

T 046468 IB2 számú, „Gliko-immunológiai vizsgálatok autoimmun folyamatok kialakulásának felderítésére” OTKA pályázat szakmai záróbeszámolója

1. Szénhidrát specifikus antitestek vizsgálata

(B György, L Tóthfalusi, G Nagy, M Pásztói, M Mazán, Z Lőrinc, A Polgár, B Rojkovich, I Ujjalussy, G Poór, P Géher, P Pócza, Z Wiener, A Falus, E I Buzás Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. Közlésre beküldve)

Bár a keringő ellenanyagok túlnyomó része természetes autoantitest, mely a mind szélesebb körben terápiásan alkalmazott IVIG (intravénás immunglobulin) készítményekben is megtalálható, a természetes autoantitesteket napjainkban kevés figyelem kíséri, és funkciójuk sem tisztázott teljes mértékben. Jelen szénhidrát-ellenes autoantitestekre irányuló vizsgálatainkat az inspirálta, hogy a posztranszlációs fehérjemódosítások jelentősége mindinkább egyértelművé válik, illetőleg, hogy a glikobiológia fejlődése ugrásszerű az elmúlt időszakban. Munkánk során szisztematikusan vizsgáltuk a glükózaminoglikánokkal (a proteoglikánok szénhidrát komponenseivel) reagáló antitesteket kontroll személyekben és rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben. A glükózaminoglikánok a degradálódó porcból igen jelentős mennyiségben szabadulnak fel, ezáltal a porc elveszti rugalmasságát, és az ízületeket érő napi terhelés és nyíróerők következtében a felpuhult porc „lekopik” az ízfelszínekről.

A glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek vizsgálatára speciális rendszert kellett alkalmaznunk, hiszen a szénhidrátok igen gyengén kötődnek a hagyományos polisztirén ELISA lemezek felszínéhez. Ezt a problémát sikerült áthidalnunk a Covalink ELISA rendszer alkalmazásával, mely rendszerben 2nm spacer karon keresztül kovalensen kötöttük a vizsgált 6, különböző glükózaminoglikánt (kondroitin szulfát A-, B- és C-t, keratán szulfátot, hialuronsavat és heparan szulfátot) a lemez felszínéhez. Így a szénhidrátok eredeti konformációban hozzáférhetőek voltak antitestek számára.

Munkánk során 66 rheumatoid arthritises beteg, 11 köldökzsínór vérminta és 54 felnőtt kontroll személy szérumában határoztuk meg a különböző glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek szintjét. Vizsgáltuk a glükózaminoglikán-specifikus antitestek bakteriális peptidoglikánokkal és gomba eredetű poliszacharid antigénnel való keresztreakcióját.

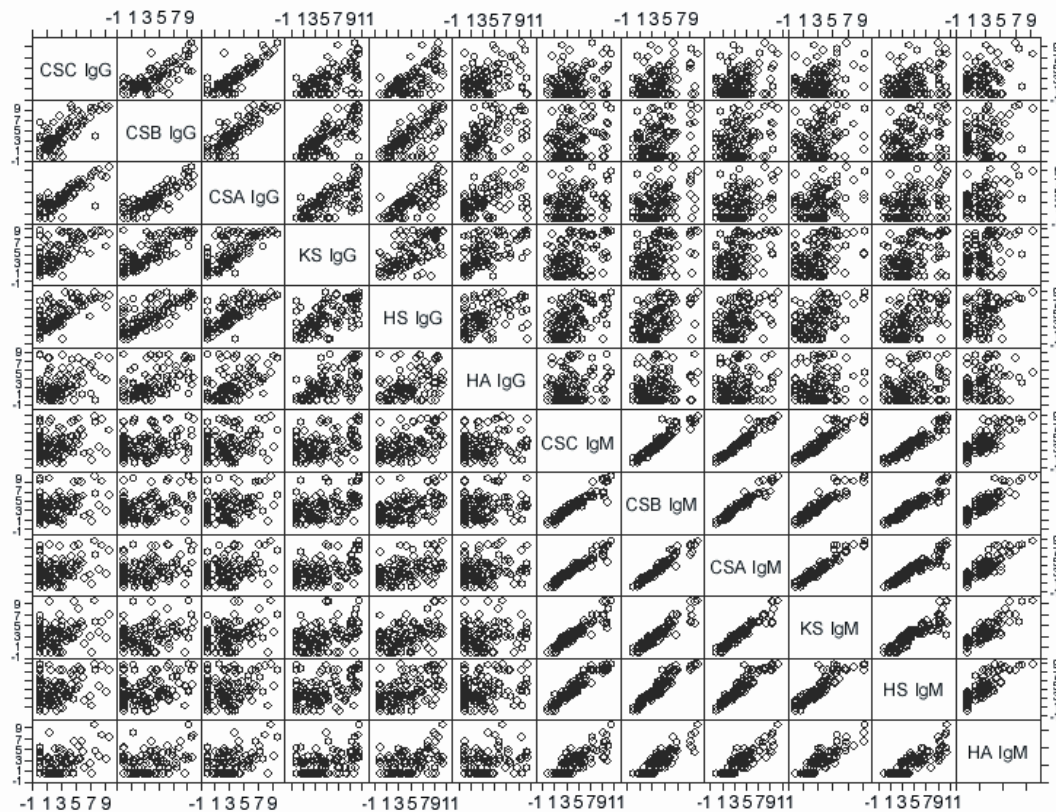
Annak érdekében, hogy pontosabb információhoz jussunk a glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek epitóp felismerésére vonatkozóan, GlycoChip szénhidrát arrayt alkalmaztunk.

Tekintettel arra, hogy az egyes glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek szintje közt igen jelentős korreláció állt fenn, annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy tekinthetők-e a glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek betegség- vagy betegségstádium markernek, többlépcsős statisztikai elemzéses stratégiát kellett választanunk (Harrell módszerét követve).

Míg a glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek hiányoztak a köldökzsínór vérszérumból, addig igen nagy (több száz µg-os) mennyiségben voltak jelen a felnőtt kontroll személyek szérumában. Rheumatoid arthritisben szintjük szignifikánsan emelkedettnek bizonyult a felnőtt kontrollokéhoz képest is ($p < 0.001$) és mennyiségük elérte a mg/ml-es nagyságrendet.

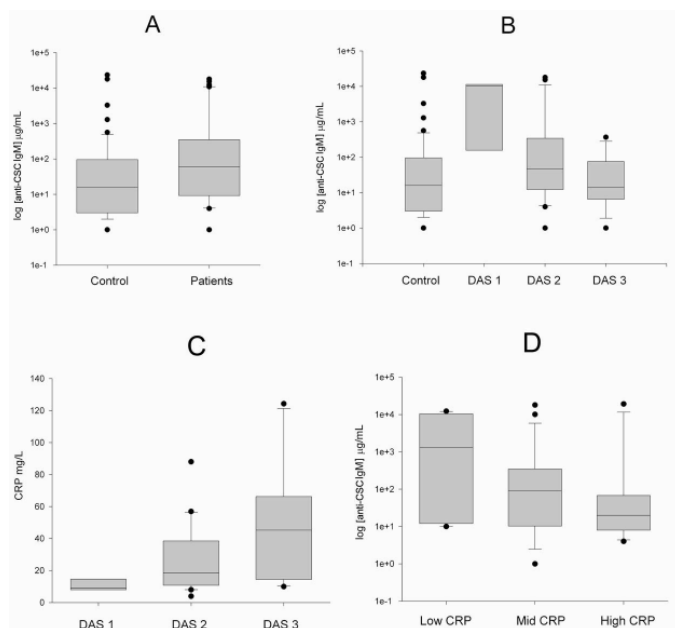
Az anti-glükózaminoglikán antitest szintek egymással igen erősen korreláltak (különösen az IgM típusú ellenanyagok esetében mutatkozott igen erős pozitív korreláció). Emellett a glükózaminoglikán elleni antitestek keresztreakáltak bakteriális peptidoglikánokkal és gomba eredetű poliszacharidokkal is. A rheumatoid arthritises szérumok gyenge ioncserélő gyantával történt előinkubációja szinte teljesen meggátolta a későbbi glükózaminoglikánhoz való

kötődést, igazolva, hogy a fenti antitestek polianion karakterű epitópokhoz kötődnek elsődlegesen.



A glükózaminoglikánokkal reagáló antitestek korrelációs mátrixa

Minden esetben az antitest mennyiségek logaritmusát ábráztuk egymással szemben. Jól megfigyelhető (elsősorban az IgM antitestek esetében) az igen erős korreláció az egyes antitestek között. A fenti megfigyelést részletes statisztikai elemzés támasztja alá, a legalacsonyabb korrelációs koefficiens érték a glükózaminoglikánokkal reagáló IgM antitestek esetében 0.86 volt. A koncentrációkat $\mu\text{g/mL}$ -ben fejeztük ki.



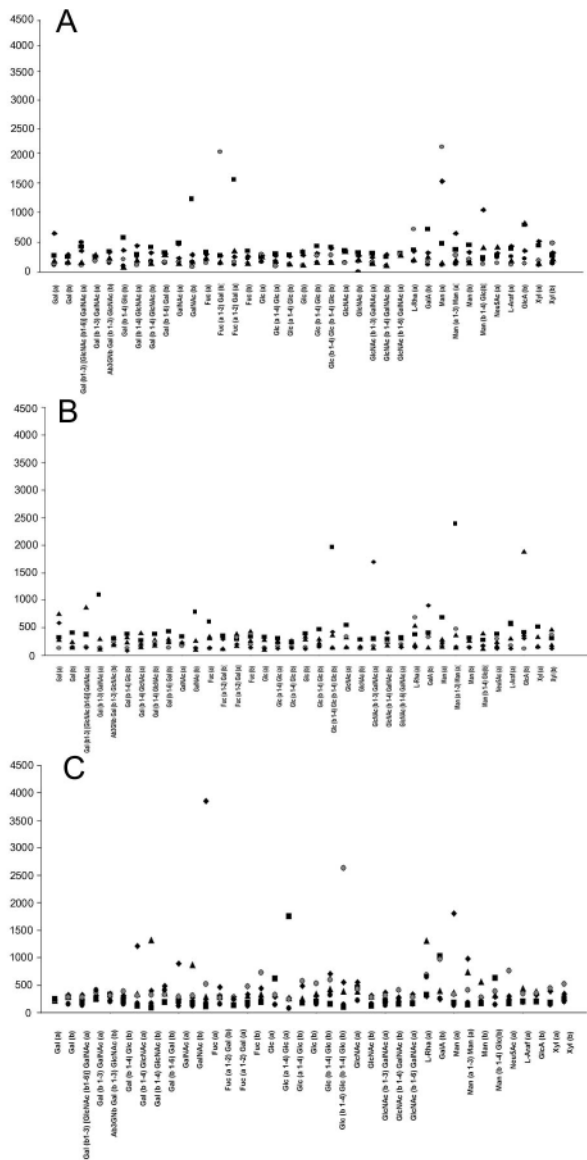
Az anti-kondroitin szulfát C (CSC) IgM koncentrációk a kontrollokban és a rheumatoid arthritises betegekben

A: Az anti-CSC IgM koncentráció logaritmusát ábrázoltuk. A téglalapokon belül található vonalak a medián értékeket jelölik. A téglalapok a 25 és 75 percentil közötti tartományt jelölik. A függőleges szakaszok vége a minimum és maximum értékeket jelzik, kivéve azokat az eseteket, amikor az értékek kívül estek a 1.5 –szeres interkvartilis tartománynak. A kontroll és rheumatoid arthritises csoportok közötti különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0.02$, F-test).

B: Az anti-CSC IgM koncentrációk kontrollokban és a DAS 28 score érték alapján sztratifikált rheumatoid arthritises csoportban. A DAS1 csoportba tartozó betegek (DAS28 score ≤ 3.2), szignifikánsan magasabb anti-CSC IgM koncentrációval rendelkeztek, mint a kontrollok és a DAS 2 (DAS28 score 3.2 - 5.0) és DAS 3 (DAS28 score ≥ 5.1) csoportba tartozó betegek ($p < 0.05$, post-hoc Tukey test). Eredményeink alapján a kondroitin szulfát C-vel reagáló IgM antitest nem betegség-, hanem betegség stádium marker rheumatoid arthritisen.

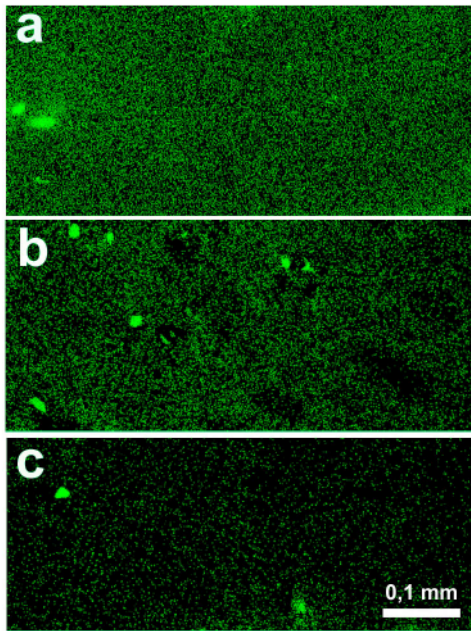
C: A C-reactive protein (CRP) szintek alakulása a rheumatoid arthritises betegekben a DAS score függvényében. A függőleges tengelyen CRP koncentráció logaritmus látható. Csak a DAS 1 és 3 csoportba tartozók között találtunk szignifikáns különbséget ($p < 0.05$, post-hoc Tukey test).

D: Az anti-CSC IgM koncentrációk alakulása a kontrollokban és a rheumatoid arthritisen szenvedő betegekben, akiket a CRP értékek szerint sztratifikáltunk három alcsoportba. Az anti-CSC IgM szint csökken a CRP koncentráció növekedésével; az alacsony és a magas CRP értékű csoport közti különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$, post-hoc Tukey test).



Egyéni szénhidrát felismerési mintázatok

Az antigéneket a vízszintes tengelyen tüntettük fel konszenzus nomenklatúrát alkalmazva (az International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) irányelvei szerint). Minden egyes jel külön mintához tartozó fluoreszcencia intenzitást jelöl. A: RA szérumbeltek, B: RA szinoviális folyadékbeltek, C: felnött kontroll szérumbeltek.



A glükózaminoglikánnal reagáló antitestek hyalinporc alapállományhoz való kötődésének igazolása

A: rheumatoid arthritises szérumban antitestek porchoz való kötődése. B: A kötődés gátolható volt a szérumban kondroitin szulfát C-vel való előinkubációjával (2 mg/ml) és C: 4 mg/ml kondroitin szulfát C-vel való előinkubáció révén. 100x nagyítás

Munkánk legjelentősebb eredménye, hogy rheumatoid arthritisben a kondroitin szulfát C-vel reagáló IgM típusú ellenanyagok mennyisége a szérumban negatív korrelációt mutatott a betegség aktivitását jelző DSA28 score értékekkel, és hasonló módon a szervezetben zajló gyulladást jelző CRP szintekkel.

Munkánk fő konklúziója, hogy a rendkívül nagy mennyiségben előforduló, erősen keresztreaktív, glükózaminoglikán-specifikus természetes autoantitestek (elsősorban a kondroitin szulfát C-vel reagáló IgM) a rheumatoid arthritis új betegségaktivitás markerének tekinthető.

2. GAG-arthritis indukciója és vizsgálata

Glükózaminoglikán (pl. kondroitin szulfát B) és 5% Al(OH)₃ szuszpenziójával végzett hiperimmunizálással BALB/c egérben 4/6 esetben periartikuláris duzzanatot és gyulladással járó sejtes infiltrációt idéztünk elő. Negatív korrelációt találtunk a közelmúltban leírt, feltehetőleg gátló funkciójú, Th1-specifikus fehérje, a Tim-3 csontvelői expressziója és a gyulladással járó tünetek között, mely szénhidrát (glükózaminoglikán)-specifikus T sejtek szerepét valószínűsíti vizsgálati rendszerünkben

Glükózaminoglikánokkal (kondroitin szulfát B-vel, valamint heparinnal és keratán szulfáttal) hiperimmunizáltuk BALB/c egerek csoportjait. Az adjuváns kontroll csoporthoz képest a CD3⁺, a CD3⁺/CD8⁺, a CD3⁺/CD4⁺, a CD4⁺/CD25^{high}, a CD19/CD5⁻ és a CD19/CD5⁺ lépsejtek arányát illetően nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A legmarkánsabb különbség a glükózaminoglikánnal hiperimmunizált csoportokban a kontrollokhoz képest a gamma/delta T sejtek arányának jelentős csökkenése volt a lépben. A heparinnal illetve keratán szulfáttal immunizált csoportban a kialakuló arthritis incidenciája alacsonyabbnak bizonyult, mint a kondroitin szulfát B-vel immunizált csoportban.

3 Szénhidrát-specifikus monoklonális antitestek előállítása

Sikerrel izoláltunk a hiperimmunizált egerekből kondroitin szulfát A-val reagáló monoklonális antitestet termelő hybridóma klónt (IgG1), azonban szénhidrát-specifikus T sejt hybridómát nem sikerült izolálnunk

4. Thymuson belül ektópiásan expresszáldó fehérjék glikozilációjának a vizsgálata

Az egér aggregátum B' loop-KS, KS-CS, CS-EFG, LB-LB domainjet kódoló exon-exon határokra (Exon 10/Exon 11, Exon 11/Exon12, Exon 12/Exon13 és Exon 13/Exon 14) tervezett primerekkel végzett RT-PCR reakciókkal igazoltuk, hogy a thymusban történő ektópiás aggregátum expresszió során a molekula legerősebben glikozilált domainjei (keratán szulfátban gazdag domain, kondroitin szulfátban gazdag domain) is kifejeződnek.

Ugyanakkor a thymocyták felszínén glükózaminoglikán-specifikus ellenanyagokkal nem vagy alig volt kimutatható festődés.

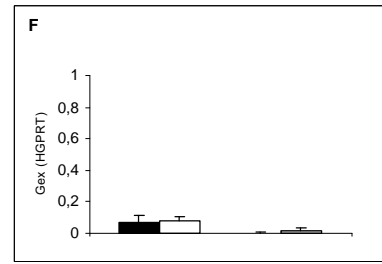
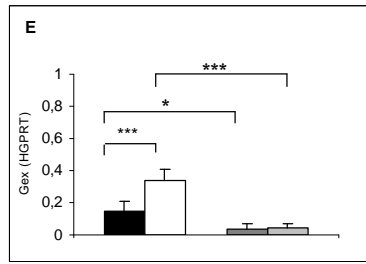
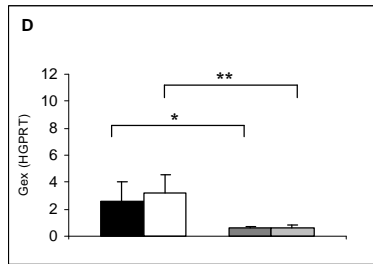
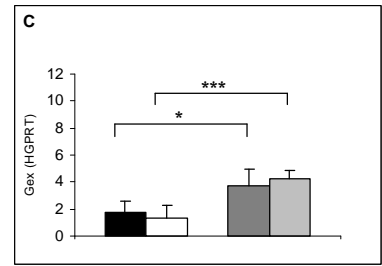
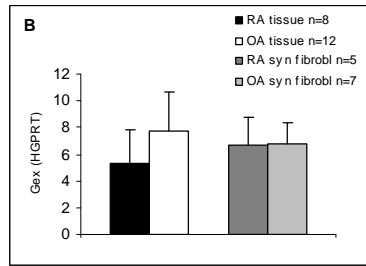
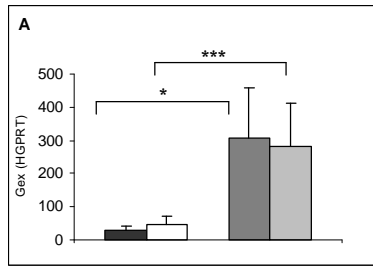
5. Glikozilációt befolyásoló gének expressziójának vizsgálata

(Pásztói, G Nagy, P Géher, T Lakatos, K Tóth, K Wellinger, P Póczy, K Pálóczy, M Mercédesz, P Nyirkos, A, Falus, El Buzas. *Synovial fibroblasts secrete cartilage-degrading glycosidases in joint diseases. Közlésre elküldve*)

A glikozidáz enzimek hasítása révén létrejövő szénhidrát hasítási termékek Toll like receptorokhoz kötődhetnek, mint endogén vészjelek, arthritis kapcsán ismert módon kidiffundálnak a degradálódó porcból, és kondroprotektív funkcióval is rendelkeznek. Jelen munkánk során szisztematikusan jellemeztük a glikozidázok ízületen belüli expresszióját. Vizsgáltuk a β -D-hexószaminidázt, (β -D-N-acetil-glükószaminidáz/ β -D-N-acetil-galaktószaminidáz), a béta-D-glükuronidázt, a hialuronidázt, a sperm adhesion molecule 1-et és a klotho enzimet rheumatoid arthritises és osteoarthritises synoviális fibroblasztokban és synoviális membrán mintákban. Összehasonlításuképpen a rheumatoid arthritisben hosszú ideje megkülönböztetett figyelemmel kitináz-szerű human cartilage glycoprotein 39-et is vizsgáltuk.

Eredményeink alapján az ízületi hexószaminidáz elsődleges forrása feltehetőleg a synoviális fibroblaszt. Mind synoviális fibroblasztokban, mind a synoviális membrán mintákban a legerősebb génexpresszió a HexA génre volt jellemző, ezt követte csökkenő sorrendben a HexB, GusB gének expressziója. A Hyal1 és KLOTTHO expressziója igen alacsonynak bizonyult. Ezzel szemben a kitináz családba tartozó Hc-gp 39 expressziója nagyságrendekkel volt magasabb a vizsgált glikozidáz géneknél. A sejt és szöveti homogenizátumokat a hexószaminidáz és glükuronidáz enzimek szignifikánsan magasabb aktivitása jellemezte, mint a synoviális folyadék mintákat.

Végeredményben tehát a hexószaminidáz bizonyult az ízületekben expresszálódó legfontosabb glikozidáznak. A hexószaminidáz N-acetil-glükószamint glükószamint hasít le a szénhidrátokból. Ugyanakkor más glikozidázokkal (melyek elsősorban az infiltráló gyulladásozó sejtek révén kerülnek az ízületekbe) alternálva hasítva jelentős mértékben hozzájárulhat a porckárosodáshoz. A TLR ligand oligoszacharid hasítási termékét létrehozó endoglikozidázok (pl. hialuronidáz) ízületen belüli expressziója igen alacsony.



Relatív génexpresszió

A: HC-gp 39

B: Hex A

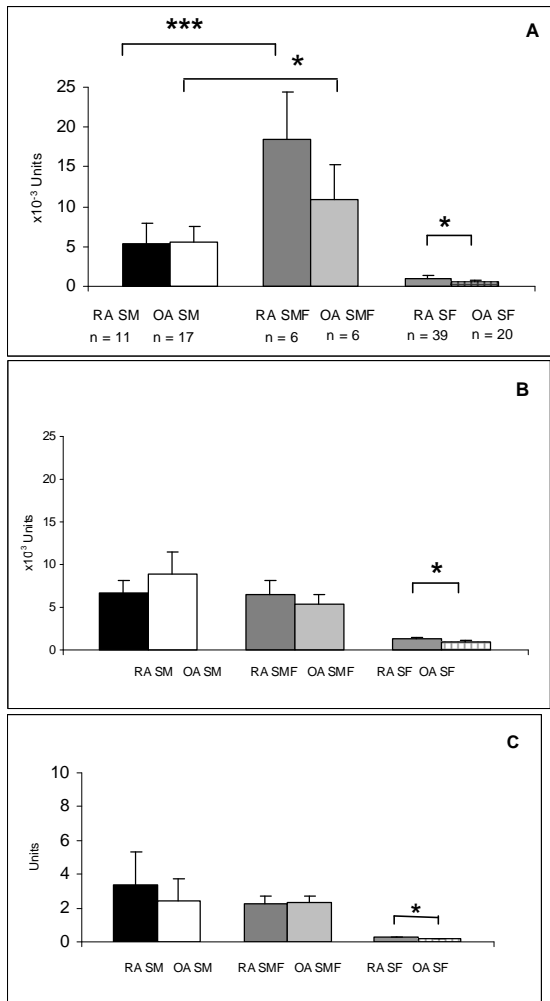
C: Hex B

D: Gus B

E: Hyal 1

F: Klotho

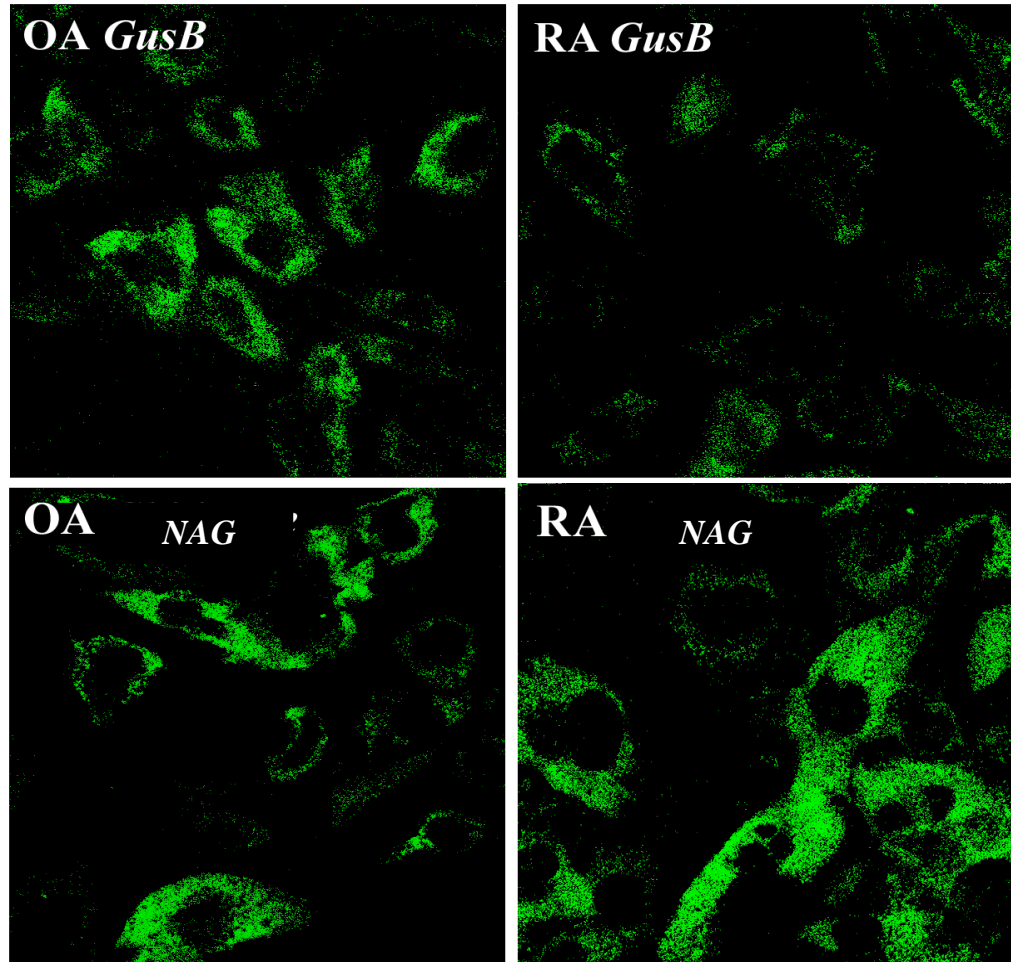
A glikozidáz illetve glikozidáz-szerű molekulákat kódoló gének HGPRT-re vonatkoztatott relatív expressziója rheumatoid arthritises (RA) és osteoarthritis (OA) synoviális fibroblaszt sejttörzsek és synoviális membránok esetében.



Enzimaktivitások

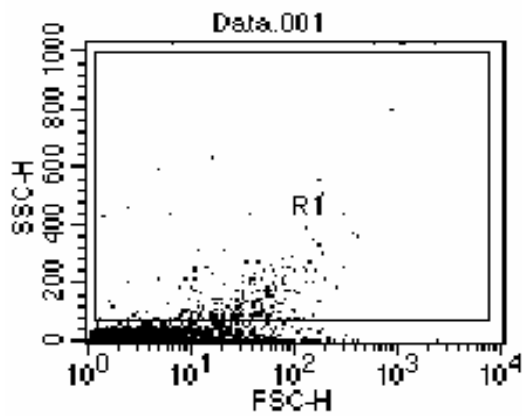
- A: N-acetil-glükózaminidáz
- B: N-acetil-galaktózaminidáz
- C: béta-D-glükuronidáz

Az N-acetil-glükózaminidáz, az N-acetil-galaktózaminidáz és a béta-D-glükuronidáz aktivitását mértük kromogén szubsztrátok segítségével rheumatoid arthritises és osteoarthritis eredetű synoviális fibroblaszt sejtörzsekben, synoviális membrán minták esetében és synoviális folyadék mintákban.

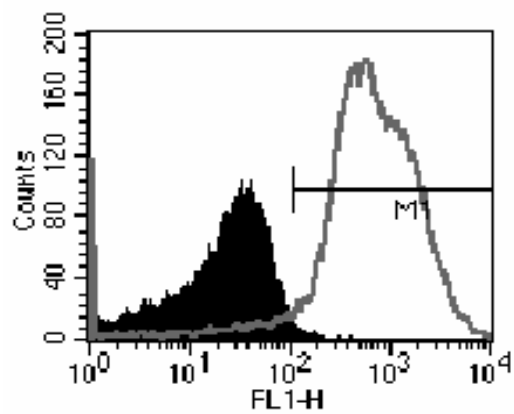
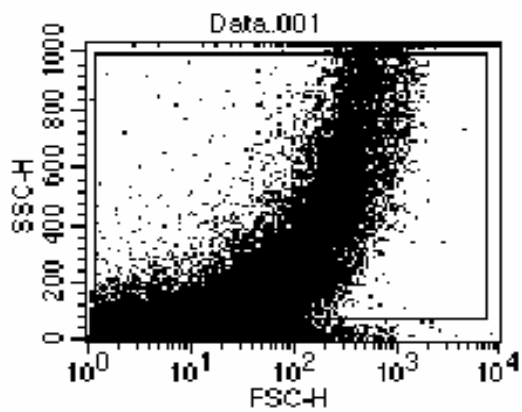
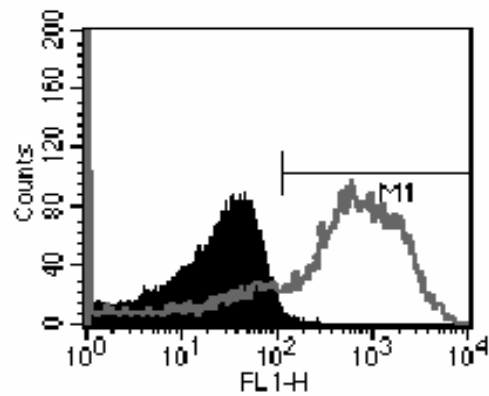


Lipofil fluorogén szubsztrátok segítségével kimutattuk az béta-glükuronidáz (GUS) és a N-acetil glükózaminidáz (NAG) aktivitását rheumatoid arthritises és osteoarthritis eredetű synoviális fibroblaszt sejtörzsek tenyésztésében.

Medium

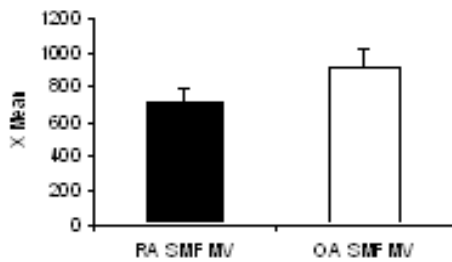


RA mikrovezikulum 76.66%



Synoviális fibroblaszt felülészó

OA mikrovezikulum 96,47%



Lipofil fluorogén szubsztrát segítségével kimutattuk, hogy mind a rheumatoid arthritises, mind az osteoarthritis fibroblaszt sejtörzsek tenyészetének felülészója tartalmaz sejt eredetű, membránnal körülvett mikrovezikulumokhoz kötött béta-glükuronidáz aktivitást.

6. A glikoziláció és az immunogenitás/autoantigén jelleg összefüggéseinek *in silico* vizsgálata

(Szabo GT, Antal P, Palotai R, Tokatly I, Tothfalusi L, Falus A, Buzas E. In silico analysis reveals characteristic changes in glycosylation of autoantigens, T cell epitopes and linear stretches of sequences shared by bacteria and humans. Kézirat előkészületben).

A leggyakoribb PTM mai ismereteink alapján a glikoziláció. Egyelőre csupán töredékes információk állnak rendelkezésre, arra vonatkozóan, hogy a glikoziláció pusztán ténye, függetlenül az oligoszacharid oldallánc szerkezetétől, hogyan befolyásolja egy fehérje immunológiai tulajdonságait. A kérdés megválaszolásához a jelen munka bioinformatikai megközelítésű, nagy léptékű elemzéssel szeretne hozzájárulni. Egészen a közelmúltig lehetetlen lett volna sok ezer fehérje közel száz paraméterét vizsgáló munka kivitelezése, hiszen laboratóriumi körülmények között mind az ezzel járó adat-, mind az anyagmennyiség kezelhetetlen. Az 1990-es évek közepére azonban olyan nagy molekuláris biológiai ismeretanyag halmozódott fel, amelyet már csupán az informatika eszköztárának segítségével lehet hatékonyan kezelni. Újabb lökést adott az informatikai módszerek biológiai alkalmazásának a Humán Genom Projekt (HGP), mely eredményeinek interpretációja elképzelhetetlen lenne bioinformatikai módszerek alkalmazása nélkül. Nem véletlen, hogy éppen a HGP során született meg a rendszerszemléletű biológia (system's biology) fogalma is. Az ezredforduló táján jöttek végül létre azok a nyilvánosan hozzáférhető, nagy elemszámú és gondosan ellenőrzött/frissített adatbázisok, melyek igyekeztek az elsődleges adatbázisok széles látókörét a másodlagos adatbázisok megbízhatóságával egyesíteni. A nagy adatbázisok fejlesztése ma is tart, az elmúlt évtizedben rengeteg változáson mentek keresztül annak érdekében, hogy minél megbízhatóbb információt szolgáltatassanak. Igen fontos a párhuzamos adatbázisok integrációja és fúziója, ami tovább csökkentette a hibalehetőségek számát. A megbízhatóság növelésére még ma is újabb és újabb erőfeszítéseket tesznek.

Munkánk során tehát a glikoziláció T sejtek általi immunfelismerésben és autoimmunitásban betöltött szerepét kívántuk vizsgálni. A teljes fehérjepopuláció glikozilációját kívántuk vizsgálni, és nem az egyes fehérjékhez kapcsolódó szénhidrát oldalláncokat. Nem vettük figyelembe a szénhidrát oldallánc összetételét és térszerkezetét, annál érdekesebb volt azonban számunkra a glikoziláció pusztán ténye.

1. Első kérdésünk az volt, hogy van-e különbség az autoantigének és a többi, a továbbiakban „normál” fehérjének nevezett szekvencia glikozilációjában. Amennyiben már a glikoziláció gyakoriságában eltérést találunk ismert autoantigének és eddigi ismereteink szerint autoimmun betegségekben antigénként nem szereplő fehérjék között, ez a különbség vajon az immunológiai felismerés sajátjaiból adódik, vagy csak egy minden oksági kapcsolatot nélkülöző markerről van szó?

A fenti kérdések megválaszolása során három, az immunológiai felismerés szempontjából kiemelt fontosságú peptid populáció glikozilációjának szenteltünk megkülönböztetett figyelmet: az ismert autoantigének, a kísérletesen igazolt, illetve a prediktált T sejt epitópok, valamint az ismert humán fehérjék ismert bakteriális fehérjékkel szekvencia egyezést mutató szakaszai. Logikusnak látszott az antigén prezentációról alkotott képünk alapján, hogy az epitóp szekvenciák a fehérjék kevésbé glikozilált részleteiből kerülnek ki, mivel a fehérjék glikozilált részletei sztérikus okokból adódóan nem teszik lehetővé, hogy a T sejt receptor egyszerre kötődhessen a peptidhez és az MHC molekulához. Ez a kézenfekvő mechanizmus, miként a glikoziláció befolyásolhatja egy fehérje immunogenitását, egyben egy újabb kérdést is felvet: valóban kisebb eséllyel kerülnek prezentációra a fehérjék glikozilált szakaszai? Az egyes kórokozók proteinjeinek humán fehérjékkel szekvencia egyezést mutató részletei nyilvánvaló keresztreaktivitást okozhatnak, hacsak nem teszi lehetővé mégis az elkülönítést

például a glikoziláció. Ebben az esetben a glikozilált részletek prezentációjának valószínűsége valóban eltérőnek kellene, hogy mutakozzon. Igen valószínű a molekuláris mimikri elmélet alapján, hogy az autoantigének esetében ez a megkülönböztetési képesség/lehetőség nem megfelelő. Kérdés, hogy összefüggésben lehet-e mindez a peptidek eltérő glikozilációjával. Feltevésünk szerint tehát az autoantigének glikozilációja eltér a „normál” fehérjékétől, és a különbség ok-okozati összefüggésben lehet a glikoziláció antigén felismerésre gyakorolt hatásával. Munkánk célja az autoantigének glikozilációjában megnyilvánuló különbségek kimutatása mellett az esetleges oksági kapcsolatok feltárása és a glikoziláció antigén felismerésre gyakorolt hatásának feltárása volt.

Elemzésünkhöz több adatbázis információit használtuk fel. Törekedtünk a kérdés minél szélesebb körű vizsgálatára, ezért minden adatbázisból az összes ismert, kísérletesen igazolt szekvenciát felhasználtuk. A SwissProt-UniProt adatbázis (www.uniprot.ebi.ac.uk) mind a 16 440 humán és 140 000 bakteriális fehérjéjére, az Immuneepitope Database (www.immuneepitope.org) mind a 2000 kísérletesen igazolt humán T sejt epitópjára, valamint az Autoantigen Database (discovery.imb.uq.edu.au/AutoantigenDB) mind az 527 ismert autoantigénjére vonatkozóan vonatkozó szekvenciákat felhasználtuk tehát elemzésünkhöz. A SwissProt-UniProt adatbázis nyújtja jelenleg a legteljesebb képet mind a humán proteomról, mind egyéb speciestek fehérjéről. Ez az adatbázis volt az ismert humán fehérjék szekvenciájának forrása. Az összes általunk vizsgált fehérje létre fehérjeszintű bizonyítékok szolgálnak, azaz a csupán valószínűsített, génszintű információk alapján feltételezett szekvenciájú fehérjéket kizártuk a további vizsgálatok sorából. A fehérjék szekvenciája mellett a SwissProt adatbázisból a fehérjék szerkezetére vonatkozó egyéb annotációs adatokat (lásd később) is felhasználtuk.

A SwissProt éppen a bioinformatikai felhasználások megkönnyítésére az adatbázis-lekérdezéseket a Sequence Retrieval System (SRS) szervere segítségével Flat File és XML formátumban is elérhetővé teszi. A kapott adatokat Flat File formátumban használtuk fel, ahol minden sor első öt (2 hasznos + 3 space) karaktere információval szolgál a sor tartalmával kapcsolatban. Ez lehetővé tette, hogy az általunk vizsgálni kívánt adatokat egy egyszerű script program segítségével kiválogassuk, és SQL adatbázisba konvertálhassuk. Minden egyes fehérje SwissProt azonosítóját (ID kezdetű sor), Accession Number jelét (AC), aminosavsorrendjét (SQ) és ismert szerkezeti elemeinek pozícióját (FT) mentettük el saját adatbázisunkba. Az ismert szerkezeti elemek közül a továbbiakban a diszulfid hidak, az α -hélixek, β -redők, transzmembrán régiók, Ca-kötő helyek, Zn-ujjak és DNS kötő helyek, valamint a szintén ezekben a sorokban annotációra kerülő SNP-k, splice variánsok, izoformák és repeatek (ismétlődések) kerültek bejegyzésre. A bakteriális fehérjéknek csupán az aminosav sorrendjét használtuk fel.

Mivel a SwissProt adatbázisból letöltött adatok megbízhatósága, a konvertálás eredményessége alapvetően meghatározza minden további következtetésünk megbízhatóságát, a létrehozott adatbázis szekvenciái közül mintegy ezret szűrőpróbaszerűen kiválasztottunk, és ezeket összeolvastuk az eredeti adatokkal. Mivel pedig a szekvenciák adatainak megbízhatósága elengedhetetlen, mind a 16 440 humán fehérje szekvenciájának esetében ellenőriztük, hogy valóban a Swissprot adatbázis alapján a fehérje azonosítójához tartozó aminosav sorrend szerepeljen.

Felmerülhet a kérdés, hogy ha elemzésünkben a glikoziláció szerepét kívánjuk vizsgálni, miért nem használtuk fel a SwissProt adatbázis glikozilációra vonatkozó igen jelentős mennyiségben rendelkezésre álló annotációs adatait. Éppen mivel elsődleges kérdésfelvetésünk a glikozilációra vonatkozott, elengedhetetlen volt minderről a lehető legszélesebb körű és a lehetőleg egységes információt nyerni. A „publication bias” (az eredmények folyóiratokban való megjelenésével összefüggő eredménytorzulás), a negatív

eredmények hiánya, illetve a glikoziláció vizsgálatára használt igen különböző módszerek azonban jelentősen megnehezítették volna ezek összevetését. Ezért döntöttünk úgy, hogy predikciós szervereket használunk a glikozilációs helyek meghatározására.

Az autoantigének, mint munkánk elsődleges célpontjai, a Vladimir Brusic munkacsoportja által létrehozott, és a Queensland-i Egyetem által gondozott Autoantigen Database alapján kerültek azonosításra. Ez a mintegy 500 fehérje 130 különböző fehérjecsaládba tartozik, melyek közül a kollagén, a 7TM receptorok és a citokeratinok alkotják a legnépesebb kategóriákat. A fehérjecsaládok száma és mérete nem tér el azonban jelentős mértékben a teljes fehérjepopuláció családszerkezetétől.

Az antigénfelismerés folyamatait kísérletesen igazolt T sejt epitópokon keresztül vizsgáltuk. A Scripps Clinic szakemberei által „adatbányászati” (data mining) módszerekkel kiszűrt, majd manuálisan ellenőrzött epitópszekvenciákat tartalmazza az Immuneepitope Database. Az adatbázis hatalmas előnye, hogy negatív eredményeket is tartalmazza az igazolt epitóp szekvenciák mellett. Ebből az adatbázisból a T sejtek által igazoltan felismert epitópok pozícióját nyertük.

Predikció

A fehérjék aminosav sorrendje alapján egyre több szerkezeti elem létét, helyzetét tudjuk prediktálni. Kísérletes adatok alapján ismert, hogy például az N-glikoziláció NXS/T motívumokon történik, vagy transzmembrán régióvá a plazmamembrán vastagságával megközelítően azonos hosszúságú α -helikális szerkezetek válhatnak nagy valószínűséggel. Természetesen nem minden közel 10 nm-es α -helix jelez transzmembrán struktúrát, mint ahogyan az N-glikoziláció a megfelelő triplet jelenlétén kívül számos egyéb tényezőtől, a környező aminosavak töltésétől, a fehérjén belüli elhelyezkedéstől, a membránnal kapcsolatos orientációtól függ. Ezen tényezők egy része kísérletesen felderíthető; sok, egyenként kevésbé jelentős tényező azonban igen nehezen lenne kiszűrhető. Ezekben az esetekben jelent segítséget két elterjedt predikciós eljárás.

A **mesterséges neuronhálózatok** (Artificial Neuronal Network, ANN) elvén működő matematikai eljárás bonyolult mintázatok megkeresésére a valós neuronhálózatok működését modellezi. Különböző logikai funkciókkal rendelkező elemeket definiál, melyek egymással összeköttetésben vannak. A valódi neuronhálózatokhoz hasonlóan ezek a hálózatok külső tényezők (azaz az inputok) hatására képesek kapcsolatrendszerüket átrendezni. Ez alapján a tanulás folyamatára emlékeztető tulajdonságuk alapján nevezik őket „tanuló”

algoritmusoknak. Az eljárás során tehát kísérletesen igazolt adatok alapján a hálózat mindaddig módosul, amíg a kapott eredmény a lehető legjobban megközelíti a valóságot. A másik széles körben biológiai alkalmazást nyert algoritmus a **rejtett Markov modell** (Hidden Markov Model, HMM). Ez a matematikai eljárás, mely egyben a legegyszerűbb dinamikus Bayes hálózatnak is számít, legszemléletesebben olyan gépezetnek fogható fel, melynek csak a hangját halljuk, s ez alapján próbáljuk megbecsülni a fogaskerek helyzetét. Van tehát elképzelésünk a kiindulási állapotról, s az egymás után következő paraméterek alapján folyamatosan megbecsüljük az állapot megváltozásának valószínűségét. Az átmeneti valószínűségeket természetesen itt is kísérletesen igazolt eredmények alapján számoljuk.

Ha az előbbi két módszert kombináljuk, még megbízhatóbb eredményeket kapunk, melyek már meglepően jól közelítik a valós állapotokat. Ilyen kombinált módszert alkalmaznak a Center for Biological Sequence Analysis (CBS, Koppenhága, Dánia) predikciós szerverei is. A szoftverek bárki által hozzáférhetőek Interneten keresztül, vagy kérésre letölthetők.

Munkánk során az itt található szoftverek segítségével vizsgáltuk a szekvenciák glikozilációjának valószínűségét és a glikoziláció pozícióját. A szoftvereket az ajánlott alap paraméterekkel használtuk, és legtöbbször a glikoziláció valószínűségére megadott diszkrét értékeket használtuk fel, míg egyes esetekben a kontinuus valószínűségekkel is számoltunk. Három glikozilációs mechanizmust: az N- az O- és a Yin-Yan típusú glikozilációt, valamint

ezzel összefüggésben a szignál szekvenciák meglétét és a transzmembrán régiókat vizsgáltuk, emellett 14 MHC II allélhez való kötődésre vonatkozóan is felhasználtuk a szoftvereket. Az MHC-kötődésre vonatkozó predikció során a humán fehérjék 15 aminosav hosszúságú részleteinek az adott allélhez való kötődésének valószínűségét vizsgáltuk. A predikció ebben az esetben magában foglalja annak a 9 aminosav hosszúságú „core” epitónak a meghatározását is, amely a peptidfragmentum kötődésében elsődleges szerepet játszik. Mint később kiderül, ennek a 9 aminosav hosszúságú régióknak kitüntetett figyelmet szenteltünk. A predikciós szoftverek által szolgáltatott adatokat script programok segítségével dolgoztuk fel. A bioinformatikában a legszelesebb körben elterjedt programozási nyelv a Perl, melyhez igen jelentős mennyiségű bioinformatikai kiegészítés hozzáférhető. Egyre népszerűbb azonban a bioinformatikai alkalmazások körében is a Python script nyelv, melyet mi is használtunk. Az adatok rendszerbe foglalásához, a további feldolgozás megkönnyítése érdekében egy SQL adatbázist hozunk létre. A statisztikai elemzések egy része SPSS segítségével készült, míg a másik része Antal Péter (Budapesti Műszaki Egyetem) által kifejlesztett Bayes statisztikai program segítségével. Szoftvereink SuSe Linux operációs rendszer alatt futottak.

Random fehérjék

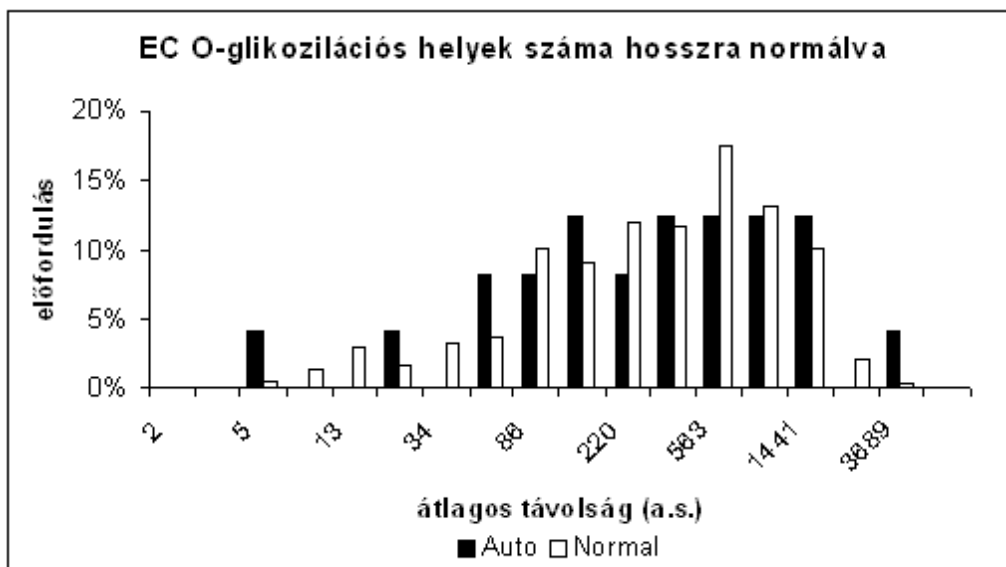
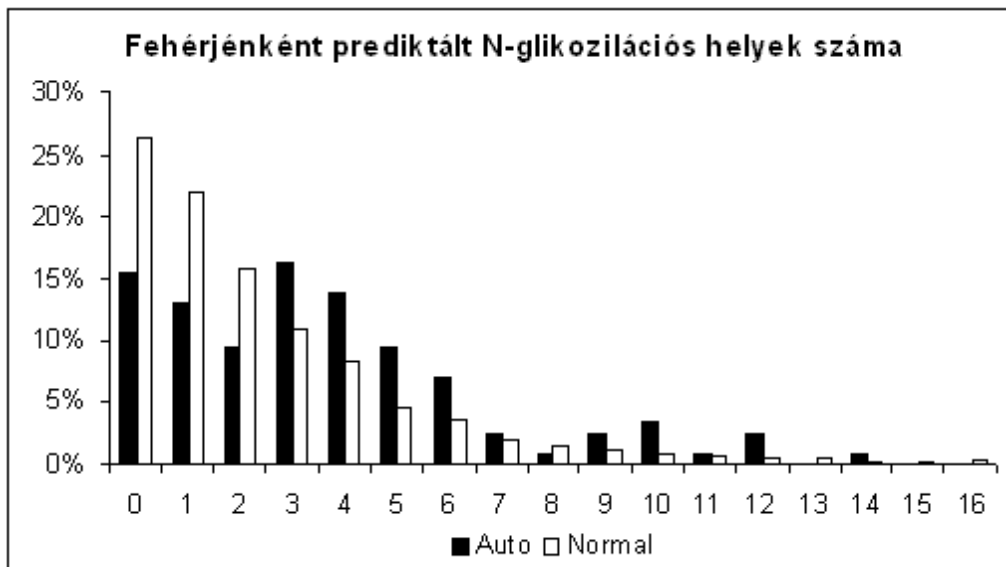
Minél hosszabb egy fehérje, statisztikailag annál nagyobb a valószínűsége egy-egy újabb glikozilációs hely kialakulásának. Hogy az egyszerűen csak az eltérő hosszakból eredő glikozilációs különbségeket kiszűrjük, minden fehérjéhez azonos hosszúságú random aminosav szekvenciákat generáltunk, melyeknek szintén vizsgáltuk a glikozilációját. Az így létrehozott virtuális „fehérjék” aminosav összetétele megegyezik a valós fehérjepopuláció átlagos összetételével, a sorrend azonban véletlenszerű. A véletlen számokat egy ún. pseudo-random szám generáló (PRNG) metódus, a Mersenne Twister algoritmus segítségével állítottuk elő, aminek az eredménye a valódi véletlen számoktól annyiban tér el, hogy bizonyos periódushossz után ismétlődő mintázatok szerepelhetnek benne. Ez a periódushossz azonban $2^{19937}-1$, amely messze meghaladja az általunk elvégzett kb. 2^{24} iterációs lépést. Előnyös tulajdonságai, 623 dimenzióra kiterjedő ekvidisztribúciója miatt az általunk használt Mersenne Twister algoritmus egyre több statisztikai szimuláció alapját képezi.

Bakteriális-humán teljes szekvencia átfedések

Mint arra a molekuláris mimikri elmélete is felhívja a figyelmet, az immunrendszer kognitív funkcióját megzavarhatja olyan rövid peptid szakaszoknak a prezentációja, melyek valamely kórokozó fehérjében és a szervezet saját fehérjében egyaránt előfordulhatnak. Ez eredményezhet toleranciát a patogén fehérjével szemben, azonban legalább ekkora valószínűséggel okozhatja saját struktúrák a kóros autoimmun felismerését. Mivel az N-, illetve O-glikozilációra kerülő fehérjék szükségszerűen szignál peptiddel rendelkező, szekretoros- vagy membránfehérjék, ezek nagy valószínűséggel lizoszómákban való emésztődés után, MHC II molekulákon fognak bemutatásra kerülni, éppen úgy, ahogyan a fagocitált bakteriális fehérjék. A humán fehérjék között kerestük tehát azokat rövid, de legalább 7 aminosavnyi szakaszokat, melyek ismert bakteriális fehérjék egy-egy részletével mutatnak teljes szekvencia egyezést.

Glikozilációs különbségek

Az autoantigének szignifikánsan nagyobb hányada (85%) N-glikozilált, mint a normál fehérjék (73%) és mind abszolút, mind az egységnyi hosszra számított relatív glikozilációs helyek száma magasabb a körükben. Ezzel szemben azonban az O-glikoziláció gyakoriságában nem találtunk szignifikáns eltéréseket (63% az autoantigének és 56% a normál fehérjék esetén).



Az O-glikoziláció előfordulása igen hasonló az autoantigének és a normál fehérjék között, jóllehet a normál fehérjepopuláció sem alkot egy egységes, egyenletes eloszlású populációt.

Bayes hálós elemzés

Mivel elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon autoantigének glikozilációjában megmutatkozó különbség okozati kapcsolatban van-e az autoantigenitással, az okság matematizálását célul tűző Bayes elemzést is elvégeztük a glikozilációs adatsoron. Az elemzésbe ezen kívül a fehérjék számos egyéb tulajdonságát is bevontuk a glikoziláción kívül, mint amilyen az SNP-k, a másodlagos térszerkezeti elemek vagy a repeatek száma.

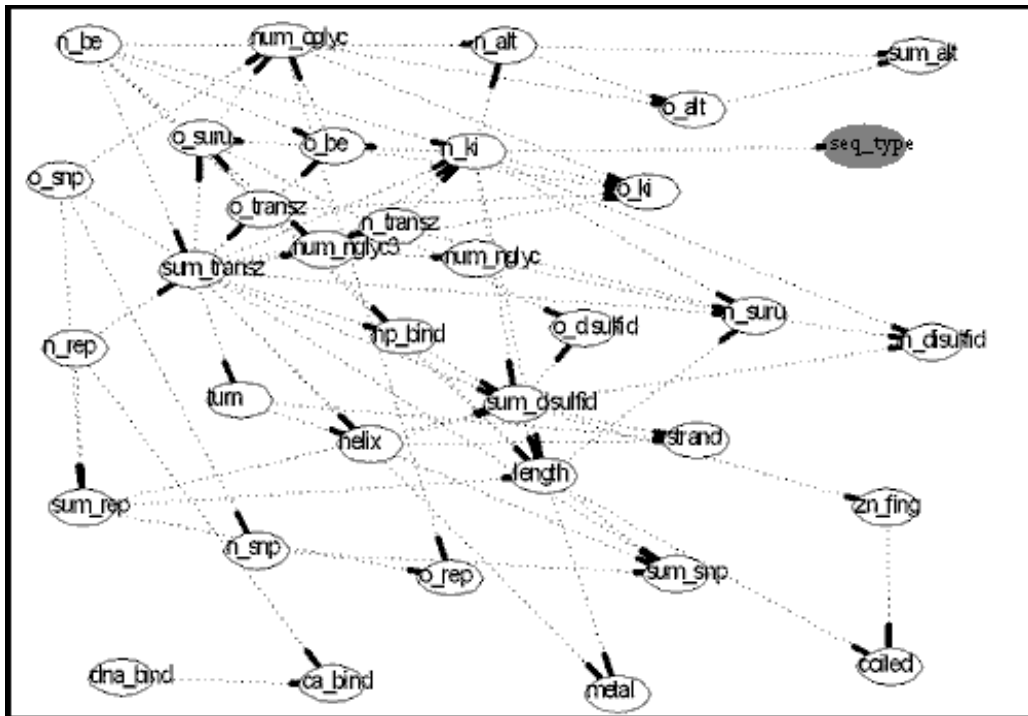
Vizsgált változó	Bayes (MBM, e=2)	Kolmogorov-Smirnoff hipotézistesz
Hossz	1	p < 0,001

EC Nglik	1	p < 0,001
Össz Nglik	1	p < 0,001
Béta-redők száma	0.986774	p < 0,01
Transzmembrán régiók száma	1	p < 0,05
Splice variánsok száma	1	p < 0,05
Turn motívumok száma	0.005305	p < 0,05
Diszulfid hidak száma	1	Nem szignifikáns
Alfa-hélixek száma	0.014117	Nem szignifikáns
Ca-kötő helyek száma	0.000901	Nem szignifikáns
Diszulfid hidak közé eső Nglik	8.79E-07	Nem szignifikáns
Diszulfid hidak közé eső Oglik	6.65E-05	Nem szignifikáns
DNS kötő helyek száma	0.012401	Nem szignifikáns
EC Oglik	0.741702	Nem szignifikáns
Fém kofaktor kötődése	0.097063	Nem szignifikáns
IC Nglik	0.132067	Nem szignifikáns
IC Oglik	5.89E-06	Nem szignifikáns
Nglik sűrűsége	1.67E-10	Nem szignifikáns
Oglik sűrűsége	2.78E-09	Nem szignifikáns
Repeatek jelenléte	0.000411	Nem szignifikáns
SNP-re eső Nglik	0.000457	Nem szignifikáns
SNP-re eső Oglik	0.000252	Nem szignifikáns
Splice variánsra eső Nglik	1.19E-06	Nem szignifikáns
Splice variánsra eső Oglik	1.00E-05	Nem szignifikáns
Szignál peptid	0.377562	Nem szignifikáns
Szuperhélixek száma	0.094628	Nem szignifikáns
Transzmembrán Nglik	0.00037	Nem szignifikáns
Transzmembrán Oglik	0.00397	Nem szignifikáns
Zn ujj	0.008453	Nem szignifikáns

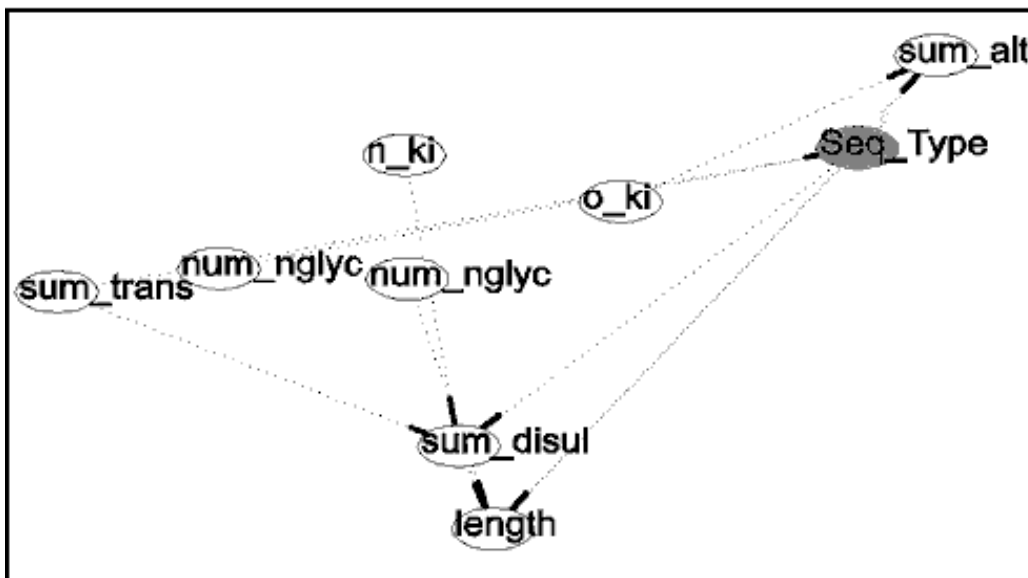
A fenti táblázat alapján egyértelmű, hogy mind Bayes hálós elemzés, mind klasszikus statisztikai vizsgálatok alapján az autoantigének N-glikozilációja eltér a normál fehérjék glikozilációjától, míg a két populáció olyan tulajdonságokban, mint az α -hélixek száma, a Ca-kötőhelyek száma vagy fém kofaktor jelenléte, melyekkel kapcsolatban nem várjuk, hogy a fehérjék felismerhetőségére jelentős hatással lennének, nem különbözik jelentősen. Meglepő azonban, hogy a transzmembrán régiók és a β -redők számában különbség mutatkozik.

Az annotált transzmembrán régióval rendelkező fehérjék százalékában megadott grafikonról leolvasható, hogy az autoantigének között egyetlen kategória, a 4TM (tetraspanin molekulacsalád) fehérjék aránya tér el jelentősen a normál fehérjékétől. Nem magyarázható az autoantigének kis számával az sem, hogy 2TM illetve 12TM fehérjék sem találhatók közöttük. Valamivel kevésbé jelentős, de szintén nem elhanyagolható a 6TM fehérjék alacsony előfordulása az autoantigének között.

Szintén igen markáns különbséget találtunk az autoantigének jelenlevő β -redők számában. Az annotált β -redővel rendelkező fehérjék fehérjénként jóval kevesebb számú β -redőt tartalmaznak, mint az annotált β -redővel rendelkező autoantigének.



Az N-glikoziláció és az antigenitás ok-okozati összefüggésére utal a Bayes elemzéssel nyert egyik igen valószínű kapcsolatrendszer is. Az ábrán pirossal szereplő seq_type utal arra, hogy az adott fehérje autoantigén-e, sárga oválisok pedig mindazokat a változókat szimbolizálják, melyek autoantigenitással való összefüggését vizsgáltuk. Megállapítható, hogy az n-ki változó, mely az extracelluláris N-glikozilációs helyek számát jelöli, közvetlen kapcsolatban van az autoantigenitással, míg a többi változó csupán közvetett módon van hatással az autoantigenitásra.

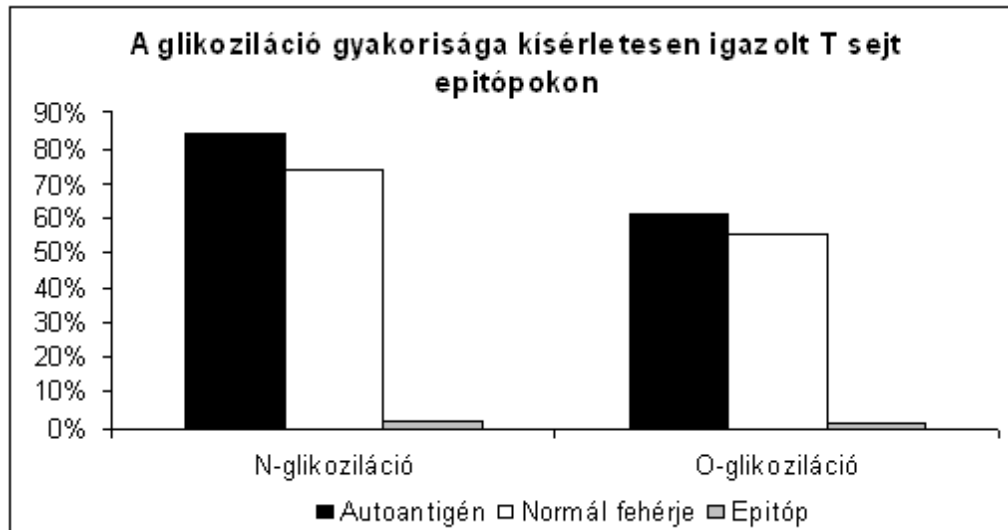


Érdekes módon azonban ha ugyanezt az elemzést immár csak a statisztikai elemzések kapcsán relevánsnak ítélt változókkal végezzük el, a legvalószínűbb kapcsolatrendszer jelentősen átalakul. Itt már az autoantigenitás hosszútól való függése dominál és az extracelluláris N-

glikozilációs helyek számától csak közvetetten függ az autoantigenitás. Az autoantigenitás és az N-glikoziláció közötti ok-okozati kapcsolat tehát nem bizonyítható egyértelműen.

Kísérletesen igazolt T sejt epitópok

Az antigénfelismerés mechanizmusának vizsgálatához hasznos segítséget nyújt többek között a kísérletesen igazolt epitópok vizsgálata. A kísérletesen igazolt T sejt epitópok glikozilációja pozíciójuk alapján könnyedén megítélhető.



Az összes kísérletesen igazolt T sejt epitóp elenyészően kis hányada, mindössze 2,5 %-a tartalmaz N-glikozilációt, és csupán 1,6 %-uk O-glikozilált.

Bakteriális átfedések

A 7 aminosavnyi, tehát biológiailag még irreleváns hosszúságú átfedő szekvencia a fehérjék majd mindegyikében található, még hozzá igen nagy számban.



Az autoantigéneken és a normál fehérjéken található szekvencia egyezések glikozilációjában nem mutatható ki szignifikáns különbség, azonban feltűnő, hogy a glikozilált peptidok előfordulása ezeken a humán-bakteriális megegyező **szekvencia** részleteken messze elmarad a

fehérjék glikoziláltságától. Kérdés, hogy mindez vajon magyarázható-e egyszerűen azzal, hogy az átfedő szekvencia részletek hossza egyszerűen elmarad a teljes fehérjék hosszától.

Összegezve:

Az autoantigének és a normál fehérjék populációját elkülönítő számos sajátosságot sikerült meghatározni. Az autoantigének szignifikánsan hosszabbak, több N-glikozilációs helyet, β -redőt tartalmaznak, több splice variánsuk van és jelentős részük 4TM fehérje. Ezek közül mi az autoantigének glikozilációját vizsgáltuk elsődlegesen. Megállapítottuk, hogy az autoantigének N-glikozilációja jelentősen eltér a normál fehérjék N-glikozilációjától, nagyobb mértékben, mint azt az eltérő hosszak alapján várnánk.

A kísérletesen igazolt T sejt epitópok elenyészően kis hányada glikozilált, míg a jelenlegi predikciós módszerekkel meghatározott potenciális MHC ligandok allélenként változó, de jelentős része glikozilált. Az autoantigének szignifikánsan több szekvenciaegyezeit hordoznak bakteriális fehérjékkel, mint a nem autoantigén humán fehérjék. A humán-bakteriális folytonos átfedő szekvenciák szintén kis hányada glikozilált, az N-glikozilált szekvencia egyezések ellenben nagyobb valószínűséggel kötődnek az MHC molekulákhoz, mint a nem glikoziláltak.

Az autoantigének több szekvencia egyezést tartalmaznak, erősebben N-glikoziláltak és mindkét tulajdonságuk hozzájárulhat ahhoz autoantigenitásukhoz.

Eredményeink egyrészt a további kísérletes munka számára szolgálnak támpontul, másrészt azonban már most átültethető egy részük a gyakorlatba. Felhasználhatók egy esetleges autoantigenitást prediktáló szoftver megalkotásához, illetve az epitóp predikciós algoritmusok finomításához. Ezek a szoftverek különösen fontosak a gyógyszertervezésben, akár oltóanyagok immunogenitásának fokozása, akár mesterségesen előállított, terápiás fehérjék immunogenitásának csökkentése szempontjából

7. Glikoimmuno-genomikai vizsgálatok a rheumatoid arthritisre jellemző, megváltozott glikozilációs hálózat génjeit illetően (SNP).

(SK Sivastava, M Mazán, M Pásztói, I Újfalussy, B Rojkovich, J Kelemen, B Visnyei, I Ungvári, C Szalai, P Antal, G Hullám, G Nagy, A Falus, E I Buzás. Association between glucuronidase-encoding genes (the antiaging KLOTHO and the lysosomal hydrolase-encoding GusB) and rheumatoid arthritis. Kézirat előkészületben)

Korábban igazoltuk, hogy a béta glükuronidáz enzim jelen van rheumatoid arthritises betegek synoviális folyadékában, és hozzájárulhat a degradálódó porc glükózaminglikán vesztéséhez, mely elősegítheti a synoviális sejtek invázióját.

A jelen munkánk során a béta glükuronidáz enzimet kódoló gének (az „öregedést gátló” KLOTHO és a lizoszómális hidroláz GusB) SNP-ít vizsgáltuk rheumatoid arthritises betegekben (n=171) és egészséges kontrollokban (n=353).

Elsőként a KLOTHO gén G-395A (promóter) és a C1818T (exon 4) polimorfizmusait vizsgáltuk. Eredményeink szerint a CT alléleket hordozó személyek közül többen szenvedtek rheumatoid arthritisben, mint a CC allélhordozók (OR: 1,546, C.I.= [1.009-2.370], p=0.04487). A ritka GC és CG haplotípusok szignifikánsak eltérő eloszlást mutattak a rheumatoid arthritises csoporton belül, mint a kontrollok körében (p=0.0034).

Vizsgáltuk a GusB gén SNP-inek lehetséges asszociációját rheumatoid arthritiszel. Meghatároztuk egy exonikus SNP (a GusB3 rs9530), egy 3' régió közelében található SNP (rs12538430) és egy intronikus SNP (rs1880556) előfordulását. A három vizsgált SNP közül

egyik sem mutatott szignifikáns összefüggést a rheumatoid arthritisszel. Azonban két SNP (az rs12538430 és az rs1880556) együttesen már szignifikáns asszociációt mutattak a rheumatoid arthritisszel.

Genotype and allele frequencies of KLOTHO and GusB polymorphisms in patients with RA and controls

Polymorphism frequencies, % 1/2*	Population no. (%)	Genotype 1/1,* no. (%)	Genotype1/2,* no. (%)	Genotype 2/2,* no (%)	Population differentiation	Total,	Allele 2
KLOTHO1 G-395A	RA Controls	113 (110,75) 186 (187,71)	46 (50,49) 112 (108,59)	8 (5,75) 14 (15,71)	p=0,250 ^x P=0,265 [#] P=0,301 [§]	167?	8/338 312?
KLOTHO2 C1818T	RA Controls	47 (55,19) 109 (106,41)	98 (81,63) 147 ((152,18)	22 (30,19) 57 (54,41)	p=0,009 ^x p=0,009 [#] p=0,011 [§]		
GusB3 rs9530	RA Control	47 (45,26) 43 (45,16)	60 (63,48) 69 (64,68)	24 (22,26) 21 (23,16)	p=0,530 ^x p=0,530 [#] p=0,588 [§]		
GusB4 rs12538430	RA Controls	43 (42,94) 48 (50,94)	64 (64,12) 68 (62,12)	24 (23,94) 16 (18,94)	p=0,982 ^x p=0,982 [#] p=1,000 [§]		
GusB5 rs1880556	RA Controls	25 (22,36) 20 (22,60)	57 (62,28) 68 (62,79)	46 (43,36) 41 (43,60)	p=0,337 ^x p=0,338 [#] p=0,364 [§]		

^x Pearson test

[#] Llr test

[§] Exact test