

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az endotoxin kötő szolúbilis CD14 lehetséges terápiás és
diagnosztikus alkalmazásai**

Vida András

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter



Debreceni Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2012

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	9
3.1. A CD14 molekula tulajdonságai.....	9
3.2 A CD14 molekula funkciója, LBP/TLR4/MD2 rendszer.....	9
3.3. A CD14 mediálta szignalizáció elemei.....	10
3.4. A CD14 molekula potenciális ligandjai.....	11
3.4.1. Szolúbilis molekulák.....	12
3.4.2. Blebek.....	13
3.4.3. Baktériumok.....	13
3.5. Szolúbilis CD14 típusai, keletkezésük és tulajdonságaik.....	14
3.6. sCD14 és betegségek összefüggése.....	14
3.6.1. Összefüggés bakteriális infekciókkal.....	14
3.6.2. Összefüggés egyéb betegségekkel.....	15
3.6.3. Akut fázis fehérje? Diagnosztikus marker?.....	15
3.7. Cirrhosis és a hozzá társuló infekciók klinikai jelentősége.....	16
3.7.1. A cirrhosis etiológiája és klinikuma.....	16
3.7.2. A cirrhosishoz társuló fertőzések klinikai jelentősége.....	16
3.7.3. A cirrhosishoz társuló fertőzések diagnosztikája.....	17
3.8. Fertőzések kezelésének problémái. Antibiotikum rezisztencia. Potenciális új terápiás szerek: Fc-fúziós fehérjék.....	17
3.8.1 Az Fc-fúziós fehérjék felépítése, típusai.....	18
3.8.2 Az Fc-rész jelentősége a molekula funkcióját illetően.....	19
3.8.3 Az Fc-fúziós fehérjék alkalmazásának területei.....	20
3.8.4 Fc-fúziós fehérjék - antimikrobiális szerek.....	20
4. Célkitűzések.....	22

5. Anyagok és módszerek.....	23
5.1 Betegek (cirrhosis)	23
5.2. A kísérletekhez használt LPS, bleb preparátum, baktérium- és gomba törzsek	23
5.3. A baktériumok és gombák FITC jelölése	24
5.4. PMN-ek, monocyták, macrophagok, dendritikus és SKBr-3 sejtek izolálása illetve tenyésztése	24
5.5. CD14/Fc és CD14/His klónozása és expressziója	25
5.6. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz/gombákhoz	26
5.7. Az opszonizált baktériumok fagocitózisa	27
5.8. A CD14/Fc opszonizált baktériumok <i>ex vivo</i> killingje	28
5.9. Neutrophil granulocyták chemiluminescenciájának aktivációja LPS-dal és blebvel	28
5.10. A LPS és blebek neutralizálása BPI-nel, plazmával és a CD14/Fc fúziós fehérjével – neutrofil kemilumineszcencia mérése, LAL assay, L-szelektin expresszió mérése	28
5.11. Szérum sCD14, LBP, PCT és CRP koncentrációjának mérése	29
5.12. Statisztikai analízis.....	30
6. Eredmények.....	31
6.1. A CD14/Fc és CD14/His expressziója és jellemzése	31
6.2. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz és gombákhoz.....	32
6.3. A CD14/Fc fokozza a Gram-negatív baktériumok fagocitózist.....	36
6.4. A CD14/Fc által opszonizált baktériumok CD16 és CD32 receptorokon keresztül fagocitálódnak.....	38
6.5. A CD14/Fc fokozza a Gram-negatív baktériumok <i>ex vivo</i> killingjét	39
6.6. A CD14/Fc és egyéb neutralizáló ágensek hatása különböző LPS preparátumok és <i>N. meningitidis</i> eredetű blebek biológiai tulajdonságaira	39
6.6.1. A CD14/Fc hatása a különböző LPS és bleb készítmények biológiai aktivitására	39
6.6.2. További neutralizáló ágensek hatásának vizsgálata a LPS és blebek biológiai aktivitására	41

6.7. A sCD14, mint biomarker – cirrhotikus betegek vizsgálata	42
6.7.1. A betegcsoport	42
6.7.2 Az APP szintek alakulása a fertőző és fertőzés nélküli betegek csoportjában....	42
6.7.3. Az egyes paraméterek diszkriminatív ereje a cirrhotishoz társuló fertőzések kimutatásában	42
7. Megbeszélés	45
7.1. CD14/Fc fúziós fehérje – potenciális antimikrobiális szer?	45
7.1.1. A CD14/Fc interakciója baktériumokkal	45
7.1.2. A CD14/Fc interakciója LPS-dal és külső membrán vezikulumokkal	48
7.2. sCD14 – használható biomarker a cirrhotishoz társuló fertőzések kimutatásában és/vagy előrejelzésében?	50
8. Irodalomjegyzék.....	53
9. Összefoglalás.....	63
11. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai relevanciái.....	65
12. Publikációs lista.....	66
13. Tárgyszavak/Keywords	68
14. Köszönetnyilvánítás	69
15. Támogatások	70
16. Függelék.....	71

1. Rövidítések jegyzéke

APC	Allophycocyanin
APP	Acute phase protein
BPI ₂₃	Bactericidal/permeability-increasing protein 23kDa-os fragment
BSA	Bovine serum albumin
CAP	Cationic antimicrobial protein
CD	Cluster of differentiation
cDNS	complementary DNA
CFU	Colony forming unit
CRP	C-reactive protein
DC	Dendritic cell
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fc	Fragment crystallizable
FcR	Fragment crystallizable receptor
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMLP	N-formyl-methionil-leucil-phenylalanine
FSC	Forward scatter
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HDL	High-density lipoprotein
HEK	Human embryonic kidney
HIV	Human immunodeficiency virus
HRP	Horseradish peroxidase
IFN- β	Interferon beta
IgG1	Immunoglobulin G1
IL	Interleukin
IQR	Interquartile range
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF3	Interferon regulatory factor 3
LAL	Limulus amebocyte lysate
LB	Luria-Broth
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mCD14	Membrane CD14
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MD2	Myeloid differentiation protein 2
MHC-I	Major histocompatibility complex
MN	Mononuclear

MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
OD	Optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCT	Procalcitonin
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyde
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PMN	Polymorphonuclear
PRR	Pattern recognition receptor
RA	Rheumatoid arthritis
RFU	Relative fluorescence unit
ROC	Receiver operating characteristic
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
S.O.C	Super optimal broth with added glucose
sCD14	Soluble CD14
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SF	Synovial fluid
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SKBr-3	Memorial Sloan-Kettering breast adenocarcinoma cell line 3
SLE	Systemic lupus erythematosus
SSC	Side scatter
TBK1	TANK binding kinase 1
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR domain-containing adapter including IFN- β

2. Bevezetés

A CD14 molekula az 5q23-31 kromoszómán lokalizált gén terméke, egy 356 aminosavból álló glikoprotein, melyet elsősorban myeloid sejtek expresszálnak. A CD14 előfordul membrán kötött (mCD14) és szolúbilis (sCD14) formában is. Míg a mCD14 egy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgonyon keresztül ágyazódik a sejtmembránba, a sCD14 vagy a mCD14 lehasadásával keletkezik, vagy közvetlenül szekretálódik.

A CD14 elsődleges funkciója a Gram-negatív baktériumok külső membránjából származó lipopoliszacharid (LPS) felismerése. A LPS és CD14 interakciójához szükséges a lipopoliszacharid kötő fehérje (LBP) jelenléte, ami a LPS micellák monomerizálásában, és a LPS monomerek CD14-hez való eljuttatásában játszik fontos szerepet. Mivel a CD14 nem rendelkezik transzmembrán régióval, a jelátviteli folyamat más membránfehérjék, a myeloid differenciációs protein (MD2) és a transzmembrán régióval rendelkező Toll-like receptor 4 (TLR4) segítségével inicializálódik.

A CD14 a LPS mellett más mikrobiális eredetű molekulákat is képes felismerni. Bár az irodalmi adatok kissé ellentmondásosak ebben a kérdésben, számos publikáció alapján a CD14 ligandjai közé tartoznak a peptidoglikán, lipoteikolsav, lipoarabinomannán és a lipoproteinek, de leírták kötődését bakteriális és fungális eredetű sejtfa fragmentumokhoz, sőt teljes kórokozókhoz is. Széles ligandspecifitása következtében a CD14 molekulát joggal nevezik mintázatfelismerő receptornak (PRR).

A sCD14 koncentrációja összefüggést mutat fertőzésekben az infekció súlyosságával, illetve számos más betegség, például autoimmun betegségek, sarcoidosis, psoriasis vagy rheumatoid arthritis (RA) aktivitásával. Szérumkoncentrációja korrelál egy akut fázis fehérje (APP), a C-reaktív protein (CRP) mennyiségével, ami felveti a sCD14 diagnosztikus markerként való alkalmazásának lehetőségét is. Különösképpen igaz lehet ez cirrhosisban, ahol a máj károsodása miatt, a májban termelődő klasszikus APP markerek csak korlátozott mértékben teszik lehetővé a cirrhosisban jelentkező fertőzések diagnosztizálását. Ezekben az esetekben érdemes megvizsgálni a sCD14 koncentráció monitorozásának lehetőségét, hiszen a sCD14 elsősorban nem a májból kerül a keringésbe, így még egy súlyosabb májkárosodás esetén is adhat felvilágosítást egy esetleges fertőzés jelenlétéről.

Az elmúlt évtizedekben az antibiotikumok túlzott és gyakran felelőtlen használata antibiotikum rezisztencia kialakulásához és elterjedéséhez vezetett. Ezzel párhuzamosan az antibiotikumok megjelenésének üteme jelentősen lassult, egyre kevesebb mozgásteret engedve az ilyen típusú fertőzések leküzdésére. A lehetőségek szűkülésével egyre nagyobb

igény mutatkozik arra, hogy hatásmechanizmusukban új antimikrobiális molekulákat hozzunk létre, melyek a patogének széles spektrumának konzervatív struktúráit ismerik fel, ezzel csökkentve a rezisztencia kialakulásának lehetőségét. Az egyik típusát az ilyen potenciális új antimikrobiális szereknek a PRR/Fc fúziós fehérjék alkotják. Ezek a molekulák egyfajta mesterséges antitestként működve, a molekula mintázatfelismerő receptorával kötődnek a mikrobiális sejtfal komponensekhez, és a humán IgG1 Fc részével identikus Fc rész segítségével immunológiai funkciókat aktiválva segítenek a kórokozók neutralizációjában. A CD14 molekula széles ligandspecifitása miatt kifejezetten alkalmasnak ígérkezik egy ilyen mesterséges antitestben a mintázatfelismerő receptor feladatának ellátására.

A kórokozók elpusztításán túl nagy jelentősége van – különösen a szeptikus állapotok terápiájában – a baktériumokból felszabaduló biológiailag aktív molekulák neutralizálásának is. Ezek megjelenhetnek izolált formában, de nem ritkán a külső membránból lefűződő vezikulák, „bleb”-ek alakjában is. A *Neisseria meningitidis* egy Gram-negatív kórokozó, mely kifejezetten hajlamos ilyen külső membrán vezikulák képzésére. Ezeknek a partikulumoknak az összetétele gyakorlatilag megegyezik a kórokozó külső membránjának összetételével, ezért magas LPS tartalom jellemzi. Valószínűleg a fokozott blebképződés és a bleb-ekből felszabaduló LPS áll a *N. meningitidis* fertőzésekben tapasztalt magas LPS koncentrációk hátterében. Mivel a bleb-ek LPS tartalmú partikulák, ezért felmerül annak a lehetősége is, hogy egy CD14/Fc fúziós fehérje elősegítheti egy ilyen fertőzésben a blebek és a LPS neutralizációját, csökkentve ezzel a magas endotoxin koncentráció káros hatásait.

Munkánk során egy CD14/Fc fúziós fehérjét hoztunk létre, és arra kerestünk választ, hogy képes-e ez a fehérje specifikusan kötődni különböző kórokozókhoz, illetve képes-e fokozni ezek fagocitózisát és elpusztítását. Megvizsgáltuk, hogy neutralizálja-e a CD14/Fc molekula különböző LPS preparátumok és *N. meningitidis* eredetű blebek biológiai hatását, illetve, hogy mennyire hasonlóan viselkednek a LPS molekulák és a bleb részecskék egyéb neutralizáló ágensekkel szemben. Végül a sCD14 egy potenciális diagnosztikai alkalmazását vizsgáltuk cirrhotikus betegek esetében, arra keresve választ, hogy a szérumban sCD14 mérése képes-e jelezni vagy megerősíteni a cirrhotishoz társuló fertőzések jelenlétét.

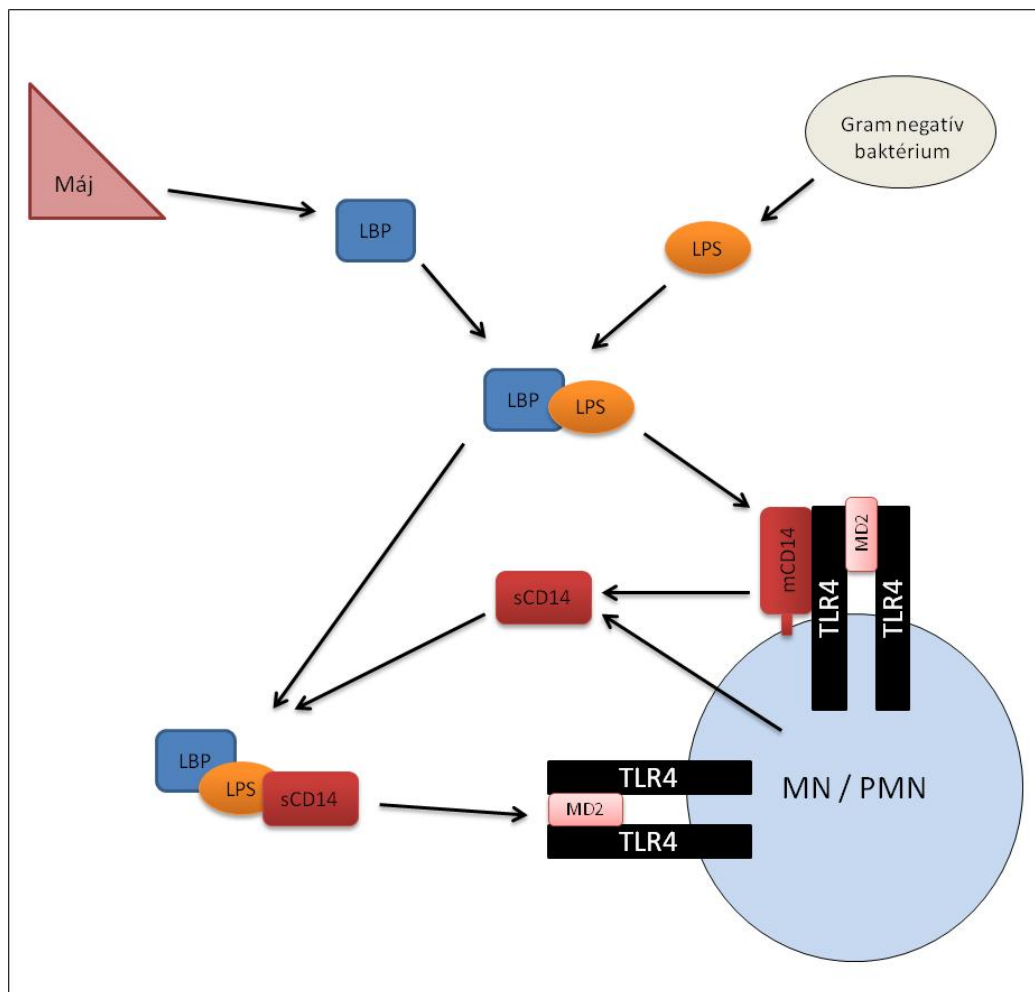
3. Irodalmi áttekintés

3.1. A CD14 molekula tulajdonságai

A CD14 molekula a veleszületett immunrendszer mintázatfelismerő receptora, melyet először monocyták és macrophagok felszínén azonosítottak 1981-ben [1]. A fehérjét kódoló gén az 5q23-31 kromoszómán lokalizálódik az IL-3, GM-CSF, EGF receptor, β_2 adrenerg receptor és PDGF génjeivel együtt [2, 3]. A gén két exonból áll, melyről egy 1,4 kb méretű mRNS transzkript íródik át [4]. A kész fehérje egy 356 aminosavból álló glikoprotein, melyet elsősorban myeloid sejtek expresszálnak, és előfordul membrán kötött (mCD14, 55 kDa) és szolúbilis formában is (sCD14, 48 kDa és 56 kDa) [5-8]. A mCD14 nem rendelkezik transzmembrán régióval, hanem egy GPI horgony segítségével ágyazódik a membránba [9, 10]. A mCD14 fehérjét magas expressziós szintje miatt elterjedten használják monocyták és macrophagok azonosítására immunhisztokémiai eljárásokban és áramlási citometriában is. A mCD14 nagyobb számban monocytákon (~100.000/sejt), és jóval kisebb számban neutrofil granulocytákon (~4.000/sejt) fordul elő, míg a sCD14 koncentrációja a szérumban néhány $\mu\text{g/ml}$ nagyságrendű [11-16].

3.2 A CD14 molekula funkciója, LBP/TLR4/MD2 rendszer

A CD14 molekula elsődleges funkciója a szervezetbe bekerülő, Gram-negatív baktériumok membránjából felszabaduló LPS felismerése és a sejtaktiváció beindítása. A LPS felismerés és a jelátviteli folyamat inicializálása a LBP/TLR4/MD2 rendszeren keresztül történik [17, 18]. A CD14-LPS interakciót a LBP facilitálja, mely monomerizálja a LPS molekulákat, és elősegíti azok eljuttatását a CD14-hez. Az LBP egy akut fázis fehérje, szerkezete homológiát mutat a BPI fehérjével, fertőzésekben a koncentrációja jelentősen megemelkedhet. Az LBP által monomerizált szabad LPS a CD14 molekulán keresztül a sejtmembránon található TLR4/MD2 komplexhez jut, ahol a LPS az MD2 molekulán keresztül kerül a transzmembrán régióval rendelkező TLR4-hez, ami az intracelluláris jelátvitel kaszkád beindításához vezet [17, 18]. (1. ábra)



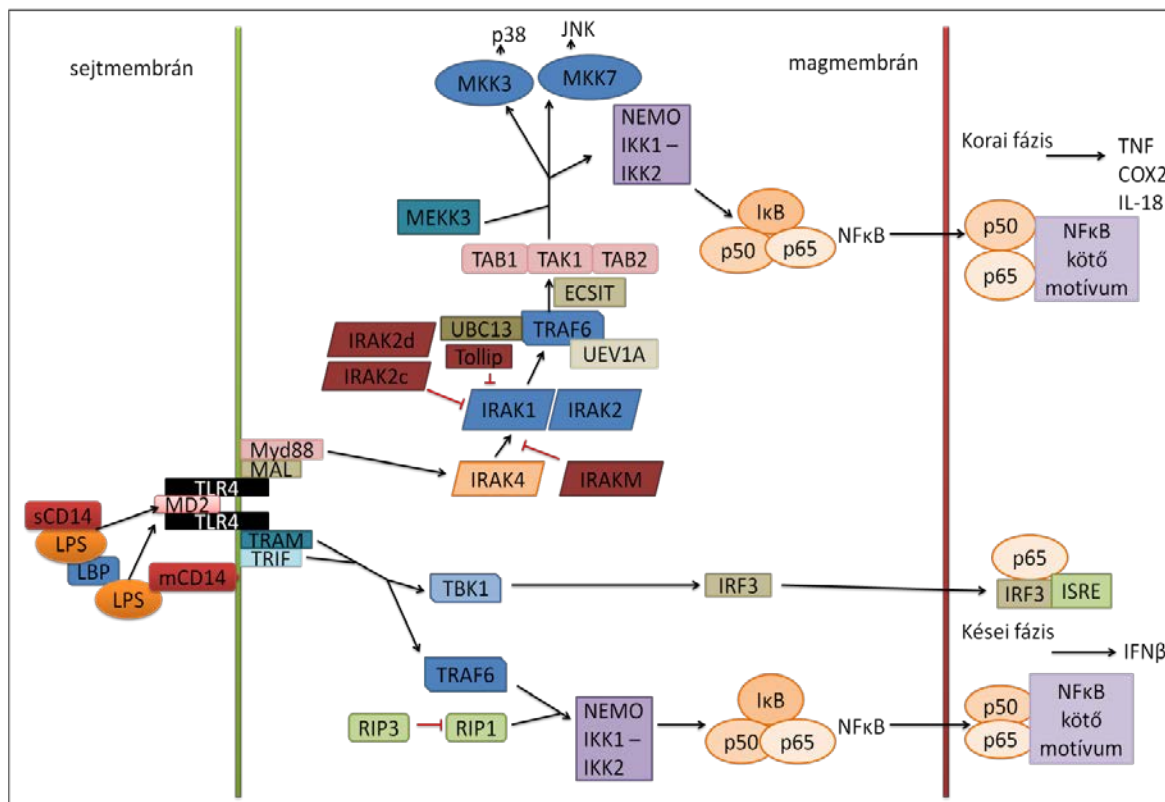
1. ábra: A LPS – mCD14 – sCD14 – LBP – TLR4/MD2 kölcsönhatása

A Gram-negatív baktériumok membránjából felszabaduló LPS monomerizálását és CD14-hez szállítását a májban termelődő LBP végzi. A sCD14 vagy közvetlenül szekretálódik, vagy a mCD14 lehasadásával keletkezik. A CD14 mindkét formája részt vesz a LPS transzportálásában a TLR4/MD2 receptor rendszerhez, ahol a transzmembrán régióval rendelkező TLR4 indítja el a sejten belüli jelátviteli kaszkádot.

3.3. A CD14 mediálta szignalizáció elemei

A jelátviteli útvonal a TLR4 aktiváció után kettéágazik a myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) dependens, illetve a MyD88 independens útra. A MyD88 dependens útvonal az nuclear factor-kappa B (NF- κ B) és mitogen-activated protein kinase (MAPK) kináz útvonalak inicializálásához vezet, ami számos pro-inflammatórikus gén „bekapcsolódását” vonja magával az IL-1 receptor associated kinase (IRAK) és tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) aktivációján keresztül. A TRAF6 inicializálódása a MyD88 independens útvonalon is megtörténik a TIR domain-containing adapter including IFN- β (TRIF) és TRIF-related adapter molecule (TRAM) adaptereken

keresztül, valamint aktiválódik a TANK-binding kinase 1 (TBK1) is, melynek az eredménye az interferon regulatory factor 3 (IRF3) által indukált interferon beta (IFN- β) termelés lesz [18] (2. ábra).



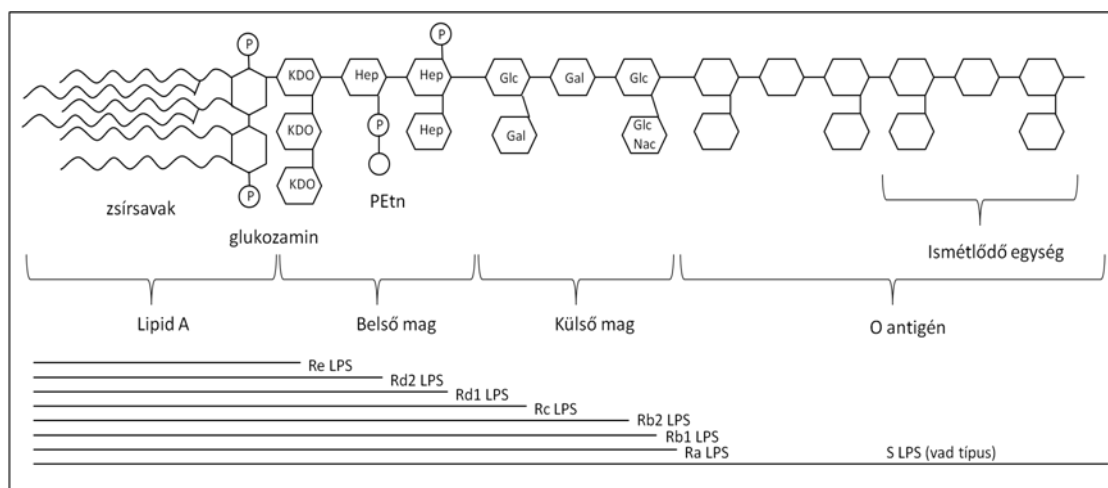
2. ábra: A TLR4 mediálta szignalizáció

A TLR4 mediálta szignalizáció a Myd88 dependens és a Myd88 independens jelátviteli utakra ágazik szét. A Myd88 independens útvonal a TRIF és TRAM adapterekén keresztül a TBK1 és TRAF6 inicializálódásához vezet. A TBK1 aktivációjának következménye az IRF3 által indukált IFN β termelés. A TRAF6 aktiváció a Myd88 dependens útvonalon is bekövetkezik, melynek eredménye az NF- κ B és MAPK kináz útvonalak bekapcsolódása, ami több pro-inflammatorikus gén stimulációját és az általuk kódolt fehérjék termelését vonja maga után. (Az ábra Palsson-McDermott és munkatársai (2004) ábrájának alapján, annak módosításával készült) [18].

3.4. A CD14 molekula potenciális ligandjai

A CD14 molekula 1981-es felfedezése óta – bár ellentmondó adatok is láttak napvilágot – egyre inkább elismertté válik a molekula széles ligandspecifitása [1]. Bár a CD14 legfontosabb szerepe a Gram-negatív baktériumok membránjából származó LPS szignalizációjában van, jelentős számú publikáció jelent meg az elmúlt 15 évben, melyek a CD14 egyéb ligandjait írják le, amik a legkülönbözőbb bakteriális eredetű molekuláktól

kezdve, gombákon és apoptotikus testeken át, egészen a mikrobiális sejtfal komponensekig, sőt teljes baktériumokig terjednek [19-23]. A CD14 sokrétű funkciója és széles ligandspecifitása következtében - annak ellenére, hogy transzmembrán régió híján a jelátviteli mechanizmusokat közvetlenül nem képes elindítani - valódi mintázatfelismerő receptorként (PRR) funkcionál [19].



3. ábra: A LPS szerkezete

A vad típusú LPS molekulát a zsírsavakból és glukózaminból álló lipid A és az ehhez kapcsolódó, szénhidrátokból felépülő belső- és külső mag, valamint az O antigén alkotja. Az R mutánsok esetében az O antigén hiányzik. Attól függően, hogy a konzervatív belső- és külső mag mekkora része hiányzik a LPS molekulák csoportokba sorolhatók (Ra, Rb1, Rb2, Rc, Rd1, Rd2, Re). Az Re mutánsok esetében csak az immunológiai funkciókért felelős lipid-A egység van jelen. (Az ábra Carla Grosselaar-de Haas „SAP, A novel LPS binding protein” című Ph.D. disszertációjának (1999) ábrája alapján, annak módosításával készült.)

3.4.1. Szolúbilis molekulák

A CD14 molekula legfontosabb, de mindenképpen legismertebb és legjobban tanulmányozott ligandja a Gram-negatív baktériumok külső membránjának esszenciális komponense a LPS. Különböző baktériumcsaládok LPS struktúrája nagy hasonlóságot mutat [24]. Az *Enterobacteriaceae* család vad típusú LPS molekulája (S-típus) az O-antigénből, az R-magból és a lipid-A komponensekből áll [25]. Az O-antigén, mely ismétlődő szacharid egységekből felépülő poliszacharid, az oligoszacharid R-maghoz kapcsolódik, mely az egész szacharid struktúrát a LPS lipid komponenséhez, a lipid-A egységhez kapcsolja. Bizonyos esetekben a LPS O-antigén poliszacharidja hiányozhat (R-típus), ami hozzáférhetőbbé teszi az immunogenitásért felelős lipid-A részt az immunrendszer számára [26-30] (3. ábra). A

lipopoliszacharidon kívül a CD14 molekulának számos más ligandját is leírták, ilyenek például a *Mycobacterium* eredetű lipoarabinomannán, a szolúbilis peptidoglikán, a *Blastomyces dermatitidis* WI-1 antigénje, a *S. aureus* sejtfal kivonata, a *Pseudomonas*-ból izolált poliuronsav, a muramilpeptid, és a *Borrelia burgdorferi* külső membrán lipoproteinjei [20, 22, 31]. Ezen molekuláknak közös jellemzője, hogy valamennyien az őket termelő mikrobák esszenciális, konzervatív struktúrái, ezért kiemelkedően jó terápiás célpontot jelenthetnek.

3.4.2. Blebek

A Gram-negatív baktériumok külső membránjából nem csak szabad LPS szabadul fel, hanem külső membrán vezikulák, úgynevezett blebek is képződhetnek. A bleb képződés különösen kifejezett a *N. meningitidis* esetében ahol *in vivo* is kimutatták blebek jelenlétét szérumban és cerebrospinalis folyadékban egyaránt [32]. Mivel a blebek összetétele lényegében megegyezik a külső membrán összetételével, igen nagy mennyiségben tartalmaz LPS-ot, és ez hozzájárulhat a *N. meningitidis* fertőzésekben mért igen magas (akár 300 µg/ml) endotoxin koncentrációk kialakulásához, és a betegség rendkívül gyors, magas lázzal járó lefolyásához [32-35]. A *N. meningitidis* LPS a klasszikus CD14-LBP, majd TLR4/MD2 mediált útvonalon aktiválja az immunrendszert [36, 37], de ezen kívül fontos szerepe van az ép baktériumok fehérvérsejtekkel való interakciójában is egy CD14 mediált útvonalnak. Rendkívül fontosak ugyanakkor a specifikus anti-meningococcus antitestek és az intakt komplement rendszer is a kórokozóval szembeni védekezésben [38].

3.4.3. Baktériumok

A mikrobiális eredetű ligandokon kívül több esetben leírták különböző Gram-negatív baktériumok CD14 dependens fagocitózisát is: Peterson és munkatársai beszámolnak opszonizálatlan *Mycobacterium tuberculosis* CD14 mediált felvételéről, valamint Onozuka és munkatársai vad típusú *S. typhimurium* macrophagok általi fagocitózisában igazolták a CD14 jelentőségét [21, 39]. Schiff és munkatársai szérum által opszonizált *Escherichia coli* fagocitózisában írták le mind a mCD14, mind a sCD14 szerepét [40]. Janot és munkatársai egy Gram-pozitív intracelluláris kórokozó, a *Listeria monocytogenes* esetében igazolták a CD14 részvételét a TLR2-vel együttműködve a baktérium felismerésében és a fertőzés leküzdésében [41]. Bár a CD14 szerepe egyes baktériumok felismerésében és fagocitózisában mára elfogadott tény, eddig mindössze egyetlen munkacsoport írta le a sCD14 és a mCD14 közvetlen kötődését baktériumokhoz [42, 43].

3.5. Szolúbilis CD14 típusai, keletkezésük és tulajdonságaik

A mCD14 egy GPI horgony segítségével ágyazódik a sejtek membránjába, míg a sCD14 vagy a GPI horgonyzás elkerülésével közvetlenül szekretálódik (56 kDa-os forma) [6, 44-46], vagy a mCD14 molekulákból, a GPI horgony lehasadásával („shedding”) keletkezik (48 kDa-os forma) [44, 45]. A közvetlenül szekretálódó sCD14 nagyobb mérete (56 kDa) annak köszönhető, hogy a fehérje ebben az esetben megtartja a C terminális szignál szekvenciáját, ami egyébként a fehérje érése során kicserélődik a GPI horgonyra [44, 45]. Ez a szekréción folyamat proteáz inhibitorokkal nem gátolható [45]. A kisebb méretű sCD14 (48 kDa), mely a GPI horgony lehasadásával keletkezik, sejtaktiváció következtében kerül a keringésbe. Ez a folyamat membrán asszociált szerin proteázok működéséhez köthető, és proteáz inhibitorokkal *in vitro* gátolható [45, 47]. A shedding hátterében egyfajta védekező mechanizmus állhat, mely megakadályozza a sejtek aktivációjakor az inflammatórikus folyamatok elszabadulását [47, 48].

3.6. sCD14 és betegségek összefüggése

A sCD14 központi szerepet játszik a Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzésekben, de széles ligandspecifitása és a veleszületett immunrendszerben betöltött fontos szerepe következtében a sCD14 szintjének változása összefüggésbe hozható a bakteriális fertőzéseken kívül számos más kórképpel, például autoimmun betegségekkel és szerepet játszhat a humán immundeficiencia vírus/hepatitis C vírus (HIV/HCV) ko-fertőzések terápiájának kimenetelében is [49].

3.6.1. Összefüggés bakteriális infekciókkal

Mintázatfelismerő receptor lévén, a sCD14 kulcsfontosságú szerepet játszik az infekciók korai szakaszában a citokin termelés beindításában, és ezen keresztül különböző immunológiai válaszreakciók inicializálásában. A sCD14 szintje korrelál az infekció súlyosságával, a fiziológiásan 2-4 µg/ml tartományban jelenlévő fehérje koncentrációja lokális fertőzésekben és szepszisben is jelentősen megemelkedhet [12, 50]. A sCD14 termelődésének pontos mechanizmusa és oka az infekciók során nem teljesen ismert, de valószínűsíthető, hogy a keletkező sCD14 elsősorban nem *de novo* szintetizálódik, hanem a membránkötött forma lehasadásával keletkezik. Ezt támasztja alá, hogy szepszisben, politraumas esetekben és égési sérüléseknél a sCD14 koncentrációjának emelkedésével a sejteken előforduló mCD14 száma csökken [12, 46]. Ennek kettős pozitív hatása lehet. Egyrészt egy súlyosabb fertőzés során a mCD14 mennyiségének csökkenésével a sejtaktiváció is csökken, így kisebb eséllyel alakul ki

szeptikus sokk, valamint a megemelkedett számú sCD14 molekula a bakteriális ligandokhoz kötődve részt vehet azok neutralizálásában, aminek szintén szerepe lehet az inflammatorikus reakciók eszkalálódásának megakadályozásában [48, 51]. Ugyanakkor az is ismert, hogy fertőzésekben a magasabb sCD14 koncentráció korrelál a mortalitással, bár nem egyértelmű, hogy ezekben az esetekben a magasabb sCD14 koncentráció oka a mortalitás emelkedésének, vagy egy súlyosabb, és ezért nagyobb eséllyel rosszabb kimenetelű fertőzés következménye [46]. Emellett nem zárható ki a sCD14 *de novo* szintézise sem, hiszen termelődése IL-6 által indukálható és szérumkoncentrációja jól korrelál egy jól ismert akut fázis fehérjé, a CRP szérumkoncentrációjával [52].

3.6.2. Összefüggés egyéb betegségekkel

A sCD14 szintjének változását nem csak infekciókban írták le, hanem számos más immunrendszert érintő kórképben is találtak példát a betegség progressziójával korreláló sCD14 koncentrációra. Sarcoidosis-ban szenvedő betegek bronchoalveolaris mosófolyadékában, valamint más autoimmun betegségekben, psoriasis-ban és szisztémás lupus erythematosusban (SLE) valamint gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek szérumban is megemelkedett sCD14 koncentrációt mértek [53-56]. A sCD14 koncentráció szintén emelkedett értéket mutat korai gyermekkori fogszuvasodásban szenvedő gyerekek nyálából származó mintákban, ami ezen betegség gyulladásos jellegére utal, és lehetővé teszi a betegség követését a sCD14 koncentráció mérésével [57]. Ezen kívül sarcoidosis-ban és extrinsic allergiás alveolitis-ben az emelkedett sCD14 mellett az alveoláris macrophagok, valamint rheumatoid arthritisben a perifériás monocytá populáció is megnövekedett CD14 expressziót mutat [54, 56, 58], továbbá a CD14 pozitív monocyták intesztinális mucosába való vándorlásának és az ottani pro-inflammatorikus citokintermelésüknek szerepe lehet a Crohn betegség és colitis ulcerosa kórképében is [59].

3.6.3. Akut fázis fehérje? Diagnosztikus marker?

A sCD14 fehérje koncentrációjának változása különböző testnedvekben jól korrelál a fertőzések súlyosságával, az autoimmun betegségek aktivitásával, és más immunrendszert érintő kórképekkel is. Elsősorban gyulladásos kórképekben merül fel a sCD14 diagnosztikus markerként való alkalmazása. Autoimmun eredetű arthritises és fertőzés-mediált arthritises (reaktív arthritis) betegek szérumban és synovialis folyadék (SF) sCD14 koncentrációját összehasonlítva nem találtak szignifikáns különbséget, és a sCD14 koncentrációk nem korreláltak a SF leukocita számmal, felvetve annak a lehetőségét, hogy a keletkező sCD14

nem csak proteáz mediálta shedding-en keresztül kerül a keringésbe, hanem *de novo* is szintetizálódik [52]. Emellett mindkét betegcsoportban szignifikáns emelkedést tapasztaltak az egészséges kontrollokhöz képest, továbbá a sCD14 koncentráció jól korrelált a betegség lefolyásával és a CRP koncentrációval, valamint a máj APP termelését szabályozó citokinjének, az IL-6-nak a koncentrációjával is [52]. Real-time PCR vizsgálatok megerősítik mRNS szintjén a CD14 termelés IL-6 általi indukálhatóságát is [52]. Ezek alapján a sCD14 molekula APP-ként viselkedik, és érdemes megvizsgálni a diagnosztikus markerként való felhasználhatóságát.

3.7. Cirrhosis és a hozzá társuló infekciók klinikai jelentősége

A cirrhosis a máj krónikus megbetegedésének a következménye, melynek során a máj szövege hegszövegté alakul és a máj funkciója csökken. A leggyakoribb komplikációk a hasüregben felgyülemelő folyadék (ascites), varix vérzések, hepatikus encephalopathia és a különböző bakteriális fertőzések kialakulásának megnövekedett kockázata.

3.7.1. A cirrhosis etiológiája és klinikuma

A betegség kialakulásának hátterében leggyakrabban alkoholizmus, valamint Hepatitis B vagy C vírus fertőzés áll, de számos más oka is lehet a májkárosodás kialakulásának, mint például cukorbetegség, elhízás, autoimmun folyamatok, illetve a vas anyagcserét érintő öröklődő betegségek, cysticus fibrosis, illetve hepatotoxikus gyógyszerek használata is. A diagnózis felállításának legbiztosabb módja a májbiopszia, de ha az egyéb klinikai, laboratóriumi és radiológiai eredmények alátámasztják a cirrhosist akkor a májbiopszia elkerülhető.

3.7.2. A cirrhosishoz társuló fertőzések klinikai jelentősége

A cirrhosis egyik leggyakoribb komplikációja valamilyen bakteriális fertőzés kialakulása, melyeknek széles skálája vezethet a máj állapotának további romlásához, és végül a cirrhosisban szenvedő beteg elhalálozásához [60, 61]. Ezen kívül a bakteriális fertőzések további komplikációk kialakulását okozhatják, mint például varix vérzés, hepatikus encephalopathia, veseelégtelenség és véralvadási zavarok [62]. A különböző fertőzések jelentősen megnövelik a mortalitást, cirrhosisban az elhalálozások mintegy 30-50%-a valamilyen fertőzéshez köthető [60-63].

3.7.3. A cirrhosishoz társuló fertőzések diagnosztikája

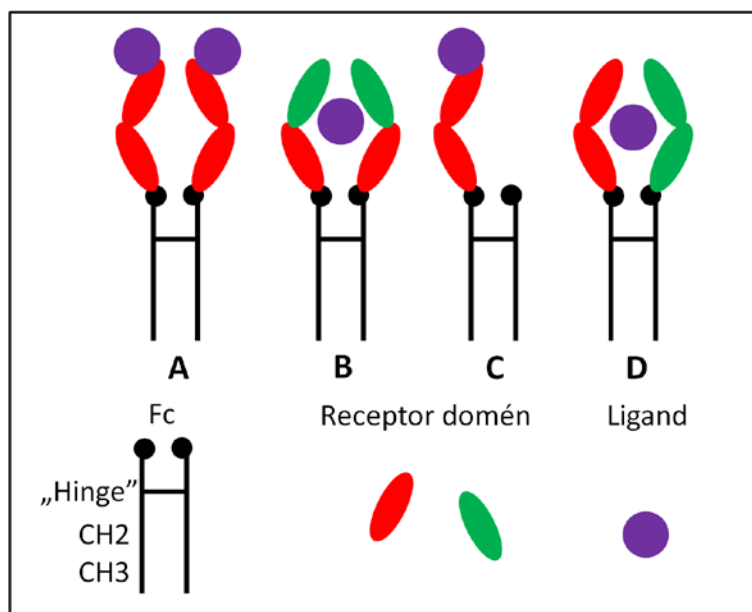
Cirrhosisban a fertőzések hozzávetőlegesen 50%-a atípusos klinikai megjelenésű, továbbá a cirrhosis néhány jellemző sajátossága is megnehezíti a fertőzések azonosítását [64]. A bacteraemia-hoz kapcsolt szerológiai markerek emelkedése korai jele az infekciónak, mely lehetővé teszi a fertőzés hatékony felismerését. Azonban ezeket az akut fázis fehérjét elsősorban a máj szintetizálja, ezért cirrhosisban sokkal kevésbé hatékonyak a fertőzés kialakulásának figyelemmel kísérésére [65]. A másik oldalról pedig fertőzés független faktorok, mint hepatocellularis carcinoma (HCC), necrosis, vagy a májszövet lokális gyulladásos reakciója illetve bakteriális transzlokáció is indukálhatja ezen markerek szintézisét, ami még jobban korlátozza klinikai használhatóságukat [66-68]. Korábbi tanulmányok szerint a CRP és a procalcitonin (PCT) a legmegbízhatóbb markerek a fertőzések felismerésére, de diagnosztikai pontosságuk és határértékeik nem pontosan meghatározottak [66, 69-72].

3.8. Fertőzések kezelésének problémái. Antibiotikum rezisztencia. Potenciális új terápiás szerek: Fc-fúziós fehérjék

Az antibiotikum terápiák abúza miatt kialakuló antibiotikum rezisztens kórokozók ellen egyre nehezebb felvenni a küzdelmet, különösen azokban az esetekben, melyekben a fertőzött egyén immunrendszere nem működik megfelelően, például újszülöttek, szerzett- vagy öröklött immundeficiencia, vagy hematológiai malignómák esetében [73]. A problémát súlyosbítja, hogy az elmúlt évtizedben jelentősen csökkent az új antibiotikumok megjelenésének üteme, ami az antimikrobiális terápiákkal kapcsolatos kutatást új irányokba tereli [73, 74]. Eddig több száz újszerű antimikrobiális molekula került tesztelésre, például humán kationos fehérjék, pentraxinok, RNázok, foszfolipázok, peptidoglikán felismerő fehérjék, kollektinek, defenzinek, valamint ezen fehérjéken és oligopeptideken alapuló kisebb peptidek [75, 76]. Az antimikrobiális szerek kutatásának viszonylag új iránya egyes antimikrobiális hatású molekulák kombinálása az immunrendszer egyéb komponenseivel. Erre példa a kationos fehérjék, mint a cationic antimicrobial protein 18 (CAP18) vagy bactericidal/permeability increasing protein (BPI₂₃) fúziója a humán IgG Fc részéhez [77, 78]. Az így keletkező fehérjék mesterséges antitestként viselkedve nemcsak közvetlen baktericid hatással bírhatnak, hanem az Fc részen keresztül bekapcsolják az immunrendszert a kórokozó neutralizálásának folyamatába [77-81].

3.8.1 Az Fc-fúziós fehérjék felépítése, típusai

A biotechnológiai és molekuláris genetikai eljárások fejlődésével megnyílt az út változatos mesterséges fehérjék létrehozására. A receptor/Fc fúziós fehérjék közös tulajdonsága, hogy egy vagy több receptor molekula, esetleg receptor domén kapcsolódik a humán IgG1 Fc részéhez. A receptor/Fc fúzió génsebészeti eljárással, vagy kémiai reakcióval hozható létre. A génsebészeti eljárás során a receptor fehérjét, esetleg doménjeiket kódoló cDNS szakaszokat kötik össze a humán IgG1 Fc részét kódoló cDNS-sel, majd valamilyen expressziós vektorral *in vitro*, illetve bizonyos esetekben *in vivo* expresszálják azokat [79, 80]. A fúziós fehérjék közös tulajdonságai, hogy az Fc rész intakt állapotban (CH2, CH3 domén és a kapocs régió) megmarad, és az N terminális részhez kapcsolódnak a receptor fehérjék [82]. Attól függően, hogy a teljes receptor, vagy csak receptor domén(ek), illetve, hogy egy vagy több receptor kapcsolódik az Fc részhez, a fúziós fehérjék a felépítésük alapján négy csoportba sorolhatók (4. ábra). A legegyszerűbb eset, amikor két intakt receptor fehérje homodimert alkotva kapcsolódik az Fc részhez (4. ábra, A). Bizonyos esetekben növelhető a ligandkötő képessége a fúziós fehérjének, ha intakt receptor helyett csak a ligandkötő domének, esetleg több receptor releváns ligandkötő doménje kapcsolódik az Fc részhez (4. ábra, B). Más esetben előfordulhat, hogy előnyösebb csak egyetlen receptort vagy receptor domént használni az esetleges sztérikus akadályozás elkerülése érdekében (4. ábra, C). A receptor/Fc fúziós fehérjék negyedik csoportjában különböző receptorok heterodimert alkotva kapcsolódnak az Fc részhez, ami szükséges lehet olyan esetekben, amikor a fuzionáltatott receptorok natív formájukban is egy másik receptorral együtt heterodimert formálva képesek csak a ligandjukat kötni (4. ábra, D) [82].



4. ábra. A receptor/Fc fúziós fehérjék főbb típusai. (A) Dimer fúziós fehérje, melyben a receptor homodimer formában van jelen. (B) Különböző receptorok doménjei vannak fuzionálva az Fc részhez. (C) Monomer Fc fúzió, melyben egyetlen receptor fehérje kapcsolódik az Fc részhez. (D) Heterodimer Fc fúziós fehérje, melyben két különböző receptor fuzionálódik az IgG Fc részéhez. (Az ábra Huang és munkatársai (2009) ábrájának alapján, annak módosításával készült [82].)

3.8.2 Az Fc-rész jelentősége a molekula funkcióját illetően

A receptor/Fc molekulák Fc részének számos előnyös tulajdonsága van mind a „kész” fehérje alkalmazási területein, mind a fehérje expresszálása és tisztítása során. Az Fc fúzió bizonyos esetekben segíthet az expresszió hatékonyságának növelésében [83], valamint az Fc rész protein A/G oszlop segítségével felhasználható a fehérje tisztítására is [84]. A biotechnológiai előnyökön kívül a fehérje felhasználási területein is hasznos tulajdonságokat kölcsönöz a fúziós fehérjének az Fc rész jelenléte. Kis méretű fúziós partner esetében megakadályozza azok vesén keresztüli kiválasztódását, ezzel növelve a fehérje féléletidejét és csökkentve pl. a kationos fehérjék vesekárosító hatását [75]. Az Fc rész segítséget nyújthat a molekula FcRn receptorokon keresztüli felvételében az intestinalis vagy pulmonaris epithel sejteken keresztül [85]. Egy másik fontos hatása lehet az Fc általi dimerizációnak, hogy megnövelheti a receptorkomponensek eredeti ligandjukhoz való aviditását, ahogyan azt korábban, egyetlen közleményben, affibody-Fc kimérák esetében tapasztalták [86]. Szintén fontos szempont lehet, hogy az Fc rész megőrzi eredeti funkcióját, és hasonlóan, mint a komplett IgG esetében, immunológiai effektor funkciókat lát el, mint a komplement aktiválás vagy a fúziós fehérje által opsonizált molekulák FcR receptorokon keresztüli fagocitózisának mediálása [77, 78, 82, 85].

3.8.3 Az Fc-fúziós fehérjék alkalmazásának területei

Az Fc fúzió előnyös tulajdonságait számos esetben kihasználja a gyógyszer- és biotechnológiai ipar, aminek következtében jó néhány hasonló elven létrehozott készítmény van forgalomban. Egy részüket kutatási segédanyagként használják fel, más részük pedig a fehérje alapú terápiák tárházát gazdagítja [82]. Az első szolúbilis receptor/Fc fúziós fehérje, melyet sikeresen alkalmaztak az Etanercept (Enbrel®), mely tumor necrosis factor α (TNF- α) receptor II extracelluláris doménjét tartalmazza az IgG1 Fc részéhez fuzionáltatva. Ez a készítmény hatásosan neutralizálja mind a membránkötött, mind a szolúbilis TNF- α hatását, ezáltal csökkentve az inflammatorikus citokinek, szérum mátrix metalloproetázok és adhéziós molekulák szérum szintjét [87, 88], így hatásos terápiás szernek bizonyult rheumatoid arthritis és egyéb eredetű arthritisek kezelésében is. Az Etanercept megjelenése óta több más készítmény is piacra került, vagy áll klinikai vizsgálat alatt. Ezek között vannak T- és B-sejt inhibitorok [89-92], selectin (PGSL-1) inhibitorok [93, 94], osteoclast inhibitorok [95], interleukin-1 inhibitorok és angiogenezis gátlók is [96, 97].

3.8.4 Fc-fúziós fehérjék - antimikrobiális szerek

A receptor/Fc fúziós fehérjék egyik csoportját antimikrobiális hatású fehérjék alkotják, melyek egyfajta antitestként viselkedve a receptor részükkel baktériumok széles spektrumához kötődnek, míg az Fc részen keresztül immunológiai funkciókat mediálnak. Bár ez egy viszonylag új felhasználási területe ezen fúziós fehérjéknek, a kezdeti eredmények nagyon biztatóak. Két fontosabb példa van eddig ilyen típusú mesterséges antitestekre, az egyik a BPI₂₃ fehérje fúziója a humán IgG1 Fc részéhez [78, 80, 81]. Ezt a rekombináns fehérjét *in vivo* expresszálták egy virális vektor (rAAV2-BPI₂₃-FC γ 1) segítségével egérmodellben. A vizsgált géntranszferált egerek vérében kimutatható volt a BPI₂₃/Fc fehérje, és jelentősen megnövekedett a túlélő egerek száma letális *E. coli* fertőzésekben. A rAAV2-BPI₂₃-FC γ 1 géntranszferált egerek szérumában jelentősen kisebb volt az IL-1 β és TNF- α szint, csökkent a baktériumszám és az endotoxin koncentráció is a kontrollként használt rAAV2-EGFP géntranszferált egerekhez képest [78, 80]. Egy másik példa egy másik kationos fehérje, a CAP18 fúziója az IgG1 Fc részéhez. Ebben az esetben az antimikrobiális fúziós partnert kémiai eljárással kötötték a humán IgG Fc részéhez, amit a teljes IgG1 papainos emésztésével állítottak elő [77, 79, 98]. Ebben az esetben is jelentősen megnövekedett a fúziós fehérjével kezelt (20 mg/kg) kísérleti egerek túlélési esélye a kontrollcsoportéhoz

képest a vizsgált szepszis modellben [77]. A protektív hatás feltételezhetően együttes következménye a fehérje baktericid és endotoxin neutralizáló tulajdonságának.

Mindkét receptor/Fc fúziós fehérje esetében *in vivo* modellt használtak a fehérjék antimikrobiális hatásának igazolására, azonban egyik esetben sem vizsgálták a fúziós fehérjék baktériumokkal való interakcióját, illetve az Fc rész effektor funkcióinak működését.

4. Célkitűzések

CD14/Fc fúziós fehérje – egy feltételezett terápiás alkalmazás

A CD14, mint mintázatfelismerő receptor a Gram-negatív baktériumok sejtfalában lévő LPS kötésére képes és potenciálisan egyéb célpontjai is elképzelhetők. Ez felvet egy lehetséges terápiás alkalmazást: a CD14 mintázat felismerő tulajdonságát kombinálva az Fc fúzió nyújtotta biotechnológiai és biológiai előnyökkel egy széles spektrumú opszonint hozhatunk létre, amely terápiás lehetőséget jelenthet antibiotikum rezisztens baktériumok által okozott fertőzésekben. Hasznos lehet továbbá olyan esetekben is, mint a *N. meningitidis* fertőzések, ahol a kórkép hátterében és az inflammatórikus folyamatok eszkalálódásában elsődleges szerepe van a fokozott külső membrán vezikula képződésnek.

- Munkánk első felében célunk egy CD14/Fc fúziós fehérje létrehozása, strukturális integritásának és biológiai aktivitásának vizsgálata. Jellemezni kívánjuk a CD14/Fc fúziós fehérje baktériumokhoz való kötődését, és igazolni a kötődés CD14-LPS specifikusságát, valamint megvizsgáljuk a fúziós fehérje opszonizáló hatását, és neutrophil granulocyták, macrophagok és dendritikus sejtek fagocitózisára gyakorolt hatását.
- Megvizsgáljuk, hogy neutralizálja-e a CD14/Fc molekula különböző LPS preparátumok és *N. meningitidis* eredetű blebek biológiai hatását, illetve, hogy mennyire hasonlóan viselkednek a LPS molekulák és a bleb részecskék egyéb neutralizáló ágensekkel szemben.

Szérum sCD14 szint mérése – egy feltételezett diagnosztikus alkalmazás

A humán sCD14 molekula, mint a veleszületett immunrendszer mintázatfelismerő receptora, kulcsfontosságú szerepet tölt be a Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések felismerésében. A sCD14 koncentrációja jól korrelál a fertőző betegségek súlyosságával, ami felveti a kérdést, hogy a sCD14 szintjének monitorozása esetleg alkalmazható-e diagnosztikai eljárásokban egy fertőzés meglétének, vagy súlyosságának megállapítására. Különösen fontos lehet egy új diagnosztikus marker bevezetése olyan esetekben, mint a cirrhosis, ahol a klasszikus APP markerek a máj károsodása miatt nem használhatóak megfelelő hatékonysággal.

- Munkánk második felében arra keresünk választ, hogy alkalmazható-e a szérum sCD14 szint mérése cirrhosisban diagnosztikus markerként a cirrhosist kísérő fertőzések kimutatására önállóan, vagy más akut fázis fehérjékkel együtt.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Betegek (cirrhosis)

368 jól karakterizált, követés alatt álló cirrhotikus beteget (férfi/nő: 204/164; kor: $56,4 \pm 10,8$ év; betegség időtartama: $3,9 \pm 4,2$ év) választottunk be a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Gastroenterológiai Tanszékéről. A cirrhosis diagnózisát klinikai, biokémiai, ultrahangos és amennyiben lehetséges volt, hisztológiai vizsgálatok alapján állították fel [99]. A beválasztásnál különös figyelmet fordítottunk akut bakteriális fertőzés jelenlétére is. A fertőzés diagnózisát a klinikai tünetek, lázas állapot, laboreredmények és mikrobiológiai tenyésztés (amennyiben lehetséges volt) alapján a betegek gondozását és követését végző Dr. Papp Mária és Dr. Vitális Zsuzsanna (Debreceni Egyetem, Belgyógyászati Intézet Gastroenterológiai Tanszék) állapították meg.

5.2. A kísérletekhez használt LPS, bleb preparátum, baktérium- és gomba törzsek

A CD14/Fc és CD14/His molekulák funkcionális teszteléséhez *Salmonella minnesota* Re (#595) LPS-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk. A bleb preparátumok izolálása a *N. meningitidis* L1 törzséből és ezek jellemzése az Utrechti Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében történt korábban publikált protokollok alapján [36, 100]. Az izolálás protokollja röviden a következő volt. *N. meningitidis* L1 törzset RPMI 1640 táptalajban (Gibco BRL, Invitrogen, San Diego, CA, USA) tenyésztették 16 órán át 37°C -on. A tenyészetet 20 percig 5.000 *g*-vel centrifugálták, majd a felülúszót 0,4 μm -es szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) átszűrték, hogy eltávolítsák a felülúszóból a benne maradt baktériumokat. Ezután a felülúszót 50-szeresére koncentrálták egy Amicon szűrőrendszer (300 kDa) segítségével (XM300, Millipore). A koncentrátumot 12 ml-es SW41 centrifugacsövekben (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) diszkontinuus dextrán gradiensre rétegezték (2 ml 10% és 2 ml 25%, Pharmacosmos, Roervangsvej, Dánia). A mintákat lengőfejes rotort használva 2 órán át 110.000 *g*-vel centrifugálták 10°C -on. A 10 és 25%-os dextrán határvonalán megjelenő bleb réteget aspirálták. A különböző izolálásokból származó bleb készítményeket összemérve, aliquotozva tárolták -20°C -on. A CD14/Fc-mikroba kötődéses kísérletekhez és a fagocitózis vizsgálatokhoz az alábbi baktériumokat és gombákat használtuk: *E. coli* (ATCC 25922), *S. hartford* (Országos Epidemiológiai Központ 100063), *Lysteria monocytogenes* (Országos Epidemiológiai Központ 130001), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *S. typhimurium* vad típus (#657), *S. typhimurium* Ra (#656), *S.*

typhimurium Re (#658), *S. minnesota* Re (#595), *Candida albicans* (#10231), *C. tropicalis* (#555) (klinikai izolátumok).

5.3. A baktériumok és gombák FITC jelölése

A baktériumokat hőinaktiváltuk (80°C, 2 h), majd az inaktiválás sikerességét véres agar táptalajon (Oxoid, Cambridge, UK) való tenyésztéssel (3 nap) ellenőriztük. A gombák hőinaktiválását (65°C, 2 h) Sabouraud táptalajon való tenyésztéssel ellenőriztük (2 nap). A mikrobákat előlésük után foszfát pufferben (PBS) reszuszpendáltuk, majd fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelöltük (40 µg/ml 45 percig 4°C-on a baktériumok esetében; 0,2 µg/ml 45 percig 4°C-on a gombák esetében). Jelölés után a nem kötődött FITC kétszeri PBS-sel való mosással távolítottuk el. A jelölés sikerességét és az abszolút mikroba számot áramlási citometriával ellenőriztük. A fluoreszcensen jelölt mikrobákat a felhasználásig aliquotozva, -20°C-on tároltuk.

5.4. PMN-ek, monocyták, macrophagok, dendritikus és SKBr-3 sejtek izolálása illetve tenyésztése

Polimorfonukleáris sejtek: A polimorfonukleáris sejteket (PMN) perifériás vérből izoláltuk. A perifériás vért heparinos vérvételi csövekbe gyűjtöttük (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) és 1:1 arányban hígítottuk PBS-sel. A hígított vért diszkontinuus histopaque gradiensre (1077/1119 g/l, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rétegeztük, majd 30 percen át szobahőmérsékleten 700 g-vel centrifugáltuk. Centrifugálás után a PMN réteget leszívtuk, majd a vörösvértesteket 30 másodpercig jéghideg desztillált vízzel lizáltuk. 30 másodperc után az izotóniás koncentrációt 1/10 térfogatnyi 10-szeres töménységű PBS pufferrel állítottuk helyre. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, és a sejtszámot 5×10^6 sejt/ml-re állítottuk be. A sejtek életképességét tripánkék és propidium jodid festéssel vizsgáltuk, a sejtek 95%-a élőnek bizonyult. A sejtfrakció tisztaságát citospin lemezeken ellenőriztük, a tisztaság 98% feletti volt.

Monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek: Perifériás vérből mononukleáris sejteket izoláltunk Ficoll-Paque (1077 g/l, GE Healthcare, Uppsala, Svédország) segítségével, majd a PBMC rétegből anti-CD14 mágneses mikrogöngyök (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Németország) alkalmazásával, a gyártó leírása alapján monocytákat szeparáltunk. Az izolált sejtfrakció tisztaságát áramlási citometriai analízissel ellenőriztük, a sejtek több mint 97%-a bizonyult monocytának. A monocyta eredetű macrophagok differenciálását 24 lyukú szövettenyésztő plate-en végeztük. L-glutaminnal (2 mM, Sigma-Aldrich) dúsított

RPMI táptalajban (Sigma-Aldrich) 10^6 sejt/ml sejtet tenyésztettünk 5 napig, 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin, 10% hőinaktivált FCS (Invitrogen) és 50 ng/ml M-CSF (Peprotech EC, London, UK) jelenlétében. A monocyta eredetű dendritikus sejtek differenciálását L-glutaminnal (2 mM, Sigma-Aldrich) dúsított RPMI táptalajban (Sigma-Aldrich) végeztük, 2×10^6 sejt/ml sejtet tenyésztettünk 5 napig, 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin és 10% hőinaktivált FCS (Invitrogen) jelenlétében. A sejtek stimulálását a második napon 80 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium) és 100 ng/ml IL-4 (Peprotech EC) és 50 ng/ml M-CSF (Peprotech EC, London, UK) hozzáadásával végeztük. A kísérletekhez a sejteket az 5. napon használtuk fel. A sejtek fenotípusát áramlási citometriával ellenőriztük, több mint 90%-uk éretlen DC fenotípust mutatott (DC-SIGN/CD209+, CD14 alacsony) és több mint 85%-uk CD1a pozitívnak bizonyult.

SKBr-3 sejtek: Az SKBr-3 humán emlő karcinóma sejtvonalat (ATCC) DMEM táptalajban, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin és 10% hőinaktivált FCS (Invitrogen) jelenlétében tenyésztettük. Ezeket a sejteket a kísérletekhez, mint FcR negatív kontrollt használtuk.

5.5. CD14/Fc és CD14/His klónozása és expressziója

A humán CD14 cDNS-e az Utrechti Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének (Utrecht, Hollandia) cDNS könyvtárából származik. A cDNS-t PCR reakcióban amplifikáltuk, melynek során a végeire restrikciós hasítóhelyeket (*Bam*HI és *Not*I, a szekvenciában aláhúzva) építettünk be, az alábbi primereket használva:

P1-5'TCGGATCCACCACGCCAGAACCTTG3'

P2-5'CAGCGGCCGCCAGCACCAGGGTTCCCGA3'

Az amplikont a szekvenáláshoz egy köztes vektorba (pCR4-TOPO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ligáltuk a kit leírása alapján: A PCR terméket Taq polimeráz jelenlétében inkubáltuk 72°C-on, 10 percig, kihasználva a Taq polimeráz azon tulajdonságát, hogy szekvenciafüggetlenül 3'A túlnyúló végeket illeszt a PCR termék végeire. A TOPO vektor egy linearizált vektor, mely 5'T túlnyúló végekkel rendelkezik, így az inzert nagy hatékonysággal ligálódik a vektorba. Ligálás után a CD14 inzertet tartalmazó vektorral One Shot TOP10 baktériumokat (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) transzformáltunk a kit leírása alapján, melyeket egy órán át S.O.C médiumban regeneráltattunk, majd előmelegített, 50 µg/ml carbenicillint tartalmazó Luria-Broth (LB) táptalajra szélesztettünk. A szelekciós táptalajon egy éjszakán át 37°C-on tenyésztettük a baktériumokat, a kinőtt telepeket 16 órán át, erősen rázatva, 50 µg/ml carbenicillint tartalmazó folyékony LB táptalajban szaporítottuk, majd a

QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) segítségével, a gyártó leírása alapján plazmidot izoláltunk a transzformált baktériumokból. Az izolált plazmidokban a CD14 inzert jelenlétét kettős restrikciós emésztéssel (*Bam*HI/*Not*I, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ellenőriztük. Az inzertet tartalmazó plazmidban a helyes szekvenciát szekvenálással (BigDye 3.1 sequencing kit, Applied Biosystems) ellenőriztük. Az inzert expressziós vektorokba való szubklónozását, és a CD14/Fc, valamint CD14/His expresszióját humán embrionális vese (HEK293) sejtekben az U-Protein Express B.V. végezte (Utrecht, Hollandia). Az expressziós vektorok megfelelő olvasási keretben már tartalmazták az Fc és His tag-eket (pABC-CMV-cystatin-dE-dH-FcC-TEV és pABC-CMV-dE-dH-optimal-hisN-TEV) [101]. Az expresszált fehérjék tisztítását a CD14/Fc esetében Protein G oszloppal, a CD14/His esetében Nikkel oszloppal (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) végeztük, a gyártó leírása alapján. A fehérjekészítmények tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük redukáló és nem redukáló körülmények között [101]. A CD14/His fehérjét a kísérletekben mint kontrollt (sCD14) használtuk.

A molekulák biológiai funkcióját immobilizált LPS-hez való kötődésük alapján jellemeztük: ELISA lemezeket (Invitrogen, San Diego, CA, USA) 30 µg/ml *S. typhimurium* Re LPS-sel (#595) borítottunk, és blokkolás után 1 µg/ml CD14/Fc vagy CD14/His fehérjét adtunk hozzá 100 ng/ml LBP (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) jelenlétében. A kötődő CD14/Fc fehérjét peroxidázzal konjugált anti-humán IgG antitesttel (1:6000 hígítás, Dako, Koppenhága, Dánia), míg a CD14/His-t biotinált poliklonális anti-CD14 antitesttel (1:100 hígítás) és sztreptavidin-tormaperoxidázzal (1:250 hígítás; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) mutattuk ki. Kromogénként tetra-metil benzidin/H₂O₂ szubsztrátrendszerrel használtunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), az abszorbanciát 405 nm-en mértük Labsystem Multiscan MS ELISA leolvasóval (Labsystems, Helsinki, Finnország).

5.6. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz/gombákhoz

Fluoreszcensen jelölt baktériumokat és gombákat (5×10^7 /ml) inkubáltunk LBP (100 ng/ml) és CD14/Fc vagy CD14/His (5 µg/ml) jelenlétében vagy hiányában. Az inkubálási idő rövid LPS mutánsok esetében 2 óra, a vad típusú baktériumok és gombák esetében 24 óra volt. Inkubáció után a mikrobákat kétszer mostuk 0,1% marha szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-sel. A mikrobákhoz kötődött CD14/Fc fehérjét Cy5-kecske-anti-humán IgG (könnyű + nehéz lánc) antitesttel (Jackson Laboratory, Sacramento, CA; 1:100 hígítás), a CD14/His fehérjét PE-anti-His antitesttel (Miltenyi Biotec, 1:100 hígítás) jelöltük. Mosás után a mikrobákat 1% PFA pufferben szuszpendáltuk és áramlási citométerrel vizsgáltuk. A

mikrobákra az előre, illetve oldalra szórt fény, valamint a FITC pozitivitás alapján kapuztunk. A vizsgált fehérjék kötődésének mértékét a Cy5 (CD14/Fc) és PE (CD14/His) pozitivitás alapján határoztuk meg.

A LPS kompetíciós és gátlásos vizsgálatokhoz a CD14/Fc molekulát LPS (kétszeres hígítási sor: 20 - 0,2 µg/ml) vagy anti-CD14 blokkoló antitest (60bca; ATCC klón felülúszójából tisztítva protein-G oszloppal; kétszeres hígítási sor: 40 – 0,6 µg/ml) jelenlétében elő-inkubáltuk. Egy óra elő-inkubálás után a fent leírtak alapján elvégeztük a kötődés vizsgálatokat. A CD14/Fc és CD14/His kompetíciós vizsgálatokhoz 1 µg/ml CD14/Fc fúziós fehérjét kevertünk össze különböző koncentrációjú (kétszeres hígítási sor: 350 – 0,7 µg/ml) CD14/His fehérjével, majd azonnal hozzáadtuk a *S. typhimurium* Re szuszpenzióhoz a fentebb leírtak szerint. A CD14/Fc kötődését áramlási citométerrel, a fent leírtak szerint vizsgáltuk, a gátlás mértékét a csak CD14/Fc-t – és gátlószert nem – tartalmazó mintához viszonyítva, százalékban adtuk meg.

5.7. Az opszonizált baktériumok fagocitózisa

A FITC-el jelölt, CD14/Fc fúziós fehérjével opszonizált baktériumokat 15 µl PBS vagy 10% szérum jelenlétében 37°C-on, 15 percig inkubáltunk. Ezt követően 35 µl PMN, macrophag, dendritikus sejt, vagy SKBr-3 sejt szuszpenziót ($1,7 \times 10^5$ sejt) adtunk a mintákhoz, majd újabb fél órán át inkubáltuk 37°C-on. Inkubáció után a sejteket kétszer mostuk, majd PBS-ben vagy 1% PFA-ban szuszpendáltuk. A mintákat áramlási citométerrel mértük, a sejtekre méretük és granuláltságuk alapján kapuztunk, és a fagocitáló sejteket FITC-pozitivitásuk alapján azonosítottuk.

A fagocitózis gátlásához a sejteket 45 percig 4°C-on inkubáltuk anti-CD16 (3G8, Abcam, Cambridge, UK) és/vagy anti-CD32 (ATCC: „IV-3” myeloma sejt vonal felülúszójából tisztítva protein-G oszloppal) blokkoló antitestekkel (20 µg/ml).

Tripánkék kioltással ellenőriztük, hogy a fagocitáló sejtek FITC-pozitivitása a sejtek felszínére tapadó baktériumoktól, vagy ténylegesen internalizálódott baktériumoktól ered. A minták lemérése után 5 µl tripánkéket (5 mg/ml, Merck, Darmstadt, Németország) adtunk 125 µl mintához, majd újramértük a mintákat áramlási citométerrel.

A sejtekhez asszociálódott baktériumok pontos lokalizációjának megállapításához konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss AG, Jena, Németország) alkalmaztunk. Fagocitózis után az Alexa-Fluor647-konjugált anti-MHC-I antitesttel (W6/32 klón) és propidium jodiddal (PI; Sigma-Aldrich) jelölt sejteket tárgylemezre cseppentettük, és

fedőlemezzel lefedtük. A FITC-ot 488 nm-en, a PI-ot 543 nm-en és az AlexaFluor647-et 633 nm-en gerjesztettük. A fluoreszcencia emissziót a fenti sorrendnek megfelelően 505-550 nm, 560-615 nm és 650-710 nm sávszűrők segítségével detektáltuk. A gerjesztés és az emisszió elválasztása UV/488/543/633 quad-dikroikus szűrővel történt. A képek 512 x 512 pixel méretűek, az 1 µm vastag optikai szekciókat 40x C-Apachromat víz-immersziós objektívvel készítettük.

5.8. A CD14/Fc opszonizált baktériumok ex vivo killingje

A killing assay kísérletek során 3×10^3 kolónia formáló egység (CFU) *S. typhimurium* wt illetve Re baktériumokat adtunk 1 ml heparinnal alvadásgátolt vérhez 5 µg/ml CD14/Fc jelenlétében, illetve hiányában. Óvatos keverés után a mintákat 60 percig 37°C-on inkubáltuk, majd mintánként 100 µl-t előmelegített véres agar táptalajra oltottunk. 24 órás tenyésztés után a kinőtt kolóniákat megszámloltuk és a megfelelő kontrollhoz hasonlítottuk.

5.9. Neutrophil granulocyták chemiluminescenciájának aktivációja LPS-dal és blebvel

Izolált neutrofil granulocitákat 30 percen keresztül 37°C-on LPS-dal vagy blebekkel aktiváltunk 1% szérumban vagy 100 ng/ml LBP jelenlétében. Mintánként 1×10^5 neutrofil sejtet 10^{-6} M formyl-MET-LEU-PHE (fMLP) (Sigma-Aldrich) segítségével stimuláltunk 150 µM luminol (Sigma-Aldrich) jelenlétében, majd a chemilumineszcencia választ luminométer (Autolumat LB 953, Berthold, Wildbad, Németország) segítségével 10 percen keresztül rögzítettük. A chemilumineszcencia választ a 10 perc alatt mért görbe alatti területtel fejeztük ki.

5.10. A LPS és blebek neutralizálása BPI-nel, plazmával és a CD14/Fc fúziós fehérjével – neutrofil kemilumineszcencia mérése, LAL assay, L-szelektin expresszió mérése

Mindegyik minta esetében 500 µl heparinnal alvadásgátolt, egészséges önkéntestől vett vér plazma- és a sejtfrakcióit centrifugálással (3.000 g, 2 perc) elválasztottuk egymástól. A plazmát 10.000 g-val 1 percig ismét centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a visszamaradt sejteket, törmeléket, illetve apoptotikus testeket. A neutralizációhoz LPS-ot vagy bleb-et inkubáltunk a plazmával 60 percig 37°C-on. Ezt követően a LPS aktivitást közvetlenül (mint fluoreszcencia intenzitást) második generációs *Limulus* amebocyte lysate (LAL) assay-vel (Lonza, Basel, Svájc) határoztuk meg. A LAL esszé a *Limulus* koagulációs kaskád Faktor C enzimét tartalmazza rekombináns formában, mely egy fluorogén szubsztátot hasít el, mely 380 nm-en

gerjeszthető, és a szubsztrát mennyiségével arányos emittált fény 440 nm-en detektálható. Az endotoxin mennyiségek meghatározásához a kit leírása alapján 100 µl mintát összekevertünk 100 µl LAL reagenssel, és fluoreszcens ELISA leolvasó automatában azonnal meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitást, majd ezt az értéket tekintettük háttérnek. Ezt követően a mintákat 1 órán át inkubáltuk 37°C-on, majd újra meghatároztuk a minták fluoreszcencia intenzitását, amit a háttérrel korrigáltunk. Az így kapott értékeket a kit sztenderdjével összevetve határoztuk meg a pontos LPS koncentrációkat.

A BPI és CD14/Fc neutralizáló hatásának vizsgálatához BPI-t (10 µg/ml), CD14/Fc-t (5 µg/ml) vagy puffert inkubáltunk LPS-dal, bleb-ekkel vagy pufferrel 30 percig 37°C-on puffer vagy 3% szérum jelenlétében. Ezt követően a LPS aktivitást vagy közvetlenül, LAL esszével (Lonza, Basel, Svájc) határoztuk meg, vagy izolált neutrofileket adtunk a mintákhoz és 30 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk azokat, majd a neutralizáció mértékét közvetve, a fent leírt chemilumineszcencia méréssel állapítottuk meg.

A CD14/Fc hatását teljes vérben lévő monocyták és granulocyták L-szelektin expressziójának mérésével is jellemeztük, LPS stimuláció hatására ugyanis mindkét sejttípus CD62-expressziója jellegzetesen lecsökken. Heparinnal alvadásgátolt perifériás vérmintákat (50 µl/minta) különböző koncentrációjú CD14/Fc (felező hígítási sor: 10 µg/ml – 0,16 µg/ml) fúziós fehérje jelenlétében LPS-dal, bleb-ekkel vagy pufferrel inkubáltunk 37°C-on, 30 percig. Inkubáció után az egyes mintákat 6 µl egér anti-humán-CD62L-APC (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) antitesttel jelöltük jégen 10 percig. Jelölés után a vörösvértesteket 10 percen keresztül lizáltuk (BD FACS Lysing Solution, Franklin Lakes, NJ, USA), majd a mintákat kétszer mostuk PBS oldattal. Mosást követően a sejteket 300 µl PBS/PFA 1% pufferben szuszpendáltuk és áramlási citométeren (BD FACS Calibur) mértük. A monocytákat és neutrofil granulocytákat fényszórási tulajdonságaik alapján azonosítottuk, a CD62L pozitivitást pedig az FL4 fluoreszcens csatornán mért jelintenzitás átlagával jellemeztük.

5.11. Szérum sCD14, LBP, PCT és CRP koncentrációjának mérése

Az analíziseket fagyasztva tárolt szérummintákon (-70°C) végeztük. A CRP szinteket egy Integra 700 automatával (Roche, Basel, Svájc) végeztük. A PCT meghatározás „two-site” immunoluminometriás esszével (Liaison Brahms PCT) történt Liaison analizátorral (DiaSorin, Saluggia, Olaszország). Az LBP koncentrációját szilárd fázisú szendvics enzimkapcsolt immunoszorbens esszé (ELISA, Hycult Biotechnology, Uden, Hollandia)

segítségével határoztuk meg. A sCD14 koncentrációját ELISA-val (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) mértük. A mintákat ugyanazon a lemezen, duplikátumban vizsgáltuk és átlagot számoltunk. Az alsó szenzitivitási határ az egyes analitok esetében a következő volt: 0,1 mg/l – CRP, 0,1 µg/l – PCT és LBP, és 0,125 µg/l – sCD14.

5.12. Statisztikai analízis

A CD14/Fc és CD14/His különböző baktériumok és gombákhoz való kötődésének összehasonlítását, illetve a kontroll mintákkal való összevetését párosított Wilcoxon teszttel végeztük. A fagocitózis és az *ex vivo* killing kísérletek, valamint a gátlásos kísérletek értékelésénél is Wilcoxon tesztet használtunk. A LPS és bleb neutralizációs kísérletekben a LAL- és chemiluminescencia esszék eredményét Mann-Whitney U teszttel értékeltük.

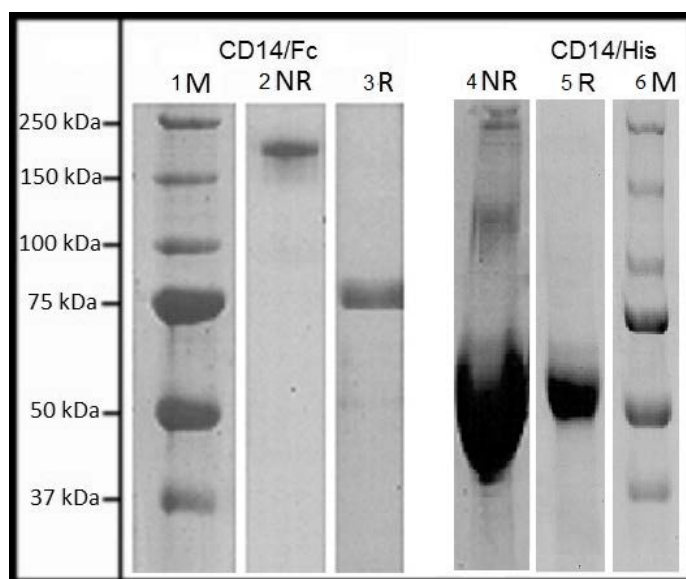
A cirrhosis diagnosztikai markereinek vizsgálatakor az egyes változók normalitását Shapiro Wilk teszt segítségével ellenőriztük. A folytonos változókat átlag [SD] vagy medián [interkvartilis tartomány (IQR)] formában összesítettük a homogenitásuknak megfelelően. A kategórikus változókat Chi-négyzet, vagy ahol szükséges volt, ott Yates korrekciós Chi-négyzet teszttel vizsgáltuk. A folytonos változókat Student t-teszttel, vagy Mann-Whitney U teszttel hasonlítottuk össze. A folytonos változók egymással való kapcsoltságát Spearman SRO teszttel ellenőriztük. Az egyes APP markerek határértékének és pontosságának vizsgálatát ROC görbével (szenzitivitás vs. 1-specificitás) analizáltuk.

A statisztikai számításokat Statistica for Windows, GraphPadPrism 5 (San Diego, CA, USA) és SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) szoftverekkel végeztük. A különbségeket $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1. A CD14/Fc és CD14/His expressziója és jellemzése

A CD14/Fc fúziós proteint és a CD14/His proteint HEK293 sejtekben expresszáltuk és Protein G illetve nikkel oszlopokon tisztítottuk. Összesen 35 mg CD14/Fc fúziós fehérjét állítottunk elő. A méretet és a tisztaságot redukáló- és nem redukáló SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. A klónozott CD14 molekulatömege 50 kDa, míg az Fc rész molekulatömege hozzávetőleg 30 kDa. A CD14/Fc molekula az immunglobulin G-hez hasonlóan dimereket alkot, ezért nem redukáló körülmények között a várt molekulatömeg 160 kDa (5. ábra, 2. oszlop), míg redukáló körülmények között 80 kDa (5. ábra, 3. oszlop). A CD14/His molekulából nikkel oszlopon való tisztítás után 8 mg-ot sikerült előállítani. Monomer lévén a CD14/His molekulamérete redukáló- és nem redukáló körülmények között is egyaránt 50 kDa körüli (5. ábra, 4. és 5. oszlop). Az expresszált fehérjék biológiai aktivitását LBP függő LPS kötő képességükkel ellenőriztük ELISA-val. Az OD 1 µg/ml CD14/Fc és CD14/His esetében $0,75 \pm 0,16$ és $0,38 \pm 0,03$ volt, míg a hátterek $0,03 \pm 0,02$ illetve $0,04 \pm 0,02$ voltak.



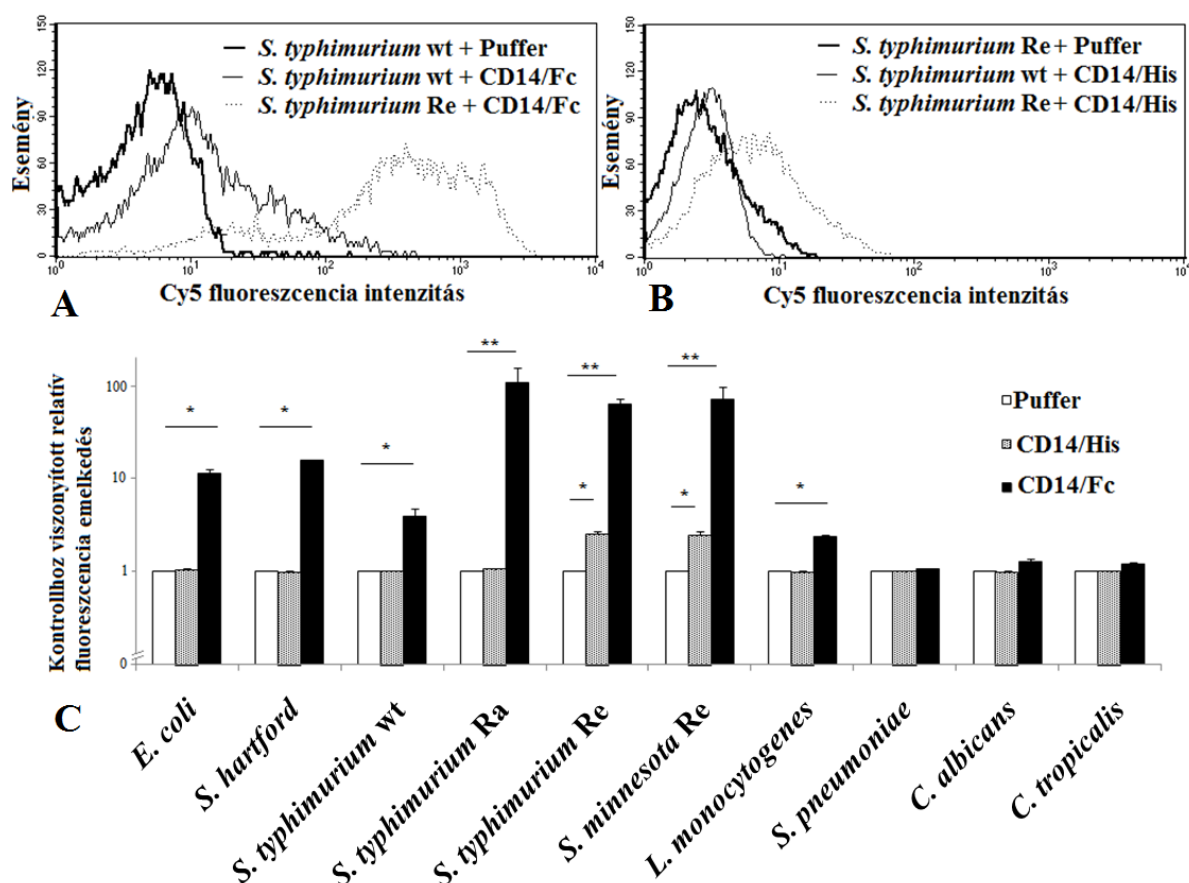
5. ábra A CD14/Fc és CD14/His fehérjék SDS-PAGE analízise. A CD14/Fc molekula nem redukáló (NR, 2. oszlop) és redukáló (R, 3. oszlop) körülmények között. A molekulatömegek megfelelnek az Fc rész által mediált dimer (160 kDa, 2. oszlop), illetve a monomer formának (80 kDa, 3. oszlop). A CD14/His esetében a molekulatömeg mind redukált, mind nem redukált formában 50 kDa (NR, 4. oszlop; R, 5. oszlop).

6.2. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz és gombákhoz

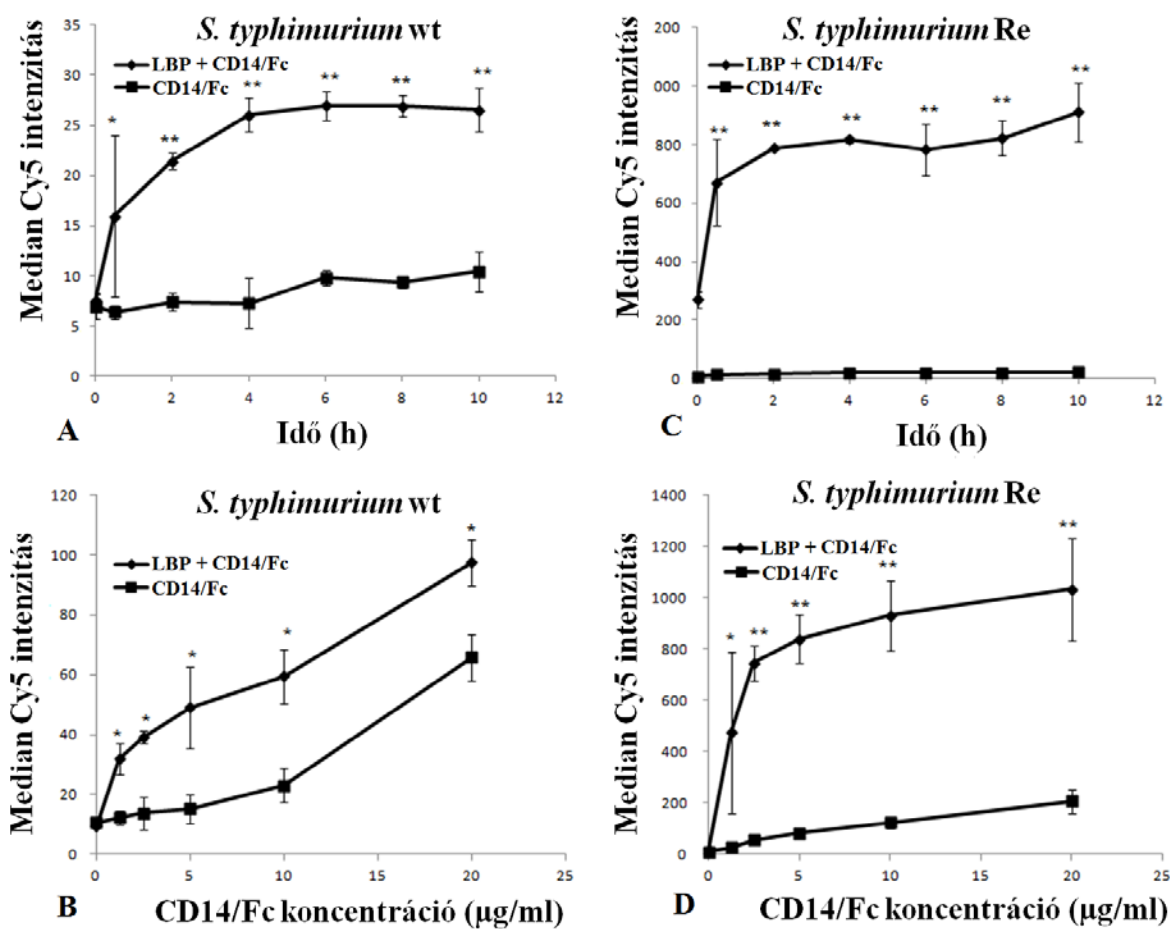
A CD14/Fc baktériumokhoz való kötődését áramlási citometriával vizsgáltuk. Fluoreszcensen jelölt (FITC) baktériumokat és gombákat inkubáltunk a CD14/Fc és CD14/His fehérjékkel. A CD14/Fc kötődött mind a vizsgált vad típusú, mind a rövid LPS (Ra & Re) mutáns Gram-negatív baktériumokhoz (6. ábra, A és C). Ezekhez a baktériumokhoz való kötődés LBP dependens volt, és függött a CD14/Fc koncentrációtól és az inkubációs időtől is (7. ábra, A-D). A vad típusú baktériumok esetében a maximális kötődés 4 óra inkubáció után, illetve 5-10 µg/ml CD14/Fc koncentrációnál következett be (7. ábra, A és B). Kifejezetten nagymértékű kötődést tapasztaltunk az Re mutánsok esetében (6. ábra, A és C), ahol már 1-5 µg/ml CD14/Fc és 2 óra inkubáció is elegendő volt a maximális kötődés eléréséhez (7. ábra, C és D). A CD14/His molekula lényegesen kevésbé kötődött a vizsgált mikrobákhoz, mint a CD14/Fc dimer. Kizárólag a rövid LPS (Re) mutánsokkal asszociálódott, és még ebben az esetben is csak kis mértékű fluoreszcencia emelkedést tapasztaltunk a kontrollokhoz képest (6. ábra, B és C). Egyik rekombináns fehérje sem kötődött a vizsgált gombákhoz (6. ábra C).

Gátlásos kísérletekkel vizsgáltuk, hogy a CD14/Fc molekula kötődése a baktériumokhoz CD14-LPS interakció következményeképpen jön-e létre. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz (*S. typhimurium* wt és *S. typhimurium* Re) dózisfüggően gátlható volt a CD14/Fc molekula LPS-dal (8. ábra, A), illetve anti-CD14 blokkoló antitesttel (8. ábra, B) történő elő-inkubálásával.

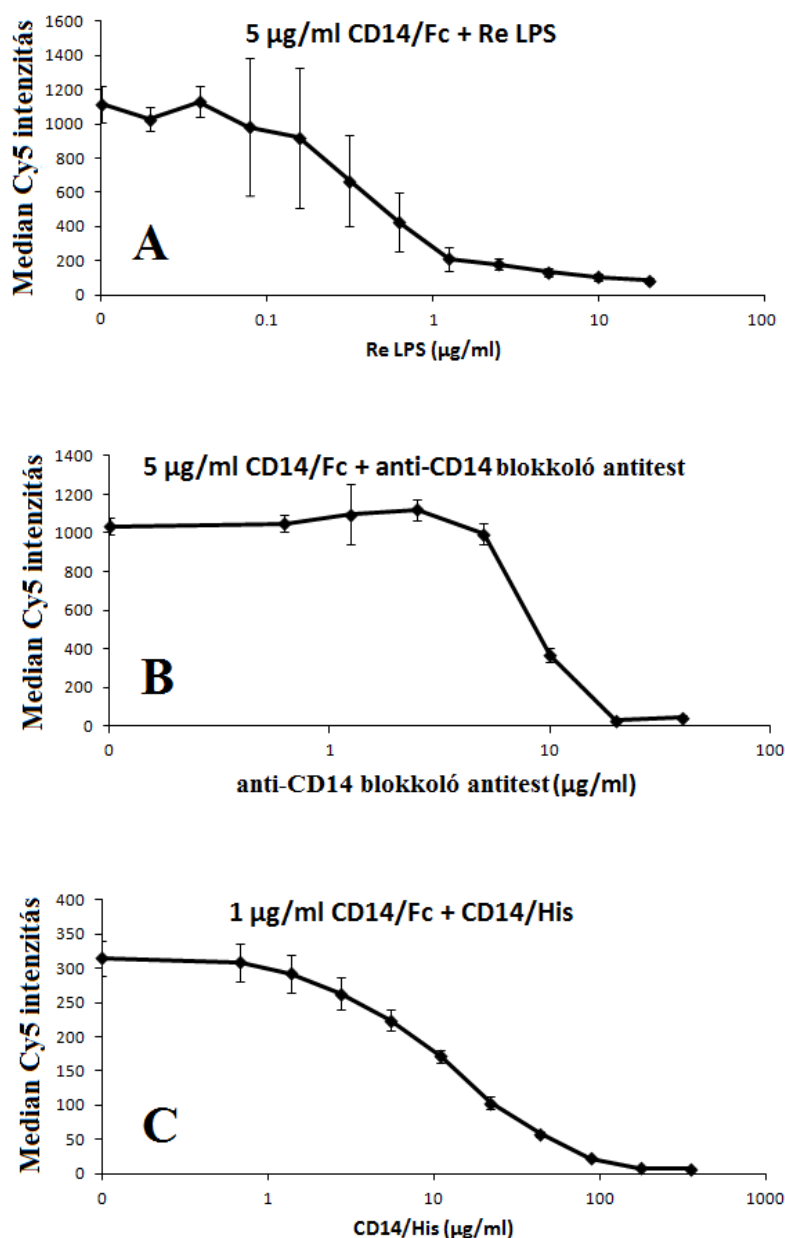
A CD14/Fc és CD14/His molekulák baktériumokhoz való kötődésének aviditását is összehasonlítottuk. A két molekulát különböző arányban összekeverve adtuk *S. typhimurium* Re baktériumhoz, és vizsgáltuk a CD14/Fc kötődésének mértékét. Az eredményeink alapján a hozzávetőleg 50-szeres moláris túlsúlyban lévő CD14/His gátolta a CD14/Fc kötődését 50%-os mértékben (1 µg/ml CD14/Fc vs. 10-20 µg/ml CD14/His, 160 kDa vs. 50 kDa, 8. ábra, C).



6. ábra A CD14/Fc és CD14/His fehérjék kötődése különböző mikrobákhoz. A CD14/Fc és CD14/His fehérjék baktériumokhoz való kötődését Cy5-anti-humán-IgG, illetve PE-anti-His antitestekkel mutattuk ki, a kötődés mértékére a Cy5 és a PE jelintenzitások mediánjából következtettünk. Az ábra C paneljében a kontrolllok (jelölt antitest a vizsgált fehérjék nélkül) fluoreszcenciájához viszonyítva a CD14/Fc és CD14/His minták relatív fluoreszcencia növekedését tüntettük fel a függőleges tengelyen. A CD14/Fc fehérje gyengén kötődött a *S. typhimurium* vad típusú baktériumhoz és jóval erősebben a rövid LPS mutáns *S. typhimurium* Re baktériumhoz (A), míg a CD14/His nem kötődött a vad típusú *S. typhimurium* baktériumhoz és csak gyengén a mutáns *S. typhimurium* Re baktériumhoz (B). Összehasonlítva a két fehérje kötődését, a CD14/Fc erősen kötődött a rövid LPS mutánsokhoz (Ra & Re) és gyengébben a vad típusú Gram-negatív baktériumokhoz. A CD14/His kizárólag a rövid LPS mutánsokhoz (Re) kötődött, és nem asszociálódott a többi vizsgált mikrobával (C). Az ábra A és B része egy reprezentatív kísérletet mutat be, a C rész pedig 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SD. Az eredményeket párosított Wilcoxon teszttel elemeztük (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



7. ábra A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz LBP dependens, és függ az inkubációs időtől és a CD14/Fc koncentrációtól. Fluoreszcensen (FITC) jelölt *S. typhimurium* wt (A és B) és Re (C és D) baktériumokat inkubáltunk 100 ng/ml LBP jelenlétében és hiányában különböző ideig (0; 0,5; 2; 4; 6; 8; 10 óra; A és C), különböző CD14/Fc koncentráció mellett (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml; B és D). A CD14/Fc kötődését Cy5-anti-humán IgG antitesttel mutattuk ki, az ábrán a medián fluoreszcencia intenzitások vannak feltüntetve. A bemutatott eredmények három független kísérlet átlagát $\pm$ SD mutatják. A különböző CD14/Fc koncentrációknál és időpontoknál, valamint LBP jelenlétében és hiányában mért értékeket párosított Wilcoxon teszttel hasonlítottuk össze (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



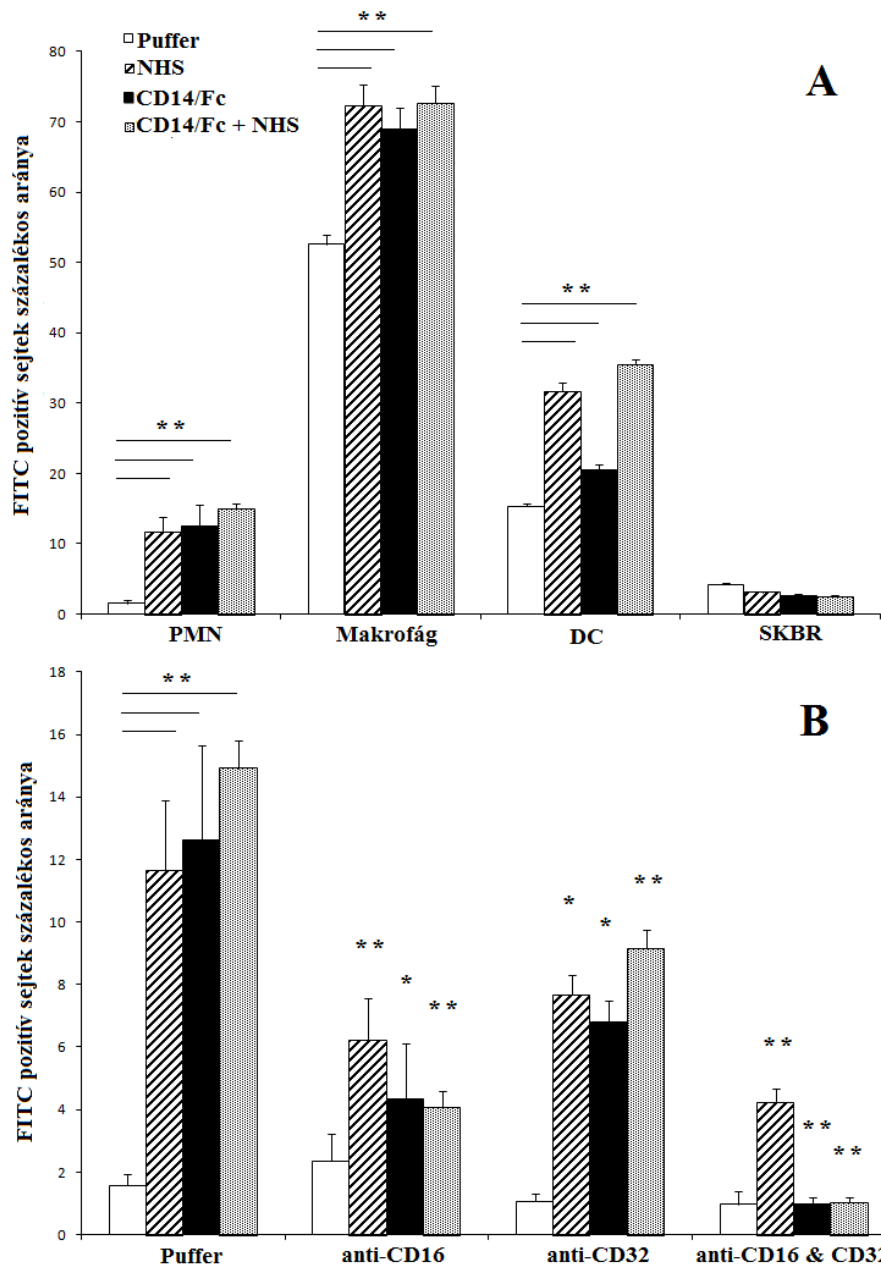
8. ábra. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz CD14-LPS specifikusnak bizonyult, mivel gátolható volt a CD14/Fc LPS-dal (A) és blokkoló anti-CD14 antitesttel (B) való elő-inkubálásával is. Szintén gátolható volt a kötődés magasabb koncentrációjú CD14/His hozzáadásával (C). A CD14/Fc fúziós fehérjét (5 µg/ml a LPS és az anti-CD14 blokkoló antitest, és 1 µg/ml a CD14/His elő-inkubáció esetében) LPS-dal (kétszeres hígítási sor: 20 – 0,2 µg/ml), anti-CD14 blokkoló antitesttel (kétszeres hígítási sor: 40 – 0,6 µg/ml) vagy CD14/His fehérjével (kétszeres hígítási sor: 350 – 0,7 µg/ml) kevertük össze és 2 órán át inkubáltuk *S. typhimurium* Re baktériummal 37°C-on LBP jelenlétében. A CD14/Fc kötődését Cy5-anti-humán IgG antitesttel mutattuk ki, az ábrán a medián fluoreszcencia intenzitások vannak feltüntetve. Az ábra három független kísérlet átlagát ± SD mutatja be.

6.3. A CD14/Fc fokozza a Gram-negatív baktériumok fagocitózist

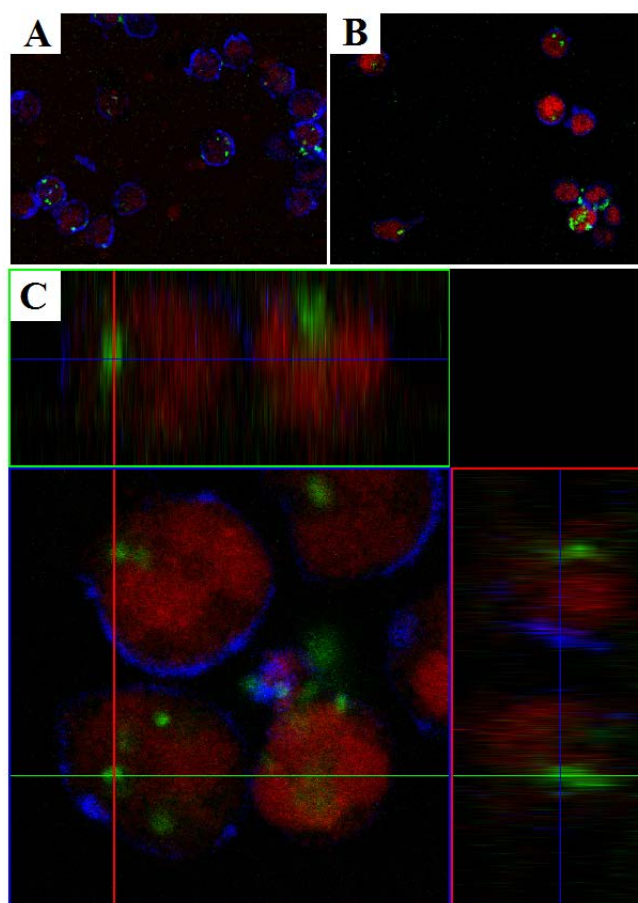
Annak igazolására, hogy a CD14/Fc fúziós fehérje nemcsak kötődik a baktériumokhoz, hanem mintegy opszoninként viselkedve fokozza is azok professzionális fagociták (neutrofil granulocyták, monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek) általi bekebelezését, áramlási citometriás fagocitózis tesztet végeztünk. Azokat a fluoreszcensen jelölt baktériumokat, melyekhez a CD14/Fc a legnagyobb mértékben kötődött (*S. typhimurium* Ra és Re, *S. minnesota* Re) 5 µg/ml CD14/Fc fúziós fehérjével opszonizáltuk, majd mosás után izolált humán PMN sejtekhez, macrophagokhoz, dendritikus sejtekhez, és kontrollként FcR negatív SKBr-3 emlő tumor sejtekhez adtuk. A PMN sejtek esetében a CD14/Fc a kontrollhoz képest fokozta a fagocitózist humán szérumban jelenlétében és hiányában is. Ez a fagocitózist fokozó hatás szérumban hiányában kifejezetten erős volt (fagocitáló sejtek aránya CD14/Fc jelenlétében illetve hiányában: *S. minnesota* Re – $10,65 \pm 0,97$ vs. $3,72 \pm 0,45$, $p < 0,05$; *S. typhimurium* Re – $12,60 \pm 3,03$ vs. $1,57 \pm 0,37$, $p < 0,05$; *S. typhimurium* Ra – $13,85 \pm 1,64$ vs. $5,47 \pm 0,42$, $p < 0,05$), míg humán szérumban jelenlétében sokkal kisebb hatást mutattunk ki (fagocitáló sejtek aránya CD14/Fc jelenlétében illetve hiányában: *S. minnesota* Re – $13,04 \pm 0,54$ vs. $12,2 \pm 1,59$, $p = 0,54$; *S. typhimurium* Re – $14,92 \pm 0,87$ vs. $11,66 \pm 2,42$, $p = 0,10$; *S. typhimurium* Ra – $15,88 \pm 2,97$ vs. $11,51 \pm 0,70$, $p = 0,09$; 9. ábra, A).

Monocyta eredetű macrophagok esetében a fagocitózis a kontroll mintákhoz képest 17%-al növekedett, így ebben az esetben a CD14/Fc opszonizáló hatása megegyezett a humán szérumban hatásával (fagocitáló sejtek aránya CD14/Fc jelenlétében illetve hiányában: $69,01 \pm 2,99$ vs. $52,54 \pm 1,33$, $p < 0,01$, 9. ábra, A). A dendritikus sejtekkel végzett kísérletek a humán szérumnál kisebb fagocitózis növelő hatást mutattak, de ebben az esetben is szignifikáns emelkedést mutatott a fagocitózis a kontroll mintákhoz képest (fagocitáló sejtek aránya CD14/Fc jelenlétében illetve hiányában: $20,46 \pm 0,88$ vs. $15,36 \pm 4,40$, $p < 0,01$, 9. ábra, A). A negatív kontrollként használt SKBr-3 sejtekkel nem asszociálódtak a baktériumok (9. ábra, A).

Tripánkéki kioltással igazoltuk, hogy a sejtekkel asszociálódott baktériumok nagy része (50-70%) internalizálódott. Annak érdekében, hogy a baktériumok pontos lokalizációjáról információt nyerjünk egy hármasszínű fagocitózis kísérletet végeztünk el konfokális mikroszkópia segítségével. A PMN sejtek membránját AlexaFluor647-konjugált anti-MHC-I antitesttel (kék), a sejtmagot propidium jodiddal (piros) jelöltük, míg a fagocitált baktériumokat FITC-tal (zöld) voltak jelölve. A mikroszkópos képek egyértelműen igazolták, hogy a PMN sejtekkel asszociált baktériumok mind a humán szérumban (10. ábra, A), mind a CD14/Fc (10. ábra, B és C) általi opszonizáció esetében internalizációra kerültek.



9. ábra A CD14/Fc fokozta a *S. typhimurium* Re felvételét PMN sejtek, monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek esetében, de nem volt hatása az FcR negatív SKBr-3 sejtek esetében (A). A fagocitózist részlegesen gátolni lehetett az izolált PMN sejtek anti-CD16 vagy anti-CD32 blokkoló antitesttel való elő-inkubálásával (B). Mindkét FcR együttes blokkolásával a fagocitózist fokozó hatás teljes mértékben gátolható volt (B). Az ábra három független kísérlet átlagát $\pm$ SD mutatja be a PMN sejtek esetében és egy reprezentatív eredményt három független kísérletből a macrophagok, dendritikus sejtek és SKBr-3 sejtek esetében. A CD14/Fc és humán szérum jelenlétében és hiányában végzett kísérletek eredményét, illetve az FcR blokkolós kísérletek eredményeit párosított Wilcoxon teszttel elemeztük (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



10. ábra Humán szérum (A) vagy CD14/Fc (B) által opsonizált *S. typhimurium* Re PMN sejtek általi fagocitózisa konfokális mikroszkóppal vizsgálva. Háromdimenziós rekonstruált képek mutatják, hogy a CD14/Fc által opsonizált baktériumok jelentős része intracellulárisan helyezkedik el (C). A PMN sejtek membránját AlexaFluor647-konjugált anti-MHC-I antitesttel (kék), a sejtmagot propidium jodiddal (piros) jelöltük. Az opsonizált baktériumok FITC-tal (zöld) vannak jelölve. A képek 130 x 100 μm látómezőt mutatnak az A és B paneleken, és 22,5 x 22,5 μm látómezőt a C panelen. A felső és a jobb oldali vetület a C panelen a zöld és a piros vonalak mentén rekonstruált vetületi képeket mutatja. Az ábrák két független kísérlet hasonló eredménye közül az egyik eredményét mutatják be.

6.4. A CD14/Fc által opsonizált baktériumok CD16 és CD32 receptorokon keresztül fagocitálódnak

Mivel a CD14/Fc fúziós fehérje egyik része intakt dimer formában tartalmazza a humán IgG1 Fc részét, abból a feltételezésből indultunk ki, hogy ez a rész felelős az opsonizált baktériumok fagocitákkal való interakciójáért. Ennek a feltételezésnek az igazolására specifikus monoklonális blokkoló antitestekkel gátoltuk a PMN sejtek felszíni Fc receptorait (CD16 és CD32). Az eredmények azt mutatták, hogy a *S. typhimurium* Re internalizációja részlegesen gátolható volt mind a CD16 ($61,64 \pm 24,16\%$ gátlás, $p < 0,05$), mind a CD32 ($42,76 \pm 20,52\%$ gátlás, $p = 0,07$) receptorok blokkolásával (9. ábra, B). Mindkét receptor

egyidejű blokkolása a fagocitózis teljes gátlásához vezet ($91,65 \pm 3,54\%$ gátlás, $p < 0,01$; 9. ábra, B). Hasonló eredményeket kaptunk a másik rövid LPS mutáns, a *S. minnesota* Re esetében is (anti-CD16: $69,54 \pm 6,62\%$ gátlás, $p < 0,01$; anti-CD32: $32,24 \pm 4,31\%$ gátlás, $p < 0,05$; anti-CD16+anti-CD32: $89,12 \pm 1,42\%$ gátlás, $p < 0,05$).

6.5. A CD14/Fc fokozza a Gram-negatív baktériumok ex vivo killingjét

Annak bizonyítására, hogy a baktériumok nem csak internalizálódnak a CD14/Fc opszonizáló hatásának következtében, hanem inaktiválódnak is a keringésben, ex vivo „killing” kísérleteket végeztünk. *S. typhimurium* wt és *S. typhimurium* Re baktériumokat adtunk teljes vérhez, mely vagy puffert vagy $5 \mu\text{g/ml}$ CD14/Fc fúziós fehérjét tartalmazott, majd 60 percen át 37°C -on inkubáltuk a mintákat. Inkubáció után $100 \mu\text{l}$ mintát véres agar táptalajra oltottunk, és 24 órán át tenyésztettünk. Tenyésztés után a telepeket megszámlálva összevetettük a CD14/Fc fehérjét tartalmazó mintákból kapott eredményt a kontrollal. A vad típusú baktériumok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget. A kezeletlen vér a CFU számot $3 \times 10^3/\text{ml}$ értékről $853 \pm 199/\text{ml}$ értékre csökkentette. Hasonlóan, a CD14/Fc fúziós fehérjével kezelt vér $830 \pm 72/\text{ml}$ értékre csökkentette a kolóniaszámot. Azonban a *S. typhimurium* Re baktérium esetében egy óra teljes vérben való inkubáció után jelentősen kevesebb baktérium maradt életben ha vér $5 \mu\text{g/ml}$ CD14/Fc-t tartalmazott. A CFU szám $550 \pm 40/\text{ml}$ értékre csökkent a kezeletlen vérminták esetében, míg a CD14/Fc-vel kezelt mintáknál ez az érték $337 \pm 84/\text{ml}$ -nek mutatkozott ($p < 0,05$, $n=3$).

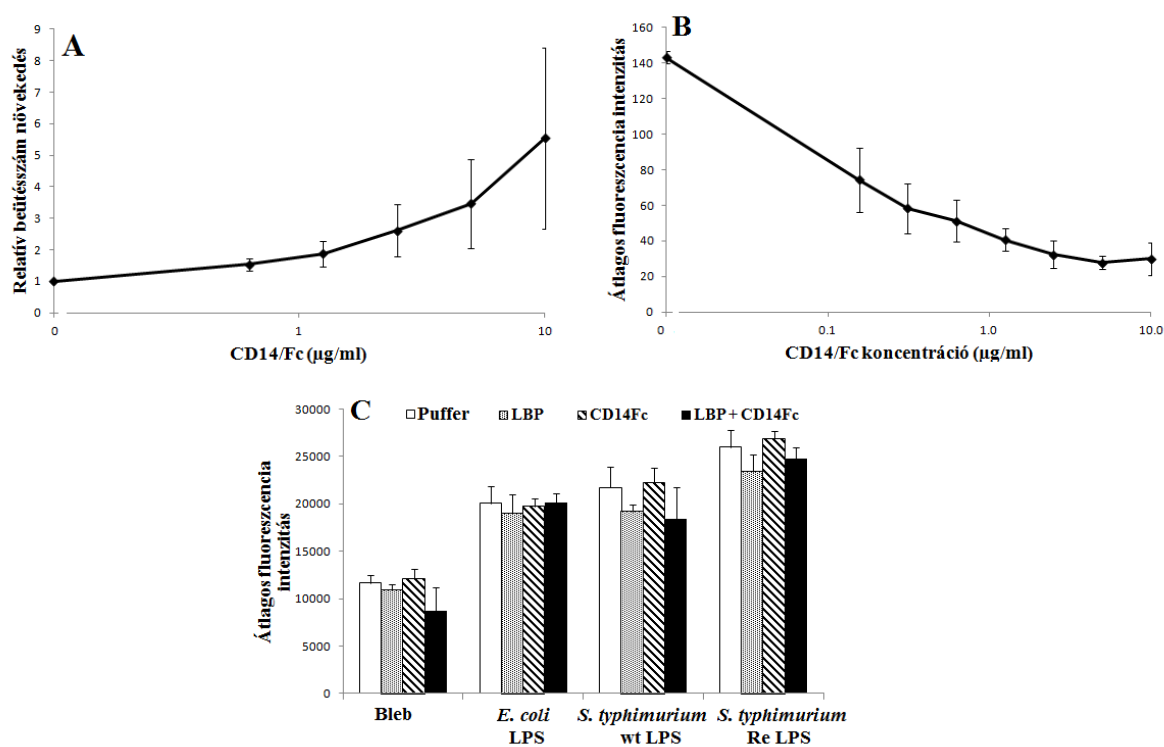
6.6. A CD14/Fc és egyéb neutralizáló ágensek hatása különböző LPS preparátumok és *N. meningitidis* eredetű blebek biológiai tulajdonságaira

A kórokozók elpusztításán túl nagy jelentősége van – különösen a szeptikus állapotok terápiájában – a baktériumokból felszabaduló biológiailag aktív molekulák neutralizálásának is. Ezek megjelenhetnek izolált formában, de nem ritkán a külső membránból lefűződő vezikulák, „bleb”-ek alakjában is. Munkánk folytatásaként megvizsgáltuk, hogy a CD14/Fc molekulának van-e ilyen neutralizáló hatása.

6.6.1. A CD14/Fc hatása a különböző LPS és bleb készítmények biológiai aktivitására

A CD14/Fc neutralizáló hatásának vizsgálatára LPS és bleb mintákat inkubáltunk elő CD14/Fc-vel vagy anélkül, és ezek izolált neutrofil granulocytákra kifejtett priming hatását vizsgáltuk meg egy chemiluminescens assay segítségével. A CD14/Fc nem befolyásolta szignifikánsan a LPS és a bleb-ek hatását, sőt meglepő módon önmagában is, dóziszfüggően

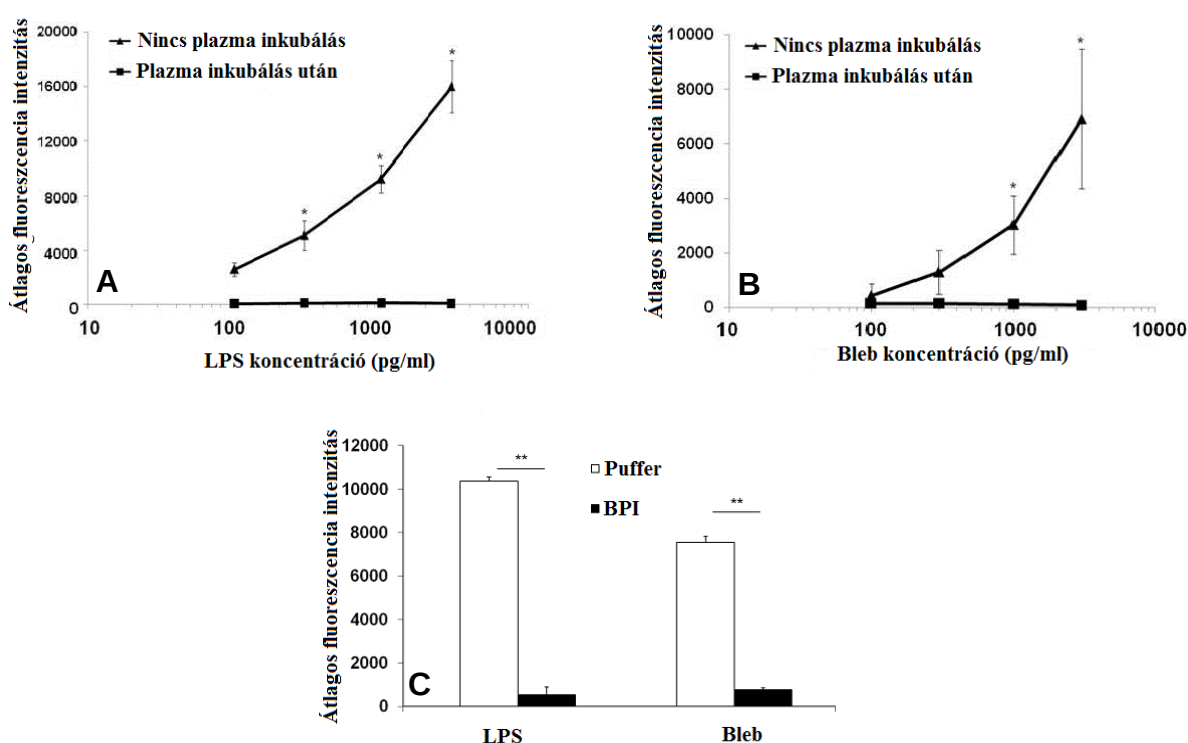
képes volt a PMN sejtek stimulálására (11. ábra, A). Megegyező eredményt kaptunk egy másik kísérletes rendszerben is, ahol teljes vér granulocyták L-szelektin expresszióját mértük áramlási citométerrel. A CD14/Fc molekula a LPS/bleb készítményekhez hasonlóan önmagában is képes volt a CD62L leregulálására (11. ábra, B). LAL assay-vel ellenőriztük a CD14/Fc készítményünk LPS tartalmát, de nem volt LPS kontamináció kimutatható. Miután egyedül a LAL assay volt az a rendszer, ahol a CD14/Fc molekula önmagában nem mutatott aktivitást, ezt használva is teszteltük a fúziós fehérje neutralizáló hatását, azonban nem tapasztaltunk gátló hatást (11. ábra, C).



11. ábra. A CD14/Fc molekula hatása a különböző LPS és bleb készítmények biológiai aktivitására. Izolált granulocytákat (A) vagy teljes vért (B) inkubáltunk különböző koncentrációjú CD14/Fc fúziós fehérje jelenlétében. A CD14/Fc fúziós fehérje önmagában is aktiválta az izolált granulocytákat, a granulocyta aktiváló hatás koncentrációfüggő volt, és megfigyelhető volt a kemilumineszcencia esszében (A) és a CD62L expresszió csökkenését tesztelő áramlási citometriás vizsgálatokban (B) is. LAL esszével vizsgáltuk, hogy a CD14/Fc fehérje képes-e neutralizálni a bleb, *E. coli*, illetve *S. typhimurium* wt és Re LPS készítményeket (C). Kísérleteink nem igazolták a CD14/Fc molekula endotoxin neutralizáló hatását. Az ábrák három (A és B), illetve négy (C) független kísérlet eredményét mutatják.

6.6.2. További neutralizáló ágensek hatásának vizsgálata a LPS és blebek biológiai aktivitására

A LPS és blebek plazma általi neutralizációjának vizsgálatára LAL assay-t használtunk [51]. A plazma teljes mértékben gátolta a szabad LPS és a blebek LAL-kaszád indukáló hatását, ami megerősíti a plazma fontos szerepét a szabad LPS és a külső membrán vezikulák neutralizációjában (12. ábra, A és B). A BPI a neutrofilek fontos antibakteriális hatású fehérjéje, melynek *in vivo* és *in vitro* LPS neutralizáló hatása is ismert [102]. Szabad LPS és blebek 10 µg/ml BPI-vel való inkubálása után a LAL esszé segítségével nem tudtunk endotoxin aktivitást kimutatni (12. ábra, C).



12. ábra. LPS és bleb neutralizációja plazma és BPI által. Különböző koncentrációjú LPS-ot (A) és bleb-et (B) inkubáltunk plazmával (fekete négyzetek) vagy anélkül (fekete háromszögek), majd LAL esszé segítségével közvetlenül vizsgáltuk az endotoxin szintet. A BPI neutralizáló hatásának vizsgálatához puffer vagy BPI jelenlétében inkubáltunk 1 ng/ml LPS-ot („LPS”) vagy ezzel megegyező biológiai hatású 3 ng/ml LPS tartalmú bleb-et („bleb”)(C). Ezt követően LAL esszével határoztuk meg az endotoxin koncentrációt és relatív fluoreszcencia egységben (RFU) tüntettük fel a mért értékeket. Az ábrákon három független kísérlet átlaga $\pm$ SEM kerül bemutatásra (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

6.7. A sCD14, mint biomarker – cirrhotikus betegek vizsgálata

6.7.1. A betegcsoport

Háromszázhatvannyolc jól karakterizált, követés alatt álló cirrhotikus beteget választottunk be a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Gastroenterológiai Tanszékéről. A betegek demográfiai, klinikai és laboratóriumi paramétereit az 1. táblázat tartalmazza. A vizsgált 368 betegből 139 esetben igazolódott bakteriális fertőzés jelenléte, míg 229 esetében nem volt fertőzés a vérvétel idején. A vizsgált betegcsoportok között nemi eloszlás, ko-morbiditás és hepatocelluláris carcinoma (HCC) jelenléte alapján nem volt különbség, azonban a fertőzött betegcsoport szignifikánsabban idősebb volt, súlyosabb cirrhosisal, és gyakrabban fordult elő ebben a csoportban cirrhosis specifikus komplikáció is (ascites, varix vérzés).

6.7.2 Az APP szintek alakulása a fertőzöses és fertőzés nélküli betegek csoportjában

A fertőzöses és fertőzés nélküli betegek összehasonlítása során egyértelmű volt, hogy a fertőzések jelenlétében szignifikánsan magasabbak a CRP, PCT és LBP szintek. Ugyanakkor a két csoport sCD14 szintje között nem volt szignifikáns különbség. A két csoport szérums APP szintjeit az 1. táblázat mutatja. Az egyes markerek közötti összefüggést megvizsgálva pozitív korrelációt találtunk a PCT, sCD14, FVS szám, abszolút PMN szám és CRP szintek között a fertőzött betegcsoportban (2. táblázat).

6.7.3. Az egyes paraméterek diszkriminatív ereje a cirrhotishoz társuló fertőzések kimutatásában

ROC analízissel is megvizsgáltuk, hogy a tesztelt APP markerek képesek-e a nem fertőzött és fertőzött betegcsoport között differenciálni, és esetlegesen lehet-e ilyen esetekben diagnosztikai értékük. A ROC görbe alatti terület a CRP esetében volt a legnagyobb [AUC, (95%CI): 0,93 (0,90–0,95)], ez a PCT esetében [AUC, (95%CI): 0,84 (0,79–0,88)] már valamivel alacsonyabb értéket mutatott, míg a többi APP és paraméter esetében a tesztek diszkriminatív ereje jóval gyengébb volt [LBP – AUC, (95%CI): 0,67 (0,61–0,73); sCD14 – AUC, (95%CI): 0,57 (0,51–0,63); fehérvérsejtszám – AUC, (95%CI): 0,73 (0,67–0,78); abszolút PMN szám – AUC, (95%CI): 0,77 (0,72–0,82)]. A 3. táblázat mutatja az egyes markerek analitikai paramétereit a ROC görbe segítségével meghatározott optimális cut-off értékek alapján (egyesével, illetve a PCT esetében a CRP szinttel kombinálva is). Az eredmények alapján a szérums sCD14 mérés alacsony szenzitivitás/specifitás valamint pozitív/negatív prediktív értékkel rendelkezik, így nem alkalmas az infekció jelenlétének kimutatására cirrhotikus betegekben. A CRP viszont az eredmények alapján érzékeny

markernek tűnik, és különösen a PCT szint meghatározásával kombinálva a bakteriális infekciók detektálásának érzékeny markere lehet.

1. táblázat. A nem fertőzött és fertőzött betegcsoportok demográfiai, klinikai és laboratóriumi adatai

	Nem fertőzött n= 229	Fertőzött n = 139	P-érték
Nem (férfi/nő), (n)	122 / 107	82 / 57	N.S.
Kor (átlag ± SD, év)	55,5 ± 11,1	58,3 ± 9,8	0,018
Child-Pugh score (pont)			
átlag±SD	7,3 ± 2,2	9,7 ± 2,3	< 0,0001
Stádium, n (%) ^a			
A	102 (46,4%)	11 (8,0%)	
B	87 (39,5%)	55 (39,9%)	
C	31 (14,1%)	72 (52,1%)	
MELD score (pont), átlag±SD	12,6 ± 4,4	18,0 ± 7,1	< 0,0001
Szérum bilirubin (μmol/l)	42,5 ± 44,3	107,2 ± 131,0	< 0,0001
Szérum albumin (g/l)	35,4 ± 7,4	30,0 ± 7,1	< 0,0001
Ascites jelenléte, n (%)	86 (37,6%)	102 (73,4%)	< 0,0001
Akut varix-vérzés, n (%)	39 (17,0%)	41 (29,5%)	0,0061
HCC, n (%)	21 (9,2%)	17 (12,2%)	N.S.
Ko-morbiditás jelenléte, n (%)	93 (40,6%)	68 (48,9%)	N.S.
Bakteriális fertőzés típusa			
Urinalis tractus fertőzés		27 (19,4%)	
Spontán bakteriális peritonitis		37 (26,6%)	
Pneumonia		27 (19,4%)	
Bőr- és lágy szövet fertőzés		5 (3,6%)	
Egyéb		43 (31,0%)	
Fehérvérsajt szám (G/l), medián [IQR]	5,3 [4,0-7,0]	7,3 [5,7-11,3]	< 0,0001
PMN szám (G/l), median [IQR]	3,2 [2,4-4,6]	5,3 [3,7-8,9]	< 0,0001
Akut fázis fehérjék, median [IQR]			
CRP (mg/l)	2,7 [1,1-6,3]	28,5 [14,9-53,1]	< 0,0001
PCT (μg/l)	0,10 [0,01-0,11]	0,32 [0,13-0,88]	0,019
LBP (μg/l)	19 081 [15 137-27 302]	29 289 [18 426-44 308]	< 0,0001
sCD14 (μg/l)	2 336 [1 792-3 147]	2 613 [1 929-4 043]	N.S.

^aA Child-Pugh stádium 10 esetben nem volt elérhető

2. táblázat. CRP és más akut fázis fehérjék és paraméterek korrelációja fertőzött betegekben

	Spearman's r	P-érték
Fehérvérsejt szám	0,23	0,0038
PMN szám	0,26	0,0025
PCT	0,61	< 0,0001
LBP	0,62	< 0,0001
sCD14	0,23	0,004

3. táblázat. Akut fázis fehérjék prediktív értéke a fertőzött és nem fertőzött betegek megkülönböztetésében

Fertőzött vs. nem fertőzött	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	Pozitív prediktív érték (%)	Negatív prediktív érték (%)
CRP (5 mg/l)	96	69	65	96
CRP (10 mg/l)	84	91	84	91
PCT (0,5 µg/l)	36	98	90	72
PCT (0,15 µg/l)	72	84	72	84
LBP (25 467 µg/l)	59	71	55	75
sCD14 (2 804 µg/l)	50	67	45	68
CRP és PCT is pozitív^a	62	98	94	81
Legalább egy marker pozitív^a	94	77	70	96

^a CRP 10 mg/l és PCT 0,15 µg/l

7. Megbeszélés

7.1. CD14/Fc fúziós fehérje – potenciális antimikrobiális szer?

7.1.1. A CD14/Fc interakciója baktériumokkal

A CD14 molekula fontos szerepet tölt be a LPS szignalizációban, melyet az LBP fehérjével kölcsönhatva a TLR4/MD2 receptor komplexen keresztül közvetít, ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésre a CD14 és baktériumok kölcsönhatásáról. Összesen két publikáció írja le a CD14 Gram-negatív baktériumokhoz való direkt kötődését [42, 43], és bár több szerző is említ membránkötött CD14 függő fagocitózis mechanizmusokat, ezek az eredmények nem támasztják alá közvetlenül a CD14-baktérium kötődést [21, 39-41]. Valószínűleg a szolúbilis CD14 kisebb affinitással kötődik a baktériumokhoz, míg a membránkötött forma eltérő konformációja vagy más a membránban előforduló molekulák elősegíthetik a CD14-baktérium interakciót.

Egy, az IgG1 Fc részéhez fuzionáltatott antimikrobiális fehérje tulajdonságai (köztük a ligandkötő képessége) jelentősen eltérhetnek az eredeti komponensek tulajdonságaitól [85, 103]. Az egyik fontos tényező az Fc rész következtében létrejövő dimerizáció, ami jelentősen megnövelheti az antimikrobiális fúziós fehérje aviditását az eredeti ligandjához, ahogyan ezt eddig egyetlen korábbi munkában affibody-Fc kimérák esetében tapasztalták [86]. A CD14 esetében hasonló hatást vártunk, ezért hoztunk létre egy CD14/Fc fúziós fehérjét, valamint kontrollként egy CD14/His molekulát, és vizsgáltuk ezek különböző mikrobákhoz való kötődését. Elképzeléseink szerint a CD14/Fc fúziós fehérje tulajdonságai nem csak a mikrobákhoz való kötődésben változnak pozitívan, hanem az Fc rész révén a molekula egyfajta opszoninként is viselkedhet, ahogyan azt más hasonló elven alapuló fehérjék esetében leírták [77-81, 98, 104]. Ezen kívül az Fc rész egyéb effektor funkciókat is elláthat, mint például a komplement rendszer aktiválása, vagy a fagociták Fc receptorához való kötődésen keresztül a fagocitózis elősegítése [85]. Az opszonizáción kívül egyéb hasznos következményei is vannak egy antimikrobiális hatású fehérje fúziójának az IgG1 Fc részéhez, mint például a megnövekedett fél-életidő, és a csökkent vese toxicitás [75]. Az Fc rész elősegítheti bizonyos esetekben a nehezen expresszálható fehérjék előállítását [83], felhasználható a fehérje tisztítására [84], és elősegítheti a molekula FcRn receptorokon keresztüli felvételét a béltraktus vagy a tüdő epithel sejtein keresztül [85].

A kísérleteink igazolták, hogy a CD14/Fc fúziós fehérje LBP függő interakcióba lép szabad LPS-dal és teljes baktériumokkal is. A fúziós fehérje és a baktériumok közötti kötődés

gátolható volt szabad LPS-dal és CD14 ellenes blokkoló antitest hozzáadásával is, ami arra utal, hogy a molekula CD14 része és a LPS közötti specifikus kölcsönhatás következménye a baktériumokhoz való kötődés.

A CD14/Fc fehérje az összes vizsgált Gram-negatív baktériumhoz kötődött olyan CD14/Fc koncentrációk mellett, melyek hasonlóak a szérumban fiziológiásan előforduló sCD14 koncentrációhoz. A CD14/Fc különösen nagy affinitással kötődött a vizsgált R-típusú mutánsokhoz. Ez a jelenség valószínűleg annak tudható be, hogy ezen mutánsok sejtfelszíni LPS-járól hiányzik az O-antigén, ami könnyebbé teszi a CD14/Fc molekula hozzáférését a LPS erősen konzervatív lipid-A részéhez. Ez a biológiai hatásokért alapvetően felelős funkcionális egysége a LPS molekulának és egyben ez a CD14 molekula által felismert rész is. Hasonló jelenség a lipid-A specifikus monoklonális antitestek csökkent kötődési képessége az O-antigént tartalmazó LPS molekulákhoz [105]. A CD14/Fc molekulával ellentétben a CD14/His molekula kizárólag az R-típusú mutánsokhoz kötődött, ezekhez is csak jóval kisebb mértékben. A két molekula baktériumkötő képessége között hozzávetőlegesen 50-szeres különbséget tapasztaltunk a CD14/Fc javára, ami azt jelzi, hogy a molekula dimerizációja valóban jelentős mértékben növeli a LPS-dal illetve a baktériumokkal való kölcsönhatás erősségét.

Bár az irodalom ellentmondásos a kérdésben, a CD14 több más ligandját is valószínűsítik, melyek egy része Gram-pozitív baktériumokból, illetve gombákból származik. Ilyen ligandok a *Mycobacterium*okból származó lipoarabinomannán, a szolúbilis peptidoglikán, a *Blastomyces dermatitidis* WI-1 antigénje, a *S. aureus* sejtfala és a *Pseudomonas*-ból származó poliuronsav [31]. A sok lehetséges ligand, és az emiatt feltételezett széles faj-specifitás ellenére a CD14/Fc molekula csak a Gram-negatív baktériumokhoz kötődött, míg a vizsgált gombákhoz nem. A Gram-pozitív baktériumok közül csak a *L. monocytogenes* esetében tapasztaltunk kötődést, ami egyezést mutat a Janot és munkatársai által leírt jelenséggel, mely szerint a CD14-nek fontos szerepe van a *L. monocytogenes* fertőzések leküzdésében. Ez a megfigyelés arra utal, hogy ebben a Gram-pozitív kórokozóban legalább egy CD14 ligand előfordul [41].

A fagocitózis vizsgálatok igazolták, hogy a rövid LPS (Ra és Re) mutáns baktériumok esetében a CD14/Fc nem csak kötődött a baktériumok felszínéhez, hanem opszoninként viselkedve fokozta ezen baktériumok izolált neutrofil granulocyták, illetve monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek általi felvételét. A fagocitózis fokozó hatáson kívül a CD14/Fc fúziós fehérje fokozta a teljes vér baktériumölő képességét is. Sajnos a vad típusú baktériumok esetében sem a fagocitózist fokozó hatást, sem a teljes vér baktériumölő

képességének növekedését nem tudtuk megfigyelni. Ennek az oka valószínűleg az, hogy a vad típusú baktériumok felszínéhez kötődő kisebb mennyiségű CD14/Fc nem elegendő az Fc receptorok keresztkötéséhez, ami alapvető fontosságú az FcR mediálta fagocitózis beindításához [106].

Az FcR blokkolós kísérleteink azt igazolják, hogy az R-típusú baktériumok esetében tapasztalt, CD14/Fc által kiváltott fagocitózis növekedés a molekula Fc része és a PMN sejtek Fc γ III/Fc γ II (CD16/CD32) receptorainak kölcsönhatása következtében jön létre. Az a tény, hogy az Fc γ III és Fc γ II egyidejű blokkolásakor a fagocitózis a CD14/Fc nélküli kontroll szintjére csökkent, arra enged következtetni, hogy az Fc-FcR interakción kívüli egyéb mechanizmusoknak (pl. komplement rendszernek) nincs jelentős szerepe a CD14/Fc mediált baktérium felvételben. A normál humán szérumban tartalmazó minták esetében az Fc receptorok kombinált blokkolása nem vezetett teljes gátláshoz, míg a normál humán szérumban + CD14/Fc-t tartalmazó minták esetében a gátlás 100%-os volt. Ez annak a jelenségnek lehet a következménye, hogy a CD14/Fc által opsonizált baktériumok felszínéről a CD14/Fc leszorítja a szérumban esetlegesen előforduló komplement kötő antitesteket.

Jelenleg három hasonló elven felépülő mesterséges antitest létezik, melyekkel segítségével a jövőben potenciálisan felvehető lehet a küzdelem Gram-negatív fertőzésekkel szemben. Warren és munkatársai kémiai fuzionáltatták a CAP18 fehérje LPS-kötő doménjét a teljes humán IgG-hez [77, 79, 98]. An és munkatársai BPI-t kapcsoltak a humán IgG-hez DNS szinten, és a fúziós fehérjét *in vitro* és *in vivo* is expresszálták egy virális vektor segítségével [78, 80, 81]. Egy viszonylag új közleményben Falk és munkatársai egy LPS-Trap-Fc fúziós protein létrehozásáról számolnak be, melyet a TLR4 extracelluláris doménjének és az MD2-nek a humán IgG Fc részéhez való fúziójával hoztak létre [104]. Mindhárom molekula képes volt szabad LPS és különböző Gram-negatív baktériumok kötésére és neutralizációjára is. Ezen kívül az első két esetben a fúziós molekula antibakteriális hatását *in vivo* egér szepszismodellekben is demonstrálták.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a CD14/Fc fúziós protein effektíven kötődött Gram-negatív baktériumokhoz, elősegítette azok fagocitózist és killingjét, de ez a hatás csak az R mutáns baktériumok esetében volt számottevő. Ezek alapján terápiás ágensként alkalmazása nem jön szóba. Kísérleteink ugyanakkor alátámasztják, hogy a PRR/Fc fúziós fehérjék jelentősen növelhetik az FcR dependens fagocitózist és baktérium neutralizálást, amennyiben az antimikrobiális rész elegendő affinitással bír a kérdéses kórokozóhoz. Ezen kívül a fúzió révén keletkező dimer affinitása akár 50-szer nagyobb lehet a kiindulási monomer affinitásánál. Úgy gondoljuk, hogy hasonló fúziós

fehérjék, széles antimikrobiális spektrummal, – ami ideális esetben magában foglalja a Gram-pozitív baktériumokat illetve a gombákat is – hatásos antimikrobiális szerek lehetnek olyan kórokozók ellen, melyek rezisztensek az általánosan használt antibiotikumokkal szemben [107].

7.1.2. A CD14/Fc interakciója LPS-dal és külső membrán vezikulumokkal

A Gram-negatív baktériumokból felszabaduló virulencia faktoroknak és egyéb molekuláris komponenseknek nagy szerepe van a fertőzésekhez társuló súlyos komplikációk – szepszis, szepszikus shock, sokszervi elégtelenség – kialakulásában. Ezek megjelenhetnek izolált formában, de nem ritkán a külső membránból lefűződő vesiculák, „bleb”-ek alakjában is. Különösen kifejezett a bleb képződés a *N. meningitidis* által okozott infekcióban. A súlyos meningococcalis fertőzéseket a betegség nagyon gyors progressziója és rendkívül magas LPS koncentráció jellemzi [32]. A LAL esszével megállapított magas LPS koncentráció a nagy számban keletkező külső membrán vezikulum következménye lehet. A LPS, blebek és egyéb bakteriális komponensek hatására bekövetkező citokin „vihar”, a kontrollálatlan effektor sejt aktiváció, valamint a vaszkuláris változások olyan mélyrehatóan zavarják meg a szervezet homeostasisát, ami az esetek jó részében visszafordíthatatlan, és a betegek elvesztését eredményezi. Így a kórokozók elpusztításán túl nagy jelentősége lenne olyan ágensek fejlesztésének, amelyek ezeket a mikrobiális virulencia faktorokat is képesek neutralizálni. Miután a CD14 molekula legfontosabb természetes ligandja a LPS, megvizsgáltuk, hogy a létrehozott CD14/Fc fúziós fehérje képes-e különböző LPS-ok és külső membrán vezikulum neutralizálására.

Kísérleteink során – meglepő módon – a két alkalmazott sejtes rendszerben a CD14/Fc nem neutralizálta sem a LPS-ok sem a bleb hatását. Mi több, önmagában is képes volt a monocyták és a PMN sejtek dóziszfüggő aktiválására. Ez a hatás nem a CD14/Fc készítmény LPS kontaminációjával volt magyarázható, mert a LAL assay teljesen negatív eredményt adott. Nagy valószínűséggel a molekula Fc része és a sejtek felszínén lévő FcR-ok interakciója magyarázhatja a jelenséget, de ez még további vizsgálatokat igényel. Ez a CD14/Fc-mediált sejtaktiváció ugyanakkor egy kétélű fegyver, hiszen a PMN sejtek reaktív oxigén intermedier termelésének fokozódása hasznos lehet a baktériumok elpusztítása során, de ugyanakkor a celluláris komponensek aktiválódása hozzájárulhat a generalizált gyulladásos reakció fokozódásához és az életet veszélyeztető szepszikus shock kialakulásához.

Miután a CD14/Fc molekula egyedül a LAL assay-ben nem mutatott önmagában aktivitást ebben a rendszerben is megvizsgáltuk hatását a különböző LPS molekulákra és bleb

preparátumokra. Érdekes módon a CD14/Fc fúziós protein nem gátolta a LAL rendszer aktiválódását, azaz nem neutralizálta sem a LPS sem a blebek hatását. A jelenség többféleképpen is magyarázható. Elképzelhető, hogy a LAL rendszer LPS felismerő és a kaszkádot beindító komponense(i) sokkal erősebben köti(k) a LPS/bleb preparátumokat, mint a CD14 molekula és ezért nem fejt ki számottevő gátló hatást a fúziós protein. Másrészt a CD14/LBP rendszer alapvető funkciója egyedi LPS molekulák transzportja az aggregált LPS micellákból megfelelő donor molekulákhoz, mint pl. a sejtmembránban lévő CD14/TLR4/MD2 komplex (sejtaktiváció) [18], vagy a plazmában lévő high density lipoprotein (HDL) molekula (neutralizáció) [108]. Elképzelhető tehát, hogy a LAL assay-ben is hasonló funkciót tölt be a vizsgált CD14/Fc molekula: ugyan megköti a LPS monomereket, de továbbítja a LAL rendszer inicializálásért felelős assay komponensekhez és ezért nincs gátló hatása.

Miután a CD14/Fc fúziós fehérje nem volt képes a LPS/blebek neutralizálására, tovább vizsgáltuk az ezek semlegesítésének lehetőségeit. Kimutattuk, hogy a humán plazma mind a LPS, mind a bleb-ek aktivitását gyakorlatilag nullára csökkenti a LAL esszé eredményei alapján. Novitsky és munkatársai hasonlóan a mi eredményeinkhez, szintén 100%-os gátlást tapasztaltak a LPS esetében a LAL esszével [109]. Ami a neutralizáció mechanizmusát illeti, nagyon valószínű, hogy az LBP szállítja a szabad LPS-ot és a bleb-ekből liberalizált LPS-ot a HDL-hoz, ahol a LPS már nem hozzáférhető a LAL kaszkádot elindító komponensek számára. További kísérleteink azt igazolták, hogy a BPI fehérjével előinkubált LPS és blebek LAL kaszkád aktiváló hatása nagyon nagy mértékben csökken. A BPI egy ismert pozitív töltésű (kationos) fehérje, amely a PMN sejtek granulumaiban és a vérplazmában is megtalálható, erős antimikrobiális hatással bír, és – saját adataink alapján is – képes a LPS és blebek neutralizálására.

A bleb vezikulák nagy mennyiségben tartalmaznak LPS-ot, de ugyanakkor partikulált részecskék, így elvileg eltérően viselkedhetnek a szabad LPS molekulákhoz képest. Eredményeink ugyanakkor azt mutatják, hogy nincs különbség a szabad LPS és a blebek aktivitásának – CD14/Fc, plazma vagy BPI általi – neutralizálásában így a bleb-ek biológiai aktivitásukat tekintve a szabad LPS-hoz hasonlíthatnak.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a CD14/Fc molekula nem képes a LPS/bleb preparátumok neutralizálására sőt önmagában is sejtaktiváló hatása van, ami vélhetően az Fc-FcR interakció következménye. Ezek alapján terápiás ágensként alkalmazása septicus állapotokban nem jön szóba. A LPS és bleb vezikulumok semlegesítése effektíven történik a plazma illetve a BPI molekulák által [110].

7.2. sCD14 – használható biomarker a cirrhosisához társuló fertőzések kimutatásában és/vagy előrejelzésében?

Számos inflammatorikus és nem inflammatorikus kórállapot jár a mCD14 expressziós szintjének, vagy a sCD14 lokális vagy szisztémás koncentrációjának változásával. Szeptikus, politraumatizált és súlyos égési sérült betegek esetében a sCD14 koncentráció megemelkedik. Szepszisben a magasabb sCD14 koncentráció korrelál a mortalitással. Ezen kívül emelkedett sCD14 koncentrációkat mértek aktív sarcoidosis betegek, bakteriális tüdőgyulladásban és ARDS-ban vagy asthma bronchialeban szenvedő betegek bronchoalveolaris mosófolyadékban. Továbbá emelkedett volt a szérumsCD14 koncentráció SLE, RA, ARDS, krónikus szív elégtelenség, alkoholos cirrhosis, psoriasis, atópiás dermatitis valamint extrinsic allergiás alveolitises betegek esetében, továbbá fertőzőes kórállapotokban is mint aktív tuberculosis, malaria, krónikus hepatitis B és C fertőzés és HIV-1 fertőzött betegekben. Bizonyos esetekben a sCD14 koncentráció változása korrelált a betegség aktivitásával [5, 53]. Számos olyan alkalmazása van tehát a sCD14 mérésnek, amikor a különböző kórképekhez társuló fertőzések kimutatásában nyújt segítséget ennek a biomarkernek a mérése. Miután a cirrhosisos betegek esetében a társuló fertőzések jelentős mértékben befolyásolják a betegek klinikai állapotát, az esetleges társuló szövődmények kialakulását és végső soron a betegek életkilátásait az infekciók azonosítása ebben a kórképben klinikai szempontból rendkívül jelentős. Sajnálatos módon azonban mind a klinikai jelek mind a jelenleg elérhető laboratóriumi tesztek meglehetősen szegényesek, így minden új biomarker, ami erre a célra használható nagy jelentőséggel bír. Számos tanulmány állapított meg emelkedett LBP és sCD14 koncentrációt, különösen dekompenzált cirrhosisban, de mindössze két esetben mutattak ki összefüggést az infekció és a megemelkedett LBP és sCD14 szintek között ezekben a betegekben [111, 112]. Sajnos ezekben az esetekben a vizsgált markerek analitikai tulajdonságait nem elemezték. Ezért határoztunk úgy, hogy további vizsgálatokat végzünk ezen a területen és meghatározzuk a sCD14 és további 3 akut fázis fehérje szérumszintjét és analitikai tulajdonságait cirrhosisos betegek mintáiban. Munkánk nagy erőssége, hogy legjobb tudásunk szerint eddig ez a legnagyobb tanulmány, 368 beteg bevonásával, mely egyszerre vizsgálja a különböző APP markerek (CRP, PCT, LBP, sCD14) klinikai hasznosíthatóságát cirrhosisban előforduló fertőzések azonosítására.

Sajnálatos módon a sCD14 szint mérés nem bizonyult érzékeny módszernek a cirrhosishoz társuló fertőzések detektálásában, a fertőzéssel jellemezhető és infekció mentes betegek szérumsCD14 koncentrációjában nem találtunk szignifikáns különbséget. Ennek megfelelően

az analitikai paraméterek (érzékenység, specificitás, negatív- és pozitív-prediktív érték) alacsonyok voltak. Két korábbi cikkben magasabb sCD14 értékeket detektáltak az infekciós cirrhotikus betegekben, azonban mindkét publikációban jóval kisebb és heterogénebb betegpopulációt vizsgáltak, amelyben ráadásul jóval több volt a súlyos (szeptikus) esetek aránya. Az eltérést magyarázhatja még az alkalmazott technikák közötti különbség is, az immunoassay-k eredményi között nem ritkán jelentős különbség is lehet [113, 114]. Nemrégiben egy automatizált sCD14 mérő rendszer került kereskedelmi forgalomba, amelyik sokkal standardizáltabban képes a szérumban CD14 mérésre. Ennek alkalmazása megbízhatóbb eredményeket adhat, és terveink között szerepel ennek tesztelése saját mintáinkon is.

A további akut fázis fehérjék vizsgálata során megállapítottuk, hogy a CRP szint, 10 mg/l határértékkel, már önmagában is érzékeny markere a bakteriális fertőzéseknek. A CRP meghatározás kombinálása a PCT meghatározásával némileg emelte a diagnosztikai pontosságot, ugyanakkor a diagnosztikai folyamat költségeinek jelentős emelkedésével járt. Ugyanakkor ezen szerológiai tesztek gyengébb teljesítményt nyújtottak a betegség előrehaladottabb stádiumaiban vagy asciteses betegek esetében. A CRP, mint a bakteriális fertőzések markere már jó ideje ismert, még cirrhotikus betegek esetében is [115]. Ugyanakkor még számos nyitott kérdés maradt a CRP optimális használatával kapcsolatban ebben a betegcsoportban. Korábbi klinikai tanulmányokban, melyek 20-127 esetet dolgoztak fel, a CRP és a PCT bizonyult a legjobb markernek a bakteriális fertőzések azonosítására, de a diagnosztika pontosságuk és határértékeik jelentősen eltértek egymástól a különböző tanulmányokban [66, 69-72, 116-118]. A CRP esetében a szenzitivitás 62-80%, a specificitás 68-96% között volt, a ROC görbe alatti terület pedig 0,72-0,91 között mozgott [66, 68, 69, 119]. Jelen tanulmányban a szenzitivitás 84%, a specificitás 91%, a ROC görbe alatti terület pedig 0,93-nak adódott. Az általunk meghatározott optimális határérték (9,2 mg/l) alacsonyabbnak adódott, mint a többi tanulmányban, melyekben ez 20 mg/l [72], 24,7 mg/l [116], 55,9 mg/l [69], valamint 80,0 mg/l [71] volt. Egy lehetséges magyarázat ezekre az eltérésekre a betegpopulációk közötti különbség. A jelen tanulmányhoz képest, a korábbi eredményeket jóval kisebb betegcsoportokon végezték, mely torzíthatja az eredményt. Továbbá a korábbi tanulmányokban a fertőzőesetek a legtöbb beteg esetében együtt jártak szisztémás gyulladásos válaszreakcióval (SIRS), szepszissel, bizonyos esetekben még szeptikus shock-kal is. A mi egész fertőzőesetek betegcsoportunk sokkal inkább a mindennapos klinikai eseteket reprezentálja [60]. Egy nagy betegcsoportot vizsgáltunk, melyekben nem csak súlyos fertőzések, hanem enyhébb formák is elegendő számmal fordultak elő. A fertőzések hozzávetőlegesen 25%-a enyhe volt, és főként a húgyutakra lokalizálódott. Mivel a

cirrhotikus betegek immunrendszere nem működik megfelelően, és ezért jobban ki vannak téve a fertőzések kiterjedésének, ami a májfunkciók további romlásához és egyéb súlyos komplikációkhoz vezethet [61, 62], ezért a korai diagnózis és a fertőzések aktív kezelése javasolt még az enyhébb esetekben is.

A második legjobb markernek a PCT bizonyult, de a teljesítménye minden tekintetben elmaradt a CRP mögött. Csak néhány tanulmány foglalkozik a PCT diagnosztikai tulajdonságaival májbetegekben, de az eredmények meglehetősen egybevágóak [66, 70, 71, 115, 116]. Ezekben az esetekben a PCT szint jelentősen megemelkedett a fertőzött betegekben a kontrollhoz képest, bár a median érték elég változó volt: 0,74 µg/l [118], 2,8 µg/l [117], 3,2 µg/l [66], 9,8 µg/l [70], 10,1 µg/l [71]. Mi is szignifikánsan emelkedett PCT szinteket mértünk a fertőzött betegekben, de a median érték alacsonyabbnak adódott: 0,24 µg/l. Továbbá a PCT diszkriminatív ereje 0,15 µg/l cut-off értéket alkalmazva szintén kissé gyengébb volt (szenzitivitás: 72%, specificitás 84%, AUC-ROC: 0,84), mint két korábbi tanulmányban (szenzitivitás: 85 és 95%, specificitás: 96 és 98%, AUC-ROC: 0,97 és 0,98) [70, 71]. Az általunk vizsgált betegcsoport egy negyede csupán enyhe fertőzésben szenvedett, mely vagy nem, vagy kismértékben jár csak PCT koncentráció emelkedéssel [113], de ezek a diszkrepanciák technikai különbségekkel is magyarázhatók. Annak ellenére, hogy klasszikus (nem szenzitív) PCT tesztet használtak minden korábbi tanulmányban, a használt vizsgálatok eredménye eltérő lehet a különböző detektálási módszerek következtében [113, 114].

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a szérumban sCD14 mérés nem alkalmas az infekció jelenlétének kimutatására vagy annak előrejelzésére cirrhosis betegekben, ugyanakkor a CRP meghatározás (különösen a PCT méréssel kombinálva) a bakteriális infekciók érzékeny markere [120].

8. Irodalomjegyzék

- [1] J.D. Griffin, J. Ritz, L.M. Nadler, S.F. Schlossman, Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells, *J. Clin. Invest.* 68 (1981) 932-941.
- [2] E. Ferrero, C.L. Hsieh, U. Francke, S.M. Goyert, CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes, *J. Immunol.* 145 (1990) 331-336.
- [3] S.M. Goyert, E. Ferrero, W.J. Rettig, A.K. Yenamandra, F. Obata, M.M. Le Beau, The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors, *Science*. 239 (1988) 497-500.
- [4] E. Ferrero, S.M. Goyert, Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 4173.
- [5] P. Antal-Szalmas, Evaluation of CD14 in host defence, *Eur. J. Clin. Invest.* 30 (2000) 167-179.
- [6] R. Landmann, A.M. Reber, S. Sansano, W. Zimmerli, Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock, *J. Infect. Dis.* 173 (1996) 661-668.
- [7] A. Cauwels, K. Frei, S. Sansano, C. Fearn, R. Ulevitch, W. Zimmerli, R. Landmann, The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis, *J. Immunol.* 162 (1999) 4762-4772.
- [8] V. Bazil, M. Baudys, I. Hilgert, I. Stefanova, M.G. Low, J. Zbrozek, V. Horejsi, Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14, *Mol. Immunol.* 26 (1989) 657-662.
- [9] A. Haziot, S. Chen, E. Ferrero, M.G. Low, R. Silber, S.M. Goyert, The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage, *J. Immunol.* 141 (1988) 547-552.
- [10] J. Takeda, T. Miyata, K. Kawagoe, Y. Iida, Y. Endo, T. Fujita, M. Takahashi, T. Kitani, T. Kinoshita, Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Cell*. 73 (1993) 703-711.
- [11] P. Antal-Szalmas, J.A. Strijp, A.J. Weersink, J. Verhoef, K.P. Van Kessel, Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 721-728.
- [12] C. Kruger, C. Schutt, U. Obertacke, T. Joka, F.E. Muller, J. Knoller, M. Koller, W. Konig, W. Schonfeld, Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients, *Clin. Exp. Immunol.* 85 (1991) 297-301.
- [13] W.C. Van Voorhis, R.M. Steinman, L.S. Hair, J. Luban, M.D. Witmer, S. Koide, Z.A. Cohn, Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages, *J. Exp. Med.* 158 (1983) 126-145.

- [14] T. Vasselon, R. Pironkova, P.A. Detmers, Sensitive responses of leukocytes to lipopolysaccharide require a protein distinct from CD14 at the cell surface, *J. Immunol.* 159 (1997) 4498-4505.
- [15] A. Marchant, J. Duchow, J.P. Delville, M. Goldman, Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 1663-1665.
- [16] A. Bikoue, F. George, P. Poncelet, M. Mutin, G. Janossy, J. Sampol, Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values, *Cytometry.* 26 (1996) 137-147.
- [17] J.I. Kim, C.J. Lee, M.S. Jin, C.H. Lee, S.G. Paik, H. Lee, J.O. Lee, Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 11347-11351.
- [18] E.M. Palsson-McDermott, L.A. O'Neill, Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4, *Immunology.* 113 (2004) 153-162.
- [19] J. Pugin, I.D. Heumann, A. Tomasz, V.V. Kravchenko, Y. Akamatsu, M. Nishijima, M.P. Glauser, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, CD14 is a pattern recognition receptor, *Immunity.* 1 (1994) 509-516.
- [20] B. Weidemann, J. Schletter, R. Dziarski, S. Kusumoto, F. Stelter, E.T. Rietschel, H.D. Flad, A.J. Ulmer, Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes, *Infect. Immun.* 65 (1997) 858-864.
- [21] K. Onozuka, T. Kirikae, F. Kirikae, Y. Suda, S. Kusumoto, S. Yamamoto, T. Shimamura, M. Nakano, Participation of CD14 in the phagocytosis of smooth-type *Salmonella typhimurium* by the macrophage-like cell line, J774.1, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 765-772.
- [22] R.M. Wooten, T.B. Morrison, J.H. Weis, S.D. Wright, R. Thieringer, J.J. Weis, The role of CD14 in signaling mediated by outer membrane lipoproteins of *Borrelia burgdorferi*, *J. Immunol.* 160 (1998) 5485-5492.
- [23] A. Devitt, O.D. Moffatt, C. Raykundalia, J.D. Capra, D.L. Simmons, C.D. Gregory, Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells, *Nature.* 392 (1998) 505-509.
- [24] E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, A.J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H.D. Grimmecke, S. Kusumoto, The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity, *Immunobiology.* 187 (1993) 169-190.
- [25] N. Kato, T. Sugiyama, S. Naito, Y. Arakawa, H. Ito, N. Kido, M. Ohta, K. Sasaki, Molecular structure of bacterial endotoxin (*Escherichia coli* Re lipopolysaccharide): implications for formation of a novel heterogeneous lattice structure, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 796-805.

- [26] D.C. Morrison, R.J. Ulevitch, The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review, *Am. J. Pathol.* 93 (1978) 526-618.
- [27] O.O. Nduka, J.E. Parrillo, The pathophysiology of septic shock, *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 23 (2011) 41-66.
- [28] J.E. Parrillo, Pathogenetic mechanisms of septic shock, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 1471-1477.
- [29] R.J. Ulevitch, P.S. Tobias, Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin, *Annu. Rev. Immunol.* 13 (1995) 437-457.
- [30] C. Galanos, O. Luderitz, M. Freudenberg, L. Brade, U. Schade, E.T. Rietschel, S. Kusumoto, T. Shiba, Biological activity of synthetic heptaacyl lipid A representing a component of *Salmonella minnesota* R595 lipid A, *Eur. J. Biochem.* 160 (1986) 55-59.
- [31] R. Landmann, B. Muller, W. Zimmerli, CD14, new aspects of ligand and signal diversity, *Microbes Infect.* 2 (2000) 295-304.
- [32] E. Namork, P. Brandtzaeg, Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus, *Lancet.* 360 (2002) 1741.
- [33] L.H. Harrison, C.L. Trotter, M.E. Ramsay, Global epidemiology of meningococcal disease, *Vaccine.* 27 Suppl 2 (2009) B51-63.
- [34] R.R. Ingalls, E. Lien, D.T. Golenbock, Differential roles of TLR2 and TLR4 in the host response to Gram-negative bacteria: lessons from a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*, *J. Endotoxin Res.* 6 (2000) 411-415.
- [35] A. Bjerre, B. Brusletto, E. Rosenqvist, E. Namork, P. Kierulf, R. Ovstebo, G.B. Joo, P. Brandtzaeg, Cellular activating properties and morphology of membrane-bound and purified meningococcal lipopolysaccharide, *J. Endotoxin Res.* 6 (2000) 437-445.
- [36] D.M. Post, D. Zhang, J.S. Eastvold, A. Teghanemt, B.W. Gibson, J.P. Weiss, Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38383-38394.
- [37] T.L. Gioannini, A. Teghanemt, K.A. Zarembler, J.P. Weiss, Regulation of interactions of endotoxin with host cells, *J. Endotoxin Res.* 9 (2003) 401-408.
- [38] T. Sprong, A.S. Moller, A. Bjerre, E. Wedege, P. Kierulf, J.W. van der Meer, P. Brandtzaeg, M. van Deuren, T.E. Mollnes, Complement activation and complement-dependent inflammation by *Neisseria meningitidis* are independent of lipopolysaccharide, *Infect. Immun.* 72 (2004) 3344-3349.
- [39] P.K. Peterson, G. Gekker, S. Hu, W.S. Sheng, W.R. Anderson, R.J. Ulevitch, P.S. Tobias, K.V. Gustafson, T.W. Molitor, C.C. Chao, CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia, *Infect. Immun.* 63 (1995) 1598-1602.

- [40] D.E. Schiff, L. Kline, K. Soldau, J.D. Lee, J. Pugin, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism, *J. Leukoc. Biol.* 62 (1997) 786-794.
- [41] L. Janot, T. Secher, D. Torres, I. Maillet, J. Pfeilschifter, V.F. Quesniaux, R. Landmann, B. Ryffel, F. Erard, CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of *Listeria monocytogenes* infection, *J. Infect. Dis.* 198 (2008) 115-124.
- [42] R.S. Jack, U. Grunwald, F. Stelter, G. Workalemahu, C. Schutt, Both membrane-bound and soluble forms of CD14 bind to gram-negative bacteria, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 1436-1441.
- [43] U. Grunwald, X. Fan, R.S. Jack, G. Workalemahu, A. Kallies, F. Stelter, C. Schutt, Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism, *J. Immunol.* 157 (1996) 4119-4125.
- [44] M.O. Labeta, J.J. Durieux, N. Fernandez, R. Herrmann, P. Ferrara, Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 2144-2151.
- [45] P. Bufler, G. Stiegler, M. Schuchmann, S. Hess, C. Kruger, F. Stelter, C. Eckerskorn, C. Schutt, H. Engelmann, Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 604-610.
- [46] R. Landmann, W. Zimmerli, S. Sansano, S. Link, A. Hahn, M.P. Glauser, T. Calandra, Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 639-644.
- [47] V. Bazil, J.L. Strominger, Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes, *J. Immunol.* 147 (1991) 1567-1574.
- [48] D. Heumann, R. Lauener, B. Ryffel, The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds, *J. Endotoxin Res.* 9 (2003) 381-384.
- [49] G. Marchetti, P. Nasta, F. Bai, F. Gatti, G.M. Bellistri, C. Tincati, F. Borghi, G. Carosi, M. Puoti, A. Monforte, Circulating sCD14 is associated with virological response to pegylated-interferon-alpha/ribavirin treatment in HIV/HCV co-infected patients, *PLoS One.* 7 (2012) e32028.
- [50] H. Aalto, A. Takala, H. Kautiainen, S. Siitonen, H. Repo, Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection, *Scand. J. Infect. Dis.* 39 (2007) 596-603.
- [51] A. Troelstra, B.N. Giepmans, K.P. Van Kessel, H.S. Lichenstein, J. Verhoef, J.A. Van Strijp, Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 173-178.
- [52] S. Bas, B.R. Gauthier, U. Spenato, S. Stingelin, C. Gabay, CD14 is an acute-phase protein, *J. Immunol.* 172 (2004) 4470-4479.

- [53] P.L. Lakatos, L.S. Kiss, K. Palatka, I. Altorjay, P. Antal-Szalmas, E. Palyu, M. Udvardy, T. Molnar, K. Farkas, G. Veres, J. Harsfalvi, J. Papp, M. Papp, Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease, *Inflamm. Bowel Dis.* 17 (2011) 767-777.
- [54] I. Striz, L. Zheng, Y.M. Wang, H. Pokorna, P.C. Bauer, U. Costabel, Soluble CD14 is increased in bronchoalveolar lavage of active sarcoidosis and correlates with alveolar macrophage membrane-bound CD14, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151 (1995) 544-547.
- [55] R.E. Schopf, J. Dobmeyer, T. Dobmeyer, B. Morsches, Soluble CD14 monocyte antigen in suction blister fluid and serum of patients with psoriasis, *Dermatology.* 186 (1993) 45-49.
- [56] A. Pforte, A. Schiessler, P. Gais, B. Beer, M. Strobel, M. Ehlers, C. Schutt, H.W. Ziegler-Heitbrock, Increased expression of the monocyte differentiation antigen CD14 in extrinsic allergic alveolitis, *Monaldi Arch. Chest Dis.* 48 (1993) 607-612.
- [57] M. Biria, M. Sattari, M. Vahid Golpayegani, F. Kooshki, Association of salivary sCD14 concentration levels with early childhood caries, *Iran. J. Immunol.* 7 (2010) 193-197.
- [58] S. Shinohara, S. Hirohata, T. Inoue, K. Ito, Phenotypic analysis of peripheral blood monocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 19 (1992) 211-215.
- [59] L.S. Khemlani, Z. Yang, P.N. Bochsler, Identification and characterization of a bovine lipopolysaccharide-binding protein, *J. Leukoc. Biol.* 56 (1994) 784-791.
- [60] M. Borzio, F. Salerno, L. Piantoni, M. Cazzaniga, P. Angeli, F. Bissoli, S. Boccia, G. Colloredo-Mels, P. Corigliano, G. Fornaciari, G. Marengo, R. Pistara, M. Salvagnini, A. Sangiovanni, Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study, *Dig. Liver Dis.* 33 (2001) 41-48.
- [61] P. Tandon, G. Garcia-Tsao, Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis, *Semin. Liver Dis.* 28 (2008) 26-42.
- [62] U. Thalheimer, C.K. Triantos, D.N. Samonakis, D. Patch, A.K. Burroughs, Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis, *Gut.* 54 (2005) 556-563.
- [63] W.R. Caly, E. Strauss, A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis, *J. Hepatol.* 18 (1993) 353-358.
- [64] F. Wong, M. Bernardi, R. Balk, B. Christman, R. Moreau, G. Garcia-Tsao, D. Patch, G. Soriano, J. Hoefs, M. Navasa, International Ascites Club, Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club, *Gut.* 54 (2005) 718-725.
- [65] C. Gabay, I. Kushner, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 448-454.
- [66] D.P. Bota, M. Van Nuffelen, A.N. Zakariah, J.L. Vincent, Serum levels of C-reactive protein and procalcitonin in critically ill patients with cirrhosis of the liver, *J. Lab. Clin. Med.* 146 (2005) 347-351.

- [67] A. Albillos, A. de la Hera, M. Gonzalez, J.L. Moya, J.L. Calleja, J. Monserrat, L. Ruiz-del-Arbol, M. Alvarez-Mon, Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement, *Hepatology*. 37 (2003) 208-217.
- [68] M. Marquez, C. Fernandez-Gutierrez, M. Montes-de-Oca, M.J. Blanco, F. Brun, C. Rodriguez-Ramos, J.A. Giron-Gonzalez, Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis, *Clin. Exp. Immunol.* 158 (2009) 219-229.
- [69] A. Tsiakalos, A. Karatzaferis, P. Ziakas, G. Hatzis, Acute-phase proteins as indicators of bacterial infection in patients with cirrhosis, *Liver Int.* 29 (2009) 1538-1542.
- [70] I.S. Elefsiniotis, M. Skounakis, E. Vezali, K.D. Pantazis, A. Petrocheilou, M. Pirounaki, G. Papatsibas, C. Kontou-Kastellanou, A. Moulakakis, Clinical significance of serum procalcitonin levels in patients with acute or chronic liver disease, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (2006) 525-530.
- [71] A. Viallon, F. Zeni, V. Pouzet, C. Lambert, S. Quenet, G. Aubert, S. Guyomarch, B. Tardy, J.C. Bertrand, Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis: diagnostic value and relationship to pro-inflammatory cytokines, *Intensive Care Med.* 26 (2000) 1082-1088.
- [72] Z.Y. Lin, W.L. Chuang, C.Y. Dai, M.L. Yu, S.C. Chen, M.Y. Hsieh, L.Y. Wang, J.F. Tsai, W.Y. Chang, Clinical application of serum C-reactive protein measurement in the detection of bacterial infection in patients with liver cirrhosis, *Kaohsiung J. Med. Sci.* 18 (2002) 121-126.
- [73] J.H. Song, What's new on the antimicrobial horizon?, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 32 Suppl 4 (2008) S207-13.
- [74] P.L. Taylor, G.D. Wright, Novel approaches to discovery of antibacterial agents, *Anim. Health. Res. Rev.* 9 (2008) 237-246.
- [75] P.C. Oyston, M.A. Fox, S.J. Richards, G.C. Clark, Novel peptide therapeutics for treatment of infections, *J. Med. Microbiol.* 58 (2009) 977-987.
- [76] Y. Shai, A. Makovitzky, D. Avrahami, Host defense peptides and lipopeptides: modes of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections, *Curr. Protein Pept. Sci.* 7 (2006) 479-486.
- [77] H.S. Warren, R. Matyal, J.E. Allaire, D. Yarmush, P. Loisel, J. Hellman, B.G. Paton, M.P. Fink, Protective efficacy of CAP18106-138-immunoglobulin G in sepsis, *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 1382-1393.
- [78] J. Chen, C. Li, Y. Guan, Q. Kong, C. Li, X. Guo, Q. Chen, X. Jing, Z. Lv, Y. An, Protection of mice from lethal *Escherichia coli* infection by chimeric human bactericidal/permeability-increasing protein and immunoglobulin G1 Fc gene delivery, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 724-731.

- [79] M.A. Fletcher, M.A. Kloczewiak, P.M. Loiselle, M. Ogata, M.W. Vermeulen, E.M. Zanzot, H.S. Warren, A novel peptide-IgG conjugate, CAP18(106-138)-IgG, that binds and neutralizes endotoxin and kills gram-negative bacteria, *J. Infect. Dis.* 175 (1997) 621-632.
- [80] J. Li, Q. Kong, Z. Lv, Y. Guan, Y. Qiu, C. Li, M. Sun, Z. Liu, Y. An, Protection of immuno-compromised mice from lethal infection of *Klebsiella pneumonia* by rAAV2-BPI23-Fc γ 1 gene transfer, *Cell. Mol. Immunol.* 5 (2008) 439-445.
- [81] C. Li, J. Li, Z. Lv, X. Guo, Q. Chen, Q. Kong, Y. An, Protection of mice from lethal endotoxemia by chimeric human BPI-Fc γ 1 gene delivery, *Cell. Mol. Immunol.* 3 (2006) 221-225.
- [82] C. Huang, Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (2009) 692-699.
- [83] J. Zhang, J. Carter, S. Siu, J.W. O'Neill, A.H. Gates, J. Delaney, C. Mehlin, Fusion partners as a tool for the expression of difficult proteins in mammalian cells, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11 (2010) 241-245.
- [84] J.A. Jazayeri, G.J. Carroll, Fc-based cytokines : prospects for engineering superior therapeutics, *BioDrugs.* 22 (2008) 11-26.
- [85] J.A. Dumont, S.C. Low, R.T. Peters, A.J. Bitonti, Monomeric Fc fusions: impact on pharmacokinetic and biological activity of protein therapeutics, *BioDrugs.* 20 (2006) 151-160.
- [86] J. Ronnmark, M. Hansson, T. Nguyen, M. Uhlen, A. Robert, S. Stahl, P.A. Nygren, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J. Immunol. Methods.* 261 (2002) 199-211.
- [87] K.M. Mohler, D.S. Torrance, C.A. Smith, R.G. Goodwin, K.E. Stremler, V.P. Fung, H. Madani, M.B. Widmer, Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists, *J. Immunol.* 151 (1993) 1548-1561.
- [88] K. Peppel, D. Crawford, B. Beutler, A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 1483-1489.
- [89] R. Korhonen, E. Moilanen, Abatacept, a novel CD80/86-CD28 T cell co-stimulation modulator, in the treatment of rheumatoid arthritis, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104 (2009) 276-284.
- [90] C.P. Larsen, T.C. Pearson, A.B. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L.A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P.S. Linsley, R.J. Peach, Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties, *Am. J. Transplant.* 5 (2005) 443-453.
- [91] J.A. Gross, S.R. Dillon, S. Mudri, J. Johnston, A. Littau, R. Roque, M. Rixon, O. Schou, K.P. Foley, H. Haugen, S. McMillen, K. Waggle, R.W. Schreckhise, K. Shoemaker, T. Vu,

M. Moore, A. Grossman, C.H. Clegg, TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS, *Immunity*. 15 (2001) 289-302.

[92] Y. Vugmeyster, D. Seshasayee, W. Chang, A. Storn, K. Howell, S. Sa, T. Nelson, F. Martin, I. Grewal, E. Gilkerson, B. Wu, J. Thompson, B.N. Ehrenfels, S. Ren, A. Song, T.R. Gelzleichter, D.M. Danilenko, A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 476-489.

[93] F. Amersi, D.G. Farmer, G.D. Shaw, H. Kato, A.J. Coito, F. Kaldas, D. Zhao, C.R. Lassman, J. Melinek, J. Ma, H.D. Volk, J.W. Kupiec-Weglinski, R.W. Busuttil, P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury, *Am. J. Transplant.* 2 (2002) 600-608.

[94] D.G. Farmer, X.D. Shen, F. Amersi, D. Anselmo, J.P. Ma, B. Ke, F. Gao, S. Dry, S. Fernandez, G.D. Shaw, S.V. McDiarmid, R.W. Busuttil, J. Kupiec-Weglinski, CD62 blockade with P-Selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin fusion protein reduces ischemia-reperfusion injury after rat intestinal transplantation, *Transplantation*. 79 (2005) 44-51.

[95] J. Ruckle, M. Jacobs, W. Kramer, A.E. Pearsall, R. Kumar, K.W. Underwood, J. Seehra, Y. Yang, C.H. Condon, M.L. Sherman, Single-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled study of ACE-011 (ActRIIA-IgG1) in postmenopausal women, *J. Bone Miner. Res.* 24 (2009) 744-752.

[96] H.M. Hoffman, M.L. Throne, N.J. Amar, M. Sebai, A.J. Kivitz, A. Kavanaugh, S.P. Weinstein, P. Belomestnov, G.D. Yancopoulos, N. Stahl, S.J. Mellis, Efficacy and safety of rilonacept (interleukin-1 Trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: results from two sequential placebo-controlled studies, *Arthritis Rheum.* 58 (2008) 2443-2452.

[97] Q.S. Chu, Aflibercept (AVE0005): an alternative strategy for inhibiting tumour angiogenesis by vascular endothelial growth factors, *Expert Opin. Biol. Ther.* 9 (2009) 263-271.

[98] M. Ogata, M.F. Fletcher, M. Kloczewiak, P.M. Loiselle, E.M. Zanzot, M.W. Vermeulen, H.S. Warren, Effect of anticoagulants on binding and neutralization of lipopolysaccharide by the peptide immunoglobulin conjugate CAP18(106-138)-immunoglobulin G in whole blood, *Infect. Immun.* 65 (1997) 2160-2167.

[99] E. Carey, W.D. Carey, Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete?, *Cleve. Clin. J. Med.* 77 (2010) 519-527.

[100] J.T. Poolman, Development of a meningococcal vaccine, *Infect. Agents Dis.* 4 (1995) 13-28.

[101] A.M. Walenkamp, I.G. Boer, J. Bestebroer, D. Rozeveld, H. Timmer-Bosscha, W. Hemrika, J.A. van Strijp, C.J. de Haas, Staphylococcal superantigen-like 10 inhibits CXCL12-induced human tumor cell migration, *Neoplasia*. 11 (2009) 333-344.

- [102] H. Schultz, J. Hume, S. Zhang de, T.L. Gioannini, J.P. Weiss, A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 2477-2484.
- [103] W.R. Strohl, Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (2009) 685-691.
- [104] P. Gross, K. Brandl, C. Dierkes, J. Scholmerich, B. Salzberger, T. Gluck, W. Falk, Lipopolysaccharide-trap-Fc, a multifunctional agent to battle gram-negative bacteria, *Infect. Immun.* 77 (2009) 2925-2931.
- [105] H.S. Warren, S.F. Amato, C. Fitting, K.M. Black, P.M. Loisel, M.S. Pasternack, J.M. Cavaillon, Assessment of ability of murine and human anti-lipid A monoclonal antibodies to bind and neutralize lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 89-97.
- [106] J.V. Ravetch, S. Bolland, IgG Fc receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290.
- [107] A. Vida, B. Bardoel, F. Milder, L. Majoros, A. Sumegi, A. Bacs, G. Vereb, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp, P. Antal-Szalmas, Fusion of the Fc part of human IgG1 to CD14 enhances its binding to gram-negative bacteria and mediates phagocytosis by Fc receptors of neutrophils, *Immunol. Lett.* 146 (2012) 31-39.
- [108] M.M. Wurfel, S.D. Wright, Lipopolysaccharide (LPS) binding protein catalyzes binding of LPS to lipoproteins, *Prog. Clin. Biol. Res.* 392 (1995) 287-295.
- [109] T.J. Novitsky, P.F. Roslansky, Quantification of endotoxin inhibition in serum and plasma using a turbidimetric LAL assay, *Prog. Clin. Biol. Res.* 189 (1985) 181-196.
- [110] A. Vida, A. Troelstra, P. Antal-Szalmas, T.J. van Bommel, A.F. Verheul, J. Verhoef, K.P. van Kessel, J.A. van Strijp, Neutralization of *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles, *Inflamm. Res.* 60 (2011) 801-805.
- [111] J. Campos, A. Gonzalez-Quintela, C. Quinteiro, F. Gude, L.F. Perez, J.A. Torre, C. Vidal, The -159C/T polymorphism in the promoter region of the CD14 gene is associated with advanced liver disease and higher serum levels of acute-phase proteins in heavy drinkers, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29 (2005) 1206-1213.
- [112] A. Albillos, L. Hera Ad Ade, E. Reyes, J. Monserrat, L. Munoz, M. Nieto, A. Prieto, E. Sanz, M. Alvarez-Mon, Tumour necrosis factor- α expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin, *J. Hepatol.* 40 (2004) 624-631.
- [113] M. Christ-Crain, B. Muller, Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less?, *Swiss Med. Wkly.* 135 (2005) 451-460.
- [114] K.L. Becker, R. Snider, E.S. Nylen, Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations, *Crit. Care Med.* 36 (2008) 941-952.

- [115] B.A. Runyon, Ascitic fluid and serum C-reactive protein concentrations in patients with and without peritonitis, *Am. J. Clin. Pathol.* 86 (1986) 773-775.
- [116] C.H. Li, R.B. Yang, J.H. Pang, S.S. Chang, C.C. Lin, C.H. Chen, H.Y. Chen, T.F. Chiu, Procalcitonin as a biomarker for bacterial infections in patients with liver cirrhosis in the emergency department, *Acad. Emerg. Med.* 18 (2011) 121-126.
- [117] S. Connert, W. Stremmel, C. Elsing, Procalcitonin is a valid marker of infection in decompensated cirrhosis, *Z. Gastroenterol.* 41 (2003) 165-170.
- [118] L. Spahr, I. Morard, A. Hadengue, L. Vadas, J. Pugin, Procalcitonin is not an accurate marker of spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis, *Hepatogastroenterology*. 48 (2001) 502-505.
- [119] L. Simon, F. Gauvin, D.K. Amre, P. Saint-Louis, J. Lacroix, Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis, *Clin. Infect. Dis.* 39 (2004) 206-217.
- [120] M. Papp, Z. Vitalis, I. Altorjay, I. Tornai, M. Udvardy, J. Harsfalvi, A. Vida, J. Kappelmayer, P.L. Lakatos, P. Antal-Szalmas, Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections, *Liver Int.* 32 (2012) 603-611.

9. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben az antibiotikum rezisztencia egyre gyakrabban fordul elő a klinikai gyakorlatban és ezzel párhuzamosan az antibiotikumok megjelenésének üteme is lelassult. A lehetőségek szűkülésével igény mutatkozik új hatásmechanizmusú antimikrobiális molekulák iránt. Az egyik típusa az ilyen új szerekek a PRR/Fc fúziós fehérjék. Ezek a molekulák a mintázatfelismerő receptor rész közreműködésével kötődnek a mikrobiális komponensekhez, és a humán IgG1 Fc részével immunológiai funkciókat aktiválva segítik a kórokozók neutralizációját. A CD14 molekula, mint az egyik legfontosabb LPS receptor alkalmasnak tűnt egy ilyen mesterséges antitestben a mintázatfelismerő receptor feladatának ellátására, ezért munkánk során egy CD14/Fc fúziós fehérjét hoztunk létre rekombináns DNS technika segítségével. A molekula dimer formájában idő- és dózis-függően kötődött a Gram-negatív baktériumokhoz és a kölcsönhatás specifikusan gátolható volt. A dimer forma kb. 50-szer erősebb affinitást mutatott a baktériumokhoz, mint a monomer sCD14. A CD14/Fc jelenléte fokozta a Gram-negatív baktériumok FcR-mediálta fagocitózist PMN sejtek, macrophagok és dendritikus sejtek esetében és igazolni tudtuk a baktériumok internalizációját is. Egy *ex vivo* teljes vér rendszerben a CD14/Fc molekula fokozta a baktériumok elpusztítását is. Ezek a hatások azonban csak az R típusú Gram-negatív baktériumok esetében voltak számottevőek, így a molekula gyakorlati jelentősége csekély. A CD14/Fc molekula önmagában is képes volt PMN sejtek és monocyták aktiválására, azonban nem neutralizálta sem a szabad, sem a külső membrán vezikulumok (bleb-ek) formájában jelenlévő LPS hatását. Megállapítottuk azt is, hogy ezek a vezikulák a szabad LPS-hoz hasonlóan viselkednek, a LAL esszében plazmával és izolált BPI-vel neutralizálhatóak.

A CD14 molekula szolúbilis formájának (sCD14) szérumszintje jól korrelál fertőzésekben az infekció súlyosságával, illetve más betegség pl. az autoimmun kórképek aktivitásával. Munkánk során a sCD14 egy potenciálisan új diagnosztikai alkalmazását vizsgáltuk cirrhotikus betegek esetében, arra keresve választ, hogy a szérumszint mérése képes-e jelezni vagy megerősíteni a cirrhotishoz társuló fertőzések jelenlétét. Eredményeink azt mutatták, hogy a sCD14 szérumszintje nem tért el szignifikánsan a fertőzött és fertőzés nélküli betegek mintáiban. Ugyanakkor a C-reaktív protein szenzitív és specifikus markere volt a cirrhotishoz társuló fertőzéseknek 10 mg/l-es cut-off érték alkalmazása mellett.

10. Summary

Antibiotic resistant microbes are more and more frequent during the past decades in the clinical practice while the rate of discovery of new antibiotics decreased. With the current limited treatment possibilities there is a growing need for antimicrobials with a new approach. One type of these novel antimicrobials are PRR/Fc fusion proteins. These molecules bind microbial components with their pattern recognition receptor part while the human IgG1 Fc parts activates immunological functions and promotes pathogen neutralization. The CD14 molecule as the most important LPS receptor seemed as a worthy candidate in such an artificial antibody as the pattern recognition component, thus we expressed a CD14/Fc fusion protein using recombinant DNA techniques. The resulting dimer molecule bound Gram-negative bacteria in a time and dose dependent manner and this interaction could be specifically inhibited. The dimer form showed an approximately 50-fold higher affinity to bacteria than the monomer sCD14. The CD14/Fc fusion molecule increased the FcR mediated phagocytosis of bacteria by PMN cells, macrophages and dendritic cells, and we also proved internalization of the opsonised bacteria by these cells. In an *ex vivo* whole blood experimental setting the CD14/Fc molecule enhanced killing of bacteria. However these effects were only significant for R-type LPS mutant bacteria, which decreases this protein's practical value. The CD14/Fc protein was able to activate PMN cells and monocytes on its own, but was unable to neutralize the effect of LPS neither in its free form nor in the form of outer membrane vesicles (blebs). We determined that these vesicles act as free LPS rather than particles as they can be neutralized similarly by plasma and BPI in the LAL assay. The serum concentration of the soluble form of CD14 (sCD14) correlates well with the severity of infections and with the activity of autoimmune diseases. We evaluated a possible new diagnostic use of sCD14 in cirrhosis patients and tried to evaluate if changes in serum sCD14 concentrations can predict or confirm cirrhosis associated infections. Our results show that serum sCD14 concentration does not differ significantly in infected and non-infected patient samples. However, we found that CRP is a sensitive and specific marker of cirrhosis associated infections at a cut-off value of 10 mg/L.

11. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai relevanciái

1., Rekombináns DNS technikával létrehoztunk egy CD14/Fc fúziós molekulát és jellemeztük mikrobákhoz való kötődését: kötődik Gram-negatív baktériumokhoz és a Gram-pozitív baktériumok közül a *L. monocytogenes*-hez. Fokozza a Gram-negatív baktériumok FcR-függő fagocitózist/internalizációját PMN sejtek, valamint monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek esetében. A CD14/Fc képes a Gram-negatív baktériumok elpusztítását is elősegíteni teljes vérben. Miután azonban ezek a hatások csak az R típusú Gram-negatív baktériumok esetében voltak számottevőek, így a molekula alkalmazása terápiás ágensként bakteriális infekciókban nem jön szóba. Úgy gondoljuk ugyanakkor, hogy hasonló fúziós fehérjék, nagyobb affinitással és szélesebb antimikrobiális spektrummal, hatásos szerek lehetnek olyan kórokozók ellen, melyek rezisztensek az általánosan használt antibiotikumokkal szemben.

2., Megvizsgáltuk a CD14/Fc molekula LPS/bleb preparátumokra gyakorolt neutralizáló hatását és azt tapasztaltuk, hogy nem képes az endotoxin készítmények neutralizálására, sőt önmagában is sejtaktiváló hatása van. Ezek alapján terápiás ágensként alkalmazása szeptikus állapotokban nem jön szóba.

3., Megvizsgáltuk, hogy a LPS molekulák és bleb vezikulumok semlegesítése a LAL assayben effektíven történik-e plazma, illetve az izolált BPI molekulák által, és mindkét esetben teljes neutralizációt tapasztaltuk, ezek alapján a bleb-ek biológiai aktivitásukat tekintve a szabad LPS-hoz hasonlítanak.

4., Megállapítottuk, hogy a szérumban sCD14 mérés nem alkalmas az infekció jelenlétének kimutatására cirrhosis betegekben, ugyanakkor a CRP meghatározás (különösen a PCT méréssel kombinálva) a bakteriális infekciók érzékeny markere.

12. Publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/285/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Vida András

Neptun kód: ALAJGD

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Papp, M., Vítális, Z., Altorjay, I., Tornai, I., Udvardy, M., Hársfalvi, J., **Vida, A.**, Kappelmayer, J., Lakatos, P.L., Antal-Szalmás, P.: Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections.
Liver Int. 32 (4), 603-611, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02689.x>
IF:3.824 (2011)
2. **Vida, A.**, Bardoel, B., Milder, F., Majoros, L., Sümegi, A., Bácsi, A., jr. Vereb, G., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., Antal-Szalmás, P.: Fusion of the Fc part of human IgG1 to CD14 enhances its binding to gram-negative bacteria and mediates phagocytosis by Fc receptors of neutrophils.
Immunol. Lett. 146 (1-2), 31-39, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.04.008>
IF:2.526 (2011)
3. **Vida, A.**, Troelstra, A., Antal-Szalmás, P., van Bommel, T.J.P., Verheul, A.F.M., Verhoef, J., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G.: Neutralization of Neisseria meningitidis outer membrane vesicles.
Inflamm. Res. 60 (9), 801-805, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-011-0344-3>
IF:2.109



Összesített impakt faktor: 8.459

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 8.459

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.01



13. Tárgyszavak/Keywords

CD14/CD14

Fc/Fc

Fúziós fehérje/Fusion protein

LPS/LPS

Neisseria meningitidis/*Neisseria meningitidis*

Szolúbilis CD14/Soluble CD14

Bleb/Bleb

Cirrhosis/Cirrhosis

Fagocitózis/Phagocytosis

14. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Antal-Szalmás Péternek, aki a közös munkánk első percétől, témavezetői feladatait messze meghaladóan támogatott, és akitől nemcsak a témához kapcsolódó ismereteket, hanem az értékes szakmai beszélgetéseink során a kutatói munkához szükséges gondolkodásmódot is elsajátíthattam. Külön köszönet illeti, amiért lehetővé tette számomra, hogy tanulmányaim során fél évet Hollandiában, az Utrechti Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében töltssek.

Hálás vagyok Jos A. G. van Strijp professzornak és Kok P. M. van Kessel hollandiai mentoraimnak, hogy fél évet náluk tölthettem, megismerve világszínvonalú munkájukat. Külön köszönet illeti két közvetlen hollandiai munkatársamat, Bart Bardoelt és Fin Mildert, akik barátjukká fogadtak, és munkatársként és magánemberként is mindig mellettem álltak.

Köszönöm Kappelmayer János professzor úrnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, hogy intézetében végezhettem munkámat, és ott bekapcsolódva a számos szerteágazó munkafolyamatba, frissen végzett egyetemistából használható munkaerővé fejlődhettem.

Köszönöm Hevessy Zsuzsának és Balogh Istvánnak az értékes szakmai és baráti beszélgetéseket, és a rengeteg segítséget, melyet munkámban nyújtottak.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Vargáné Földesi Rózának, Szabó Gabriellának és Steiber Zoltánnak a felbecsülhetetlen segítséget, melyet munkámban nyújtottak, továbbá köszönet illeti a Laboratóriumi Medicina Intézet összes dolgozóját a rengeteg segítségért, és azért, mert társaságukban baráti légkörben dolgozhattam.

Hálásan köszönöm a munkában közreműködő elméleti intézetekben dolgozó kollegák – Majoros László, Vereb György, Bácsi Attila – és klinikusok – Papp Mária, Vitális Zsuzsanna, Tornai István, Altorjay István és Lakatos Péter – segítségét is.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és elviseltek a nehezebb időkben.

15. Támogatások

A disszertáció elkészítését az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA; T046694) támogatta.

A disszertáció elkészítését az EU FP6 (512093-AMIS) projekt támogatta.

A disszertáció elkészítését a 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 számú és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 projekt támogatta. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



SZÉCHENYI TERV

16. Függelék