

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az endotoxin kötő szolúbilis CD14 lehetséges terápiás és diagnosztikus alkalmazásai

Vida András, M.Sc.

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Vida András, M.Sc.

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2012

AZ ENDOTOXIN KÖTŐ SZOLÚBILIS CD14 LEHETSÉGES TERÁPIÁS ÉS DIAGNOSZTIKUS ALKALMAZÁSAI

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Vida András, M.Sc.

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
Klinikai vizsgálatok programja keretében

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság tagjai:

elnök: Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Dr. Berki Tímea, az MTA doktora
Dr. Szántó Sándor, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja, helyszíne: 2013. január 15. 11:00 óra, DE OEC Szemészeti
Klinika könyvtára

Az értekezés bírálói: Dr. Kiss Emese, Ph.D.
Dr. Csípő István, Ph.D.

A bírálóbizottság tagjai:

elnök: Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Dr. Berki Tímea, az MTA doktora
Dr. Szántó Sándor, Ph.D.
Dr. Kiss Emese, Ph.D.
Dr. Csípő István, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja, helyszíne: 2013. január 15. 13:00 óra, DE OEC
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A CD14 molekula

A CD14 molekula a veleszületett immunrendszer mintázatfelismerő receptora. A fehérjét kódoló gén az 5q23-31 kromoszómán lokalizálódik, két exonból áll, melyről egy 1,4 kb méretű mRNS transzkript íródik át. 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). A mCD14 nem rendelkezik transzmembrán régióval, hanem egy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgony segítségével ágyazódik a membránba. A mCD14 nagyobb számban monocytákon (~100.000/sejt), és jóval kisebb számban neutrofil granulocitákon (~4.000/sejt) fordul elő, míg a sCD14 koncentrációja a szérumban néhány µg/ml nagyságrendű.

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

A CD14 molekula elsődleges funkciója a szervezetbe bekerülő, Gram-negatív baktériumok membránjából felszabaduló lipopoliszacharid (LPS) felismerése és a sejtaktiváció beindítása. A LPS felismerés és a jelátviteli folyamat inicializálása a Lipopolysaccharide Binding Protein/Toll-like Receptor 4/Myeloid differentiation protein 2 (LBP/TLR4/MD2) rendszeren keresztül történik. Az LBP által monomerizált szabad LPS a CD14 molekulán keresztül a sejtmembránban található TLR4/MD2 komplexhez jut, ahol a LPS az MD2 molekulán keresztül kerül a transzmembrán régióval rendelkező TLR4-hez, ami az intracelluláris jelátviteli kaszkád beindításához vezet.

1.3. A CD14 molekula potenciális ligandjai

A CD14 molekula egy mintázatfelismerő receptor, legfontosabb szerepe a Gram-negatív baktériumok membránjából származó LPS szignalizációjában van. A LPS-on kívül több egyéb ligandját is leírták, melyek a legkülönbözőbb bakteriális eredetű molekuláktól kezdve, gombákon és apoptotikus testeken át, egészen a mikrobiális sejtfal komponensekig, sőt teljes baktériumokig terjednek.

1.3.1. Szolúbilis molekulák

A CD14 molekula legismertebb és legjobban tanulmányozott ligandja a Gram-negatív baktériumok külső membránjának esszenciális komponense a LPS. Különböző baktériumcsaládok LPS struktúrája nagy hasonlóságot mutat. Az *Enterobacteriaceae* család vad típusú LPS molekulája (S-típus) az O-antigénből, az R-magból és a lipid-A komponensekből áll. Bizonyos esetekben a LPS O-antigén poliszacharidja hiányozhat (R-típus), ami hozzáférhetőbbé teszi az immunogenitásért felelős lipid-A részt az immunrendszer számára. 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 *Staphylococcus aureus* sejtfal kivonata, a *Pseudomonas*-ból izolált poliuronsav, a muramilpeptid, és a *Borrelia burgdorferi* külső membrán lipoproteinjei. Ezen molekuláknak közös jellemzője, hogy valamennyien az őket termelő mikrobák esszenciális, konzervatív struktúrái, ezért kiemelkedően jó terápiás célpontot jelenthetnek.

1.3.2. 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 *Neisseria meningitidis* esetében, ahol *in vivo* is kimutatták blebek jelenlétét szérumban és

cerebrospinalis folyadékban egyaránt. Mivel a blebek összetétele lényegében megegyezik a külső membrán összetételével, a *N. meningitidis* eredetű blebek a klasszikus CD14-LBP, majd TLR4/MD2 mediált útvonalon aktiválja az immunrendszert.

1.3.3. Baktériumok

A mikrobiális eredetű ligandokon kívül több esetben leírták különböző kórokozók CD14 dependens fagocitózist is, melyek közé olyan baktériumok tartoznak, mint a *Mycobacterium tuberculosis*, a *Salmonella typhimurium*, az *Escherichia coli* és a *Listeria monocytogenes*. 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.

1.4. sCD14 és betegségek összefüggése.

1.4.1. 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, koncentrációja lokális fertőzésekben és szepszisben is jelentősen megemelkedhet. A sCD14 termelődésének pontos mechanizmusa és oka az infekciók során nem teljesen ismert, de valószínűsíthető, hogy a keletkező sCD14 elsősorban nem csak *de novo* szintetizálódik, hanem a membránkötött forma lehasadásával keletkezik. Ugyanakkor nem zárható ki a sCD14 *de novo* szintézise sem, hiszen termelődése IL-6 által indukálható és szérumkoncentrációja jól korrelál egy jól ismert akut fázis fehérje (APP), a C-reaktív protein (CRP) szérumkoncentrációjával. A sCD14 koncentráció korrelál a mortalitással is, 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.

1.4.2. 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 psoriasis-ban és szisztémás lupus erythematosusban (SLE) valamint gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek szérumában is megemelkedett sCD14 koncentrációt mértek.

1.4.3. Akut fázis fehérje? Diagnosztikus marker?

Elsősorban gyulladásos kórképekben merül fel a sCD14 diagnosztikus markerként való alkalmazása. A sCD14 koncentráció jól korrelál a betegségek lefolyásával, és a CRP koncentrációval, valamint a máj APP termelését szabályozó citokinjének, az IL-6-nak a koncentrációjával is. Real-time PCR vizsgálatok megerősítik mRNS szintjén a CD14 termelés IL-6 általi indukálhatóságát is. Ezek alapján a sCD14 molekula APP-ként viselkedik, és érdemes megvizsgálni a diagnosztikus markerként való felhasználhatóságát.

1.5. Cirrhosis és az ehhez társuló infekciók klinikai jelentősége

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

1.5.1. 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, cisticus fibrosis, illetve hepatotoxikus gyógyszerek használata is.

1.5.2. 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. Ezen kívül a bakteriális fertőzések további komplikációk kialakulását okozhatják, mint például varix vérzés, hepatikus encephalopathia, veseelégtelenség és véralvadási zavarok. A különböző fertőzések jelentősen megnövelik a mortalitást, cirrhosisban az elhalálozások mintegy 30-50%-a valamilyen fertőzéshez köthető.

1.5.3. 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. A bacteraemia-hoz kapcsolt szerológiai markerek emelkedése korai jele az infekciónak, mely lehetővé teszi a fertőzés hatékony felismerését. Azonban ezeket az akut fázis fehérjét (APP) elsősorban a máj szintetizálja, ezért cirrhosisban sokkal kevésbé hatékonyak a fertőzés kialakulásának figyelemmel kísérésére. 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. Korábbi tanulmányok szerint a CRP és a procalcitonin

(PCT) a legmegbízhatóbb markerek a fertőzések felismerésére, de diagnosztikai pontosságuk és határértékeik nem pontosan meghatározottak.

1.6. 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. Az egyik lehetséges megközelítése a problémának, bizonyos antimikrobiális hatású molekulák kombinálása az immunglobulin molekula Fc részével. Az így keletkező új fehérjék mesterséges antitestként viselkedve nemcsak közvetlen baktericid hatással bírhatnak, hanem az Fc részen keresztül bekapcsolják az immunrendszert a kórokozó neutralizálásának folyamatába.

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. Ezen fúziós fehérjékben az Fc rész intakt állapotban (CH2, CH3 domén és a „hinge” régió) megmarad, és az N terminális részhez kapcsolódnak a receptor fehérjék, melyek kórokozók vagy azokból származó ligandok széles spektrumát ismerhetik fel.

A receptor/Fc molekulák Fc részének számos előnyös tulajdonsága van mind a „kész” fehérje alkalmazási területein, mind a fehérje expresszálása és tisztítása során. Az antimikrobiális alkalmazás szempontjából a legfontosabb ilyen tulajdonságok, hogy az Fc rész általi dimerizáció megnövelheti a receptorkomponensek eredeti ligandjukhoz való aviditását, és hogy az Fc rész megőrzi eredeti funkcióját, és immunológiai effektor funkciókat lát el, mint a komplement aktiválás vagy a fúziós fehérje által opsonizált molekulák FcR receptorokon keresztüli fagocitózisának mediálása.

Két fontosabb példa van eddig ilyen típusú mesterséges antitestekre, az egyik a BPI₂₃ fehérje fúziója a humán IgG1 Fc részéhez, a másik egy szintén kationos fehérje, a CAP18 fúziója az IgG1 Fc részéhez. Mindkét esetben jelentősen megnövekedett a fúziós fehérjével kezelt kísérleti egerek túlélési esélye a kontrollcsoportéhoz képest a vizsgált szepszis modellekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A CD14, mint mintázatfelismerő receptor, több mikrobiális eredetű liganddal is bír. Ez felvet egy lehetséges terápiás alkalmazást: a CD14 mintázat felismerő tulajdonságát kombinálva az Fc fúzió nyújtotta biológiai előnyökkel egy széles spektrumú opszonint hozhatunk létre, amely terápiás lehetőséget jelenthet antibiotikum rezisztens baktériumok által okozott fertőzésekben, és hasznos lehet olyan esetekben is, mint a *N. meningitidis* fertőzések, ahol az inflammatorikus folyamatok eszkalálódásában elsődleges szerepe van a fokozott külső membrán vezikula képződésnek.

- Célunk egy CD14/Fc fúziós fehérje létrehozása, strukturális integritásának és biológiai aktivitásának vizsgálata, valamint a fúziós fehérje baktériumokhoz való kötődésének jellemzése, és a kötődés CD14-LPS specifikusságának igazolása. Vizsgáljuk továbbá a molekula neutrophil granulocyták, macrophagok és dendritikus sejtek fagocitózisára gyakorolt hatását.

- Megvizsgáljuk, hogy neutralizálja-e a CD14/Fc molekula a 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.

A humán sCD14 molekula 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.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. 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. A beválasztásnál különös figyelmet fordítottunk az akut bakteriális fertőzések jelenlétére is.

3.2. LPS, bleb preparátum, baktérium- és gomba törzsek

A CD14/Fc és CD14/His molekulák funkcionális teszteléséhez *S. minnesota* Re (#595) LPS-t (Sigma-Aldrich) használtunk. A bleb preparátumok izolálása a *N. meningitidis* L1 törzséből és ezek jellemzése az Utrechti Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében történt. A CD14/Fc-mikróba kötődéses kísérletekhez és a fagocitózis vizsgálatokhoz az alábbi baktériumokat és gombákat használtuk: *E. coli* (ATCC 25922), *S. hartford* (Országos Epidemiológiai Központ - OEK 100063), *Listeria monocytogenes* (OEK 130001), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Salmonella typhimurium* vad típus (#657), *S. typhimurium* Ra (#656), *S. typhimurium* Re (#658), *S. minnesota* Re (#595), *Candida albicans* (#10231), *C. tropicalis* (#555) (klinikai izolátumok). A baktériumokat és gombákat hőinaktiváltuk (80°C , 2 h, illetve 65°C , 2 h), majd FITC-el jelöltük ($40\text{ }\mu\text{g/ml}$ 45 percig 4°C -on a baktériumok esetében; $0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 45 percig 4°C -on a gombák esetében). A fluoreszcensen jelölt mikrobákat kétszeri mosás után aliquotozva, -20°C -on tároltuk.

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

Polimorfonukleáris sejtek: A polimorfonukleáris sejteket perifériás vérből izoláltuk diszkontinuus histopaque gradiensen ($1077/1119\text{ g/L}$, Sigma-Aldrich).

A PMN réteg leszívása után a vörösvértesteket 30 másodpercig lizáltuk jéghideg desztillált vízzel, majd 1/10 térfogatnyi tízszeres töménységű PBS pufferrel helyreállítottuk az izotóniás koncentrációt. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, és a sejtszámot 5×10^6 sejt/ml-re állítottuk be.

Monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek: Perifériás vérből mononukleáris sejteket izoláltunk Ficoll-Paque (1077 g/L, GE Healthcare) segítségével, majd a PBMC rétegből anti-CD14 mágneses mikrogöngyök (Miltenyi Biotec) alkalmazásával, a gyártó leírása alapján monocytákat szeparáltunk. A monocyta eredetű macrophagok és dendritikus sejtek differenciálását komplett RPMI táptalajban (Sigma-Aldrich) végeztük 50 ng/ml M-CSF (PeproTech EC) hozzáadásával a makrofágok esetében, és 80 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products), 100 ng/ml IL-4 (PeproTech EC) és 50 ng/ml M-CSF (PeproTech EC) jelenlétében a dendritikus sejtek esetében. A kísérletekhez a sejteket az 5. napon használtuk fel. A sejtek fenotípusát áramlási citometriával ellenőriztük.

SKBr-3 sejtek: Az SKBr-3 humán emlő karcinóma sejtvonalat (ATCC) komplett DMEM táptalajban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük.

3.4. 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 restriktációs *Bam*HI és *Not*I hasítóhelyeket építettünk be, az alábbi primereket használva:

P1-5'TCGGATCCACCGCCAGAACCTTG3'

P2-5'CAGCGGCCGCGCCAGCACCAGGGTTCCCGA3'

Az amplikont a szekvenáláshoz egy köztes vektorba (pCR4-TOPO, Invitrogen) ligáltuk a kit leírása alapján. A CD14 inzertet tartalmazó vektorral One Shot TOP10 baktériumokat (Invitrogen) transzformáltunk, melyeket szelekció után 50 µg/ml carbenicillint tartalmazó folyékony LB táptalajban szaporítottunk,

majd belőlük QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) segítségével, a gyártó leírása alapján plazmidot izoláltunk. A CD14 inzert jelenlétét kettős restrikciós emésztéssel (*Bam*HI/*Not*I, New England Biolabs), illetve szekvenálással ellenőriztük (BigDye 3.1 sequencing kit, Applied Biosystems). Az expressziós vektorokba való szubklónozást, és a CD14/Fc, valamint CD14/His expresszióját 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. Az expresszált fehérjék tisztítását a CD14/Fc esetében Protein G oszloppal, a CD14/His esetében Nikkel oszloppal (GE Healthcare) végeztük, a gyártó leírása alapján. A fehérjekészítmények tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A molekulák biológiai funkcióját immobilizált LPS-hoz való kötődésük alapján jellemeztük ELISA módszerrel.

3.5. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz és 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. Inkubáció után a mikrobákat kétszer mostuk 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-sel. A mikrobákhoz kötődött CD14/Fc fehérjét Cy5-kecske-anti-humán IgG (könnyű + nehéz lánc) antitesttel (Jackson Laboratory; 1:100 hígítás), a CD14/His fehérjét PE-anti-His antitesttel (Miltenyi Biotec, 1:100 hígítás) jelöltük. Mosás után a mikrobákat áramlási citométerrel vizsgáltuk, és a 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), anti-CD14 blokkoló antitest (60bca, ATCC; kétszeres hígítási sor: 40 – 0,6 µg/ml) jelenlétében elő-inkubáltuk, majd a fent leírtak alapján elvégeztük a kötődéses 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 CD14/Fc kötődését áramlási citométerrel, a fent leírtak szerint vizsgáltuk, a gátlás mértékét a csak CD14/Fc-t – és gátlószert nem – tartalmazó mintákhoz viszonyítva, százalékban adtuk meg.

3.6. Az opszonizált baktériumok fagocitózisa, ex vivo killing assay

A FITC-al jelölt, CD14/Fc fúziós fehérjével opszonizált baktériumokat 15 µl PBS vagy 10% szérum jelenlétében 37°C-on, 15 percig inkubáltuk. 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. Mosás után a mintákat áramlási citométerrel mértük és a fagocitáló sejteket FITC-pozitivitásuk alapján azonosítottuk. A sejtekhez asszociálódott baktériumok pontos lokalizációjának megállapításához konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss AG) alkalmaztunk.

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

A killing assay kísérletek során 3×10^3 CFU *S. typhimurium* wt illetve Re baktériumokat adtunk 1 ml heparinnal alvadésgátolt 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 megszámoltuk és a megfelelő kontrollhoz hasonlítottuk.

3.7. Neutrophil granulocyták aktivációja LPS-dal és blebbel

Izolált neutrofil granulocitákat 30 percen keresztül 37°C-on LPS-dal vagy blebekkel aktiváltunk 1% szérum vagy 100 ng/ml LBP jelenlétében. Mintánként 1×10^5 neutrofil sejtet 10^{-6} M formil-MET-LEU-PHE (fMLP) (Sigma-Aldrich) segítségével stimuláltunk 150 µM luminol (Sigma-Aldrich) jelenlétében, majd a chemiluminescencia választ luminométer (Autolumat LB 953, Berthold,)

segítségével 10 percen keresztül rögzítettük, majd a választ a görbe alatti területtel fejeztük ki.

3.8. 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 (3.000xg, 2 perc) elválasztottuk egymástól, majd a plazmát 10.000xg-vel 1 percig ismét centrifugáltuk. A neutralizációhoz LPS-ot vagy bleb-et inkubáltunk plazmával 60 percig 37°C-on, illetve BPI-vel (10 µg/ml) vagy CD14/Fc-vel (5 µg/ml) 30 percig, puffer vagy 3% szérum jelenlétében. Ezt követően a LPS aktivitást vagy LAL esszével (Lonza) határoztuk meg, vagy izolált neutrofileket adtunk a mintákhoz és 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. 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) antitesttel jelöltük. Jelölés után a vörösvértesteket 10 percen keresztül lizáltuk (BD FACS Lysing Solution) majd mosás után a sejteket áramlási citométeren (BD FACS Calibur) mértük. A CD62L pozitivitást az FL4 fluoreszcens csatornán mért jelintenzitás átlagával jellemeztük.

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

Az analíziseket fagyasztva tárolt szérummintákon (-70°C) végeztük. A CRP szinteket egy Integra 700 automatával (Roche) végeztük. A PCT meghatározás

„two-site” immunoluminometriás esszével (Liaison) történt Liaison analizátorral (DiaSorin). Az LBP koncentrációját szilárd fázisú szendvics ELISA (Hycult Biotechnology) segítségével határoztuk meg. A sCD14 koncentrációját ELISA-val (Quantikine, R&D Systems) mértük.

3.10. Statisztikai analízis

A CD14/Fc és CD14/His különböző baktériumok és gombákhoz való kötődésének összehasonlítását, illetve a kontroll mintákkal való összevetését, valamint a fagocitózis-, az *ex vivo* killing- és a gátlásos kísérletek eredményeinek kiértékelését párosított Wilcoxon teszttel végeztük. A LPS és bleb neutralizációs kísérletekben a LAL- és chemilumineszcencia 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 analizáltuk. A statisztikai számításokat Statistica for Windows, GraphPadPrism 5 és SPSS 15.0 szoftverekkel végeztük. A különbségeket $p < 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. 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. A méretet és a tisztaságot redukáló- és nem redukáló SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. A CD14/Fc molekula az immunglobulin G-hez hasonlóan dimereket alkot, ezért nem redukáló körülmények között a várt molekulatömeg 160 kDa, míg redukáló körülmények között 80 kDa. Monomer lévén a CD14/His molekulamérete redukáló- és nem redukáló körülmények között is egyaránt 50 kDa. 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.

4.2. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz és gombákhoz

A CD14/Fc baktériumokhoz való kötődését áramlási citometriával vizsgáltuk. A CD14/Fc kötődött mind a vizsgált vad típusú, mind a rövid LPS (Ra & Re) mutáns Gram-negatív baktériumokhoz. A baktériumokhoz való kötődés LBP dependens volt, és függött a CD14/Fc koncentrációtól és az inkubációs időtől is. A vad típusú baktériumok esetében a maximális kötődés 4 óra inkubáció után, illetve 5-10 µg/ml CD14/Fc koncentrációnál következett be. Kifejezetten nagymértékű kötődést tapasztaltunk az Re mutánsok esetében, ahol már 1-5 µg/ml CD14/Fc és 2 óra inkubáció is elegendő volt a maximális kötődés eléréséhez. 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. Egyik rekombináns fehérje sem kötődött a vizsgált gombákhoz. A CD14/Fc kötődése baktériumokhoz (*S. typhimurium* wt és *S. typhimurium* Re) dóziszfüggően gátolható volt a CD14/Fc

molekula LPS-dal, illetve anti-CD14 blokkoló antitesttel történő előinkubálásával.

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).

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

Fluoreszcensen jelölt baktériumokat (*S. typhimurium* Ra és Re, *S. minnesota* Re) 5 µg/ml CD14/Fc fúziós fehérjével opsonizáltuk, 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 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.

Monocyta eredetű macrophagok esetében a fagocitózis a kontroll mintákhoz képest 17%-al növekedett, így ebben az esetben a CD14/Fc opsonizáló hatása megegyezett a humán szérumban hatásával (fagocitáló sejtek aránya CD14/Fc jelenlétében illetve hiányában: $69,01 \pm 2,99$ vs. $52,54 \pm 1,33$, $p < 0,01$). 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. $15,36 \pm 4,40$, $p < 0,01$). A negatív kontrollként használt SKBr-3 sejtekkel nem asszociálódtak a baktériumok.

Tripánkék kioltással igazoltuk, hogy a sejtekkel asszociálódott baktériumok nagy része (50-70%) internalizálódott. A baktériumok pontos lokalizációját konfokális mikroszkópia segítségével határoztuk meg. A PMN sejtek membránját AlexaFluor647-konjugált anti-MHC-I antitesttel (kék), a sejtmagot propidium jodiddal (piros) jelöltük, míg a fagocitált baktériumok FITC-tal (zöld) voltak jelölve. A mikroszkópos képek egyértelműen igazolták, hogy a PMN sejtekkel asszociált baktériumok mind a humán szérumban, mind a CD14/Fc általi opszonizáció esetében internalizációra kerültek.

4.4. A CD14/Fc által opszonizált baktériumok CD16 és CD32 receptorokon keresztül fagocitálódnak

Annak igazolására, hogy a baktérium felvétel a fagociták Fc receptorainak és az Fc rész interakciójának részeként jön létre, 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. Mindkét receptor egyidejű blokkolása a fagocitózis teljes gátlásához vezet ($91,65 \pm 3,54\%$ gátlás, $p < 0,01$). Hasonló eredményeket kaptunk a másik rövid LPS mutáns, a *S. minnesota* Re esetében is.

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

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 3×10^3 /ml értékről 853 ± 199 /ml értékre csökkentette. Hasonlóan, a CD14/Fc fúziós fehérjével kezelt vér 830 ± 72 /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 µg/ml CD14/Fc-t tartalmazott. A CFU szám 550 ± 40 /ml értékre csökkent a kezeletlen vérminták esetében, míg a CD14/Fc-vel kezelt mintáknál ez az érték 337 ± 84 /ml-nek mutatkozott ($p < 0,05$, $n=3$).

4.6. 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 septicus állapotok terápiájában – a baktériumokból felszabaduló biológiailag aktív molekulák neutralizálásának is. Ezek megjelenhetnek izolált formában, de nem ritkán komplexebb, a külső membránból lefűződő vezikulák, „bleb”-ek alakjában is.

4.6.1. 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 blebek hatását, sőt önmagában is dózisfüggően stimulálta a PMN sejteket. 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. 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.

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

A LPS és blebek plazma általi neutralizációjának vizsgálatára LAL assay-t használtunk. 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. A BPI a neutrofilek fontos antibakteriális hatású fehérjéje, melynek *in vivo* és *in vitro* LPS neutralizáló hatása is ismert. Szabad LPS és blebek 10 µg/ml BPI-vel való inkubálása után a LAL esszé segítségével nem tudtunk endotoxin aktivitást kimutatni.

4.7. A sCD14, mint biomarker – cirrhosisos betegek vizsgálata

4.7.1. A betegcsoport

Háromszázhatvannyolc jól karakterizált, követés alatt álló cirrhosisos beteget választottunk be a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetének Gastroenterológiai Tanszékéről. 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).

4.7.2 Az APP szintek alakulása a fertőzések és fertőzés nélküli betegek csoportjában

A fertőzések 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. Az egyes markerek közötti összefüggést megvizsgálva pozitív korrelációt találtunk a PCT, sCD14, FVS szám, abszolút PMN szám és a CRP szintek között a fertőzött betegcsoportban.

4.7.3. Az egyes paraméterek diszkriminatív ereje a cirrrosishoz 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 [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: 0,67 (0,61–0,73); sCD14: 0,57 (0,51–0,63); fehérvérsejtszám: 0,73 (0,67–0,78); abszolút PMN szám: 0,77 (0,72–0,82)]. Az eredmények alapján a szérum sCD14 mérés alacsony szenzitivitás/specifitás valamint pozitív/negatív prediktív értékkel rendelkezik, így nem alkalmas az infekció jelenlétének kimutatására cirrrosisos betegekben. A CRP viszont az eredmények alapján érzékeny markernek tűnik, és különösen a PCT szint meghatározásával kombinálva a bakteriális infekciók detektálásának érzékeny markere lehet cirrrosisban.

5. MEGBESZÉLÉS

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

5.1.1. 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. Bár több szerző is említ membránkötött CD14 függő fagocitózis mechanizmusokat, ezek az eredmények nem támasztják alá közvetlenül a CD14-baktérium kötődést.

Egy, az IgG1 Fc részéhez fuzionáltatott antimikrobiális fehérje tulajdonságai jelentősen eltérhetnek az eredeti komponensek tulajdonságaitól. Többek között a dimerizáció jelentősen megnövelheti az antimikrobiális fúziós fehérje aviditását az eredeti ligandjához. Mivel a CD14 esetében hasonló hatást vártunk, ezért létrehoztunk egy CD14/Fc fúziós fehérjét, valamint kontrollként egy CD14/His molekulát, és vizsgáltuk ezek különböző mikrobákhoz való kötődését. Az aviditásbeli változásokon kívül ez a molekula az Fc rész révén egyfajta opszoninként is viselkedhet, és az Fc rész egyéb effektor funkciókat is elláthat, mint például a fagociták Fc receptorához való kötődésen keresztül a fagocitózis elősegítése. A kísérleteink igazolták, hogy a CD14/Fc fúziós fehérje LBP függő specifikus interakcióba lép szabad LPS-dal és teljes baktériumokkal is.

A CD14/Fc fehérje az összes vizsgált Gram-negatív baktériumhoz kötődött, mely kötődés kifejezetten erősnek mutatkozott a vizsgált R-típusú mutánsok esetében. 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. 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 számottevően növeli a baktériumokkal való kölcsönhatás erősségét.

A CD14/Fc molekula a mintázatfelismerő receptor jellege, a sok lehetséges ligand, és az emiatt feltételezett széles faj-specifititás ellenére csak a Gram-negatív baktériumokhoz kötődött, 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, ami arra utal, hogy ebben a kórokozóban legalább egy CD14 ligand előfordul.

A fagocitózis vizsgálatok igazolták, hogy a rövid LPS (Ra és Re) mutáns baktériumok esetében a CD14/Fc nem csak kötődött a baktériumok felszínéhez, hanem 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 egyik hatást sem tudtuk megfigyelni. Valószínű, hogy a vad típusú baktériumok felszínéhez kötődő kevesebb CD14/Fc nem elegendő az Fc receptorok keresztkötéséhez, ami szükséges az FcR mediálta fagocitózis beindításához.

Az FcR blokkolós kísérleteink igazolják, hogy a CD14/Fc által kiváltott fagocitózis növekedés a molekula Fc része és a PMN sejtek FcR γ III/FcR γ II (CD16/CD32) receptorainak kölcsönhatása következtében jön létre. Az a tény, hogy az FcR γ III és FcR γ II egyidejű blokkolásakor a fagocitózis a CD14/Fc nélküli kontroll szintjére csökkent, arra enged következtetni, hogy az Fc-FcR interakción kívüli egyéb mechanizmusoknak nincs jelentős szerepe a CD14/Fc mediált baktérium felvételben.

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

A Gram-negatív baktériumokból felszabaduló virulencia faktoroknak (pl. a bleb képződésnek) és egyéb molekuláris komponenseknek nagy szerepe van a

fertőzésekhez társuló súlyos komplikációk – szepszis, szепtikus shock, sokszervi elégtelenség – kialakulásában. Különösen kifejezett a bleb képződés a *N. meningitidis* által okozott infekciókban, mely rendkívül magas LPS koncentrációkat eredményez. A LPS, blebek és egyéb bakteriális komponensek hatására bekövetkező kontrollálatlan effektor reakciók az esetek jó részében visszafordíthatatlanok, és a betegek elvesztését eredményezik. Így a kórokozók elpusztításán túl, nagy jelentősége lenne olyan ágensek fejlesztésének, amelyek ezeket a mikrobiális virulencia faktorokat is képesek neutralizálni. Ezért megvizsgáltuk, hogy a létrehozott CD14/Fc fúziós fehérje képes-e különböző LPS-ok és külső membrán vezikulák neutralizálására.

Kísérleteink során a két alkalmazott sejtes rendszerben a CD14/Fc nem neutralizálta sem a LPS-ok sem a bleb hatását. Sőt, 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 negatív eredményt adott. Nagy valószínűséggel a molekula Fc része és a sejtek felszínén lévő FcR-ok interakciója magyarázhatják a jelenséget. Bár a PMN sejtek reaktív oxigén intermediér termelésének fokozódása hasznos lehet a baktériumok elpusztítása során, a celluláris komponensek aktiválódása hozzájárulhat a generalizált gyulladásos reakció fokozódásához.

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. A CD14/Fc fúziós protein nem neutralizálta sem a LPS sem a blebek hatását. 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. 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), vagy a plazmában lévő high density

lipoprotein (HDL) molekula (neutralizáció). 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 inicializálásáért felelős assay komponensekhez és ezért nincs gátló hatása.

Miután a CD14/Fc fúziós fehérje nem volt képes a LPS/blebek neutralizálására, tovább vizsgáltuk ezek semlegesítésének lehetőségeit. Kimutattuk, hogy a humán plazma mind a LPS, mind a bleb-ek aktivitását gyakorlatilag nullára csökkenti a LAL esszé eredményei alapján. Ami a neutralizáció mechanizmusát illeti, nagyon valószínű, hogy a LBP szállítja a szabad LPS-ot és a bleb-ekből liberalizált LPS-ot a HDL-hoz, ahol a LPS már nem hozzáférhető a LAL kaszkádját elindító komponensek számára. További kísérleteink azt igazolták, hogy a BPI fehérjével előinkubált LPS és blebek LAL kaszkád aktiváló hatása nagyon nagy mértékben csökken.

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 hasonlítanak.

5.2. sCD14 – használható biomarker a cirrhosishoz 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, és jónéhány olyan alkalmazása is van 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. 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. 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 cirrhotikus 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.

Eredményeink alapján a sCD14 szint mérés nem bizonyult érzékeny módszernek a cirrhotishoz társuló fertőzések detektálásában, a fertőzőes és infekció mentes betegek szérum sCD14 koncentrációjában nem találtunk szignifikáns különbséget. Ennek megfelelően az analitikai paraméterek (érzékenység, specificitás, negatív- és pozitív-prediktív érték) alacsonyak voltak. 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. A CRP, mint a bakteriális fertőzések markere már jó ideje ismert, még cirrhotikus betegek esetében is. 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 diagnosztikai pontosságuk és határértékeik jelentősen eltértek egymástól a különböző tanulmányokban. 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. 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, 24,7 mg/l, 55,9 mg/l, valamint 80,0 mg/l 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 fertőzőes betegcsoportunk sokkal inkább a mindennapos klinikai eseteket reprezentálja. 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, 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 egybevágnak. 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, 2,8 µg/l, 3,2 µg/l, 9,8 µg/l, 10,1 µg/l. Mi is szignifikánsan emelkedett PCT szinteket mértünk a fertőzőes 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). Az általunk vizsgált betegcsoport egy negyede csupán enyhe fertőzésben

szenvedett, mely vagy nem, vagy kismértékben jár csak PCT koncentráció emelkedéssel, 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.

6. 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) szérumban koncentrációja 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 szérumban sCD14 mérése képes-e jelezni vagy megerősíteni a cirrhotishoz társuló fertőzések jelenlétét. Eredményeink azt mutatták, hogy a sCD14 szérumban szintje nem tér 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.

7. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai relevanciái

1., A rekombináns DNS technikával létrehoztunk egy CD14/Fc fúziós molekulát és jellemeztük biológiai tulajdonságait: 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 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 szepszis 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 tapasztaltunk, ezek alapján a bleb-ek biológiai aktivitásukat tekintve a szabad LPS-hoz hasonlítanak.

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

8. 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., Vitális, 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



9. 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 projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



SZÉCHENYI TERV
