 fehérje 20-mer átlapoló peptidok antigenitása 10 aktív TBC-s beteg és 29 látens fertőzött donor PBMC sejtjein (ELISpot). 15 SFC/M értéknél nagyobb T-sejt választ adók száma az összes donorhoz viszonyítva százalékosan.

Az Rv2654 fehérje C-terminális régiója (61-81) a tbc-s betegek 60%-ánál indukált specifikus immunválaszt. Irodalmi adatok alapján a rekombináns Rv2654 fehérje a tbc-s betegek 53%-

ánál (10/19) stimulálta a PBMC sejteket [100].

A kapott eredmények alapján lokalizált építő régiókon (*N*-terminális, 31-50 és *C*-terminális régió) belül további peptideket szintetizáltunk. Célunk az volt, hogy rövidebb (15-mer), átfedő peptidek segítségével meghatározhassuk a funkcionális építőpotot, tehát azt a legkisebb szekvenciát, amely szintetikus peptidként immunválaszt indukál. Az előállított peptidek analitikai jellemzését a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat. Rv2654 fehérje szekvenciája alapján szintetizált 15-mer átlapoló peptidek analitikai jellemzése.

kód	szekvencia	M _{mo} számított	M _{mo} ^a mért	R _t ^b [perc]
1-15	MSGHALAARTLLAAA	1451,8	1451,9	26,0
6-20	LAARTLLAAADELVG	1481,8	1481,8	30,8
31-45	LAGDAAGAWRTAAVE	1456,7	1456,8	21,9
36-50	AGAWRTAAVELARAL	1553,9	1553,8	32,3
51-65	VRAVAESHGVAAVLF	1523,8	1523,8	28,4
55-70	AESHGVAAVLFAATAA	1483,8	1483,8	30,0
61-75	AAVLFAATAAAAAAV	1286,7	1286,8	16,5*
66-81	AATAAAAAAVDRGPP	1422,7	1422,8	16,6*
pnc (38-55)	AWRTAAVELARALVRAVA	1922,1	1922,2	41,5 [§]

^a monoizotópos molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5µm, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5perc, 5-60B%, 35 perc

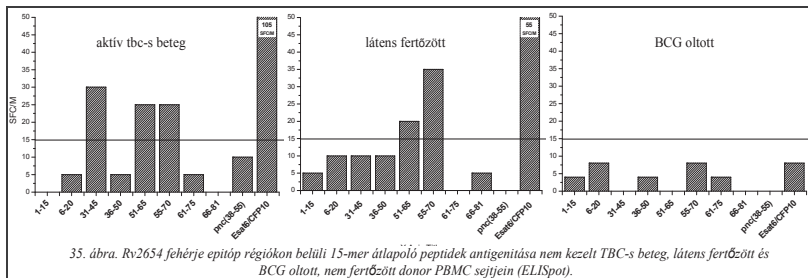
^{*} Phenomenex Jupiter C4, 5µm, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-70 B%, 35 perc;

[§] Eurospher-100 C18, 5µm, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-90 B%, 45 perc;

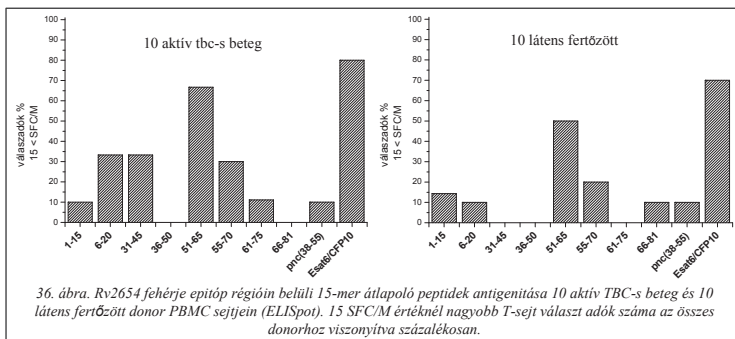
A 15-mer peptidek szintézise nemcsak gazdaságosabb, de számos esetben jobb oldékonyágú peptidet kaptunk azáltal, hogy csökkentettük az apoláros aminosavak számát. A peptidek tervezésénél figyelembe vettük, hogy az *N*-terminális aminosav ne legyen glutaminsav (E), mert így elkerülhető az esetleges piroglutaminsav képződés. Ezekben az esetekben a peptidet a fehérje szekvenciájának megfelelően hosszabbítottuk egy aminosavval (pl. 55-70 peptid). Kontrollként előállítottuk azt a peptidet (pnc(38-55)), mely megtalálható a Cellestis cég (Victoria, Ausztrália) által forgalmazott QuantiFERON-TB Gold In-Tube tesztben (TB7.7(p.4) kóddal).

A peptideket a fentiekhez hasonlóan ELISpot kísérletben vizsgáltuk kezelést nem kapott (radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok alapján diagnosztizált) tbc-s betegek, látens fertőzöttek és BCG oltott, nem fertőzött donorok PBMC sejtjein (35. ábra). Az előző kísérlethez hasonlóan a BCG oltott, nem fertőzött donor esetében itt sem mértünk 15 SFC/M értéknél nagyobb választ, tehát nem tapasztaltunk hamis pozitív stimulációt. A példaként bemutatott tbc-s beteg és látens fertőzött donor esetében a rövidebb, 15-mer peptidek is

indukáltak IFN- γ termelést.



Összesen 10 aktív tbc-s beteg és 10 látens fertőzött donor PBMC sejtejn vizsgáltuk a peptideket és ábrázoltuk a 15 SFC/M értéknél nagyobb választ adókat (36. ábra). Az Rv2654 fehérje C-terminális régióján belül az 51-65 peptid a tbc-s betegek 67%-ánál, a látens fertőzöttek 50%-ánál indukált specifikus immunválaszt. A QuantiFERON-TB Gold In-Tube tesztben alkalmazott peptid (pnc(38-55)) az általunk végzett tesztekben jóval kisebb százalékban stimulálta a PBMC sejteket. Az epitópszerkezet szisztematikus feltérképezése alapján a legnagyobb T-sejt választ a VRAVAESHGVA AVL F (51-65) peptid váltotta ki, mely az ESAT6/CFP10 fehérjekeverékkel közel azonos.



4.1.3. Az Rv1733c immundomináns fehérje építőszerkezetének feltérképezése

Az Rv1733c fehérjét kódoló gén a *Mycobacterium tuberculosis* genomján belül a DosR (dormancy regulon) régióban található (az Rv1733c kód jelöli a gént és a fehérjét is). A baktérium dormans állapotban is expresszálja a fehérjét. Az Rv1733c gén hiányzik a környezeti mycobacteriumok genomjából, viszont megtalálható a *M. bovis* genomjában. A fehérje humorális és/vagy celluláris T-sejtes immunválaszt indukál látns fertőzötteknél és tbc-s betegeknél [101, 102]. Az Rv1733c fehérje T-sejt építőszerkezete nem ismert. Az építőszerkezet feltérképezésére 20 aminosavat tartalmazó, átlapoló peptideket ELISpot kísérletben teszteltünk látns fertőzöttek PBMC sejtjein.

7. táblázat. Rv1733c fehérje szekvenciája alapján szintetizált dodekamer átlapoló peptidek analitikai jellemzése.

Kód	szekvencia	M _w , számított	M _w , ^a mért	R _f ^b [perc]
1-20	MIATRDREGATMITFRLRL	2351,8	2351,5	27,9
11-30	ATMITFRLRLPCRTILRVFS	2393,0	2393,5	29,2
21-40	PCRTILRVFSRNPLVGTDR	2354,8	2355,5	27,0
31-50	RNPLVGTDRLEAVVMLLAV	2221,7	2221,5	32,5
41-60	LEAVVMLLAVTVSLLTIPFA	2099,6	2099,8	38,2
51-70	TVSLLTIPFAAAAGTAVQDS	1932,2	1932,0	28,2
61-80	AAAGTAVQDSRSHVYAHQAQT	2168,3	2168,0	20,2
71-90	RSHVYAHQAQTRHPATATVI	2243,5	2243,2	21,4
81-100	TRHPATATVIDHEGVIDSNT	2133,3	2133,0	22,3
91-110	DHEGVIDSNTTATSAPPRTK	2096,2	2096,0	27,4
101-121	TATSAPPRTKITVPARWVNG	2221,6	2221,2	25,8
111-130	ITVPARWVNGIERSGEVNA	2166,5	2166,1	27,4
121-140	GIERSGEVNAKPGTKSGDRV	2056,3	2056,1	18,7
131-150	KPGTKSGDRVGHWVDSAGQL	2070,3	2069,9	26,8
141-160	GIWVDSAGQLVDEPAPPARA	2048,3	2048,1	26,7
151-170	VDEPAPPARAADAALAALG	1888,2	1888,0	27,7
161-180	IADAALAALGLWLSVAAVAG	1853,2	1853,4	35,5
171-190	LWLSVAAVAGALLALTRAIL	2021,5	2021,1	36,2
181-200	ALLALTRAILRVNRNASWQH	2301,8	2301,4	31,3
191-210	IRVRNASWQHIDSLFCTQR	2443,8	2444,4	27,1

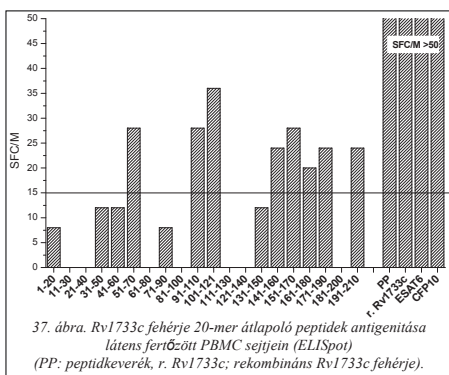
^a átlag molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5µm, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc

A peptideket szilárd fázison, Fmoc/tBu stratégia alkalmazásával automata peptidszintetizátorban állítottuk elő (ld. 5.1.2. fejezet). A hasítás után a peptideket RP-HPLC alkalmazásával tisztítottuk, majd analitikai RP-HPLC, tömegspektrometria és aminosavanalízis segítségével jellemeztük. Az előállított peptidek szekvenciáját és analitikai

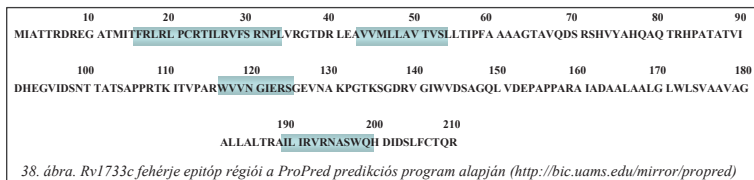
jellemzését a 7. táblázat foglalja össze. A peptidek C-terminálisát minden esetben amid formában állítottuk elő, az N-terminális szabad aminosav volt. Húsz átlapoló peptidet szintetizáltunk, mely lefedte a 210 aminosavat tartalmazó Rv1733c fehérje teljes szekvenciáját. Az aszparagin C-terminális esetében a fehérje szekvenciájának megfelelően hosszabbítottuk a peptidet, mert így elkerülhető az esetleges aszpartamid kialakulásával járó mellékreakció (101-121 peptid).

A peptidek T-sejt választ indukáló hatását ELISpot kísérletben vizsgáltuk PPD pozitív látens fertőzötték PBMC sejtjein (ld. 5.2.5. fejezet). Az ELISpot kísérleteket a fentiekhez

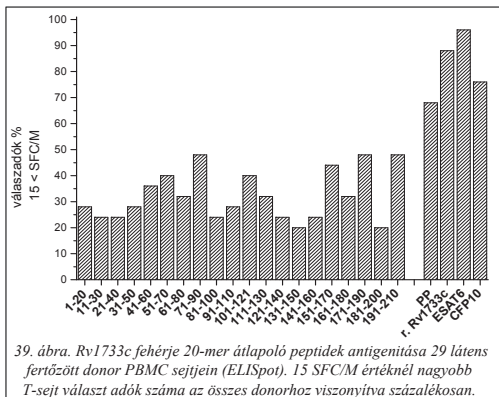


hasonlóan végeztük, a tesztben alkalmazott koncentrációk, kontrollok és inkubálási idők megegyeztek az Rv2654 peptideknél alkalmazottakkal. Az ELISpot kísérletek alapján peptidenként ábrázoltuk az 1 millió sejtre vonatkoztatott „pöttyformáló kolóniák” (spot forming colony, SFC) számát. Pozitív válaszként itt is a 15-nél nagyobb SFC/M értéket fogadtuk el. Látens fertőzöttek esetében jól mérhető

immunválaszt detektáltunk az Rv1733c fehérje szekvenciája alapján szintetizált átlapoló peptidekre (37. ábra). A fehérjén belül több építő régiót különíthetünk el, melyek meglehetősen jó egyezést mutatnak a ProPred számítógépes predikció [110] során kapott eredményekkel (38. ábra).



Az átlapoló peptidek antigenitását összesen 29 látens fertőzött, tüneteket nem mutató donor vérén vizsgáltuk. A 15-nél nagyobb SFC/M értéket adó donorok számát osztottuk az összes vizsgált donor számával és peptidenként százalékosan ábrázoltuk (39. ábra).



A látens fertőzött donorok 76%-a adott 15 SFC/M értéknél nagyobb T-sejt választ a rekombináns Rv1733c fehérjére (r. Rv1733c), mely közel azonos, mint az ESAT6 és CFP10 fehérjék esetében. Ez az eredmény jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal (61%) [102]. A peptidkeverék (PP) a rekombináns fehérjéhez hasonlóan stimulálta a PBMC sejteket (59%). A fehérje szekvenciáján belül a következő építők régiókat lokalizáltuk: 71-90, 101-121, 151-170, 170-190 és 191-210.

A kapott eredmények alapján 2 régió (91-130 és 191-210) belül további peptideket szintetizáltunk, hogy meghatározhassuk a funkcionális T-sejt építőt. Vizsgáltuk továbbá, hogy a szekvenciában található cisztein (C^{22} , C^{207}) aminosavat szerinre (S) cserélve megmarad-e a peptid T-sejt választ indukáló hatása. Az előállított peptidok szekvenciáját és analitikai jellemzését a 8. táblázat foglalja össze.

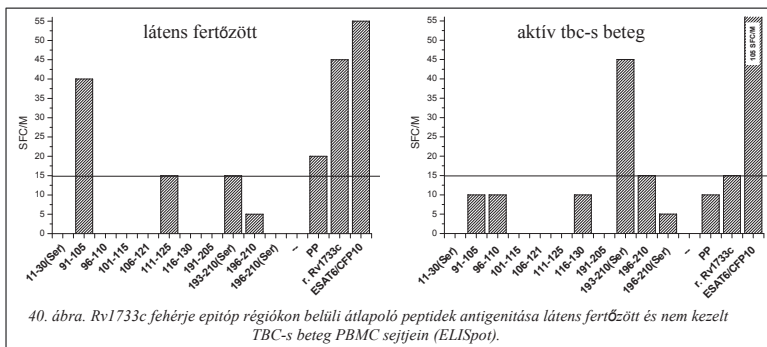
8. táblázat. Rv1733c fehérje szekvenciája alapján szintetizált további átlapoló peptidok analitikai jellemzése.

kód	szekvencia	M_r számított	M_r ^a mért	R_f ^b [perc]
11-30(Ser)	ATMITFRLRLPSRTLRVFS	2377,9	2377,6	29,1
91-105	DHEGVDSNTTATSA	1516,5	1516,4	15,4
96-110	IDSNTTATSAPPRTK	1558,7	1558,3	14,5
101-115	TATSAPPRTKITVPA	1509,8	1509,8	18,6
106-121	PPRTKITVPARVVVNG	1790,1	1789,7	24,5
111-125	ITVPARVVVNGIERS	1696,0	1696,2	27,3
116-130	RWVVNGIERSGEVNA	1684,9	1684,9	22,1
191-205	IRVRNASWQHIDDSL	1809,0	1809,3	25,3
193-210(Ser)	VRNASWQHIDSLFSTQR	2159,3	2159,9	28,7
196-210	ASWQHIDSLFCTQR	1806,0	1805,8	29,3
196-210(Ser)	ASWQHIDSLFSTQR	1789,9	1789,8	28,5

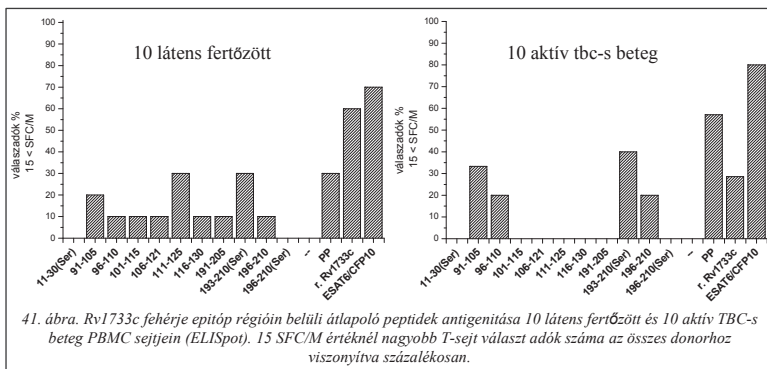
^a átlag molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5 μ m, 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B% 35 perc

A peptidek T-sejt választ indukáló hatását ELISpot kísérletben vizsgáltuk látens fertőzött donorok és kezelést nem kapott, (radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok alapján diagnosztizált) tbc-s betegek PBMC sejtjein (40. ábra).



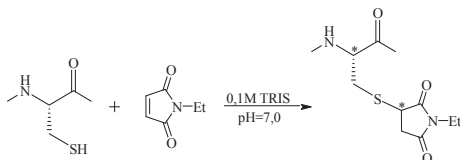
Összesen 10 aktív tbc-s beteg és 10 látens fertőzött donor PBMC sejtjein vizsgáltuk a peptideket és ábrázoltuk a 15 SFC/M értéknél nagyobb T-sejt választ adókat (41. ábra).



A rekombináns Rv1733c fehérjét (r. Rv1733c) ebben a kísérletben is a látens fertőzöttek 60%-a ismerte fel, mely az ESAT6/CFP10 fehérjekeverékhez hasonló. Tuberkulózisos betegek esetében azonban a rekombináns fehérjét a vizsgált betegek kisebb százaléka (30%) ismerte fel. A 11-30 és 196-210 peptid esetében a cisztein – szerin csere lerontotta a peptidek antigenitását, míg a 193-210(Ser) peptid esetében a donorok 30%, illetve 40%-a adott választ.

4.2. Peptidek cisztein tartalmának meghatározása *N*-etilmaleimiddel

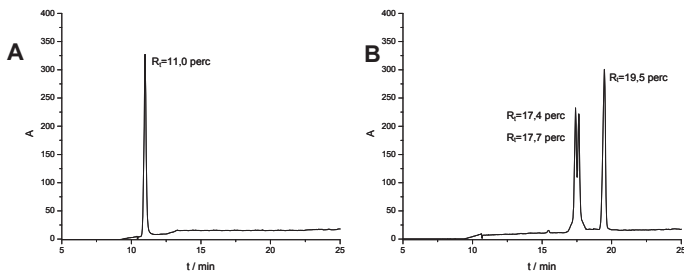
Ciszteintartalmú peptidek tisztaságának kvantitatív analízise során számos nehézséggel kell szembenéznünk. A cisztein oxidációra érzékeny aminosav. Az oxidáció végbemehet a szintézis és az analitikai elemzés során is. Nagyobb aminosavtagszámú peptidek esetében gyakori probléma, hogy az oxidált ciszteint tartalmazó származék a folyadékkromatográfiás analízis során nem, vagy nehezen különíthető el a főterméktől. Az aminosavanalízis során a cisztein cisztinné történő átalakulása végbemehet a hidrolízis alatt. A hidrolizátum ioncserélő kromatográfiás elválasztásakor a prolin retenciós ideje szinte azonos a ciszteinével. Mindezek miatt célunk volt egy olyan analitikai módszer kifejlesztése, amely segítségével ellenőrizhető a peptidekben a cisztein oxidációs állapota. *N*-etilmaleimiddel reagáltatva a cisztein tartalmú peptidet a szabad tiolsoport stabil adduktot képez (42. ábra).



42. ábra. Ciszteintartalmú peptid reakciója *N*-etilmaleimiddel.

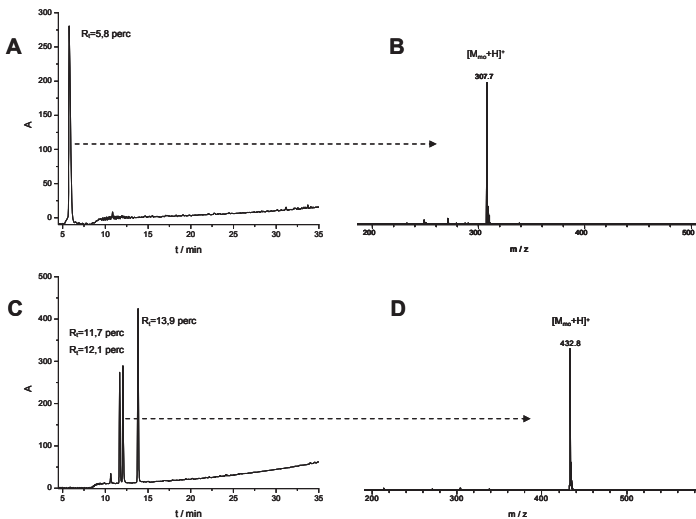
A reakció pillanatszerűen és kvantitatíven lejátsszódik semleges vagy enyhén lúgos közegben (pH=7-8). A kapott *S*-szukcinimid származék analitikai RP-HPLC kromatogramon minden esetben jól elválik a kiindulási anyagtól. A csúcs alatti terület alapján meghatározható a szabad tiolsoportot tartalmazó peptid relatív mennyisége [201]. Az alkalmazott kísérleti körülmények az 5.1.8.3. fejezetben találhatóak.

Referenciaként *N*-acetilciszteint és glutationt reagáltattunk *N*-etilmaleimiddel. A reakcióelegyet RP-HPLC segítségével analizáltuk, majd frakciószedést követően a keletkezett termékeket tömegspektrometriával azonosítottuk. *N*-acetilciszteint 1,1 ekvivalens *N*-etilmaleimiddel reagáltattunk. A analízis során kapott RP-HPLC kromatogramokat a 43. ábra mutatja be. Az addíció során új kiralitás centrum keletkezik a molekulában. A kapott 1:1 arányú diasztereomerek alacsony aminosavtagszámú peptidek, illetve cisztein származékok esetében az általunk alkalmazott kromatográfiás körülmények között elválaszthatóak ($R_t=17,4$ és 17,7 perc). Az *S*-(*N*-etilszukcinimido) *N*-acetilcisztein retenciós ideje nagymértékben eltér az *N*-acetilcisztein retenciós idejétől ($R_t=11,0$ perc).



43. ábra. *N*-acetyliszteín RP-HPLC kromatogramja (A). 1,1 ekvivalens *N*-etilmaleimid hozzáadása után a kromatogramon (B) jól elkülöníthető a keletkezett szukcinimid származék. A 19,5 percnél eluálódó csúcs az *N*-etilmaleimidnek felel meg. Grad.:0B% 5 perc, 0-40B% 20 perc.

Az *N*-etilmaleimiddel történő reakció során keletkezett diasztereomerek a glutation esetében is különböző retenciós idővel eluálódtak az alkalmazott kromatográfiai körülmények között. A termékek szerkezetét tömegspektrometriával azonosítottuk (44. ábra).



44. ábra. Glutation analitikai RP-HPLC kromatogramja (A) és ESI tömegspektruma (B). 1,1 ekvivalens *N*-etilmaleimid ($R_t=13,9$ perc) hozzáadása után a szukcinimid származék két csúcsban eluálódott ($R_t=11,7$ és $12,1$ perc)(C), melyek tömege azonos volt ($[M_{mo}+H]^+=432,8$) (D). Grad.: 2B% 5 perc, 2-60B% 30 perc

A referenciaanyagok analízise után négy szintetikus peptid esetében vizsgáltuk a cisztein oxidációs állapotát *N*-etilmaleimid reagens segítségével. A peptidok analitikai elemzésének összefoglalását a 9. táblázat tartalmazza.

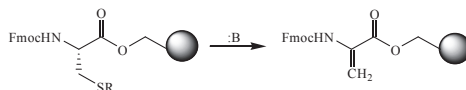
9. táblázat. Szintetikus peptidok és az *N*-etilmaleimiddel képzett származékok analitikai jellemzése.

peptid	M_{mo} ^a	R_t ^b [perc]	szukcinimid származék M_{mo} ^a	szukcinimid származék R_t [perc] ^b
glutation	306,7	5,8	431,8	11,7 / 12,1
SEWSC	609,9	20,5	734,9	23,8
SEFAYGSFVRTVSLPVC	1860,1	32,8	1985,2	34,3
DQVHFQPLPPAAVVC	1450,2	28,6	1575,2	30,3
IRVRNASWQHDIIDSLFCTQR	2444,4	31,1	2569,6	32,3

^amonoizotópos molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS

^banalitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5 μ m, 250x4mm, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B% 35 perc, kivéve glutation: 2B% 5 perc, 2-60B%, 30 perc

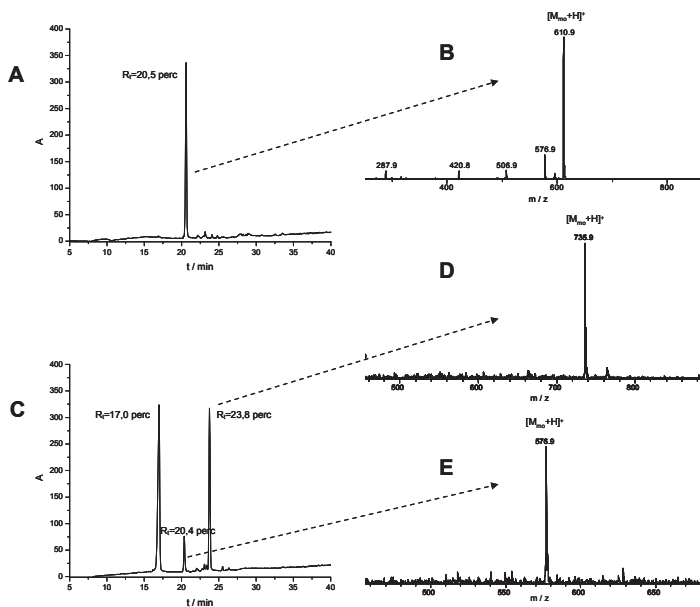
A fent bemutatott módszerrel az SEWSC pentapeptid elemzése során egy váratlan reakciót tapasztaltunk. Az alkalmazott RP-HPLC analízis körülményei között homogénnek tűnő SEWSC peptid az *N*-etilmaleimiddel történő reakció után egy közel 20%-os szennyezést tartalmazott, melynek móltömege 34 Daltonnal kisebb a peptid számított monoizotópos molekulatömegénél. Ez a tömegvesztés cisztein \rightarrow dehidroalanin átalakulásra utal, mely bázisos körülmények között játszódik le β -eliminációval (45. ábra).



45. ábra. Dehidroalanin képződése ciszteiből β -eliminációval.

A dehidroalanin tartalmú melléktermék kvantitatív kimutatása *N*-etilmaleimid reagens alkalmazásával vált lehetővé (46. ábra). A keletkező szukcinimid származék retenció ideje ($R_t=23,8$ perc) kb. 3 perccel nagyobb a kiindulási peptid retenció idejénél ($R_t=20,5$ perc), így az *N*-etilmaleimiddel nem reagáló szennyező jól elválasztható az alkalmazott RP-HPLC körülmények között.

Az ismertetett analitikai eljárást számos olyan esetben alkalmaztuk (pl. dimerizáció követése), ahol az *N*-etilmaleimiddel történő reakció megkönnyítette a cisztein tartalmú peptidok elemzését. Az eredményeket egy 2008-ban megjelent dolgozatban közzöltük [201].

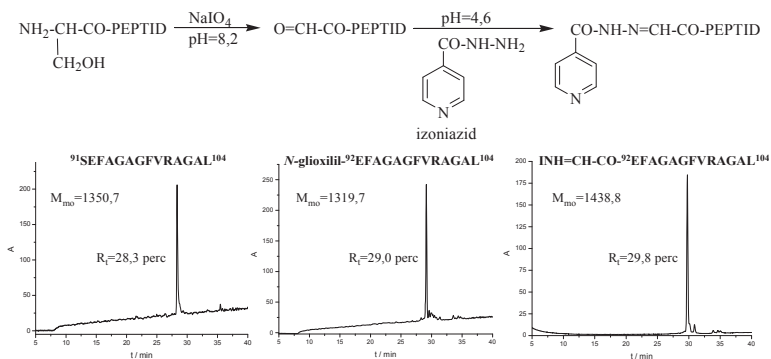


46. ábra. SEWSC peptid RP-HPLC kromatogramja (A) és ESI tömegspektruma (B). (C) a feleslegben adott *N*-etilmaleimid ($R_t = 17,0$ perc), a keletkezett szukcinimid származék ($R_t = 23,8$ perc) ($[M_{mo} + H]^+ = 735,9$) (D) és a dehidroalanin tartalmú melléktermék ($R_t = 20,4$ perc) ($[M_{mo} + H]^+ = 576,9$) (E). Grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc.

4.3. Antituberkulotikumot tartalmazó konjugátumok előállítása és *in vitro* funkcionális vizsgálata

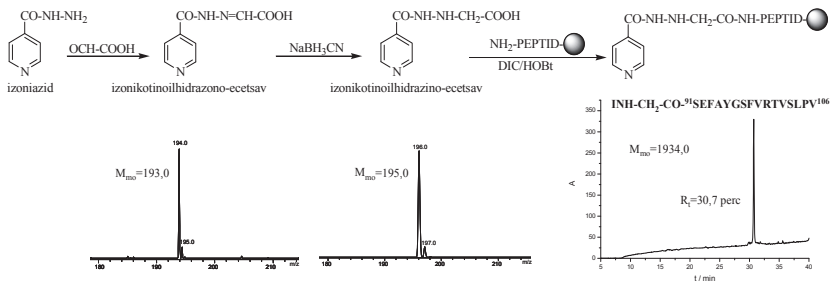
Az izoniazid (INH), a *p*-aminoszalicilsav (PAS) és a pirazinamid (PZA) antituberkulotikumok peptidkonjugátumait állítottuk elő. Célunk az volt, hogy a hatóanyag-konjugátumok *in vitro* funkcionális aktivitását vizsgáljuk. Az irodalomban nem találtunk INH-, PAS- és PZA-peptidkonjugátumok előállítására vonatkozó adatokat, ezért erre alkalmas szintézis utakat dolgoztunk ki. A következőkben meghatároztuk, hogy az adott antituberkulotikum kémiai módosítása hogyan befolyásolja annak *in vitro* gátló hatását. A konjugátumok antituberkulotikus hatását *Mycobacterium tuberculosis* és *Mycobacterium kansasii* tenyészetben vizsgáltuk az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet területén található Bakteriológiai Laboratóriumban (Corden International Magyarország Kft.). Az antituberkulotikus hatással rendelkező vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatását vizsgáltuk humán sejteken, illetve sejtvonalakon.

Az INH-peptidkonjugátumok előállítására két módszert dolgoztunk ki. Az első esetben szerin *N*-terminálisú peptidet NaIO₄ segítségével szelektíven oxidáltunk. Tisztítás után a peptidaldehidet oldatban reagáltattuk az izoniaziddal (5.1.6.1. fejezet). A kapott hidrazon származékot tisztítottuk, majd kémiaileg jellemeztük analitikai RP-HPLC és tömegspektrometria alkalmazásával. A szintézis menetét a 47. ábra mutatja be, az előállított vegyületek kémiai jellemzését a 10. táblázat foglalja össze.



47. ábra. INH-peptidkonjugátumok előállítása I: szerin *N*-terminálisú peptid szelektív oxidációjával kapott peptidaldehid reakciója izoniaziddal. A kapott vegyületek analitikai RP-HPLC kromatogramja (grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc). Az INH=CH-CO-⁹¹SEFAYGSFVRTVSLP¹⁰⁶ konjugátum serében a kiindulási peptid S-⁹¹SEFAYGSFVRTVSLP¹⁰⁶ volt.

A másik módszer kidolgozásánál az volt a célunk, hogy az ioniazid szilárd fázison is tudjuk konjugálható legyen peptidok *N*-terminálisához, vagy lizin ϵ -aminocsoportjához. Az ioniazidot glioxilsavval reagáltattuk, majd a kapott izonikotinoilhidrazono-ecetsavat NaCNBH₃ segítségével redukáltuk (5.1.6.1. fejezet). Az így előállított izonikotinoilhidrazino-ecetsavat szilárd fázison kapcsoltuk a peptidokhoz DIC/HOBt reagensek jelenlétében. A szintézis menetét a 48. ábra mutatja be.



48. ábra. INH-peptidkonjugátumok előállítása II: glioxilsavval reagáltatott INH redukciójával kapott izonikotinoilhidrazino-ecetsav kapcsolása szilárd fázison. A kapott vegyületek ESI-MS tömegspektruma és a konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja (grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc).

A gyantáról való hasítás után az INH-peptidkonjugátumokat tisztítottuk, majd jellemeztük analitikai RP-HPLC és tömegspektrometria segítségével (10. táblázat). Az előállított peptidszármazékok *C*-terminálisa minden esetben amid volt.

10. táblázat. INH-peptidkonjugátumok és szabad hordozó peptidok analitikai jellemzése.

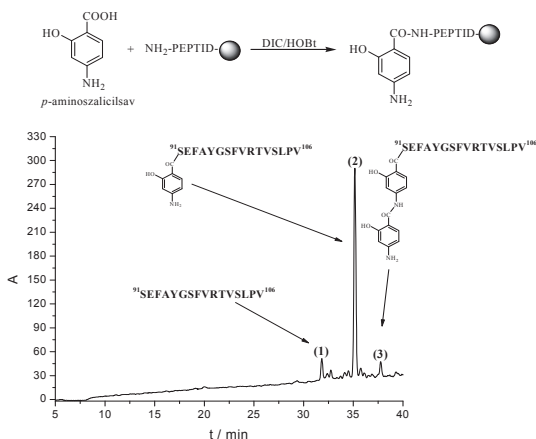
vegyület	M _{mo} számított	M _{mo} ^a mért	R _f ^b [perc]
⁹¹ SEFAGAGFVRAGAL ¹⁰⁴	1350,7	1350,7	28,3
<i>N</i> -glioxilil- ⁹² EFAGAGFVRAGAL ¹⁰⁴	1319,7	1319,8	29,2
INH=CH-CO- ⁹² EFAGAGFVRAGAL ¹⁰⁴	1438,8	1438,8	29,8
⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶	1756,9	1756,9	32,0
<i>N</i> -glioxilil- ⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶	1812,9	1813,0	33,0
INH=CH-CO- ⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶	1932,0	1932,0	31,4
INH-CH ₂ -CO- ⁹¹ SEFAYGSFVRTVSLPV ¹⁰⁶	1934,0	1934,0	30,7
GTKPKG	585,3	585,3	9,5
GTKPK(INH-CH ₂ -CO)G	762,4	762,4	15,1
palmitil-GTKPKG	822,5	822,6	33,5
palmitil-GTKPK(INH-CH ₂ -CO)G	1000,6	1000,6	31,5
[TKPKG] ₄	2063,5*	2063,5*	14,8
[TKPK(INH-CH ₂ -CO)G] ₄	2771,9*	2772,0*	18,8

^a monoisotópos molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS; átlag molekulatömeg

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5 μ m, 250 \times 4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc

Egy tuftsin-származék (T6) esetében olyan INH-konjugátumot is előállítottunk, mely az *N*-terminálison palmitinsavat tartalmaz. A palmitinsav kapcsolásával növelhető a vegyületek membránon való átjutásának mértéke. A palmitinsavat amidkötés kialakításával kapcsoltuk szilárd fázison DIC/HOBT reagensek segítségével. Az előállított INH-konjugátumok és hordozó peptidek analitikai jellemzését a 10. táblázat foglalja össze.

PAS-peptidkonjugátumok előállítása során a *p*-aminoszalicilsav karboxilcsoportját DIC/HOBT reagensekkel aktiváltuk és hozzáadtuk a szabad aminos csoportot tartalmazó peptidgyantához (5.1.6.2. fejezet). A nyertermék RP-HPLC analízise során három csúcsot detektáltunk, melyeket frakciószedés után tömegspektrometriával azonosítottunk (50. ábra).



49. ábra. PAS-peptidkonjugátumok előállítása: *p*-aminoszalicilsav kapcsolása szilárd fázison DIC/HOBT reagensek jelenlétében. PAS-peptidkonjugátum RP-HPLC kromatogramja. (1): szabad 91-106 peptid ($R_t=32,0$ perc; $M_{mo}=1757,2$). (2): PAS-konjugátum ($R_t=35,2$ perc; $M_{mo}=1892,2$). (3): PAS-PAS-konjugátum ($R_t=37,7$ perc; $M_{mo}=2027,2$). Grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc.

A kapott analitikai RP-HPLC kromatogramon a főcsúcsban (2) a várt PAS-peptidkonjugátum eluálódott. Emellett kis mennyiségben detektáltunk szabad peptidet (1) és PAS-PAS-peptidkonjugátumot (3). Ebben az esetben egy második PAS molekula aktivált karboxilcsoportja reagált a PAS-konjugátum kevésbé nukleofil aromás aminos csoportjával. A kétszeresen szubsztituált PAS-PAS-peptidkonjugátum mennyisége növelhető volt, ha a kapcsolást megismételtük 10 ekvivalens PAS/DIC/HOBT reagensekkel. A PAS-peptid és PAS-PAS-peptidkonjugátumokat tisztítottuk, majd analitikailag jellemeztük. A kapott eredményeket a 11. táblázat foglalja össze.

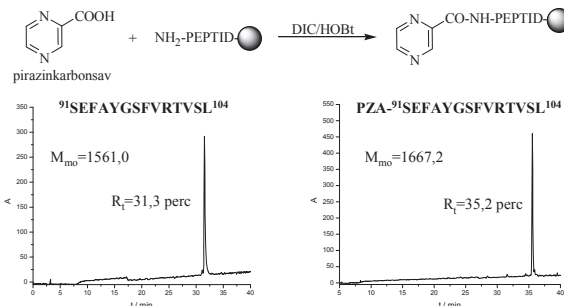
11. táblázat. PAS-peptidkonjugátumok és szabad hordozó peptidok analitikai jellemzése.

vegyület	M_{mo} számított	M_{mo}^a mért	R_t^b [perc]
$^{91}\text{SEFAYGSFVRTV}^{102}$	1360,7	1360,8	29,0
PAS- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTV}^{102}$	1495,7	1495,8	33,0
$^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$	1756,9	1756,9	32,0
PAS- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$	1892,1	1892,2	35,4
PAS-PAS- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$	2027,2	2027,2	37,7

^a monoizotópos molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS;

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5 μm , 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc

PZA-peptidkonjugátumok előállítása során pirazinkarbonsavat (PZC) kapsoltunk szilárd fázison Boc/Bzl, vagy Fmoc/tBu stratégiával felépített peptidok *N*-terminálisához, illetve lizin ϵ -aminocsoportjához DIC/HOBt reagensekkel (5.1.6.3. fejezet). A szintézis menetét az 50. ábra mutatja be.



50. ábra. PZA-peptidkonjugátumok előállítása: pirazinkarbonsav kapsolása szilárd fázison DIC/HOBt reagensek jelenlétében.

Hasítás után a PZA-konjugátumokat RP-HPLC alkalmazásával tisztítottuk, majd kémiai jellemeztük RP-HPLC és tömegspektrometria segítségével (12. táblázat).

12. táblázat. PZA-peptidkonjugátumok és szabad hordozó peptidok analitikai jellemzése.

vegyület	M_{mo} számított	M_{mo}^a mért	R_t^b [perc]
$^{91}\text{SEFAYGSFVRTV}^{102}$	1360,7	1360,8	29,0
PZA- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTV}^{102}$	1466,7	1466,8	33,2
$^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSL}^{104}$	1560,8	1561,0	31,3
PZA- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSL}^{104}$	1666,8	1667,2	35,2
$^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$	1756,9	1756,9	32,0
PZA- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$	1863,0	1862,8	35,0
Ac-[TKPKG] ₄	2105,5*	2105,5*	16,4
Ac-[TKPK(PZA)G] ₄	2529,6*	2529,6*	23,0

^a monoizotópos molekulatömeg; Bruker Esquire 3000+ ESI-MS; * átlag molekulatömeg

^b analitikai RP-HPLC Knauer, Eurospher-100 C18, 5 μm , 250x4mm oszlop, grad.: 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc

Az INH- és a PAS-peptidkonjugátumok antibakteriális hatását *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsen vizsgáltuk Sula felszintetikus folyékony táptalajban (pH=6,5) [12, 13]. A PZA-peptidkonjugátumok ilyen kísérleti körülmények között (táptalaj, pH) nem vizsgálhatóak, mert a PZA intracellulárisan, alacsony pH-n fejt ki baktericid hatását (az aktív forma, a pirazinkarbonsav csak protonált állapotban képes kifejteni hatását és ehhez savasabb kémhatásra van szükség)¹. Az INH- és PAS-peptidkonjugátumokból a hígítási sort 0,01–0,50µg/ml, illetve 0,1–50µg/ml koncentráció tartományban készítettük. A konjugátumok mellett vizsgáltuk az INH és PAS hatóanyagokat, a peptidhordozókat, pozitív kontrollként pedig hatóanyagot nem tartalmazó csöveket alkalmaztunk. A legkisebb gátló koncentráció (MIC, minimal inhibitory concentration) és telepszám (CFU, Colony Forming Unit) meghatározását az 5.2.9. fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük. A kapott eredményeket a 13. táblázat foglalja össze.

13. táblázat. INH- és PAS-peptidkonjugátumok minimális gátló koncentrációja (MIC) és telepszáma (CFU) *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsen.

vegyület	MIC ^a γ (µg/ml)	MIC (mol/dm ³)	CFU ^b
INH	0,16	1,17×10 ⁻⁶	12
izonikotinoilhidrazono-ecetsav	0,40	2,07×10 ⁻⁶	60
izonikotinoilhidrazino-ecetsav	0,40	2,07×10 ⁻⁶	6
INH-CH-CO- ⁹¹ SEFAGAGFVRAGAL ¹⁰⁴	0,24	1,75×10 ⁻⁶	40
INH-CH-CO- ⁹¹ SEFAYGFSVRTVSLPV ¹⁰⁶	0,18	1,31×10 ⁻⁶	30
INH-CH ₂ -CO- ⁹¹ SEFAYGFSVRTVSLPV ¹⁰⁶	0,16	1,12×10 ⁻⁶	2
GTKPK(INH-CH ₂ -CO)G	0,18	1,31×10 ⁻⁶	20
palmitil-GTKPK(INH-CH ₂ -CO)G	0,16	1,17×10 ⁻⁶	12
[TKPK(INH-CH ₂ -CO)G] ₄	0,32	2,26×10 ⁻⁶	n.a.
PAS	0,10	6,53×10 ⁻⁷	15
PAS- ⁹¹ SEFAYGFSVRTV ¹⁰²	-	-	-
PAS- ⁹¹ SEFAYGFSVRTVSLPV ¹⁰⁶	-	-	-
PAS-PAS- ⁹¹ SEFAYGFSVRTVSLPV ¹⁰⁶	-	-	-
⁹¹ SEFAYGFSVRTV ¹⁰²	-	-	-
⁹¹ SEFAGAGFVRAGAL ¹⁰⁴	-	-	-
⁹¹ SEFAYGFSVRTVSLPV ¹⁰⁶	-	-	-
GTKPKG	-	-	-
palmitil-GTKPKG	-	-	-
[TKPKG] ₄	-	-	-

^a minimális inhibíciós koncentráció *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsen Sula táptalajban; hatóanyag tartalomra számitva

^b telepszám Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon

Az INH esetében az irodalmi adatnak (MIC_{INH}=0,02-0,2µg/ml) [153] megfelelő gátló koncentrációt mértünk (0,16µg/ml). Az INH-peptidkonjugátumok mindegyike gátolta a *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktérium növekedését. A konjugátumok az INH MIC értékével közel

¹ Az előállított PZA-konjugátumok *in vitro* aktivitásának vizsgálata folyamatban van fertőzött makrofágokon az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Bakteriológiai Laboratóriumában

azonos koncentrációban hatottak ($1,17 \times 10^{-6}$ - $2,26 \times 10^{-6}$ M). A vártak megfelelően a hatóanyagot nem tartalmazó peptidek egyike sem fejtett ki antituberkulotikus hatást [202]. A PAS az irodalmi érték ($MIC_{PAS}=0,5-2 \mu\text{g/ml}$) [153] alatt mutatott antibakteriális hatást ($0,1 \mu\text{g/ml}$), míg a PAS-peptidkonjugátumok egyike sem gátolta a baktériumok növekedését. Valószínűsítjük, hogy a PAS molekula szabad karboxilcsoportja elengedhetetlen a gátló hatáshoz (a *p*-aminobenzoesavhoz hasonlóan). Bár kísérleti adatokkal még tudjuk alátámasztani, de feltételezzük, hogy *in vivo* körülmények között a PAS felszabadulhat a konjugátumból.

M. tuberculosis mellett *M. kansasii* törzsön is vizsgáltuk az INH és PAS antibakteriális hatását (14. táblázat). A csapvízben is megtalálható *M. kansasii* a környezeti mikobaktériumok közé tartozik. Egészséges szervezetet általában nem fertőz meg, de legyengült immunrendszerű páciensek (pl. immunszupresszáltak, HIV fertőzöttek) esetében súlyos szimptomákat okozhat.

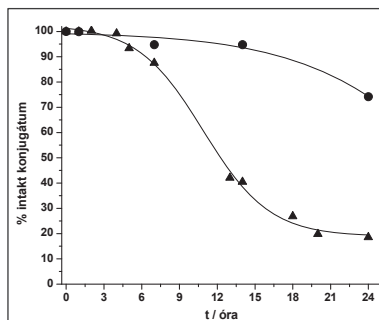
14. táblázat. INH- és PAS-peptidkonjugátumok minimális gátló koncentrációja (MIC) és telepszáma (CFU) *M. kansasii* (ATCC 27294) tenyészetben.

vegyület	MIC ^a γ (μg/ml)	MIC (mol/dm ³)	CFU ^b
INH	5	$3,65 \times 10^{-5}$	120
PAS	20	$1,31 \times 10^{-4}$	40

^a minimális inhibíciós koncentráció *M. kansasii* baktériumtörzsön Sula táptalajban

^b telepszám Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon

Az INH a *M. kansasii* baktérium növekedését harmincszor nagyobb koncentrációnál gátolta. A



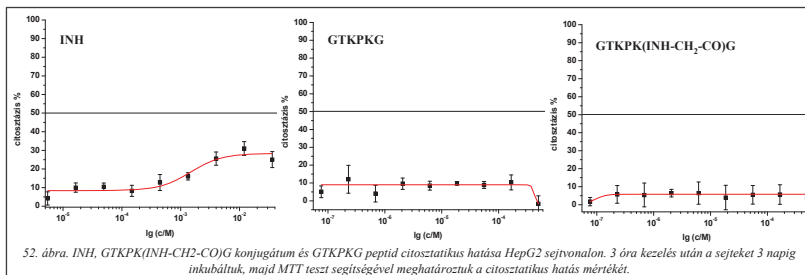
51. ábra. Intakt INH-konjugátumok mennyiségének változása az idő függvényében Sula folyékony táptalajban (pH=6,5).
 INH=CH₂-CO-⁹¹SEFAYGSFVRTV¹⁰⁶ hidrazon (●) és
 INH-CH₂-CO-⁹¹SEFAYGSFVRTV¹⁰⁶ hidrazid (▲)
 konjugátumok fogyasztása a csücs alatti terület alapján
 (RP-HPLC, grad.: 5B% 3 perc, 5-60B%, 35 perc).

PAS esetében a minimális inhibíciós koncentráció kétszázszor volt nagyobb, mint *M. tuberculosis* baktériumon.

Az INH-peptidkonjugátumokban az izoniazid hidrazon-, illetve hidrazidkötésen keresztül kapcsolódik a peptidekhez. Vizsgáltuk, hogy a két különböző kötést tartalmazó konjugátumból milyen kinetikával szabadul fel a szabad INH hatóanyag. A konjugátumokat Sula folyékony táptalajban oldottuk 0,5mg/ml koncentrációban. Az oldatokból óránként mintát vettünk és RP-

HPLC analízist végeztünk (5.1.8.1. fejezet). Frakciószedés után a csúcsokat tömegspektrometria segítségével azonosítottuk, majd a csúcs alatti terület alapján ábrázoltuk az intakt konjugátum fogyásának időfüggését (51. ábra). Az *in vitro* antibakteriális hatást mutató $\text{INH}=\text{CH}-\text{CO}-^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$ (hidrazon) és $\text{INH}-\text{CH}_2-\text{CO}-^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$ (hidrazid) konjugátumokból felszabadul az izoniazid Sula folyékony táptalajban. A hidrazonkötést tartalmazó konjugátumból lassabban szabadul fel az INH (~15 óra). A hidrazon konjugátum hidrolízise során *N*-glixilil- $^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$ peptid és INH keletkezik, melyek pH=6,5 oldatban újra reagálhatnak egymással, míg a másik konjugátumnál ez nem lehetséges. 6 órán belül mindkét típusú konjugátum stabilitása > 90%.

Vizsgáltuk a $\text{GTKPK}(\text{INH}-\text{CH}_2-\text{CO})\text{G}$ konjugátum citosztatikus hatását HepG2 humán hepatoma sejtvonalon (52. ábra). A sejtvonal fenntartását az 5.2.2.3. fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük. A sejteket $\text{GTKPK}(\text{INH}-\text{CH}_2-\text{CO})\text{G}$ konjugátummal, izoniaziddal és GTKPKG peptiddel kezeltük 3 órán keresztül. A kezelőoldatok koncentrációját az RPMI-1640 médiumban való oldhatóságuk határozta meg (INH: $5 \times 10^{-6}\text{M}$ - $3 \times 10^{-2}\text{M}$; peptid, konjugátum: $7 \times 10^{-8}\text{M}$ - $5 \times 10^{-4}\text{M}$).



A kezelés után a sejtekről eltávolítottuk a hatóanyagot, majd 3 nap inkubálás után a sejtek életképességét MTT teszt segítségével határoztuk meg (5.2.10. fejezet).

Az INH-peptidkonjugátum a legnagyobb vizsgált koncentrációban ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) sem volt citosztatikus humán hepatoma sejteken. A GTKPKG peptid és az izoniazid nem rontotta a sejtek életképességét. A konjugátum baktériumon mért MIC értéke két nagyságrenddel volt alacsonyabb, mint a legnagyobb vizsgált koncentráció HepG2 sejteken. A kapott eredményeket tudományos közlemény formájában publikáltuk [202, 203].

4.4. *In silico* azonosított hatóanyagok antituberkulotikus aktivitása, citotoxicitása és sejtfelvételének vizsgálata

A *Mycobacterium tuberculosis* túléléséhez fontos, enzimaktivitását fehérvérjéhez kötődő hatóanyagokat egy újonnan kifejlesztett dokkolási algoritmus segítségével az ELTE Számítógéptudományi Tanszékén Dr. Grolmusz Vince kutatócsoportjában találták. Az *in silico* módszer lényege, hogy ismert háromdimenziós (NMR, vagy röntgen kristallográfia) szerkezettel rendelkező fehérvérjéhez dokkolnak egy több millió molekulából álló vegyülettár elemeit. A kísérletekben használt molekulát az interneten hozzáférhető Zinc adatbázis (Zinc – a free database for virtual screening, <http://zinc.docking.org/>) [145]. A ligandumok dokkolása DUTPáz, PriA és 2bZr enzimekhez történt, melyek a baktérium anyagcseréjében kulcsfontosságú szerepet játszanak [204]. A dokkolást követően a fehérje – ligandum közti kötődési erősség alapján a legjobb molekulákat a Zinc adatbázisban található rendelési információk alapján megvásároltuk. A ligandumok szerkezetét szabadalmi okokból nem közöljük.

A DUTPáz enzim (deoxiuridin 5'-trifoszfát nukleotidohidroláz; EC 3.6.1.23; Rv2697; PDB kód: 1mq7) a nukleotid metabolizmusban vesz részt ($dUTP + H_2O \leftrightarrow dUMP + PP_i$). Csökkenti az uracil intracelluláris koncentrációját és így megakadályozza, hogy az uracil a timidin helyett beépüljön a baktérium DNS-ébe [205]. A PriA enzim a hisztidin és triptofán bioszintézisében vesz részt (foszforibozil izomeráz A; EC 5.3.1.16; Rv 1603; PDB kód: 1qo2). A PriA enzim aminoaldóz – aminoketóz izomerizációt katalizál [206-208]. A 2bZr enzim a karboxitranszferázok közé sorolható (propinoil-CoA karboxiláz; EC 6.4.1.3; Rv3280; PDB kód: 2bZr). Zsírsvak, izoleucin, treonin, metionin és valin bioszintézisében vesz részt ($ATP + \text{propinoil-CoA} + H_2O + CO_2 \leftrightarrow ADP + P + \text{metilmalonil-CoA}$) [209, 210].

A ligandumok *in vitro* antituberkulotikus hatását *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön vizsgáltuk Sula félszintetikus táptalajban (5.2.9. fejezet). A vizsgált koncentráció tartomány 0,5 - 50 µg/ml volt. Összesen 19 DUTPáz fehérjéhez dokkolt ligandum *in vitro* antibakteriális hatását mértük. A vizsgált molekulák közül 10 vegyület gátolta a baktérium növekedését 50 µg/ml koncentráció alatt, tehát az *in silico* azonosított molekulák 53%-a mutatott *in vitro* hatást. A PriA fehérje esetében ez 40%, míg a 2Bzr fehérjénél 23% volt. A DUTPáz és PriA fehérje ligandumjai közül a DUT69, DUT3, DUT13, DUT44 és a PriA42 molekula MIC értéke volt a legkisebb (1-20 µg/ml, $3,73 \times 10^{-6}$ - $4,59 \times 10^{-5}$ M). A mért MIC és CFU értékeket a

15. táblázat foglalja össze.

15. táblázat. *In silico* azonosított ligandumok minimális gátló koncentrációja (MIC) és telepszáma (CFU) *M. tuberculosis* baktériumtörzsön.

vegyület	MIC ^a	MIC	CFU ^b
	γ ($\mu\text{g/ml}$)	(mol/dm^3)	
DUT 1/4	25	$5,07 \times 10^{-5}$	n.a.
DUT 3	5	$1,22 \times 10^{-5}$	5
DUT 13	15	$3,12 \times 10^{-5}$	42
DUT 32	30	$6,30 \times 10^{-5}$	n.a.
DUT 44	20	$4,59 \times 10^{-5}$	11
DUT 56	45	$1,00 \times 10^{-4}$	7
DUT 63	25	$5,75 \times 10^{-5}$	20
DUT 69	1	$3,73 \times 10^{-6}$	5
DUT 78	45	$9,26 \times 10^{-5}$	70
DUT 83	45	$1,11 \times 10^{-4}$	2
PriA 42	7,5	$2,02 \times 10^{-5}$	9
PriA 52	30	$7,52 \times 10^{-5}$	0
2bzzr 14	25	$6,54 \times 10^{-5}$	6
2bzzr 22	30	$6,97 \times 10^{-5}$	n.a.
2bzzr 35	25	$6,51 \times 10^{-5}$	n.a.

^a minimális inhibíciós koncentráció *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsön Sula táptalajban
^b telepszám Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon

A *M. tuberculosis* törzsön antibakteriális hatást mutató vegyületeket *M. kansasii* baktériumtörzsön is vizsgáltuk. Az előzőekben vizsgált hatóanyagok (INH, PAS) MIC értéke *M. kansasii* törzsön jóval magasabb volt, mint *M. tuberculosis* törzsön, ezért a koncentráció tartományt megnöveltük (1 - 100 $\mu\text{g/ml}$). A vizsgált vegyületek közül csak egy gátolta 100 $\mu\text{g/ml}$ alatt a *M. kansasii* növekedését (16. táblázat).

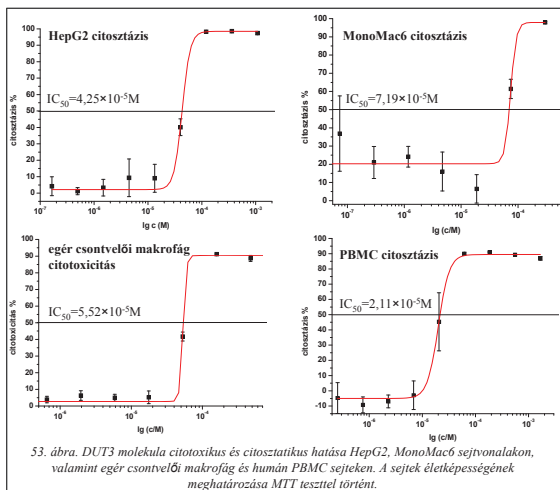
16. táblázat. PriA42 vegyület minimális gátló koncentrációja (MIC) és telepszáma (CFU) *M. kansasii* baktériumtörzsön.

törzs	MIC ^a	MIC	CFU ^b
	γ ($\mu\text{g/ml}$)	(mol/dm^3)	
<i>M. tuberculosis</i>	7,5	$2,02 \times 10^{-5}$	9
<i>M. kansasii</i>	33	$8,87 \times 10^{-4}$	3

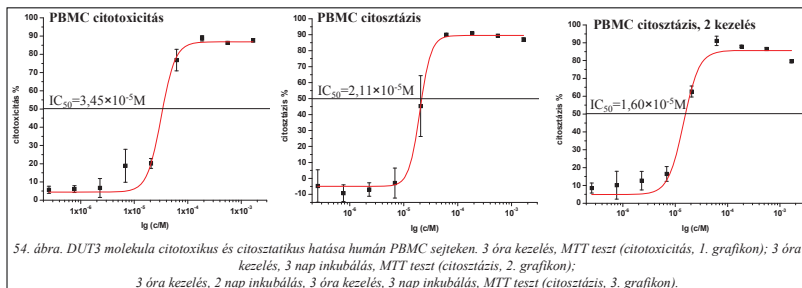
^a minimális inhibíciós koncentráció *M. kansasii* baktériumtörzsön Sula táptalajban
^b telepszám Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon

A PriA42 vegyület gátolta a *M. kansasii* törzs növekedését. A kapott MIC érték 4,4-szer volt nagyobb, mint a *M. tuberculosis* törzsön mért minimális inhibíciós koncentráció.

A legkisebb MIC értékkel rendelkező ligandumok citotoxicitását és citosztatikus hatását vizsgáltuk MonoMac6 monocita sejtvonalon, HepG2 humán hepatoma sejtvonalon, preparált humán PBMC sejteken és egér csontvelői makrofágokon (53. ábra). A sejtek preparálását, illetve a sejtvonalak fenntartását az 5.2.2. fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük. A



esetében közel azonos volt és ez a koncentráció a vegyület MIC értékével ($1,22 \times 10^{-5} M$) egy nagyságrendben van (53. ábra). A továbbiakban vizsgáltuk, hogy tapasztalható-e különbség a citotoxicitás, illetve a citostatikus hatás mérésekor kapott IC_{50} értékekben humán PBMC sejteken. Végeztünk olyan kísérletet, ahol a PBMC sejteket kétszer kezeltük a DUT3 hatóanyaggal, majd összesen 5 nap inkubálás után határoztuk meg a sejtek életképességét (54. ábra).



A DUT3 vegyület esetében nem mértünk nagyságrendi különbséget az IC_{50} értékekben citotoxicitás és citostatikus hatás mérésekor frissen preparált humán PBMC sejteken. Kétszeri kezelés után a sejtek életképessége közel azonos volt.

sejteket 3 órán át kezeltük a hatóanyagokkal, majd MTT teszt segítségével meghatároztuk a sejtek életképességét (5.2.10. fejezet). A citotázis vizsgálatánál a kezelés után a sejteket 3 napig inkubáltuk, majd ezután végeztük el az MTT tesztet. A DUT3 molekula IC_{50} értéke mind a négy sejtípus

A DUT44 vegyület citotoxicitását és citosztatikus hatását MonoMac6, HepG2 sejtvonalakon és egér csontvelői makrofágokon vizsgáltuk (17. táblázat).

17. táblázat. DUT44 molekula citotoxikus és citosztatikus hatása MonoMac6 és HepG2 sejtvonalakon, valamint egér csontvelői makrofág sejteken.

sejt/sejtvonal		DUT 44 IC ₅₀ (mol/dm ³)
MonoMac6	citotoxicitás	3,75×10 ⁻⁴
MonoMac6	citosztázis	4,70×10 ⁻⁴
HepG2	citosztázis	4,89×10 ⁻⁴
egér csontvelői makrofág	citotoxicitás	9,01×10 ⁻⁴

A sejtek életképességének meghatározása MTT teszttel történt.

A DUT44 vegyület minimális inhibíciós koncentrációja *M. tuberculosis* baktériumtörzsön (MIC=4,59×10⁻⁵M) egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint a humán sejteken, illetve sejtvonalakon mért IC₅₀ érték.

A legkisebb MIC értékkel rendelkező DUT3, DUT44, DUT69 és PriA42 vegyületek citotoxicitását MonoMac6 sejtvonalon vizsgáltuk. A kapott IC₅₀ értékeket a 18. táblázat foglalja össze.

18. táblázat. *In silico* azonosított vegyületek citotoxikus hatása MonoMac6 sejtvonalon

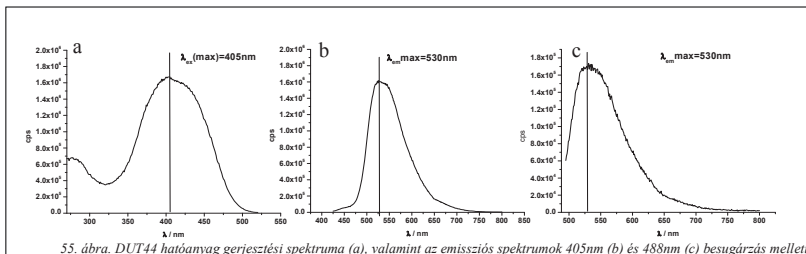
vegyület	MIC (mol/dm ³)	IC ₅₀ (mol/dm ³)
DUT 3	1,22×10 ⁻⁵	7,19×10 ⁻⁵ *
DUT 44	4,59×10 ⁻⁵	3,75×10 ⁻⁴
DUT 69	3,73×10 ⁻⁶	1,21×10 ⁻²
PriA 42	2,02×10 ⁻⁵	6,80×10 ⁻³

A sejtek életképességének meghatározása MTT teszttel történt. (* citosztázis).

Az *in silico* azonosított antituberkulotikus hatású vegyületek IC₅₀ értéke minden esetben magasabb, mint a *M. tuberculosis* törzsön mért minimális inhibíciós koncentráció. A DUT69 molekula MIC értéke (3,73×10⁻⁶M) 4 nagyságrenddel alacsonyabb, mint a MonoMac6 sejtvonalon mért IC₅₀ érték (1,21×10⁻²M).

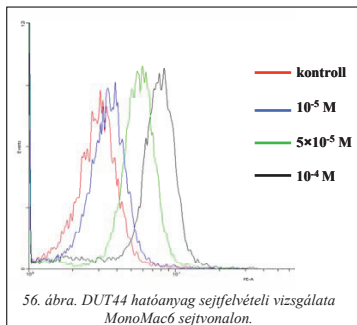
Az antibakteriális hatással rendelkező *in silico* azonosított vegyületek sejtfelvételel áramlási citométerrel vizsgáltuk. BD LSR II áramlási citométerrel olyan anyagok vizsgálhatóak, melyek 488nm, vagy 635nm hullámhosszon gerjeszthetőek (argon ion és HeNe lézer). A készülék beállításához tudnunk kell, hogy ezen a hullámhosszon gerjesztve hol van a hatóanyagok emissziós maximuma. A sejtfelvételi vizsgálatok előtt ezért felvettük a hatóanyagok gerjesztési és emissziós spektrumát (5.1.8.7. fejezet). A vizsgálatokhoz a hatóanyagokat 10⁻³M koncentrációban oldottuk DMSO-ban, majd 100-szorosára hígítottuk

HPMI médiummal (ezt a médiumot használtuk a sejtfelvételi vizsgálatok során). A összes vizsgált hatóanyag közül csak a DUT44 molekula rendelkezett a megfelelő spektrális tulajdonságokkal (55. ábra).



A DUT44 hatóanyag gerjesztési maximuma 405nm-en van, de 488nm-en gerjesztve 10^{-5} M koncentrációban értékelhető intenzitású emissziós spektrumot kapunk. Az emissziós maximumot 530nm-en detektáltuk. A sejtfelvételi vizsgálatok során az áramlási citométer mérési paramétereinek beállításait ennek megfelelően végeztük.

MonoMac6 sejteket 3 koncentrációban (10^{-4} M; 5×10^{-5} M; 10^{-5} M) kezeltük a DUT44 hatóanyaggal. 1 óra kezelés után a sejteket tripszinnel kezeltük, majd HPMI médiumban felvéve BD LSR II áramlási citométerrel analizáltuk. A tripszines kezelésre azért van szükség, mert eltávolítja a sejt felszíni struktúrákat, így csak azokat a sejteket mérjük, amelyek

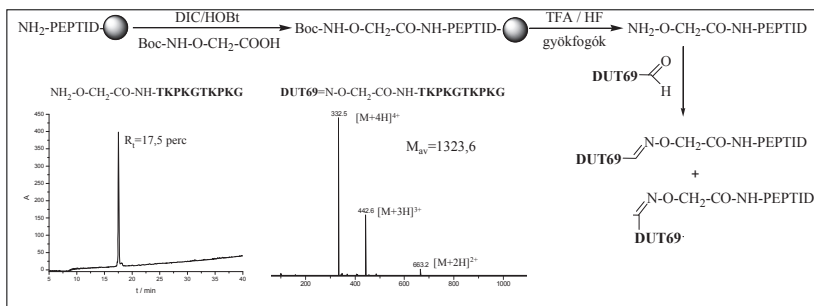


intracellulárisan tartalmazzák a DUT44 hatóanyagot (56. ábra). A sejtfelvételi vizsgálatokat az 5.2.11. fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük. A DUT44 molekula esetében koncentrációfüggő felvételt mértünk MonoMac6 monocita sejtvonalon. Értékelhető fluoreszcens jelet detektáltunk egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban, mint a molekula IC_{50} értéke ($3,75 \times 10^{-4}$ M) MonoMac 6 sejtvonalon.

4.4.1 *In silico* azonosított DUT69 és DUT44 hatóanyagok peptidkonjugátumainak előállításának jellemzése és antibakteriális hatása

Két alacsony MIC értékkel rendelkező *in silico* azonosított hatóanyagot peptid alapú hordozó molekulához konjugáltuk.

A DUT69 aldehidsoportot tartalmazó származékát OT10 ([TKPKG]₂, dituftsín) hordozóhoz konjugáltuk az 5.1.6.4. fejezetben leírtaknak megfelelően. Az OT10 peptidet szilárd fázison reagáltattuk Boc-aminooxi-ecetsavval, majd hasítás után oldatban oximkötésen keresztül kapcsoltuk a DUT69 származékot. A konjugálás menetét, valamint a kapott eredményeket az 57. ábra mutatja be.

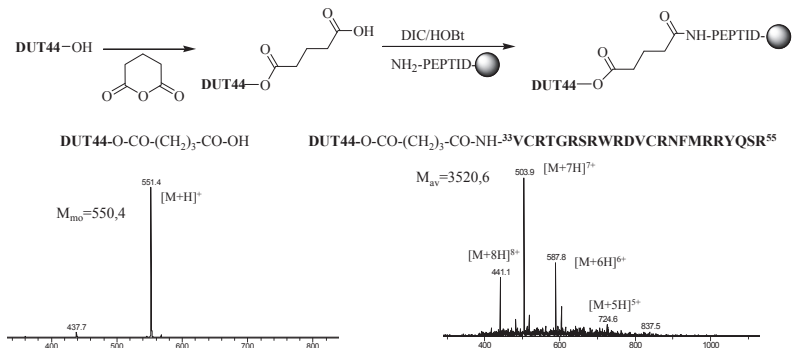


57. ábra. DUT69 aldehid származékának konjugálása OT10 peptidhez. Az aminoszecetsavval módosított OT10 analitikai RP-HPLC kromatogramja (grad.: 0B% 5 perc, 0-40B%, 35 perc) és a DUT69-konjugátum ESI-MS tömegspektruma.

A konjugálás során kapott Z-E izomerek aránya 1:1 volt, melyek az alkalmazott körülmények között az analitikai RP-HPLC kromatogramon két csúcsban eluálódtak. Vizsgáltuk a DUT69 aldehidsoportot tartalmazó származékának és tuftsín konjugátumának antibakteriális hatását *M. tuberculosis* H₃₇Rv tenyészetben. Az alapvegyület MIC értéke 1 µg/ml volt (CFU=3), míg a konjugátumé 6,9 µg/ml (CFU=10). Az oximkötésen keresztüli konjugálás hatására a vegyület megőrizte antituberkulotikus hatását.

A DUT44 hatóanyag konjugálásához először a molekula hidroxilcsoportját glutaraldehiddel reagáltattuk (ld. 5.1.6.4. fejezet). A kapott észterkötést tartalmazó származékot szilárd fázison kapcsoltuk peptidnek N-terminálisához. Hasítás után a kapott terméket tisztítottuk és kémiaiailag jellemeztük (58. ábra). A kapott vegyületek antituberkulotikus hatását *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsen vizsgáltuk. A glutaraldehiddel

képzett származék MIC értéke 42,5 μ g/ml volt, ami közel van a DUT44 alapvegyület MIC értékéhez (20 μ g/ml). A hatóanyag hidroxilcsoportjának észteresítése tehát nem befolyásolta jelentős mértékben a vegyület antituberkulotikus hatását.



58. ábra. DUT44 molekula reakciója glutáraldehiddel és konjugálása peptidhez. A kapott vegyületek ESI-MS tömegspektruma.

5. Kísérleti rész

5.1. Kémiai kísérletek

5.1.1. A szintetikus munka során használt vegyszerek, műszerek

Aminosavszármazékok, gyanták

Elnevezés, kapacitás	Rövidítés, jelzés	Gyártó cég
Boc- és Fmoc-aminosavszármazékok		Reanal (Budapest, Magyarország) Iris (Marktredwitz, Németország) NovaBiochem (Läufelfingen, Svájc)
4-metilbenzhidrilamin (MBHA) gyanta (kapacitás: 1,1mmol/g)	MBHA	NovaBiochem (Läufelfingen, Svájc)
Fmoc-Rink-amid MBHA gyanta (kapacitás: 0,65-0,69mmol/g)		NovaBiochem (Läufelfingen, Svájc)

Oldószerek, reagensek

Elnevezés, kapacitás	Rövidítés, jelzés	Gyártó cég
diklórometán	DCM	Reanal
<i>N,N</i> -dimetilformamid	DMF	(Budapest, Magyarország)
ecetsav, <i>n</i> -butanol, jégecet, etanol, metanol, etilacetát, dietil-éter, acetonitril		Molar (Budapest, Magyarország)
<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid	DCC	Fluka (Buchs, Svájc)
<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid	DIC	
<i>N,N</i> -diizopropiletilamin	DIEA	
4-dimetilaminopiridin	DMAP	
etánditiol	EDT	
<i>N</i> -etilmaleimid	NEM	
izoniazid	INH	
<i>p</i> -aminoszalicilsav	PAS	
pirazinamid	PZA	
pirazinkarbonsav	PZC	
piperidin, fenol, NaIO ₄ , NaBH ₃ CN, hidrogén-fluorid, anizol, ninhidrin, glutaraldehid		
1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én	DBU	Iris (Marktredwitz, Németország)
1-hidroxibenzotriazol	HOBt	Merck (Darmstadt, Németország)
dimetilszulfoxid	DMSO	
<i>N</i> -metilpirrolidon	NMP	
trifluoecetsav	TFA	

Műszerek

Elnevezés	Gyártó cég
SYRO-I Multiple Peptide Synthesizer automata peptidszintetizátor	MultiSynTech (Witten, Németország)
Knauer HPLC rendszer (pumpa, UV detektor, kézi injektor)	Knauer (Bad Homburg, Németország)
SYKAM S-433H automata aminosavanalizátor	Sykam (Eresing, Németország)
Bruker Esquire 3000+ tömegspektrométer	Bruker (Bremen, Németország)
VARIO EL III automata elemanalizátor	Elementar Analysensysteme (Hanau, Németország)
Büchi 530 olvadáspont mérő	Büchi Labortechnik (Flawil, Svájc)
Perkin Elmer Lambda 2S spektrofotométer	Perkin Elmer (Überlingen, Németország)
FS900CD spektrofluoriméter	Analytical Instruments (Edinburgh, UK)
HF teflon készülék	Peptide Institute (Osaka, Japán)

HPLC oszlopok, töltetek

Elnevezés	Töltet, méret, jellemzők	Gyártó cég
C18 Phenomenex Jupiter	fordított fázisú 250×10mm félpreparatív oszlop 10µm, 300Å módosított szilika töltettel	Phenomenex (Torrance, CA, USA)
C4 Phenomenex Jupiter	fordított fázisú 250×10mm félpreparatív oszlop 10µm, 300Å módosított szilika töltettel	
C4 Phenomenex Jupiter	fordított fázisú 250×4mm analitikai oszlop 5µm, 300Å módosított szilika töltettel	
C18 Eurosphere-100	fordított fázisú 250×4mm analitikai oszlop 5µm, 300Å módosított szilika töltettel	Knauer (Bad Homburg, Németország)

5.1.2. Peptidek szintézise Fmoc/tBu módszerrel

Fmoc/tBu stratégia alkalmazásával a peptideket manuálisan vagy automata peptidszintetizátoron (SYRO Multiple Peptide Synthesizer) állítottuk elő. A manuális szintézis során ciklusonként ellenőrizhető a kapcsolás, míg a szintetizátorban végzett szintézis során erre nincs lehetőség. Az automata szintézis során ezért eleve nagyobb feleslegben alkalmazzuk az aminosavszármazékokat és a kapcsolóreagenseket, valamint a kapcsolást minden esetben megismételjük.

A peptidek szintéziséhez Fmoc-Rink-amid MBHA gyantát alkalmaztunk (kapacitás: 0,65-0,69mmol/g). Valamennyi aminosavat N^{α} -Fmoc-származék formájában használtuk. Az Fmoc-aminosavak nukleofil oldalláncai a 19. táblázatban felsorolt savvézékeny védőcsoportokat tartalmazták.

19. táblázat. Fmoc/tBu stratégia során alkalmazott Fmoc-aminosavszármazékok oldallánc védőcsoportjai.

aminosav	funciócsoport	védőcsoport	rövidítés
Asp, Glu	karboxil	<i>terc</i> -butil észter	OrBu
Lys	amino	<i>terc</i> -butiloxikarbonil	Boc
Arg	guanidino	1,1,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil	Pbf
Cys	merkaptó	trítill	Trt
Ser, Thr, Tyr	hidroxil	<i>terc</i> -butill	<i>t</i> Bu
Asn, Gln	amid	trítill	Trt
Trp	indol	<i>terc</i> -butiloxikarbonil	Boc
His	imino	trítill	Trt
Gly, Ala, β -Ala, Val, Pro, Ile, Leu, Phe, Met		oldallánc védőcsoport nélkül	

A peptidszintézis első lépése az Fmoc-Rink-amid MBHA gyanta duzzasztása és védőcsoportjának eltávolítása. Az első aminosav felkapcsolása amidkötés kialakításával történt. A peptidlánc felépítését *in situ* aktív észterek kialakításával (DIC/HOBT alkalmazásával) végeztük. Az Fmoc-aminosavakat és a kapcsolóreagenseket NMP-ban oldottuk 0,55-0,65mol/dm³ koncentrációban. Az Fmoc/tBu stratégiával végzett szintézis egy ciklusának összefoglalása a 20. táblázatban látható.

20. táblázat. Az Fmoc/tBu stratégia szerint végzett peptidszintézis egy ciklusának menete.

művelet	manuális szintézis	automata szintetizátor
Fmoc hasítás	piperidin/DBU/DMF=2 : 2 : 96 v/v (2+2+5+10 perc)	piperidin:DMF=2 : 3 v/v (5 perc) piperidin:DMF =1 : 4 v/v (30 perc)
mosás	DMF (5x1 perc)	DMF (5x1 perc)
kapcsolás	3ekv.* Fmoc-Aaa-OH/DIC/HOBt (40-60 perc)	4ekv.* Fmoc-Aaa-OH/DIC/HOBt (60 perc)
újra kapcsolás	-	4ekv.* Fmoc-Aaa-OH/DIC/HOBt (60 perc)
mosás	DMF (5x1 perc)	DMF (5x1 perc)
ellenőrzés	ninhidrin- [211], izatin-teszt [212]	-

*gyantakapacitásra számított mennyiség

A peptidlánc felépítése után a peptid-gyantát mostuk DCM-nal, majd szárítottuk. A szilárd hordozóról a peptidet, illetve az oldallánc védőcsoportokat TFA segítségével manuálisan hasítottuk le. A hasítás során keletkező reaktív karbokationok alkilezhetik az aminosavakat (főként Trp, Met, Tyr, Cys), ezért nukleofil reagenseket, ún. gyökfogókat alkalmazunk. A hasítóelegy összetételét a peptid szekvenciája, illetve az oldallánc védőcsoportok határozták meg (21. táblázat).

21. táblázat. Az Fmoc/tBu stratégiában alkalmazott hasítóelegyek összetétele.

szekvencia	hasítóelegy összetétele
Arg, Met, Trp aminosavakat és Trt védőcsoportot nem tartalmaz	TFA/víz 95 : 5 v/v
Trp aminosavat vagy Trt védőcsoportot tartalmaz	TFA/víz/EDT 95 : 2,5 : 2,5 v/v
Arg vagy Met aminosavat tartalmaz	TFA/tioanizol/víz /EDT/fenol 82,5 : 5 : 5 : 2,5 : 5 v/v/v/v/w (Reagens K)

100mg peptid-gyantára átlagosan 5ml hasítóelegyet használtunk. A hasítóelegyet jeges hűtés mellett adtuk a peptid-gyantához és szobahőmérsékleten 1-3 órán át kevertettük. A Rink-amid MBHA gyantáról való hasítás után a peptidek C-terminálisát amid formában kaptuk. A hasítás után a keveréket szűrtük és mostuk 1ml TFA-val, majd a peptidet hideg (0°C) dietil-éterrel kicsaptuk. Centrifugálás után (2000rpm, 10 perc) az üledéket mostuk éterrel, majd vízben, illetve acetonitril/víz elegyben oldottuk és liofilizálás segítségével izoláltuk.

5.1.3. Peptidek szintézise Boc/Bzl módszerrel

A peptidek egy részét Boc/Bzl stratégia alkalmazásával manuálisan állítottuk elő 4-metilbenzihidrilamin (MBHA) gyantán (kapacitás: 1,1mmol/g). A peptidek C-terminálisát amid formában kapjuk e gyantáról való hasítás után. A felhasznált N^t -Boc-aminosavakat a 22. táblázat foglalja össze.

22. táblázat. Boc/Bzl stratégia során alkalmazott Boc-aminosavszármazékok oldallánc védőcsoportjai.

aminosav	funciócsoport	védőcsoport	rövidítés
Lys	Amino	2-klórbenziloxikarbonil	Ciz
		9-fluorenilmetiloxikarbonil*	Fmoc
Arg	Guanidino	tozil	Tos
Thr	Hidroxil	benzil	Bzl (Bn)
Gly, Ala, β -Ala, Pro	oldallánc védőcsoport nélkül		

A MBHA gyantára az első aminosavat amidkötés kialakításával kapcsoltuk. A peptidlánc felépítését N,N' -diizopropilkarbodiimid (DIC) és HOBt reagens segítségével végeztük. Bár a Boc/Bzl stratégia során N,N' -dicklohexilkarbodiimid (DCC) alkalmazása gyakoribb, de a reagens allergiás reakciót válthat ki, ezért ha helyettesítése lehetséges volt, használatát elkerültük. A szintézis egy ciklusának menetét a 23. táblázat foglalja össze.

23. táblázat. A Boc/Bzl stratégia szerinti peptidszintézis egy ciklusának menete.

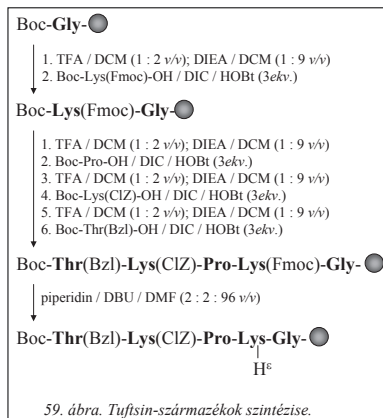
művelet	Boc/Bzl szintézis
Boc hasítás	TFA/DCM = 1 : 2 v/v (2+20 perc)
mosás	DCM (5x1 perc)
semlegesítés	DIEA/DCM=1 : 9 v/v (5x1 perc)
mosás	DCM (5x1 perc)
kapcsolás	3ekv.* Boc-Aaa-OH/DIC/HOBt (40-60 perc)
mosás	DCM (5x1 perc)
ellenőrzés	ninhidrin-, izatin-teszt

*gyantakapacitásra számított mennyiség

A végső hasítás előtt a peptid-gyantát legalább egy napig vákuum exsikkátorban szárítottuk. A hasítást folyékony hidrogén-fluorid segítségével végeztük teflon készülékben 0°C-on. 0,5-1g peptid-gyantára 10ml HF-ot desztilláltunk *p*-krezol (0,5g) gyökfogó jelenlétében. 1-1,5 óra elteltével a HF-ot vákuum alatt eltávolítottuk és a lehasított peptidet hideg dietil-éterrel (0°C) kicsaptuk. Éteres mosást követően a peptidet tömény ecetsavban vagy 5-10% ecetsav/víz elegyben oldottuk, majd liofilizálással izoláltuk.

5.1.4. Tuftsin-származékok szintézise

A tuftsin elágazó láncú hordozó peptideket MBHA gyantán (kapacitás: 1,1mmol/g) ortogonális védőcsoport kombináció alkalmazásával állítottuk elő. Az 59. ábrán bemutatott szintézis szerint állítottuk elő az OT20 ([TKPKG]₄), OT10 ([TKPKG]₂), és T6 (GTKPKG)



származékokat. A szabad aminosóportot tartalmazó lizin oldalláncokat antituberkulotikum származékokkal (pl. [TKPK(INH-CH₂-CO)G]₄) vagy klórecetsav-pentaklórifenil-észterrel reagáltattuk szilárd fázison. A gyantáról való hasítást egy napi vákuum exszikkátoros szárítás előzte meg. A hasítást folyékony hidrogén-fluorid segítségével végeztük teflon készülékben 0°C-on. 0,5-1g peptid-gyantára 10ml HF-ot desztilláltunk *p*-krezol (0,5g) gyökfogó jelenlétében. 1-1,5 óra elteltével a HF-ot vákuum alatt eltávolítottuk és

a lehasított peptidet hideg dietil-éterrel (0°C) kicsaptuk. Éteres mosást követően a peptidet tömény ecetsavban vagy 5-10% ecetsav/víz elegyben oldottuk, majd liofilizálással izoláltuk.

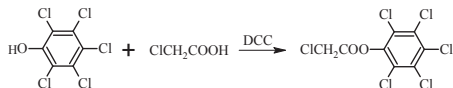
5.1.5. Tioéterkötést tartalmazó peptidkonjugátumok szintézise

5.1.5.1. Klóracetilezett hordozó molekulák szintézise

Ciszteinnel hosszabbított peptideket tioéterkötésen keresztül kapcsoltuk klóracetilcsoportot tartalmazó hordozó molekulákhoz.

A hordozó molekulák klóracetilézését klórecetsav-pentaklórifenil-észter (ClAc-OPcp) reagens segítségével állítottuk elő. A ClAc-OPcp reagens szintézise során pentaklórifenol és klórecetsavat etilacetátban oldottunk (0,1mol; c=2mol/dm³), majd 0°C-on összeöntöttük DCC etilacetátos oldatával (0,1mol; c=2mol/dm³). A fehér csapadék kiválása után szobahőmérsékleten további 24 óráig kevertettük az elegyet, majd 0°C-ra való visszahűtés után szűrjük. A szűrletet háromszor kiráztuk 5%-os NaHCO₃ oldattal, kétszer vízzel és egyszer telített NaCl oldattal. Ezután az oldatot szárítottuk (MgSO₄) és vákuum alatt

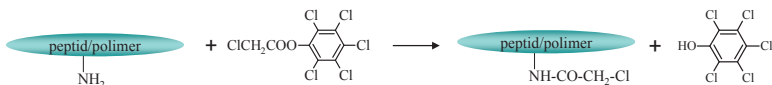
bepároltuk. A kapott fehér csapadékot metanolból kristályosítottuk át, majd meghatároztuk az olvadáspontját (Op: 126-127°C). Kitermelés: 82%.



60. ábra. Klórecetsav-pentaklórfenil-észter (ClAc-OPcp) reagens előállítása.

Az OT20 tuftsin-származék klóracetilézését szilárd fázison végeztük. A szabad aminosoporra nézve 3 ekvivalens ClAc-OPcp aktív észtert oldottunk NMP-ban és 24 órán át kevertettük szobahőmérsékleten. Negatív Kaiser-teszt után a peptidet hasítottuk a gyantáról a fent leírt módszerek szerint, majd félpreparatív RP-HPLC tisztítás után elvégeztük a kapott OT20(ClAc) származék analízisét (M_{av} számított=2180,3; M_{av} mért=2180,6; R_t =22,9 perc).

A SAK és EAK polipeptidek klóracetilezett származékait oldatban állítottuk elő. A polimert (10mg) 1ml vízben oldottuk és 5ml DMF-dal hígítottuk. A számított mennyiségű klórecetsav-pentaklórfenil-észtert (25% a monomer molekulatömegére számítva) 4ml DMF-ban oldottuk. Összeöntés után az elegyet szobahőmérsékleten, egy éjszakán át kevertettük, majd vízzel szemben dializáltuk (Pierce dialízis hártya, 10.000 MWCO). A kapott vizes oldatból a klóracetilezett SAK illetve EAK polimert liofilizálással izoláltuk.



61. ábra. Hordozó peptidok és polimerek klóracetilézése

A kapott polimerek klórtartalmát módosított Schöniger égetéssel [196] szerint határoztuk meg (ld. x. fejezet). ClAc-SAK esetében a klórtartalom alapján számított szubsztitúciófok 21%, ClAc-EAK esetében 15% volt.

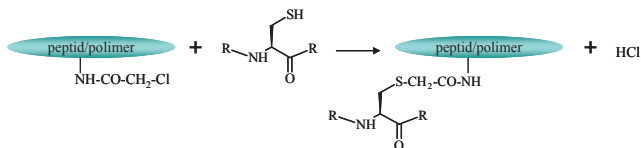
5.1.5.2. Cisztein tartalmú peptidok konjugációs reakciót megelőző dimerizációs vizsgálata

A cisztein tartalmú peptidok bázikus közegben diszulfidhídon keresztül dimereket képezhetnek, mely reakció verseng a tioéterkötés kialakulásával. A konjugálás előtt ezért dimerizációs próbát végeztünk, hogy a reakció körülményeit meghatározhassuk. A dimerizációs próbát 0,1M TRIS-pufferben (pH=8,3) végeztük (c=1mg/ml) zárt reakcióedényben. A peptidekből 1mg/ml koncentrációjú oldatot szobahőmérsékleten

kevertettünk és óránként 50 μ l mintát vettünk. A mintához 1,1 ekvivalens *N*-etilmaleimidet adtunk, majd RP-HPLC analízist végeztünk (gradiens: 5B%, 5 perc, 5-60B%, 35 perc). A csúcás alatti területek alapján meghatároztuk a dimer, illetve monomer arányát. A terméket frakciószedés után tömegspektrometriával azonosítottuk.

5.1.5.3. A tioéterkötés kialakítása

A tioéterkötés kialakítása a konjugálandó peptid szabad ciszteinjének tiolsoportja és a hordozó peptiden illetve polimeren kialakított klóracetilzett aminocsoportok között történik 0,1M TRIS-pufferben (pH=8,3).



62. ábra. Klóracetilzett hordozó peptidok és polimerek reakciója cisztein tartalmú peptidekkel.

5-10mg hordozó OT20 tuftsin-származékot 2-5ml 0,1M TRIS-pufferben (pH=8,3) oldottunk. Az oldatot argon segítségével oxigénmentesítettük, majd a konjugálandó peptidet a klóracetilcsoportokra számított kétszeres moláris feleslegben kis részletekben adagoltuk. Az oldatból óránként mintát vettünk és analitikai RP-HPLC segítségével követtük a reakciót. A konjugálás 12-24 óra alatt ment végbe. Ezután az oldatot félpreparatív eljárással RP-HPLC segítségével tisztítottuk és analizáltuk. (M_{av} számított=4005,8; M_{av} mért=4006,0; R_t =26,2 perc).

A klóracetilzett SAK és EAK polimerekből 5-10mg-ot 10-20ml 0,1M TRIS-pufferben (pH=8,3) oldottunk és a konjugálandó peptidet kis részletekben 3-4 óra alatt 10-15 percenként adtuk az oldathoz. A konjugálandó peptidet a klórtartalomra számított 20%-os feleslegben alkalmaztuk. A teljes peptidmennyiség hozzáadása után a reakcióelegyet 12 órán át kevertettük. Az el nem reagált klóracetilcsoportokat a klórtartalomra számított 5 ekvivalens cisztein hozzáadásával semlegesítettük. A kapott terméket 2 napig desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd a konjugátumot liofilizálással izoláltuk. A konjugátumok szubsztitúciófokát aminosavanalízis segítségével határoztuk meg. A (SAK(91-106) esetében a szubsztitúciófok 15% volt, EAK(91-106) esetében 12%.

5.1.6. Antituberkulotikum – peptidkonjugátumok szintézise

5.1.6.1. Izoniazid (INH) – peptidkonjugátumok szintézise

Az izoniazid-konjugátumok előállítására két szintézis utat fejlesztettünk ki. Az első módszerben peptidaldehidet állítottunk elő szerin *N*-terminálisú peptidből és ezt reagáltattuk izoniaziddal oldat fázisban. A másik szintézisben először az izoniazidból glioxilsavval származékot állítottunk elő, melyet szilárd fázison kapcsolunk peptidekhez.

A szerin *N*-terminálisú $^{91}\text{SEFAGAGFVRAGAL}^{104}$ vagy $\text{S-}^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$ peptidet 1% NaHCO_3 oldatban (pH=8,3) oldottuk 5mg/ml koncentrációban. A szelektív oxidációt 4ekv. NaIO_4 -tal végeztük. Az oldathoz gyökfokóként 10ekv. metionint adtunk. 50 perc kevertetés után a reakciót 10ekv. etilén-glikol hozzáadásával állítottuk le. A reakcióelegyet RP-HPLC segítségével tisztítottuk. Liofilizálás után a peptidaldehidet 0,1M NH_4OAc -ban (pH=4,6) oldottuk ($c=10\text{mg/ml}$), majd 10ekv. izoniazid acetonitriles oldatát adtuk hozzá ($c=10\text{mg/ml}$). 60 perc kevertetés után a reakcióelegyet RP-HPLC segítségével tisztítottuk, majd a kapott hidrazon származékot liofilizálás után kémiaiileg jellemeztük. $\text{INH}=\text{CH-CO-}^{92}\text{EFAGAGFVRAGAL}^{104}$ (M_{av} számított=1438,8; M_{av} mért=1438,8; $R_t=29,8$ perc). $\text{INH}=\text{CH-CO-}^{91}\text{SEFAYGSFVRTVSLPV}^{106}$: (M_{av} számított=1932,0; M_{av} mért=1932,0; $R_t=31,4$ perc)

A másik módszerben 10mmol (1,37g) izoniazidot 10ml acetonitril/víz (1 : 4 v/v) elegyben oldottunk és hozzáadtuk a glioxilsav-monohidrát vizes oldatát (10mmol; 0,92g / 2ml). 60 perc kevertetés után a kiváló fehér csapadékot szűrtük és mostuk vízzel. A terméket vákuum exsikkátorban szárítottuk P_2O_5 felett (kitermelés: 97%). Ezután meghatároztuk a termék olvadáspontját (Op: 204,5-205,0°C) és monoizotópos molekulatömegét (M_{mo} számított=193,1; M_{mo} mért=193,0). Izonikotinoilhidrazono-ecetsavat (9mmol; 1,75g) 15ml absz. metanolban szuszpendáltunk, majd ekvimoláris mennyiségben hozzáadott NaBH_3CN (9mmol; 0,57g) segítségével redukáltuk. 12 óra kevertetés után az oldatot vákuum alatt szárazra pároltuk, majd metanolból átkristályosítottuk (kitermelés: 92%). Ezután meghatároztuk az így előállított izonikotinoilhidrazino-ecetsav olvadáspontját (Op: 192,5-193,0°C) és monoizotópos molekulatömegét (M_{mo} számított=195,1; M_{mo} mért=195,0). A terméket szilárd fázison kapcsolunk Boc/Bzl, illetve Fmoc/*t*Bu stratégiával előállított peptidek *N*-terminálisához, illetve lizin ϵ -aminocsoportjához. A gyantakapacitásra számított 5 ekvivalens izonikotinoilhidrazino-ecetsavat, DIC és HOBt reagenseket NMP-ban oldottuk és a

peptid-gyantához adtuk. 1 óra elteltével a kapcsolás végbemenetelét Kaiser-teszt segítségével ellenőriztük. A gyantáról való hasítást és a termék feldolgozását az 5.1.2 és 5.1.3. fejezetekben ismertetett módszerek szerint végeztük. A tisztított terméket analitikai RP-HPLC, tömegspektrometria és aminosavanalízis segítségével jellemeztük. Az analízis eredménye a 10. táblázatban található.

5.1.6.2. *p*-Aminoszalícilsav (PAS) – peptidkonjugátumok szintézise

p-Aminoszalícilsavat szilárd fázison kapcsoltuk Fmoc/*t*Bu stratégia szerint felépített peptidok *N*-terminálásához. A gyantakapacitásra számított 5 ekvivalens mennyiségben PAS-t és 5 ekvivalens DIC/HOBt reagenseket NMP-ban oldottunk és hozzáadtuk a szabad aminosoportot tartalmazó peptid-gyantához. 1 óra kevertetés után mostuk és szárítottuk a gyantát, majd TFA segítségével lehasítottuk a PAS-peptidkonjugátumot a fent leírt módszerek szerint (5.1.2. fejezet). A kapott terméket RP-HPLC segítségével tisztítottuk, liofilizáltuk majd kémiaiailag jellemeztük analitikai RP-HPLC, aminosavanalízis és tömegspektrometria segítségével (az analízis eredménye a 11. táblázatban található).

5.1.6.3. Pirazinamid (PZA) – peptidkonjugátumok szintézise

Pirazinkarbonsavat (PZC) szilárd fázison kapcsoltuk peptidok *N*-terminálásához, illetve lizin ϵ -aminocsoportjaihoz, DIC és HOBt reagensek segítségével (gyantakapacitásra számított 5 ekvivalens mennyiségben) amidkötés kialakításával. A kapcsolást Kaiser-teszttel ellenőriztük. A kapott pirazinamid-konjugátumot a gyantáról HF, illetve TFA segítségével hasítottuk attól függően, hogy a peptidlánc felépítése során Boc/Bzl vagy Fmoc/*t*Bu védőcsoport-kombinációt alkalmaztunk (5.1.2 és 5.1.3. fejezetek). A terméket tisztítottuk (RP-HPLC), majd kémiaiailag jellemeztük. Az analitikai RP-HPLC és tömegspektrometria során kapott eredmények a 12. táblázatban találhatóak.

5.1.6.4. DUT69 – peptidkonjugátumok szintézise

TKPKGTKPKG (OT10) peptid-gyantát (Rink-amid MBHA gyanta, kapacitás: 0,70mmol/g) a gyantakapacitásra számított 3 ekvivalens Boc-aminooxiecetsavval reagáltattuk 3 ekvivalens PyBOP, 3 ekvivalens HOBt és 6 ekvivalens DIEA jelenlétében. Egy óra kevertetés után negatív Kaiser-teszt esetén a peptid-gyantát mostuk DCM-nal, majd

szárítottuk. A hasítás során 100mg peptid-gyantát TFA/H₂O (4,75ml : 0,25ml) eleggyel kevertettük 1,5 órán át. A hasítás után a keveréket szűrtük, majd a peptidet hideg (0°C) dietil-éterrel kicsaptuk. Centrifugálás után (2000rpm, 10 perc) az üledéket vízben oldottuk, majd liofilizáltuk. Az aminosaxi-származékok acetonnal reagálnak, ezért annak használatát mindig kerüljük és a fagyasztást aceton/szárazjég elegy helyett folyékony nitrogénnel végeztük. (M_{av} számított=1114,3; M_{av} mért=1114,2).

50mg NH₂-O-CH₂-CO-T10 peptidszármazékot 2ml piridin/MeOH/H₂O (1 : 4 : 1 v/v) elegyben oldottunk. Az oldathoz 4 ekvivalens DUT69 (M_{mo} =229,3) származékot adtunk, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. Ezután az oldathoz 0,1% TFA/víz elegyet öntöttünk és a kiváló csapadékot (DUT69 származék feleslege) szűrtük. A szűrletet vízzel négyszeresére hígítottuk és RP-HPLC segítségével tisztítottuk. A terméket liofilizálással izoláltuk, majd kémiaiilag jellemeztuk analitikai RP-HPLC, tömegspektrometria és aminosavanalízis segítségével. (M_{av} számított=1323,5; M_{av} mért=1323,6).

5.1.6.5. DUT44 – peptidkonjugátumok szintézise

50mg DUT44 (M_{mo} =436,2) hatóanyagot 2ml DMF-ban oldottunk, majd 3 ekvivalens glutaraldehiddel reagáltattunk 5 ekvivalens DIEA jelenlétében. 2 óra kevertetés után az oldathoz 0,1% TFA/víz elegyet adtunk és a kiváló sárga csapadékot szűrtük, mostuk vízzel és szárítottuk. (M_{mo} számított=550,3; M_{mo} mért=550,4).

Rink-amid MBHA gyantán (kapacitás: 0,70mmol/g) Fmoc/tBu stratégiával felépített peptidhez a gyantakapacitásra számított 2 ekvivalens DUT44-O-CO-(CH₂)₃-CO-OH származékot adtunk 2 ekvivalens PyBOP, 2 ekvivalens HOBt és 4 ekvivalens DIEA jelenlétében. 1,5 óra kevertetés után negatív Kaiser-teszt esetén a peptid-gyantát mostuk DCM-nal, majd szárítottuk. A hasítást TFA/tioanizol/víz /EDT/fenol (82,5 : 5 : 5 : 2,5 : 5 v/v/v/v/w) eleggyel végeztük (2 óra kevertetés). A hasítás után a keveréket szűrtük, majd a peptidet hideg (0°C) dietil-éterrel kicsaptuk. Centrifugálás után (2000rpm, 10 perc) az üledéket vízben oldottuk, majd liofilizáltuk. A nyersterméket RP-HPLC segítségével tisztítottuk, majd kémiaiilag jellemeztuk analitikai RP-HPLC, tömegspektrometria és aminosavanalízis segítségével. (M_{av} számított=3520,8; M_{av} mért=3520,6).

5.1.7. Peptidok és peptidszármazékok tisztítása

Az előzetesen feldolgozott peptidokat és peptidszármazékokat félpreparatív eljárással nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával tisztítottuk. Knauer rendszeren, C18 csoporttal módosított szilika töltetű oszlop felhasználásával egy injektálással 5-10mg nyersterméket választottunk el a szennyezéseitől. Apolárosabb peptidok esetében C4 csoporttal módosított oszlopot használtunk. A munka során használt oszlopok adatai az 5.1.1. fejezetben láthatóak. Az oszlop ekvilibrálásához, illetve az elúcióhoz alkalmazott elegyek a következők voltak: *A eluens*: 0,1% TFA/víz; *B eluens*: 0,1% TFA/acetonitril-víz (80 : 20 v/v). Az elegyeket a felhasználás előtt vákuum alatt ultrahangos rázatás mellett levegőtlenítettük. Minden peptid és peptidszármazék esetében lineáris gradienselúciót alkalmaztunk, a gradienst a peptidok és peptidszármazékok hidrofilitása határozta meg. A detektálás UV detektor segítségével történt ($\lambda=214\text{nm}$, 280nm). Az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztük, a folyássebesség 4ml/perc volt. A mintát *A eluens*ben oldottuk, 2,5-5mg/ml töménységben. Az oszlopra 2ml oldatot injektáltunk. A főkomponenst tartalmazó oldatból az acetonitrilt vákuum alatt elpárologtattuk és a maradék vizes oldatot liofilizáltuk.

5.1.8. Peptidok, peptidkonjugátumok és hatóanyagok analitikai jellemzése

5.1.8.1. Analitikai RP-HPLC vizsgálatok

A vizsgálandó vegyületek homogenitását analitikai RP-HPLC vizsgálattal elemeztük. Knauer készülék, fordított fázisú, C18, illetve C4 oszlopok felhasználásával, analitikai eljárással (az oszlopok adatai az 5.1.1. fejezetben találhatóak). Az oszlopok ekvilibrálásához, illetve az elúcióhoz a következő elegyeket alkalmaztuk: *A eluens*: 0,1% TFA/víz; *B eluens*: 0,1% TFA/acetonitril-víz (80 : 20 v/v). Az *A eluens*ben oldott 0,5-1,0mg/ml töménységű mintákból az oszlopra 20 μl -t injektáltunk. Minden peptid és peptidszármazék esetében lineáris gradienselúciót alkalmaztunk (leggyakrabban 5B% 5 perc, 5-60B%, 35 perc). Az áramlási sebesség 1ml/perc volt. A detektálás abszorbancia mérésével ($\lambda=214$, 280nm) történt.

5.1.8.2. Aminosavanalízis

100-200 μg peptidet, illetve peptidszármazékot 6M sósavval, 110°C-on, 24 óra alatt evakuált csőben hidrolizáltunk, majd a hidrolizátumból az aminosavösszetételt SYKAM S-433 automata aminosavanalizátor segítségével állapítottuk meg. Az aminosavanalíziseket Dr. Medzihradzky Schweiger Hedvig és Dr. Bősze Szilvia végezte.

5.1.8.3. Peptidek cisztein tartalmának meghatározása *N*-etilmaleimiddel

100µg peptidet 1mg/ml koncentrációban 0,1M TRIS-pufferben (pH=7,0) oldottunk és 20µl-t injektáltunk azonnal analitikai RP-HPLC-re. A maradék oldathoz *N*-etilmaleimid etanolos oldatát (c=0,1mg/ml) adtuk a tiolcsoportokra számított 1,1 moláris feleslegben. Az oldatot 5 percig szobahőmérsékleten ultrahangfürdőben rázattuk, majd analitikai RP-HPLC segítségével elemeztük Eurosphere-100 C18 oszlop felhasználásával (5.1.8.1. fejezet). Az alkalmazott gradiens a vizsgált vegyület polaritásától függött. A reakció során keletkezett szukcinimid származék retenciós ideje minden esetben eltért a kiindulási peptidétől, így a csúcás alatti terület alapján kiszámítható a szabad tiolcsoportot tartalmazó peptid mennyisége. A kiindulási anyagokat és a reakció során kapott termékeket tömegspektrometriával azonosítottuk.

5.1.8.4. Tömegspektrometria

A tömegspektrumokat electrospray ionforrással, Bruker Esquire 3000+ típusú ioncsapdás készüléken vettük fel. A mintákat 0,1% AcOH-t tartalmazó acetonitril/víz 1:1 (v/v) oldószerkezeletben oldottuk és 10µl/perc áramlási sebességgel injektáltuk. A spektrumokat pozitív módban, 50-3000 *m/z* tartományban, 13,000 *m/z/sec* mintavételi sebességgel vettük fel.

5.1.8.5. Elemanalízis

A vegyületek elemanalízisét Dr. Medzihradzky Schweiger Hedvig végezte VARIO EL III automata elemanalizátor segítségével.

A polimer hordozók klórtartalmának meghatározását Kiskó Mária végezte módosított Schöniger égetéses módszer alkalmazásával [196].

5.1.8.6. Olvadáspont meghatározás

A vegyületeket achátmozsárban való elporítás után egyik végén leforrasztott üvegkapillárisba töltöttük. Az olvadáspontot Büchi 530 készülék segítségével határoztuk meg 0,5°C/perc fűtési sebesség mellett.

5.1.8.7. Spektrofluorimetria

A hatóanyagok, illetve konjugátumok fluoreszcens spektrumát FS900CD spektrofluoriméter segítségével vettük fel. A méréseket Dr. Csík Gabriella (SOTE, Biofizikai Intézet) végezte. A minták gerjesztése Xe lámpával, a jelek detektálása Hamamatsu "photomultiplier"(R955) alkalmazásával történt. A monokromátor felbontása 0,5 nm volt. A 10-3mol/dm³ koncentrációjú (DMSO) törzsoldatokat HPMI médiummal 100-szorosára hígítottuk, majd a spektrumokat 1cm-es küvettában, szobahőmérsékleten vettük fel.

5.2. *In vitro* kísérletek

5.2.1. Az *in vitro* kísérletek során használt vegyszerek, eszközök, műszerek

Anyagok, vegyszerek

Elnevezés	Rövidítés, jelzés	Gyártó cég
polioxietilén-szorbitán-monolaurát	Tween-20	Sigma (St.Louis, MO, USA)
forbol-12-mirisztát-13-acetát	PMA	
fitohemagglutinin	PHA	
marha szérum albumin (bovine serum albumin)	BSA	
(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazolium) bromid	MTT	
tripánkék, DMSO, Sigma fast OPD, ionomycin, monensin, szaponin, gentamicin, L-glutamin		
5(6)-karboxifluorescein-diacetát <i>N</i> -szukcinimid- észter	CF-SE	Fluka (Buchs, Svájc)
Humán IFN- γ standard	IFN- γ	EuroClone (Paignton, Anglia)
magzati borjú savó (foetal calf serum)	FCS	Gibco (Paisly, Anglia)
Ficoll-Hypaque		Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)
H ₂ O ₂ , HCl, NaN ₃ , NaCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , MgCl ₂ , citromsav, etanol		Reanal (Budapest)

Ellenanyagok

Elnevezés	Gyártó cég
monoklonális anti-humán IFN- γ antitest	BD Bioscience (San Jose, CA, USA)
biotinált monoklonális anti-humán IFN- γ antitest	
PE-konjugált monoklonális anti-humán IFN- γ antitest	
PE-konjugált monoklonális anti-humán CD25 antitest	
FITC-konjugált monoklonális anti-humán CD4 antitest	Sigma (St.Louis, MO, USA)
avidin-peroxidáz (EC 1.11.1.7)	
Human Interferon- γ ELISpot ^{PRO} készlet	MABTECH (Nacka Strand, Svédország)

Táptalajok, pufferek

Összetétel	Rövidítés, jelzés	pH
0,01M foszfát puffer + 0,1M NaCl	PBS	7,4
2-amino-2-hidroxietyl-propán-1,3-diol	TRIS	7,0 és 8,3
4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin etánszulfonsav	HEPES	7,4
9mMglükóz, 10mM NaHCO ₃ , 119mM NaCl, 9mM HEPES, 5mM KCl, 0,85mM MgCl ₂ , 0,053mM CaCl ₂ , 5mM Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O	HPMI	7,4
RPMI-1640 szövettenyésztő médium	RPMI	7,4
FacsFlow (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)		7,5

Eszközök

Elnevezés	Gyártó cég
25cm ² , 75cm ² , 175cm ² szövettenyésztő flaska	Sarstedt (Nümbrecht, Németország)
24, 96 lyukú letapadó és szuszpenziós szövettenyésztő lemez	
1ml, 5ml, 10ml, 50ml szerológiai pipetta	
15ml, 50ml centrifuga-cső	
3,5ml Pasteur-pipetta	
96 lyukú MaxiSorp mikrotitrációs "flat-bottom" lemez	Nunc (Roskilde, Dánia)
Millex 0,22µm szűrő	Millipore (Cork, Írország)
1ml-es fecskendő	Terumo (Leuven, Belgium)
27G tű	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)

Műszerek, programok

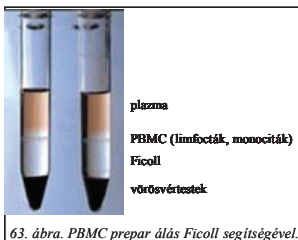
Elnevezés	Gyártó cég
ELISA lemez leolvasó spektrofotométer	Labsystem (Helsinki, Finnország)
Sedival fénymikroszkóp	Carl Zeiss (Jena, Németország)
ESCO Labculture lamináris fülke (Class II)	Esco (Hatboro, PA, USA)
Multifuge 3 S-R centrifuga	Hereaus (Hanau, Németország)
Hera Cell inkubátor	
FACSCalibur áramlási citométer	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
BD LSR II áramlási citométer	
DiVa FCS 3.0 program	
CellQuest program	
ImmunoSpot lemez leolvasó készülék	C.T.L. (Bonn, Németország)
Image Acquisition program	

5.2.2. Sejtek izolálása, sejtvonalak fenntartása

A következő fejezetben ismertetem a munka során alkalmazott sejtek preparálásának menetét, illetve a sejtvonalak fenntartásának körülményeit.

5.2.2.1. PBMC (perifériás vérből származó monomorfonukleáris sejtek) izolálása

10-15ml alvadásgátolt vénás vért (vérvételi cső: Vacuette 3,5ml 9NC Na-citrát 3,2%) kétszeresére hígítottunk RPMI-1640 szérumentes médiummal. A hígított vért 15ml-es centrifuga-csőekben Ficoll-Hypaque fölé rétegeztük (3ml Ficoll + 6ml hígított vér), majd 30 percig centrifugáltuk (2000rpm, 18°C, fékezés nélkül) [213].



Az elvált limfocita réteget (63. ábra) Pasteur-pipetta segítségével 15ml-es centrifuga-csőbe szedtük, majd mostuk RPMI-1640 szérumentes médiummal (1500rpm, 10 perc, 18°C). A felülúszó leöntése után a kapott pelletet felfuszpendáltuk, majd a sejteket ismét mostuk szérumentes médiummal (1000rpm, 15 perc, 18°C). Ezután a sejteket 2ml RPMI-1640 teljes

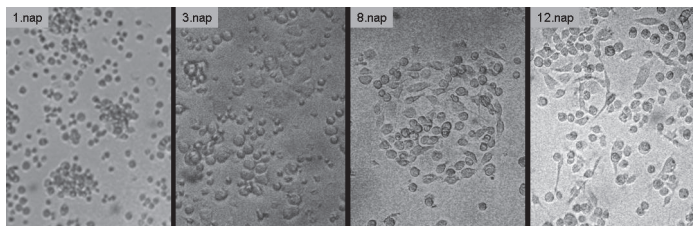
médiumban² vettük fel. A sejtszámot Bürker-kamrában határoztuk meg (általában 10 μ l sejtszuszpenziót 190 μ l 0,4% tripánkék oldattal hígítottunk). A sejteket ezután 24 vagy 96 lyukú szuszpenziós szövettenyésztő lemezekre osztottuk a kísérleteknek megfelelő sejtszámmal.

5.2.2.2. Egér csontvelői sejtek preparálása és differenciáltatása

11 hetes Balb/c nőstény egerekből származó femur (combsont) és tibia (sípcsont) csontokat 70%-os etanolban sterilizáltuk (0,5 perc), majd steril PBS pufferbe (pH=7,4) tettük. A csontvégek levágása után a csontvelőt 27G-s tűvel átmostuk (steril PBS), majd centrifugálás után (1000rpm, 5 perc) a sejteket 5ml R10/M-CSF fenolvörös nélküli médiumban vettük fel. Az R10/M-CSF médium összetétele a következő volt: fenolvörös nélküli RPMI-1640; 10% FCS; 10mM HEPES; 0,160 μ mol/ml gentamicin; 2,5 μ g/ml rMu M-CSF (makrofág-koloniasztimuláló faktor). A sejteket ezután 19G-s tű segítségével homogenizáltuk, majd steril

² A teljes RPMI-1640 médium 10% FCS-t (hővel inaktivált magzati borjú szérum, foetal calf serum), L-glutamint (2mM) és gentamicint (160 μ mol/ml) tartalmazott

Petri-csészékbe osztottuk. A sejteken 3 naponta cseréltük a médiumot úgy, hogy a nem-letapadó sejteket óvatosan a médiummal együtt eltávolítottuk [214-216].

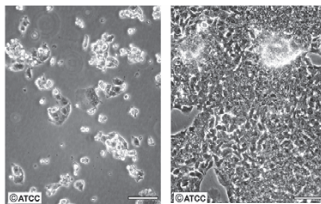


64. ábra. Egér csontvelői sejtek differenciálódása M-CSF hatására, fénymikroszkópos felvételek.

A makrofág kolóniasztimuláló faktor (M-CSF) hatására a sejtek differenciálódtak, ami a mikroszkópos felvételeken jól látszik (64. ábra). Két hét elteltével a differenciálódott sejteket szövettenyésztő lemezekre osztottuk és citotoxicitási és sejtlevételi vizsgálatokat végeztünk. A citotoxicitási vizsgálatokhoz 96 lyukú Sarstedt letapadó sejtekhez való lemezeket használtunk és lyukanként 10^4 sejt számot alkalmaztunk.

5.2.2.3. HepG2 – humán hepatoma sejt vonal fenntartása

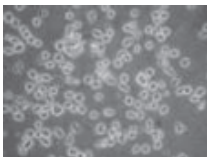
A humán máj eredetű hepatokarcinoma HepG2 sejt vonalat [217, 218] (ATCC HB-8065) 150ml-es szövettenyésztő flakóban tenyésztettük RPMI-1640 teljes médiumban, 37°C -on, 5% CO_2 atmoszférában. A teljes médium 10% FCS-t, L-glutamint (2mM) és gentamicint (160 $\mu\text{g/ml}$) tartalmazott. A sejteket kétnaponta passzáltuk. A sejt számot Bürker-kamrában határoztuk meg 0,4%-os tripánkék oldat alkalmazásával. A citotoxicitási vizsgálatokhoz a logaritmikus növekedési szakaszban lévő sejteket 96 lyukú letapadó szövettenyésztő lemezre osztottuk.



65. ábra. HepG2 sejt vonal mikroszkópos képe

5.2.2.4. MonoMac6 – monocita sejt vonal fenntartása

A humán monocitikus MonoMac6 sejt vonalat [219-221] a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Németország) forgalmazza. A szuszpenziós sejteket 150ml-es szövettenyésztő flakóban tenyésztettük RPMI-1640 teljes



66. ábra. MonoMac6 sejtvonal mikroszkópos képe.

médiumban. A teljes médium 10% FCS-t, L-glutamint (2mM) és gentamicint (160 μ g/ml) tartalmazott. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában tartottuk. A citotoxicitási és sejtfelvételi vizsgálatok előtt a logaritmikus növekedési fázisban lévő sejteket 24 illetve 96 lyukú szuszpenziós szövettenyésztő lemezekre osztottuk.

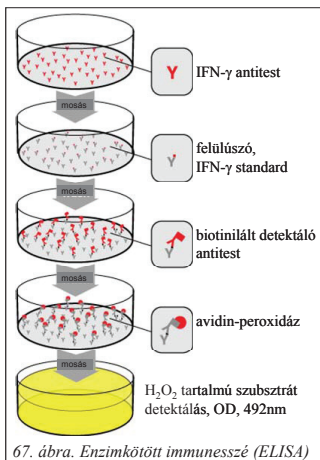
5.2.3. Az izolált PBMC sejtek stimulálása epitóp peptidekkel és konjugátumokkal

A teljes, alvadásgátolt vérből a kísérlet napján izolált PBMC sejteket 96 lyukú, U-aljú szuszpenziós lemezre osztottuk (1,5 \times 10⁵ sejt/225 μ l RPMI-1640 teljes médium). A vizsgálandó peptideket és peptidszarmazékokat RPMI-1640 szérummentes médiumban oldottuk és 0,22 μ m szűrővel steril oldatokat készítettünk. Az oldatokból 25 μ l-t adtunk a sejtsuszpenzióhoz úgy, hogy a végkoncentráció 25 μ M és 12,5 μ M legyen. A pozitív kontroll 0,5 μ g/ml PHA (fitohemagglutinin) mitogén volt, amely a sejtek (elsősorban limfociták) DNS szintézisének és osztódásának fokozódását - nem antigénspecifikus módon - indukálja. Negatív kontrollként 25 μ l szérummentes médiumot adtunk a sejtekhez. 24 és 48 óra inkubálás után (37°C, 5% CO₂) a sejtekről 100 μ l felülűszót szedtünk, amit az ELISA teszt elvégzéséig - 80°C-on tároltunk.

5.2.4. PBMC sejtek által termelt IFN- γ meghatározása ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel

A sejtek által termelt IFN- γ mennyiségét enzimkötött immunesszé (ELISA) segítségével határoztuk meg a felülűszóból. 96 lyukú NUNC Maxisorp lemezt lyukanként 50 μ l 2 μ g/ml monoklonális anti-humán IFN- γ antitesttel érzékenyítettünk egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezután a lemezt kétszer mostuk 0,05% Tween-20/PBS pufferrel (200 μ l/lyuk), majd a nem-specifikus kötőhelyeket 10% FCS/PBS oldattal blokkoltuk (200 μ l/lyuk, 2 óra, 25°C). Mosás után (2 \times 200 μ l/lyuk; 0,05% Tween-20/PBS) hozzáadtuk a -80°C-on tárolt vagy frissen eltávolított 100 μ l felülűszókat, illetve az IFN- γ standard oldatokat³.

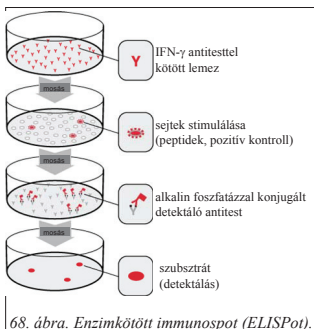
³ Az 1 μ g/ml koncentrációjú IFN- γ törzsoldatból a hígítást 10% FCS/0,05% Tween-20/PBS oldattal végeztük. A legnagyobb végkoncentráció 10000pg/ml volt. Ebből 3-szoros továbbmenő hígítással állítottuk elő a további 3333pg/ml; 1111pg/ml; 370pg/ml; 123pg/ml; 41pg/ml és 14pg/ml koncentrációjú oldatokat. Az IFN- γ koncentráció és a mérés során kapott OD adatokra másodfokú függvényt illesztettünk és a parabola egyenletéből számítottuk ki a PBMC sejtek által termelt IFN- γ mennyiségét.



2 óra elteltével (25°C) a lemezt mostuk ($4 \times 200\mu\text{l}/\text{lyuk}$; $0,05\%$ Tween-20/PBS), majd lyukanként $100\mu\text{l}$ biotinált monoklonális anti-humán IFN- γ antitestet adtunk $1\mu\text{g}/\text{ml}$ végkoncentrációban (1 óra, 25°C). Mosást követően ($6 \times 200\mu\text{l}/\text{lyuk}$; $0,05\%$ Tween-20/PBS) avidin-peroxidázt pipettáztunk a lemezre ($1\mu\text{l}/\text{ml}$, $100\mu\text{l}/\text{lyuk}$). 30 perc inkubálás (25°C) után mostuk a lemezt ($8 \times 200\mu\text{l}/\text{lyuk}$; $0,05\%$ Tween-20/PBS), majd hozzáadtuk a peroxid tartalmú szubsztrát oldatot ($100\mu\text{l}/\text{lyuk}$), melyet *Sigma fast OPD* tablettából készítettük 20ml vízzel. A lemezt sötétben inkubáltuk a szín megjelenéséig, majd a reakciót $50\mu\text{l}$ 3M HCl hozzáadásával állítottuk le. A szín intenzitását (OD, optical density) ELISA lemez leolvasó spektrométer segítségével határoztuk meg $\lambda=492\text{nm}$ -en

5.2.5. PBMC sejtek által termelt IFN- γ meghatározása ELISpot (enzyme-linked immunospot) teszttel

Az ELISpot kísérleteket a MABTECH készlet (Nacka Strand, Svédország) segítségével végeztük (Human Interferon- γ ELISpot^{PRO} kit). A készlet tartalmazza az IFN- γ antitesttel kötött lemezt, a pozitív kontrollt, biotinált IFN- γ antitestet, alkalin foszfatázzal konjugált detektáló antitestet és a szubsztrát oldatot. Az IFN- γ antitesttel kötött ELISpot lemezt steril



PBS pufferrel ($\text{pH}=7,4$) mostuk ($200\mu\text{l}/\text{lyuk}$), majd 10% FCS-t tartalmazó médiummal blokkoltuk ($200\mu\text{l}/\text{lyuk}$, 45 perc). A lemezre 2×10^5 PBMC sejtet osztottunk $100\mu\text{l}$ teljes médiumban, majd hozzáadtuk a médiumban oldott peptideket ($c=10\mu\text{g}/\text{ml}$), peptidkeverékeket ($c=3\mu\text{g}/\text{ml}$), ESAT6+CFP10 fehérjekeveréket ($c=5\mu\text{g}/\text{ml}$), rekombináns fehérjét ($c=5\mu\text{g}/\text{ml}$), illetve a pozitív kontrollt ($c=\text{ng}/\text{ml}$). 16 óra inkubálás (37°C , 5% CO_2) után a sejteket eltávolítottuk,

majd a lemezt ötször mostuk PBS pufferrel. Ezután hozzáadtuk az alkalin foszfatáz enzimmel konjugált detektáló antitestet (mAb 7-B6-1, 1:2000 hígítás, 100 μ l/lyuk) és 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a lemezt. Mosás (5 \times 200 μ l PBS/lyuk) után 100 μ l szubsztrát oldatot (BCIP/NBT-plus) pipettáztunk a lyukakba és a színes pöttyök (spots) megjelenését követően (kb. 10-15 perc) csapvízzel mostuk a lemezt, majd szárítottuk. A lemez leolvasását szabad szemmel, vagy Image Acquisition 4.5 és ImmunoSpot 3.2 programok segítségével végeztük.

5.2.6. PBMC sejtek stimulálása és az intracelluláris IFN- γ meghatározása áramlási citometriával

A PBMC sejteket 24 lyukú szuszpenziós lemezre osztottuk (5 \times 10⁵ sejt/950 μ l RPMI-1640 teljes médium). A vizsgálandó epitóp peptidekből és peptidszármazékokból steril oldatokat készítettünk RPMI-1640 szérummentes médiummal és 50 μ l-t adtunk a sejtuszuszpenzióhoz úgy, hogy a végkoncentráció 50 μ M és 25 μ M legyen. Pozitív kontrollként a sejteket 10ng/ml PMA és 1 μ g/ml ionomycin oldattal stimuláltuk. Negatív kontrollként 50 μ l szérummentes médiumot adtunk a sejtekhez. 2 óra inkubálás után (37°C, 5% CO₂) a sejtekhez fehérje transzport gátló monensin (30 μ l, 1mM) oldatot adtunk. 6, 16 és 24 óra elteltével áramlási citometriával határoztuk meg az intracelluláris IFN- γ mennyiségét.

Centrifugálás (2000rpm, 5 perc) után eltávolítottuk a felülúszót, majd a sejtekhez lyukanként 5 μ l FITC-konjugált monoklonális anti-humán CD4 antitestet adtunk (10 perc, 4°C). Mosás (1% hővel inaktivált FCS / 0,2mg/ml NaN₃ / PBS) után a sejteket fixáltuk 100 μ l 4% paraformaldehid tartalmú PBS pufferrel 30 percig (25°C). Ezután a sejteket mostuk és permeabilizáltuk 0,1% szaponin tartalmú permeabilizáló pufferrel (1% FCS / PBS). Az intracelluláris IFN- γ jelöléshez a sejteket lyukanként 3 μ l PE-konjugált anti-humán IFN- γ antitesttel inkubáltuk 1 óráig 4°C-on. Mosás után a sejteket FacsFlow folyadékban vettük fel és FACSCalibur áramlási citométerrel analizáltuk. A kapott eredményeket CellQuest program segítségével értékeltük.

5.2.7. T-sejt proliferáció vizsgálata áramlási citometriával

PPD+ egészséges donor vérből preparált PBMC sejteket hideg PBS pufferrel mostuk (2000rpm, 5 perc). A felülúszó leöntése után a sejteket 1ml PBS-ben felfuszpendáltuk majd

2,5 μ M (1,39mg) CF-SE (5(6)-karboxifluoreszcein-diacetát *N*-szukcinimid-észter) reagenst adtunk a sejtszuszpenzióhoz [57, 58]. 10 perc 37°C-on való inkubálás után a reakciót 5% FCS/PBS hozzáadásával állítottuk le. Mosást követően (2 \times PBS) a sejteket 24 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk (5 \times 10⁵ sejt/ml/lyuk) RPMI-1640 teljes médiumban. A sejtekhez ezután hozzáadtuk a vizsgálandó peptidek / konjugátumok steril oldatát 25 μ M végkoncentrációban. Pozitív kontrollként a sejtekhez 0,5 μ g/ml PHA-t adtunk. 6 nap (37°C, 5% CO₂) elteltével a sejteket lecentrifugáltuk (2000rpm, 5 perc), FACSFlow folyadékban felvettük és FACSCalibur áramlási citométerrel analizáltuk. A kiértékelést CellQuest programmal végeztük.

5.2.8. T-sejt stimuláció vizsgálata CD25 korai aktivációs marker jelölésével

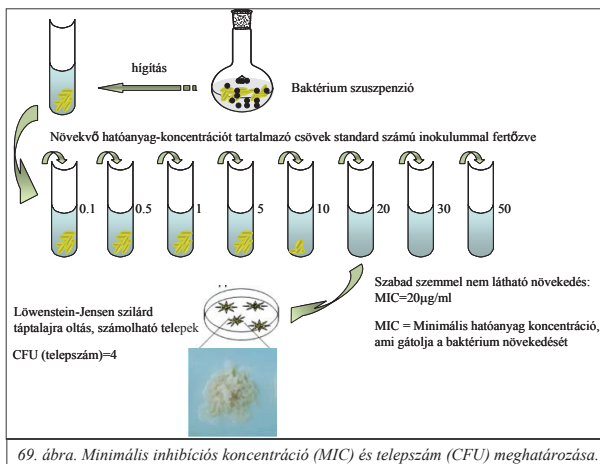
A preparált PBMC sejteket 24 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk (5 \times 10⁵ sejt/ml/lyuk) RPMI-1640 teljes médiumban. A vizsgálandó peptidből és konjugátumból steril oldatokat készítettünk és 25 μ M végkoncentrációban a sejtekhez adtuk. Pozitív kontrollként a sejteket 0,5 μ g/ml PHA reagenssel stimuláltuk. 3, 6, 12 és 24 óra inkubálás (37°C, 5% CO₂) után a sejteket lecentrifugáltuk (2000rpm, 5 perc). A korai aktivációs marker jelöléséhez a sejtekhez 5 μ l PE-konjugált monoklonális anti-humán CD25 antitestet adtunk (10 perc, 4°C) [198-200]. A sejteket ezután mostuk (1% FCS / 0,2mg/ml NaN₃ / PBS), fixáltuk (100 μ l 4% paraformaldehid / PBS; 30 perc, 4°C), majd permeabilizáltuk (0,1% szaponin / 1% FCS / PBS; 10 perc, 25°C). Mosás után a sejtekhez 3 μ l FITC-konjugált monoklonális anti-humán IFN- γ antitestet adtunk. 1 óra 4°C-on való inkubálás után a sejteket mostuk, FACSFlow folyadékban felvettük és FACSCalibur áramlási citométerrel analizáltuk. A kiértékelést CellQuest program segítségével végeztük.

5.2.9. Minimális inhibíciós koncentráció (MIC) és telepszám (CFU) meghatározása *M. tuberculosis* és *M. kansasii* tenyészetben

Kísérleteinket az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet területén található Bakteriológiai Laboratóriumban (Corden International Magyarország Kft.), Dr. Szabó Nóra irányításával és Dávid Sándor közreműködésével végeztük.

Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv (ATCC 27294), vagy *Mycobacterium kansasii* (ATCC 35775) 4 hetes friss tenyészetéből golyós lombikban 0,5 Mcfarland (1,5 \times 10⁸ CFU/ml

[222] sűrűségű szuszpenzió készült Sauton táptalajban. A baktérium szuszpenziót ezután 10^3 -, illetve 10^4 -szeresére hígítottuk.



A vizsgálandó vegyületeket DMSO-ban oldottuk, sterilre szűrtük, majd DMSO-dal sterilen 10 hígítást készítettünk⁴. A hatóanyagoldatokból 100µl-t pipettáztunk az 5ml Sula folyékony táptalajt (pH=6,5) [12, 13, 223] tartalmazó csövekbe. A csöveket ezután befertőztük a hígított baktérium szuszpenzióval (100µl) és 28 napig 37°C-on inkubáltuk. 28 nap elteltével meghatároztuk a minimális inhibíciós koncentrációt (MIC), tehát azt a legkisebb hatóanyag koncentrációt, ahol szabad szemmel a csövekben nem láttunk baktériumnövekedést (zavarosodást). Ezekből a csövekből szilárd Löwenstein-Jensen [9, 10] táptalajokra oltottunk ki, és 4-6 hét elteltével megszámláltuk a kinövekedett kolóniák számát (CFU, Colony forming Unit, telepszám) A telepszámnak a megfelelő baktérium szuszpenzió hígítással való szorzatát hasonlítottuk össze a kiindulásként alkalmazott 0,5 Mcfarland szuszpenzió telepszámával ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). A MIC és CFU értékeket minden esetben legalább két független kísérletben határoztuk meg.

⁴ INH és INH-konjugátumok esetében (az irodalmi adatok alapján, $MIC_{INH}=0,02-0,2\mu\text{g/ml}$) a vizsgált koncentráció tartomány 0,01 – 0,50µg/ml volt. A többi vegyületből 0,1 – 50µg/ml közötti koncentrációban vizsgáltuk a gátló hatást.

5.2.10. Citotoxicitás és citosztatikus hatás vizsgálata kolorimetriás tetrazólium (MTT) teszt alkalmazásával

Az antituberkulotikus hatású vegyületek és konjugátumok citotoxicitását vizsgáltuk HepG2, MonoMac6 sejtvonalakon, valamint preparált humán PBMC és egér csontvelői makrofág sejteken. A citosztatikus hatást HepG2, MonoMac6 és PBMC sejteken vizsgáltunk. Mindkét vizsgálatnál a sejtek életképességének meghatározása MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) teszt segítségével történt [224-226].

HepG2 és MonoMac6 sejtvonalak esetén a logaritmikus növekedési szakaszban lévő sejteket 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk 100µl RPMI-1640 teljes médiumban (5×10^3 sejt/lyuk). Az izolált humán PBMC illetve csontvelői eredetű differenciáltott egér makrofágok esetében a vizsgálat napján osztottuk lemezre a sejteket (egér makrofág: 10^4 sejt/lyuk, humán PBMC: 5×10^4 sejt/lyuk) 100µl szérumentes RPMI-1640 médiumban.

50µl médium eltávolítása után 150µl szérumentes médiumban oldott, sterilre szűrt vizsgálendő vegyületet / konjugátumot⁵ adtunk a sejtekhez 4-8 párhuzamosban és 37°C-on inkubáltuk a lemezt. 3 óra kezelési idő elteltével a sejtekről lemostuk a hatóanyagot. Citosztatikus hatás vizsgálatánál a sejtekhez 150µl teljes médiumot pipettáztunk és további 3 napig inkubáltunk (37°C, 5% CO₂). 3 nap elteltével, citotoxicitás esetében pedig a kezelést követően a sejtekhez lyukanként 45µl MTT-oldatot adtunk (c=2mg/ml, szérumentes médiumban oldva). 3,5 óra inkubálás után a lemezt centrifugáltuk (2000rpm, 5 perc) és a felülszót G30 tüvel óvatosan eltávolítottuk. A lila kristályokat 100µl DMSO-ban oldottuk és 10 perc rázatás után ELISA lemez leolvasó spektrométer segítségével határoztuk meg az abszorbanciát $\lambda=540\text{nm}$ és 620nm -en. A két hullámhosszon mért abszorbancia értékek különbségét átlagoltuk (*A*). A citotoxicitást, illetve a citosztatikus hatás mértékét a következő képlet alapján számítottuk ki:

$$\text{citotoxicitás \%} = 100 \cdot \left(1 - \frac{A_{\text{kezelt sejtek}}}{A_{\text{kontroll sejtek}}} \right) \quad \text{ahol } A \text{ a 4-8 párhuzamos lyukban mért abszorbancia \u00e1tlaga.}$$

A citotoxicitás mértékét (%) a koncentráció függvényében ábrázoltuk és az illesztett g\u00f6rbe segítségével meghat\u00e1roztuk az IC₅₀ \u00e9rt\u00e9ket.

⁵ A vizsgál\u00e1nd\u00f3 vegy\u00fcletek koncentr\u00e1ci\u00f3j\u00e1t a m\u00e9diumban val\u00f3 oldhat\u00f3s\u00e1guk hat\u00e1rozta meg. A telített t\u00f6rzsoldatokb\u00f3l h\u00e1romszoros tov\u00e1bbmen\u0151 h\u00edgt\u00e1ssal 8 tov\u00e1bbi oldatot \u00e1llítottunk el\u0151 \u00e9s ezekb\u0151l pipett\u00e1ztunk 150µl-t a sejtekhez. Minden lemezen alkalmaztunk negat\u00edv kontrollt, ahol a sejtekhez lyukank\u00e9nt 150µl sz\u00e9rumentes m\u00e9diumot adtunk.

5.2.11. DUT44 hatóanyag sejtfelvételének vizsgálata MonoMac6 monocita sejtvonalon áramlási citometriával

A logaritmikus növekedési fázisban lévő MonoMac6 sejteket 24 lyukú szuszpenziós lemezre osztottuk (10^5 sejt/1ml RPMI-1640 teljes médium). A vizsgálandó DUT44 hatóanyagot RPMI-1640 szérummentes médiumban oldottuk, majd az oldatot sterilre szűrtük. A törzsoldat végkoncentrációja 10^{-4} M volt. Ebből 5-szörös tovaftató hígítással állítottuk elő a többi oldatot (koncentrációtartomány: 5×10^{-5} M; 10^{-5} M). A sejtekről centrifugálás (1000rpm, 5 perc) után eltávolítottuk a médiumot, majd 250 μ l szérummentes médiumot és 250 μ l hatóanyagoldatot adtunk a lyukakhoz. 1 óra inkubálás után (37°C, 5% CO₂) a sejteket lecentrifugáltuk (1000rpm, 5 perc), eltávolítottuk a médiumot, majd 100 μ l 1mM tripszin oldatot adtunk a sejtekhez. Ezután 1ml 10%FCS/HPMI médiumot adtunk a lyukakhoz, majd mosás után a sejteket 0,5ml HPMI médiumban vettük fel. A sejteket BD LSR II áramlási citométerrel analizáltuk. A kapott eredményeket WinMDI program segítségével értékeltük ki.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Nyitrai, J., Nagy, J. Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezékτανához (A IUPAC Szerves Kémiai Nomenklaturabizottságának 1993-as ajánlása alapján). **1998**, Budapest. *Magyar Kémikusok Egyesülete*.
2. Jones, J. H. A short guide to abbreviations and their use in peptide science. *J Pept Sci*, **1999**. 5(11): p. 465-71.
3. Sylvius, F. d. L. B. Opera Medica. **1679**, Amsterdam. *Elzevier*.
4. Marten, B. New Theory of Consumptions: more especially of a phisthis or consumption of the lungs. **1720**, London. *T. Knaplock*.
5. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl Klin Wechnschr*, **1882**. 19: p. 221-230.
6. Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2008.393). **2008**.
7. Jónás, J., Barsiné Fodor, K., Kiss, P., Péterfiné Tüfgyei, M., Nyári, L. A pulmonológiai Intézmények 2004. évi epidemiológiai és működési adatai. **2005**, Budapest. *Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet*.
8. TB/HIV Fact Sheet. World Health Organization, forrás: http://www.who.int/tb/challenges/hiv/tbhiv_facts08_en.pdf. **2008**.
9. Jensen, K. A. Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentamen. *Zentralb. Bakteriol Parasitenkd infektionskr hyg Agt I Orig*, **1932**. 125: p. 222.
10. Löwenstein, E. Die Zachtung der Tuberkelbazillen aus dem stramenden Blute. *Zentralb. Bakteriol Parasitenkd infektionskr hyg Abt I orig*, **1931**. 120: p. 127.
11. Middlebrook, G., Cohn, M. L. Bacteriology of Tuberculosis: Laboratory Methods. *Am J Public Health Nations Health*, **1958**. 48: p. 844-853.
12. Sula, L. WHO cooperative studies on a simple culture techniques for the isolation of mycobacteria: 2. Comparison of the efficacy of lyophilized liquid medium with that of Lowenstein-Jensen (L-J) medium. *Bull World Health Organ*, **1963**. 29(5): p. 607-625.
13. Sula, L. WHO cooperative studies on a simple culture techniques for the isolation of mycobacteria: 1. preparation, lyophilization and reconstitution of a simple semi-synthetic concentrated liquid medium; culture technique, growth pattern of different mycobacteria. *Bull World Health Organ*, **1963**. 29(5): p. 589-606.
14. Chatterjee, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol*, **1997**. 1(4): p. 579-88.

15. Brennan, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, **2003**. 83(1-3): p. 91-7.
16. Brennan, P. J., Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, **1995**. 64: p. 29-63.
17. Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C., Schoolnik, G. K. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med*, **2003**. 198(5): p. 693-704.
18. Rosenkrands, I., Slayden, R. A., Crawford, J., Aagaard, C., Barry, C. E., 3rd, Andersen, P. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Bacteriol*, **2002**. 184(13): p. 3485-91.
19. Wayne, L. G., Hayes, L. G. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*, **1996**. 64(6): p. 2062-2069.
20. Falus, A. Az Immunológia élettani és molekuláris alapjai. **1998**, Budapest. *Semmelweis Kiadó*.
21. Sándor, M., Weinstock, J. V., Wynn, T. A. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends Immunol*, **2003**. 24(1): p. 44-52.
22. Co, D. O., Hogan, L. H., Kim, S. I., Sándor, M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol*, **2004**. 113(2): p. 130-136.
23. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **1998**. 393(6685): p. 537-544.
24. Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs Jr, W. R., Jr., Venter, J. C., Fraser, C. M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol*, **2002**. 184(19): p. 5479-5490.

25. Camus, J. C., Pryor, M. J., Medigue, C., Cole, S. T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, **2002**. 148(10): p. 2967-2973.
26. Pusztai, R., Mycobacteriaceae p. 175-182. Orvosi mikrobiológia, egyetemi tankönyv. Szerkesztette: Gergely Lajos. 2. átdolgozott kiadás. **2003**, Budapest. *Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány*.
27. Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., Hewinson, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(13): p. 7877-82.
28. Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Armdt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., Kaufmann, S. H. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*, **1999**. 33(6): p. 1103-17.
29. Mattow, J., Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Lamer, S., Zimny-Armdt, U., Hagens, K., Muller, E. C., Kaufmann, S. H. Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis*, **2001**. 22(14): p. 2936-46.
30. Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**. 102(35): p. 12344-9.
31. Toracchio, S., El-Zimaity, H. M., Urmacher, C., Katz, S., Graham, D. Y. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease granulomas. *Scand J Gastroenterol*, **2008**. 43(9): p. 1108-11.
32. Chamberlin, W., Graham, D. Y., Hulten, K., El-Zimaity, H. M., Schwartz, M. R., Naser, S., Shafran, I., El-Zaatari, F. A. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, **2001**. 15(3): p. 337-46.
33. Hermon-Taylor, J. The causation of Crohn's disease and treatment with antimicrobial drugs. *Ital J Gastroenterol Hepatol*, **1998**. 30(6): p. 607-10.
34. Thayer, W. R. The use of antimycobacterial agents in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*, **1992**. 15(1): p. 5-7.
35. Picardeau, M., Prod'Hom, G., Raskine, L., LePenec, M. P., Vincent, V. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*, **1997**. 35(1): p. 25-32.

36. Richter, E., Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Hoffner, S. Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol*, **1999**. 37(4): p. 964-70.
37. Huang, Z. H., Ross, B. C., Dwyer, B. Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, **1991**. 29(10): p. 2125-9.
38. Joynson, D. H. Water: the natural habitat of *Mycobacterium kansasii*? *Tubercle*, **1979**. 60(2): p. 77-81.
39. Stinear, T. P., Seemann, T., Harrison, P. F., Jenkin, G. A., Davies, J. K., Johnson, P. D., Abdellah, Z., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Goodhead, I., Holroyd, N., Jagels, K., Lord, A., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Walker, D., White, B., Whitehead, S., Small, P. L., Brosch, R., Ramakrishnan, L., Fischbach, M. A., Parkhill, J., Cole, S. T. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*, **2008**. 18(5): p. 729-41.
40. Etienne, G., Laval, F., Villeneuve, C., Dinadayala, P., Abouwarda, A., Zerbib, D., Galamba, A., Daffe, M. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology*, **2005**. 151(Pt 6): p. 2075-86.
41. Chaturvedi, V., Dwivedi, N., Tripathi, R. P., Sinha, S. Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Appl Microbiol*, **2007**. 53(6): p. 333-7.
42. Tuberkulózis - Diagnosztikus és terápiás protokoll. A Tüdőgyógyászati Szakmai Kollégium ajánlása. **2007**, Budapest. *Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet*.
43. A tuberkulózis mikrobiológiai diagnosztikájának standardjai. A Tüdőgyógyászati Szakmai Kollégium és az Orvosi Mikrobiológiai Szakmai Kollégium diagnosztikus irányelvei. Összeállította: Dr. Somoskövi Ákos, Dr. Szabó Nóra, Dr. Nagy Erzsébet. **2004**, Budapest. *Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet*.
44. Ellner, P. D., Kiehn, T. E., Cammarata, R., Hosmer, M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol*, **1988**. 26(7): p. 1349-52.
45. Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D., Bottger, E. C. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*, **1996**. 34(2): p. 296-303.
46. Pai, S., Esen, N., Pan, X., Musser, J. M. Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65). *Arch Pathol Lab Med*, **1997**. 121(8): p. 859-64.

47. Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., Bodmer, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, **1993**. 31(2): p. 175-8.
48. Taylor, T. B., Patterson, C., Hale, Y., Safranek, W. W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol*, **1997**. 35(1): p. 79-85.
49. Devallois, A., Goh, K. S., Rastogi, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, **1997**. 35(11): p. 2969-73.
50. Leite, C. Q., de Souza, C. W., Leite, S. R. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **1998**. 93(6): p. 801-5.
51. Butler, W. R., Guthertz, L. S. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species. *Clin Microbiol Rev*, **2001**. 14(4): p. 704-26, table of contents.
52. Bothamley, G. H., Rudd, R., Festenstein, F., Ivanyi, J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax*, **1992**. 47(4): p. 270-5.
53. Sada, E., Ferguson, L. E., Daniel, T. M. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, **1990**. 162(4): p. 928-31.
54. Hewitt, J., Coates, A. R., Mitchison, D. A., Ivanyi, J. The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. *J Immunol Methods*, **1982**. 55(2): p. 205-11.
55. Daniel, T. M., Anderson, P. A. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis*, **1978**. 117(3): p. 533-9.
56. Furcolow, M. L., Hewell, B., Nelson, W. E., Palmer, C. E. Quantitative Studies of the Tuberculin Reaction: I. Titration of Tuberculin Sensitivity and Its Relation to Tuberculous Infection. *Public Health Reports (1896-1970)*, **1941**. 56(21): p. 1082-1100.
57. Lyons, A. B. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*, **1999**. 77(6): p. 509-15.
58. Hasbold, J., Gett, A. V., Rush, J. S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J., Hodgkin, P. D. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*, **1999**. 77(6): p. 516-22.

59. Pai, M., Zwerling, A., Menzies, D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*, **2008**. 149(3): p. 177-84.
60. Raby, E., Moyo, M., Devendra, A., Banda, J., De Haas, P., Ayles, H., Godfrey-Faussett, P. The effects of HIV on the sensitivity of a whole blood IFN-gamma release assay in Zambian adults with active tuberculosis. *PLoS ONE*, **2008**. 3(6): p. e2489.
61. Luetkemeyer, A. F., Charlebois, E. D., Flores, L. L., Bangsberg, D. R., Deeks, S. G., Martin, J. N., Havlir, D. V. Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med*, **2007**. 175(7): p. 737-42.
62. Jones, S., de Gijzel, D., Wallach, F. R., Gurtman, A. C., Shi, Q., Sacks, H. Utility of QuantiFERON-TB Gold in-tube testing for latent TB infection in HIV-infected individuals. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2007**. 11(11): p. 1190-5.
63. Balcells, M. E., Perez, C. M., Chanqueo, L., Lasso, M., Villanueva, M., Espinoza, M., Villarroel, L., Garcia, P. A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis*, **2008**. 12(6): p. 645-52.
64. Kobashi, Y., Sugiu, T., Ohue, Y., Mouri, K., Obase, Y., Miyashita, N., Oka, M. Long-term follow-up of the QuantiFERON TB-2G test for active tuberculosis disease. *Intern Med*, **2008**. 47(22): p. 1957-61.
65. Chang, Z., Choudhary, A., Lathigra, R., Quiocho, F. A. The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem*, **1994**. 269(3): p. 1956-8.
66. Vyas, N. K., Vyas, M. N., Quiocho, F. A. Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure*, **2003**. 11(7): p. 765-74.
67. Harboe, M., Wiker, H. G. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis*, **1992**. 166(4): p. 874-84.
68. Vordermeier, H. M., Harris, D. P., Mehrotra, P. K., Roman, E., Elsaghier, A., Moreno, C., Ivanyi, J. *M. tuberculosis*-complex specific T-cell stimulation and DTH reactions induced with a peptide from the 38-kDa protein. *Scand J Immunol*, **1992**. 35(6): p. 711-8.
69. Vordermeier, H. M., Harris, D. P., Friscia, G., Roman, E., Surcel, H. M., Moreno, C., Pasvol, G., Ivanyi, J. T cell repertoire in tuberculosis: selective anergy to an immunodominant epitope of the 38-kDa antigen in patients with active disease. *Eur J Immunol*, **1992**. 22(10): p. 2631-7.

70. Vordemeier, H. M., Harris, D. P., Roman, E., Lathigra, R., Moreno, C., Ivanyi, J. Identification of T cell stimulatory peptides from the 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, **1991**. 147(3): p. 1023-9.
71. Andersen, A. B., Hansen, E. B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, **1989**. 57(8): p. 2481-8.
72. Maeji, N. J., Bray, A. M., Geysen, H. M. Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis. *J Immunol Methods*, **1990**. 134(1): p. 23-33.
73. Geysen, H. M., Meloen, R. H., Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1984**. 81(13): p. 3998-4002.
74. Bószé, S., Mező, G., Caccamo, N., Dieli, F., Andreu, D., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Hudecz, F. Synthesis and *in vitro* effect of peptide conjugates from 38 kDa protein of *M. tuberculosis* on T-cell proliferation and IFN-gamma production. Peptides 2004 - Proceedings of 3rd International and 28th European Peptide Symposium, ed. M. Flegel, Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J. **2004**. 1105-1106.
75. Verbon, A., Hartskeerl, R. A., Schuitema, A., Kolk, A. H., Young, D. B., Lathigra, R. The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. *J Bacteriol*, **1992**. 174(4): p. 1352-9.
76. Valdez, M. M., Clark, J. I., Wu, G. J., Muchowski, P. J. Functional similarities between the small heat shock proteins *Mycobacterium tuberculosis* HSP 16.3 and human alphaB-crystallin. *Eur J Biochem*, **2002**. 269(7): p. 1806-13.
77. Kennaway, C. K., Benesch, J. L., Gohlke, U., Wang, L., Robinson, C. V., Orlova, E. V., Saibil, H. R., Keep, N. H. Dodecameric structure of the small heat shock protein AcrI from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **2005**. 280(39): p. 33419-25.
78. Yuan, Y., Crane, D. D., Simpson, R. M., Zhu, Y. Q., Hickey, M. J., Sherman, D. R., Barry, C. E., 3rd. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**. 95(16): p. 9578-83.
79. Yuan, Y., Crane, D. D., Barry, C. E., 3rd. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*, **1996**. 178(15): p. 4484-92.
80. Cunningham, A. F., Spreadbury, C. L. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*, **1998**. 180(4): p. 801-8.

81. Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. F., Quioco, F. A. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*, **1996**. 271(12): p. 7218-23.
82. Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I., Schoolnik, G. K. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**. 98(13): p. 7534-9.
83. Jackett, P. S., Bothamley, G. H., Batra, H. V., Mistry, A., Young, D. B., Ivanyi, J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **1988**. 26(11): p. 2313-8.
84. Chandramuki, A., Bothamley, G. H., Brennan, P. J., Ivanyi, J. Levels of antibody to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*, **1989**. 27(5): p. 821-5.
85. Bothamley, G., Udani, P., Rudd, R., Festenstein, F., Ivanyi, J. Humoral response to defined epitopes of tubercle bacilli in adult pulmonary and child tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **1988**. 7(5): p. 639-45.
86. Kingston, A. E., Salgame, P. R., Mitchison, N. A., Colston, M. J. Immunological activity of a 14-kilodalton recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect Immun*, **1987**. 55(12): p. 3149-54.
87. Verbon, A., Hartskeerl, R. A., Moreno, C., Kolk, A. H. Characterization of B cell epitopes on the 16K antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*, **1992**. 89(3): p. 395-401.
88. Vordermeier, H. M., Harris, D. P., Lathigra, R., Roman, E., Moreno, C., Ivanyi, J. Recognition of peptide epitopes of the 16,000 MW antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by murine T cells. *Immunology*, **1993**. 80(1): p. 6-12.
89. Friscia, G., Vordermeier, H. M., Pasvol, G., Harris, D. P., Moreno, C., Ivanyi, J. Human T cell responses to peptide epitopes of the 16-kD antigen in tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, **1995**. 102(1): p. 53-7.
90. Caccamo, N., Meraviglia, C., La Mendola, C., Bösze, S., Hudecz, F., Ivanyi, J., Dieli, F., Salerno, A. Characterization of HLA-DR- and TCR-binding residues of an immunodominant and genetically permissive peptide of 16-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*, **2004**. 34(8): p. 2220-2229.
91. Caccamo, N., Barera, A., Di Sano, C., Meraviglia, S., Ivanyi, J., Hudecz, F., Bösze, S., Dieli, F., Salerno, A. Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4+ T clones specific for an immunodominant epitope of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein. *Clin Exp Immunol*, **2003**. 2: p. 260-266.

92. Bősze, S., Caccamo, N., Majer, Z., Mező, G., Dieli, F., Hudecz, F. In vitro T-Cell Immunogenicity of Oligopeptides Derived from the Region 92-110 of the 16 kDa Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biopolymers*, **2004**. 76: p. 467-476.
93. Bősze, S., Caccamo, N., Majer, Zs., Dieli, F., Mező, G., Hudecz, F. T cell immunogenicity of synthetic oligopeptides with 91-105 epitope core and Ala flanks of 16 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*, ed. M. Chorev and T.K. Sawyer. **2004**. *American Peptide Society*. 1001-1002.
94. Renshaw, P. S., Lightbody, K. L., Veverka, V., Muskett, F. W., Kelly, G., Frenkiel, T. A., Gordon, S. V., Hewinson, R. G., Burke, B., Norman, J., Williamson, R. A., Carr, M. D. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *Embo J*, **2005**. 24(14): p. 2491-8.
95. Harboe, M., Oettinger, T., Wiker, H. G., Rosenkrands, I., Andersen, P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*, **1996**. 64(1): p. 16-22.
96. Gordon, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S. T. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*, **1999**. 32(3): p. 643-55.
97. Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S., Small, P. M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, **1999**. 284(5419): p. 1520-3.
98. Brock, I., Weldingh, K., Lillebaek, T., Follmann, F., Andersen, P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*, **2004**. 170(1): p. 65-9.
99. Brock, I., Weldingh, K., Leyten, E. M., Arend, S. M., Ravn, P., Andersen, P. Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol*, **2004**. 42(6): p. 2379-87.
100. Aagaard, C., Brock, I., Olsen, A., Ottenhoff, T. H., Weldingh, K., Andersen, P. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis*, **2004**. 189(5): p. 812-9.
101. Roupie, V., Romano, M., Zhang, L., Korf, H., Lin, M. Y., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Klein, M. R., Huygen, K. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*, **2007**. 75(2): p. 941-9.
102. Leyten, E. M., Lin, M. Y., Franken, K. L., Friggen, A. H., Prins, C., van Meijgaarden, K. E., Voskuil, M. I., Weldingh, K., Andersen, P., Schoolnik, G. K., Arend, S. M.,

- Ottenhoff, T. H., Klein, M. R. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*, **2006**, 8(8): p. 2052-60.
103. Watts, C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol*, **2004**, 5(7): p. 685-92.
104. Watts, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, **1997**, 15: p. 821-50.
105. Monji, T., McCormack, A. L., Yates, J. R., 3rd, Pious, D. Invariant-cognate peptide exchange restores class II dimer stability in HLA-DM mutants. *J Immunol*, **1994**, 153(10): p. 4468-77.
106. Lanzavecchia, A., Watts, C. Peptide partners call the tune. *Nature*, **1994**, 371(6494): p. 198-9.
107. Ferrante, A., Anderson, M. W., Klug, C. S., Gorski, J. HLA-DM mediates epitope selection by a "compare-exchange" mechanism when a potential peptide pool is available. *PLoS ONE*, **2008**, 3(11): p. e3722.
108. Achour, A. Major Histocompatibility Complex: Interaction with Peptides. Encyclopedia of Life Sciences. **2001**. John Wiley & Sons, Ltd.
109. Shams, H., Klucar, P., Weis, S. E., Lalvani, A., Moonan, P. K., Safi, H., Wizel, B., Ewer, K., Nepom, G. T., Lewinsohn, D. M., Andersen, P., Barnes, P. F. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of multiple HLA alleles. *J Immunol*, **2004**, 173(3): p. 1966-77.
110. Singh, H., Raghava, G. P. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*, **2001**, 17(12): p. 1236-7.
111. Wilkinson, K. A., Vordermeier, M. H., Kajtar, J., Jurcevic, S., Wilkinson, R., Ivanyi, J., Hudecz, F. Modulation of peptide specific T cell responses by non-native flanking regions. *Mol Immunol*, **1997**, 34(18): p. 1237-46.
112. Hudecz, F. Manipulation of epitope function by modification of peptide structure: a minireview. *Biologicals*, **2001**, 29(3-4): p. 197-207.
113. Manea, M., Kalászi, A., Mezô, G., Horváti, K., Bodor, A., Horváth, A., Farkas, Ö., Perczel, A., Przybylski, M., Hudecz, F. Antibody recognition and conformational flexibility of a plaque-specific beta-amyloid epitope modulated by non-native peptide flanking regions. *J Med Chem*, **2008**, 51(5): p. 1150-61.
114. Wilkinson, K. A., Hudecz, F., Vordermeier, H. M., Ivanyi, J., Wilkinson, R. J. Enhancement of the T cell response to a mycobacterial peptide by conjugation to synthetic branched polypeptide. *Eur J Immunol*, **1999**, 29(9): p. 2788-96.

115. Mező, G., Hudecz, F., Kajtár, J., Szókán, G., Szekerke, M. The influence of the side-chain sequence on the structure-activity correlations of immunomodulatory branched polypeptides. Synthesis and conformational analysis of new model polypeptides. *Biopolymers*, **1989**. 28(10): p. 1801-26.
116. Hudecz, F., Szekerke, M. Synthesis of new branched polypeptides with polylysine backbone. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1985**. 50: p. 103-113.
117. Hudecz, F., Szekerke, M. Investigation of drug-protein interactions and the drug-carrier concept by the use of branched polypeptides as model systems. Synthesis and characterisation of model peptides. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1980**. 45: p. 933-940.
118. Hudecz, F. Design of synthetic branched-chain polypeptides as carriers for bioactive molecules. *Anticancer Drugs*, **1995**. 6(2): p. 171-93.
119. Mező, G., Reményi, J., Kajtar, J., Barna, K., Gaal, D., Hudecz, F. Synthesis and conformational studies of poly(L-lysine) based branched polypeptides with Ser and Glu/Leu in the side chains. *J Control Release*, **2000**. 63(1-2): p. 81-95.
120. Mező, G., Kajtár, J., Nagy, I., Szekerke, M., Hudecz, F. Carrier design: synthesis and conformational studies of poly(L-lysine) based ranhed polypeptides with hydroxyl group in the side chain. *Biopolymers*, **1997**. 42: p. 719-730.
121. Mező, G., Kajtár, J., Hudecz, F., Szekerke, M. Carrier design: conformational studies of amino acid (X) and oligopeptide (X-DL-Alam) substituted poly (L-lysine). *Biopolymers*, **1993**. 33(6): p. 873-85.
122. Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**. 85(15): p. 5409-13.
123. Shao, J., Tam, J. P. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *Journal of American Chemical Society*, **1995**. 117(14): p. 3893-3899.
124. Francis, M. J., Hastings, G. Z., Brown, F., McDermed, J., Lu, Y. A., Tam, J. P. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, **1991**. 73(3): p. 249-54.
125. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Orlewski, P., Marraud, M., Cung, M. T., Vatzaki, E., Tzartos, S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOCn) for multiple anchoring of antigenic peptides--application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Int J Biol Macromol*, **1996**. 19(3): p. 195-205.
126. Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Cung, M. T., Marraud, M., Konidou, G., Tzinia, A., Soteriadou, K. P. Use of sequential oligopeptide carriers (SOCn) in the design of potent Leishmania gp63 immunogenic peptides. *Pept Res*, **1996**. 9(5): p. 240-7.

127. Nishioka, K., Constantopoulos, A., Satoh, P. S., Najjar, V. A. The characteristics, isolation and synthesis of the phagocytosis stimulating peptide tuftsin. *Biochem Biophys Res Commun*, **1972**. 47(1): p. 172-9.
128. Nishioka, K., Constantopoulos, A., Sato, P. S., Mitchell, W. M., Najjar, V. A. Characteristics and isolation of the phagocytosis-stimulating peptide, tuftsin. *Biochim Biophys Acta*, **1973**. 310(1): p. 217-29.
129. Najjar, V. A., Nishioka, K. "Tuftsin": a natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature*, **1970**. 228(5272): p. 672-3.
130. Najjar, V. A., Constantopoulos, A. A new phagocytosis-stimulating tetrapeptide hormone, tuftsin, and its role in disease. *J Reticuloendothel Soc*, **1972**. 12(2): p. 197-215.
131. Najjar, V. A. Tuftsin, a natural activator of phagocyte cells: an overview. *Ann N Y Acad Sci*, **1983**. 419: p. 1-11.
132. Najjar, V. A. Biological and biochemical characteristics of the tetrapeptide tuftsin, Thr-Lys-Pro-Arg. *Adv Exp Med Biol*, **1979**. 121(A): p. 131-47.
133. Mező, G., Kalászi, A., Reményi, J., Majer, Z., Hilbert, A., Láng, O., Köhidai, L., Barna, K., Gaál, D., Hudecz, F. Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers*, **2004**. 73(6): p. 645-56.
134. Mező, G., Kalászi, A., J., R., Mihala, N., Majer, Z., Hilbert, Á., Láng, O., Köhidai, L., Barna, K., Gaál, D. Synthesis of new carrier molecules based on repeated tuftsin sequences. *Peptides 2000*, **2000**.
135. Mező, G., de Oliveira, E., Krikorian, D., Fejlbrieff, M., Jakab, A., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Welling-Wester, S., Andreu, D., Hudecz, F. Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjug Chem*, **2003**. 14(6): p. 1260-9.
136. Manea, M., Hudecz, F., Przybylski, M., Mező, G. Synthesis, solution conformation, and antibody recognition of oligotuftsin-based conjugates containing a beta-amyloid(4-10) plaque-specific epitope. *Bioconjug Chem*, **2005**. 16(4): p. 921-8.
137. Manea, M., Przybylski, M., Hudecz, F., Mező, G. Design, structural, and immunological properties of antigenic bioconjugates comprising a beta-amyloid-plaque specific epitope. *Biopolymers*, **2008**. 90(2): p. 94-104.
138. Mező, G., Manea, M., Jakab, A., Kapuvári, B., Bösze, S., Schlosser, G., Przybylski, M., Hudecz, F. Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches. *J Pept Sci*, **2004**. 10(12): p. 701-13.
139. Steenken, W. J., Wolinsky, E. Isoniazid in experimental tuberculosis. *Trans Annu Meet Natl Tuberc Assoc*, **1952**. 48: p. 425-430.

140. Newman, R., Doster, B., Murray, F. J., Ferebee, S. Rifampin in initial treatment of pulmonary tuberculosis. A U.S. Public Health Service tuberculosis therapy trial. *Am Rev Respir Dis*, **1971**. 103(4): p. 461-476.
141. Snider, D. E., Jr., Cohn, D. L., Davidson, P. T., Hershfield, E. S., Smith, M. H., Sutton, F. D., Jr. Standard therapy for tuberculosis 1985. *Chest*, **1985**. 87(2 Suppl): p. 117S-124S.
142. The Stop TB Strategy: Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goal. World Health Organization, 2006 (WHO/HTM/TB/2006.368).
143. Chan, E. D., Iseman, M. D. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr Opin Infect Dis*, **2008**. 21(6): p. 587-95.
144. Matteelli, A., Migliori, G. B., Cirillo, D., Centis, R., Girard, E., Raviglioni, M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2007**. 5(5): p. 857-71.
145. Irwin, J. J., Shoichet, B. K. ZINC-a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, **2005**. 45(1): p. 177-82.
146. Ádám, É., D. Tóth, F., Emödy, L., Gergely, L., Gönczöl, É., Nagy, E., Pál, T., Pusztai, R., Rozsgonyi, F., Szabó, B. Orvosi mikrobiológia. **2003**, Budapest. *Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány*.
147. Heym, B., Zhang, Y., Poulet, S., Young, D., Cole, S. T. Characterization of the katG gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol*, **1993**. 175(13): p. 4255-9.
148. Bodiguel, J., Nagy, J. M., Brown, K. A., Jamart-Gregoire, B. Oxidation of isoniazid by manganese and Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase yields a new mechanism of activation. *J Am Chem Soc*, **2001**. 123(16): p. 3832-3.
149. Slayden, R. A., Lee, R. E., Barry, C. E., 3rd. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*, **2000**. 38(3): p. 514-25.
150. Slayden, R. A., Barry, C. E., 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect*, **2000**. 2(6): p. 659-69.
151. Sandy, J., Holton, S., Fullam, E., Sim, E., Noble, M. Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from Mycobacterium smegmatis. *Protein Sci*, **2005**. 14(3): p. 775-82.
152. Bardou, F., Raynaud, C., Ramos, C., Laneelle, M. A., Laneelle, G. Mechanism of isoniazid uptake in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology*, **1998**. 144 (Pt 9): p. 2539-44.

153. Zhang, Y., Young, D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, **1994**. 34(3): p. 313-9.
154. Mackaness, G. B. The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamide. *Am Rev Tuberc*, **1956**. 74(5): p. 718-28.
155. Konno, K., Feldmann, F. M., McDermott, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis*, **1967**. 95(3): p. 461-9.
156. Scorpio, A., Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*, **1996**. 2(6): p. 662-7.
157. Sun, Z., Scorpio, A., Zhang, Y. The *pncA* gene from naturally pyrazinamide-resistant *Mycobacterium avium* encodes pyrazinamidase and confers pyrazinamide susceptibility to resistant *M. tuberculosis* complex organisms. *Microbiology*, **1997**. 143 (Pt 10): p. 3367-73.
158. Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Kreiswirth, B. N., Musser, J. M. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(3): p. 636-40.
159. Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M., Zhang, Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(3): p. 540-3.
160. Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., Sun, Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*, **1999**. 181(7): p. 2044-9.
161. Zhang, Y., Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2003**. 7(1): p. 6-21.
162. McDermott, W., Tompsett, R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. *Am Rev Tuberc*, **1954**. 70(4): p. 748-54.
163. Stottmeier, K. D., Beam, R. E., Kubica, G. P. Determination of drug susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide in 7H10 agar. *Am Rev Respir Dis*, **1967**. 96(5): p. 1072-5.
164. Crowle, A. J., Sbarbaro, J. A., May, M. H. Inhibition by pyrazinamide of tubercle bacilli within cultured human macrophages. *Am Rev Respir Dis*, **1986**. 134(5): p. 1052-5.
165. Bernheim, F. The Effect of Salicylate on the Oxygen Uptake of the Tubercle Bacillus. *Science*, **1940**. 92: p. 204.
166. Zhang, Z. D., Zhao, Y. L., Li, Z. H., Jia, H. Y., Liu, Y. H., Chen, X., Liu, Z. Q., Du, B. P., Xing, A. Y., Ma, Y. Mutations in the thymidylate synthase gene is a major

- mechanism in the para-aminosalicylic acid resistance of *M. tuberculosis*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, **2007**. 30(9): p. 683-5.
167. Rengarajan, J., Sasseti, C. M., Naroditskaya, V., Sloutsky, A., Bloom, B. R., Rubin, E. J. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol*, **2004**. 53(1): p. 275-82.
168. Peloquin, C. A., Henshaw, T. L., Huitt, G. A., Berning, S. E., Nitta, A. T., James, G. T. Pharmacokinetic evaluation of para-aminosalicylic acid granules. *Pharmacotherapy*, **1994**. 14(1): p. 40-6.
169. Dye, C., Williams, B. G., Espinal, M. A., Raviglione, M. C. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science*, **2002**. 295(5562): p. 2042-6.
170. Dye, C., Espinal, M. A., Watt, C. J., Mbiaga, C., Williams, B. G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*, **2002**. 185(8): p. 1197-202.
171. Barrow, E. L., Winchester, G. A., Staas, J. K., Quenelle, D. C., Barrow, W. W. Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**. 42(10): p. 2682-9.
172. Vladimirsky, M. A., Ladigina, G. A. Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed Pharmacother*, **1982**. 36(8-9): p. 375-7.
173. Cynamon, M. H., Swenson, C. E., Palmer, G. S., Ginsberg, R. S. Liposome-encapsulated-amikacin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **1989**. 33(8): p. 1179-83.
174. Nightingale, S. D., Saletan, S. L., Swenson, C. E., Lawrence, A. J., Watson, D. A., Pilkiewicz, F. G., Silverman, E. G., Cal, S. X. Liposome-encapsulated gentamicin treatment of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrob Agents Chemother*, **1993**. 37(9): p. 1869-72.
175. Saito, H., Tomioka, H. Therapeutic efficacy of liposome-entrapped rifampin against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **1989**. 33(4): p. 429-33.
176. Kawashima, Y., Serigano, T., Hino, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H. Surface-modified antiasthmatic dry powder aerosols inhaled intratracheally reduce the pharmacologically effective dose. *Pharm Res*, **1998**. 15(11): p. 1753-9.
177. Sharma, R., Saxena, D., Dwivedi, A. K., Misra, A. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm Res*, **2001**. 18(10): p. 1405-10.

178. Deol, P., Khuller, G. K., Joshi, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **1997**. 41(6): p. 1211-4.
179. Deol, P., Khuller, G. K. Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. *Biochim Biophys Acta*, **1997**. 1334(2-3): p. 161-72.
180. Szabó, R., Peiser, L., Pluddemann, A., Bösze, S., Heinsbroek, S., Gordon, S., Hudecz, F. Uptake of branched polypeptides with poly[L-lys] backbone by bone-marrow culture-derived murine macrophages: the role of the class a scavenger receptor. *Bioconjug Chem*, **2005**. 16(6): p. 1442-50.
181. Kóczan, G., Ghose, A. C., Mookerjee, A., Hudecz, F. Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection in vitro and in experimental animals. *Bioconjug Chem*, **2002**. 13(3): p. 518-24.
182. Majumdar, S., Basu, S. K. Receptor-mediated delivery of *p*-aminosalicylic acid to maleylated serum albumin against *Mycobacterium tuberculosis* infection in guinea pigs. *Drug Delivery*, **1995**. 2: p. 144-149.
183. Majumdar, S., Basu, S. K. Killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by receptor-mediated drug delivery. *Antimicrob Agents Chemother*, **1991**. 35(1): p. 135-40.
184. Gottlieb, P., Hazum, E., Tzehoval, E., Feldman, M., Segal, S., Fridkin, M. Receptor-mediated endocytosis of tuftsin by macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **1984**. 119(1): p. 203-11.
185. Mező, G., Mező, I., Pimm, M. V., Kajtár, J., Seprődi, J., Teplan, I., Kovács, M., Vincze, B., Palyi, I., Idei, M., Szekerke, M., Hudecz, F. Synthesis, conformation, biodistribution, and hormone-related in vitro antitumor activity of a gonadotropin-releasing hormone antagonist-branched polypeptide conjugate. *Bioconjug Chem*, **1996**. 7(6): p. 642-50.
186. Bai, K. B., Láng, O., Orbán, E., Szabó, R., Kóhidai, L., Hudecz, F., Mező, G. Design, synthesis, and *in vitro* activity of novel drug delivery systems containing tuftsin derivatives and methotrexate. *Bioconjug Chem*, **2008**.
187. Dutta, T., Garg, M., Jain, N. K. Targeting of efavirenz loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages in vitro. *Eur J Pharm Sci*, **2008**. 34(2-3): p. 181-9.
188. Soyez, H., Schacht, E., Vanderkerken, S. The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1996**. 21: p. 81-106.
189. Omelyanenko, V., Gentry, C., Kopeckova, P., Kopecek, J. HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro. *Int J Cancer*, **1998**. 75(4): p. 600-8.

190. Mező, G., Láng, O., Jakab, A., Bai, K. B., Szabó, I., Schlosser, G., Lang, J., Kőhidai, L., Hudecz, F. Synthesis of oligotuftsin-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting. *J Pept Sci*, **2006**. 12(5): p. 328-36.
191. Etrych, T., Jelinkova, M., Rihova, B., Ulbrich, K. New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties. *J Control Release*, **2001**. 73(1): p. 89-102.
192. Shen, W. C., Ryser, H. J. cis-Aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem Biophys Res Commun*, **1981**. 102(3): p. 1048-54.
193. Reményi, J., Balázs, B., Tóth, S., Falus, A., Tóth, G., Hudecz, F. Isomer-dependent daunomycin release and in vitro antitumour effect of cis-aconityl-daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**. 303(2): p. 556-61.
194. Lee, B. Y., Hefta, S. A., Brennan, P. J. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, **1992**. 60(5): p. 2066-74.
195. Caccamo, N., Milano, S., Di Sano, C., Cigna, D., Ivanyi, J., Krensky, A. M., Dieli, F., Salerno, A. Identification of epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein recognized by human leukocyte antigen-A*0201 CD8(+) T lymphocytes. *J Infect Dis*, **2002**. 186(7): p. 991-8.
196. Schöniger, W. Eine mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogen in organischen Substanzen. *Mikrochimica Acta*, **1954**. 1: p. 123-129.
197. Horváti, K., Bősze, S., Mező, G., Caccamo, N., Dieli, F., Hudecz, F. Synthesis and in vitro effect of peptides and peptide-conjugates from 16 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* on IFN- γ production. *J. Peptide Sci.*, **2006**. 12S: p. 230.
198. Antas, P. R., Oliveira, E. B., Milagres, A. S., Franken, K. C., Ottenhoff, T. H., Klatser, P., Sarno, E. N., Sampaio, E. P. Kinetics of T cell-activation molecules in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2002**. 97(8): p. 1097-9.
199. Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A., Turano, A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*, **1997**. 27(1): p. 71-6.
200. Ribeiro-Rodrigues, R., Resende Co, T., Rojas, R., Toossi, Z., Dietze, R., Boom, W. H., Maciel, E., Hirsch, C. S. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, **2006**. 144(1): p. 25-34.
201. Horváti, K., Bősze, S., Hudecz, F., Medzihradsky-Schweiger, H. A simple method for monitoring the cysteine content in synthetic peptides. *J Peptide Sci*, **2008**. 14(7): p. 838-44.

202. Horváti, K., Mező, G., Szabó, N., Hudecz, F., Bősze, S. Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid - design, synthesis and antimycobacterial effect. *J. Peptide Sci. közlésre elfogadva*, **2009**.
203. Horváti, K., Bősze, S., Szabó, N., Kiss, É., Hill, K., Mező, G., Hudecz, F. Peptide conjugates of antitubercotic drugs. Peptide Science 2006, Proceedings of the International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting, , ed. H. Ishida and H. Mihara. **2006**, Yokohama. *The Japanese Peptide Society*. 271-272.
204. Sasseti, C. M., Boyd, D. H., Rubin, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*, **2003**. 48(1): p. 77-84.
205. Mizrahi, V., Andersen, S. J. DNA repair in Mycobacterium tuberculosis. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol*, **1998**. 29(6): p. 1331-9.
206. Kuper, J., Doenges, C., Wilmanns, M. Two-fold repeated (betaalpha)₄ half-barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity. *EMBO Rep*, **2005**. 6(2): p. 134-9.
207. Barona-Gomez, F., Hodgson, D. A. Occurrence of a putative ancient-like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis. *EMBO Rep*, **2003**. 4(3): p. 296-300.
208. Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R., Wilmanns, M. Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science*, **2000**. 289(5484): p. 1546-50.
209. Lin, T. W., Melgar, M. M., Kurth, D., Swamidass, S. J., Purdon, J., Tseng, T., Gago, G., Baldi, P., Gramajo, H., Tsai, S. C. Structure-based inhibitor design of AccD5, an essential acyl-CoA carboxylase carboxyltransferase domain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006**. 103(9): p. 3072-7.
210. Holton, S. J., King-Scott, S., Nasser Eddine, A., Kaufmann, S. H., Wilmanns, M. Structural diversity in the six-fold redundant set of acyl-CoA carboxyltransferases in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett*, **2006**. 580(30): p. 6898-902.
211. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*, **1970**. 34: p. 595-598.
212. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Olser, D. B. Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Chem Acta*, **1980**. 118: p. 149-151.
213. Jurcevic, S., Hills, A., Pasvol, G., Davidson, R. N., Ivanyi, J., Wilkinson, R. J. T cell responses to a mixture of *Mycobacterium tuberculosis* peptides with complementary HLA-DR binding profiles. *Clin Exp Immunol*, **1996**. 105(3): p. 416-21.

214. Peiser, L., Gough, P. J., Kodama, T., Gordon, S. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun*, **2000**. 68(4): p. 1953-63.
215. Hume, D. A., Gordon, S. Optimal conditions for proliferation of bone marrow-derived mouse macrophages in culture: the roles of CSF-1, serum, Ca²⁺, and adherence. *J Cell Physiol*, **1983**. 117(2): p. 189-94.
216. Lin, H. S., Gordon, S. Secretion of plasminogen activator by bone marrow-derived mononuclear phagocytes and its enhancement by colony-stimulating factor. *J Exp Med*, **1979**. 150(2): p. 231-45.
217. Knowles, B., Aden, D. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. *USA patent 4,393,133*, **1983**.
218. Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, **1980**. 209(4455): p. 497-9.
219. Haas, J. G., Thiel, C., Blomer, K., Weiss, E. H., Riethmuller, G., Ziegler-Heitbrock, H. W. Downregulation of tumor necrosis factor expression in the human Mono-Mac-6 cell line by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, **1989**. 46(1): p. 11-4.
220. Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, **1988**. 41(3): p. 456-61.
221. Steube, K. G., Teepe, D., Meyer, C., Zaborski, M., Drexler, H. G. A model system in haematology and immunology: the human monocytic cell line MONO-MAC-1. *Leuk Res*, **1997**. 21(4): p. 327-35.
222. McFarland, J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, **1907**. 14: p. 1176-1178.
223. Lányi, B. Folyékony mycobacterium tenyésztésre alkalmas standard táptalaj. Módszertani Útmutató. **1980**, Budapest. *Járványügyi és Klinikai Bakteriológia*.
224. Gerlier, D., Thomasset, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*, **1986**. 94(1-2): p. 57-63.
225. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **1983**. 65(1-2): p. 55-63.
226. Slater, T. F., Sawyer, B., Strauli, U. Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta*, **1963**. 77: p. 383-93.

Összefoglalás

Doktori munkám során *Mycobacterium tuberculosis* immundomináns fehérjét reprezentáló peptidantigénekkal foglalkoztam, melyek immundiagnosztikai reagensként potenciálisan a fertőzöttség korai detektálását tennék lehetővé. A 16kDa fehérje funkcionális T-sejt epitópjának származékait állítottam elő. PPD pozitív donorok esetében a peptidszármazékok nagyobb T-sejt választ indukáltak. Megállapítottam, hogy az antituberkulotikus kezelés hatására csökken az IFN- γ termelés mértéke. A ⁹¹SEFAYGSFVRTVSLPV¹⁰⁶-C peptidet OT20 oligotuftsin származékhoz és SAK, EAK polimerekhez konjugáltam tioéterként keresztül. A konjugálás többszörösére növelte a 91-106 peptid által kiváltott IFN- γ termelést. Az Rv2654 (Tb7.7) fehérje antigénszerkezetének felderítését átlapoló dodekamer peptid segítségével végeztem. A fehérjén belül három T-sejt epitóp régiót lokalizáltam ELISpot módszerrel PPD pozitív látens fertőzöttek és aktív tbc-s betegek PBMC sejtjein. Az Rv2654 fehérje C-terminális régiója (61-81) a tbc-s betegek 60%-ánál indukált specifikus immunválaszt. Az N-terminális, a 31-50 és a C-terminális régiókn belül további peptideket szintetizáltam. Megállapítottam, hogy a legnagyobb, az ESAT6/CFP10 fehérjekeverékkel közel azonos mértékű, T-sejt választ az 51-65 peptid váltja ki. A dormans állapotú baktérium által expresszált Rv1733c fehérje építőszerkezetének felderítésére húsz átlapoló dodekamer peptidet állítottam elő. Az *in vitro* tesztek alapján lokalizált két régió (91-130 és 191-210) belül további peptideket szintetizáltam. A legnagyobb mértékű T-sejt választ a 91-105, 111-125 és 193-210(Ser) peptidek esetében detektáltam.

Peptidek cisztein tartalmának kvantitatív meghatározására alkalmas új analitikai módszert dolgoztam ki N-etilmaleimid reagens alkalmazásával. Az eljárás a tioéter kötésen keresztül történő konjugálási reakció követésére is alkalmas.

INH, PAS és PZA antituberkulotikumok molekulárisan jellemezett peptidalapú konjugátumait állítottam elő. Megállapítottam, hogy az INH konjugátumok mindegyike a szabad izoniaziddal közel azonos hatást mutat. A karboxilcsoporton történő konjugálás hatására a PAS elveszti *in vitro* antituberkulotikus hatását.

Az általam vizsgált harminchét *in silico* azonosított vegyület közül tizenöt mutatott antituberkulotikus hatást. A legkisebb MIC értékkel rendelkező vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatását határoztam meg. Fluoreszcens sajátosságú DUT44 molekula esetében koncentráció függő sejtfelvételt tapasztaltam MonoMac6 sejtvonalon. A DUT44 és a DUT69 molekula származékait oligopeptid hordozóhoz konjugáltam. A konjugálás hatására a vegyületek megőrizték antituberkulotikus hatásukat.

Summary

Peptide antigens representing immunodominant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* can be considered as potential diagnostics. Derivatives of the functional T-cell epitope of 16kDa protein were synthesized and characterized. The *in vitro* functional activity of these peptides was higher in the case of PPD positive donors. The amount of the released IFN- γ decreased under the antituberculous treatment. Peptide ⁹¹SEFAYGSFVRTVSLPV¹⁰⁶-C was conjugated to OT20 oligotufsin derivatives and SAK, EAK polymers *via* thioether bond formation. The conjugation dramatically increased the T-cell response of the 91-106 peptide. Epitope mapping of Rv2654 (Tb7.7) protein was carried out using 20-mer overlapping synthetic peptides. Three epitope regions were determined using ELISpot method on PBMC of PPD positive latently infected individuals and active TB patients. Based on these results shorter peptides were synthesized according to *N*-terminal, 31-50 and *C*-terminal epitope regions. Peptide 51-65 provoked the highest T-cell response which was comparable to ESAT6/CFP10 protein mixture. The Rv1733c protein is expressed by dormant *M. tuberculosis*. The epitope mapping of the protein was carried out using twenty 20-mer overlapping peptides. Corresponding to the *in vitro* activity shorter peptides of 91-130 and 191-210 regions were synthesized. Peptide 91-105, 111-125 and 193-210(Ser) provoked the highest IFN- γ release.

New method for the quantitative determination of the cysteine content of synthetic peptides was described using *N*-ethylmaleimide reagent. The method is also useful to follow the conjugation reaction.

Well characterized peptide conjugates of recently used isoniazid (INH), *p*-aminosalicylic acid (PAS), pyrazinamide (PZA) antituberculars were prepared. All of the INH-conjugates were effective against *M. tuberculosis* and the MIC values were comparable to the free INH moiety. In contrast PAS, which was coupled on its carboxylic group, lost the antitubercular activity after conjugation.

Antitubercular activity of 37 *in silico* identified drug candidates was determined on *M. tuberculosis* and 15 molecules had a relevant inhibition. Cytotoxicity and the cytostatic effect of the compounds were evaluated. The cellular uptake of fluorescent DUT44 molecule showed concentration dependence on MonoMac6 cell line. Derivatives of DUT44 and DUT69 compounds were coupled to oligopeptide carriers. The antitubercular activity of the conjugates was comparable to the free molecules.

A témában megjelent tudományos közlemények:

K. Horváti, Sz. Bősze, F. Hudecz, H. Medzihradsky-Schweiger: Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid - design, synthesis and antimycobacterial effect. *J. Peptide Sci.* (2009) *közlésre elfogadva*

K. Horváti, Sz. Bősze, F. Hudecz, H. Medzihradsky-Schweiger: A simple method for monitoring the cysteine content in synthetic peptides. *J. Peptide Sci.* 14(7):838-44 (2008).

***K. Horváti**, G. Mező, N. Szabó, V. Grolmusz, F. Hudecz, Sz. Bősze: Peptide conjugates of new *in silico* identified drug candidates and first/second line antituberculars - design, synthesis and antimycobacterial effect. *J. Peptide Sci.* 14S:161 (2008).

***K. Horváti**, Sz. Bősze, N. Szabó, É. Kiss, K. Hill, G. Mező, F. Hudecz: Peptide conjugates of antitubercular drugs, *Peptide Science 2006*. pp 271-272.

***K. Horváti**, Sz. Bősze, G. Mező, N. Caccamo, F. Dieli and F. Hudecz: Synthesis and *in vitro* effect of peptides and peptide-conjugates from 16 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* on IFN- γ production. *J. Peptide Sci.* 12S:230 (2006). *Peptides 2006*. pp 608-609.

**Folyóiratban megjelent előadáskivonatok*

A témában bemutatott poszterek, előadások:

K. Horváti, G. Mező, N. Szabó, F. Hudecz, Sz. Bősze: Isoniazid and *p*-aminosalicylic acid - peptide conjugates: synthesis and antimycobacterial evaluation. *9th International Symposium on Solid Phase Synthesis, Norwich, England, 2007 (előadás) I. díj a Young Investigator Mini Symposium-on.*

F. Hudecz, Zs. Miklán, Z. Bánóczy, E. Orbán, Sz. Bősze, **K. Horváti**, G. Mező. Synthesis and biomedical application of peptide based bioconjugates. *1st Hungarian-Singaporean Workshop on Drug Discovery and Biomaterials, Budapest, 2008.*

F. Hudecz, Zs. Miklán, Z. Bánóczy, E. Orbán, Sz. Bősze, **K. Horváti**, G. Mező. Synthesis and application for targeting of peptide bioconjugates. *Cell-penetrating peptides. Satellite Symposium. 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finnország, 2008.*

K. Horváti, Sz. Bősze, S. Egerszegi, G. Mező, N. Caccamo, F. Dieli and F. Hudecz: *In vitro* effect of CD4⁺ and CD8⁺ epitope peptides and derivatives corresponding to the of 16kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* on PBMC. *Alexander von Humbolt Workshop, Mátraháza, 2007.*

K. Horváti, N. Szabó, V. Grolmusz, É. Kiss, F. Hudecz, B. Vértessy, Sz. Bősze: *In vitro* antitubercular effect of INH-conjugates and *in silico* identified drug candidates. *Alexander von Humbolt Workshop on Structure Based Approaches Towards Disease Control, Mátraháza, 2007.*

K. Hill, Sz. Bősze, **K. Horváti**, F. Hudecz, Cs. Péntzes, G. Szabó and É. Kiss: Interaction of membrane lipid and antibacterial peptide conjugates in Langmuir layers. *ESF-EMBO Symposium „Biological Surfaces and Interfaces”, Sant Feliu de Guixols, Spanyolország, 2007.*

K. Hill, Sz. Bősze, **K. Horváti**, F. Hudecz and É. Kiss: Molecular Interaction between lung surfactant and antibacterial peptide conjugates related to enhanced drug transport. *6th Annual Surface and Colloid Symposium, Lipid-Peptide Interactions and Biological Function, Lund, Norvégia, 2006.*

K. Horváti, Sz. Bősze and H. Medzihradzky-Schweiger: A selective and simple determination of cysteine content in different peptides and peptide derivatives. *1st European Chemistry Congress, Budapest, 2006.*

Egyéb közlemények:

Á. Balogh, **K. Horváti**, G. Mező, L. Derzbach, B. Szebeni, L. Nagy, J. Prechl, B. Vásárhelyi, F. Hudecz, Sz. Bősze: Synthesis of hepcidin derivatives in order to develop standards for immune adsorption method. *J. Peptide Sci.* (2009) DOI 10.1002/psc.1113

B. Bacsa, **K. Horváti**, Sz. Bősze, F. Andreae, C. O. Kappe: Solid-phase synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: a critical comparison of microwave and conventional heating technologies. *J. Org. Chem.* 73(19):7532-42 (2008) [IF: 3,790]

M. Manea, A. Kalászi, G. Mező, **K. Horváti**, A. Bodor, A. Horváth, Ö. Farkas, A. Perczel, M. Przybylski, F. Hudecz: Antibody Recognition and Conformational Flexibility of a Plaque-Specific beta-Amyloid Epitope Modulated by Non-native Peptide Flanking Regions. *J. Med. Chem.* 51(5):1150-61 (2008).

*B. Bacsa, **K. Horváti**, Sz. Bősze, F. Andreae, C. O. Kappe: Solid-Phase Peptide Synthesis at Elevated Temperatures - A Comparison of Conventional and Microwave Heating Technology. *J. Peptide Sci.*, 14S, 73. (2008).

***K. Horváti**, M. Manea, Sz. Bősze, G. Mező, M. Przybylski, F. Hudecz: Influence of flanking and cyclisation of a β -amyloid peptide derived B-cell epitope on the antibody recognition and enzymatic stability. *FEBS Journal* 272:534 (2005).

*M. Manea, **K. Horváti**, G. Mező, R. Cecal, X. Tian, R. Stefanescu, F. Hudecz, M. Przybylski: Synthesis, antibody recognition and enzymatic stability of linear, cyclic and branched polypeptides containing a β -amyloid plaque specific epitope, *J. Peptide Sci.* 10S:291 (2004).

*Folyóiratban megjelent előadáskivonatok