

Humán neutrofil granulociták mikrovezikuláinak antibakteriális hatása

Doktori értekezés

Dr. Timár Csaba István

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Matkó János egyetemi tanár, az MTA
Doktora
Nyitrayné Dr. Pap Erna egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA rendes
tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella egyetemi tanár, az MTA
Doktora
Dr. Zsembery Ákos egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	0
Rövidítések jegyzéke	3
1. Irodalmi háttér.....	5
1.1 Az immunrendszer törzsfajlódása – néhány gondolat.....	5
1.2 Az immunrendszer általános szerveződése	6
1.3 A neutrofil granulocita.....	9
1.3.1 A neutrofil granulociták általános jellemzése	9
1.3.2 A PMN fagocitózisának menete	12
1.3.2.a. A baktériumok opszonizációja	12
1.3.2.b. A PMN főbb fagocitotikus receptorai.....	14
1.3.2.c. A fagolizoszóma jellemzése és a baktériumok elpusztítása.....	15
1.3.3 A PMN extracelluláris antimikrobiális hatásai: a „Neutrophil Extracellular Trap” (NET)	20
1.4 Az extracelluláris vezikulák (EV)	22
1.4.1 Általános jellemzés	22
1.4.2 A PMN EV-i	25
2. Célkitűzések	28
3. Módszerek	29
3.1 A neutrofil granulociták izolálása	29
3.2 Mikrovezikulák (MV) termeltetése és preparálása PMN-ekből	29
3.3 Mikrovezikulák preparálása humán plazmából.....	30
3.4 A mikrovezikulák mennyiségének becslése – a fehérjemennyiség analízise .	31
3.5 A mikrovezikulák mennyiségének becslése – áramlási citométer alkalmazása	31
3.6 Baktériumok preparálása és opszonizálása	32
3.7 Baktérium túlélés vizsgálata	33
3.8 A MV-ok, valamint a PMN-ek fixálása és fluoreszcens jelölése fluoreszcens konfokális és videó mikroszkópiához.....	34
3.9 A szuperoxid termelés mérése	36
3.10 Western blot	36
3.11 Statisztikai módszerek.....	37
3.12 Dinamikus fényszórási teszt.....	37
3.13 Elektronmikroszkópia.....	37
3.14 A társzserzők közötti munkamegosztás.....	38
4. Eredmények	39
4.1 A keletkezett MV-ok alapvető jellemzése	39
4.1.1 A MV-ok mérete	39
4.1.2 A MV-ok vezikuláris természetének igazolása	40
4.2 A MV-ok keletkezésének vizsgálata	44
4.2.1 Az MV termelést kiváltó ágensek.....	45
4.2.2 Az MV termelés kinetikája	47
4.2.3 A PMN az MV termelést követően.....	48
4.3 A keletkezett MV-ok minőségi összetétele.....	49

4.4 A MV-ok egy lehetséges funkciójának vizsgálata – a PMN eredetű MV-ok baktériumokra gyakorolt hatása.....	52
4.4.1 Az antibakteriális hatás és a MV-ok vezikuláris természetének kapcsolata	52
4.4.2 Az antibakteriális hatás és a támadandó baktériumok jellemzőinek kapcsolata	54
4.4.3 A MV-ok antibakteriális hatását meghatározó tényezők	56
A baktériumok és a tapasztalt antibakteriális hatás közti kapcsolat vizsgálatát követően szeretném ismertetni a MV-k egyes jellemzőinek az antibakteriális hatásban betöltött szerepét is.	56
4.4.3.a. Különböző MV-ok antibakteriális tulajdonságának összehasonlítása	56
4.4.3.b. A MV-ok fehérjéinek egyedi szerepe az antibakteriális hatásban..	60
4.4.3.c. Az MV-baktérium interakció anatómiája	61
4.4.3.d. A baktériumok aggregálódása és az antibakteriális hatás közötti kapcsolat vizsgálata	63
4.4.3.e. A aggregált MV-ok mennyisége és az antibakteriális hatás közötti kapcsolat	65
4.4.3.f. A bMV-baktérium interakció időbeni követése	67
4.5 MV-ok ex vivo vizsgálata.....	69
4.6 Az extracelluláris ionösszetétel szerepe a <i>S. aureus</i> elleni antibakteriális folyamatokra	71
5. Megbeszélés	75
6. Következtetések	79
Összefoglalás	81
Summary	82
Irodalomjegyzék	83
Saját közlemények jegyzéke	96
Köszönetnyilvánítás.....	97
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatai	99

Rövidítések jegyzéke

ANCA – anti – neutrofil-citoplazma antitest
 ARDS - akut respirációs disztressz szindróma (acute respiratory distress syndrome)
 BCR - B limfocita receptor
 bMV - bakteriális stimulusra termelt mikrovezikulum
 BPI - baktérium permeabilitást fokozó fehérje (bactericidal permeability increasing protein)
 CD14 - lipopoliszacharid receptor
 CD16 - Fc γ receptor III
 CD - cluster of differentiation
 CFU - colony forming unit - osztódásra képes baktérium
 CGD - krónikus granulomatózus betegség (chronic granulomatous disease)
 CR - komplement receptor (complement receptor)
 DAF - decay-accelerating factor, CD55
 DAMP- damage associated molecular pattern
 DLS - dinamikus fényszóródási teszt (dynamic light scattering)
 ERK- extracellular-signal-regulated kinase
 EV- extracelluláris vezikulum
 FcR - Fc receptor
 FITC - fluorescein isothiocianát
 fMLP - formil-metionin-leucin-fenylalanin
 FPR - N-formil-peptid receptor
 GFP - green fluorescent protein
 H₂O₂ - hidrogén peroxid
 HBSS- Hank's Balanced Salt Solution
 HNP - humán neutrofil peptid
 Hv1- human voltage-gated proton channel 1
 ICAM - intercellular adhesion molecule
 IL- interleukin
 IRAK- Interleukin-1 receptor-associated kinase
 LAD- leukocitaadhézió deficiencia
 LB - Luria-Bertani médium
 LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen 1
 LPS - lipopoliszacharid
 Mac-1 - macrophage-1 antigén, integrin α M β 2, CR3, CD11b/CD18
 MAP(K)- mitogén aktivált protein (kináz)
 MBL- mannose-binding lectin
 MCP - membrane cofactor protein, CD46
 MPO- mieloperoxidáz
 MSSA - methicillin szenzitív Staphylococcus aureus
 MV- mikrovezikulum
 MVB - multivesicular body, multivezikuláris test
 NADP- nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát oxidált alakja
 NADPH- nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált alakja
 NET- neutrophil extracellular trap
 NF- κ B- nuclear factor κ B
 NGAL - neutrofil zselatináz-asszociált lipokalin

NLR- NOD-like receptor
NOD- nucleotide-binding oligomerization domain
NOX- NADPH oxidáz
OCL⁻ - hipoklorit ion
OD - optikai denzitás
PAMP - pathogen-associated molecular pattern, patogénhez társult molekuláris mintázat
PECAM - platelet endothelial cell adhesion molecule, CD31
PECAM-1- platelet-endothel cell adhesion molecule-1
PGRP - peptidoglycan recognition protein
PKC- protein kináz C
PMA - phorbol myristate acetate, forbol észter
PMN - polimorfonukleáris sejt, neutrofil granulocita
pMV - phorbol észter hatására termelt MV
PPAR γ - peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRR- pattern recognition receptor
RNS - ribonukleinsav
ROS- reaktív oxigén gyökök
R-PE - red-phycoerythrin
sMV - spontán termelődött mikrovezikulum
SOD- superoxide dismutase
Syk- spleen tyrosine kinase
TF - tissue factor, szöveti faktor
TGF β 1 - transforming growth factor béta
TLR- toll-like receptor
TNF α - tumor nekrozis faktor alfa

1. Irodalmi háttér

1.1 Az immunrendszer törzsfejlődése – néhány gondolat

Az immunrendszer fogalomköre alatt egy olyan összetett, redundáns és hálózatosan felépülő struktúrát értünk, melynek legalapvetőbb feladata az adott élőlény védelme külső behatolóktól, illetve a saját, de már nem megfelelően működő sejtektől. Az immunrendszer előalakjainak tekinthető, valamelyest már a szervezet védelmére specializált sejtek – az irodalomban ma elfogadott nézetek szerint – evolúciós léptékkal mérve igen korán, a többsejtűség kialakulásával gyakorlatilag egy időben, mintegy 2 milliárd éve, a cianobaktériumokkal és nyálkagombákkal együtt jelentek meg [1]. Mindemellett a szervezet védelmét ellátó sejtek és rendszerek töretlen és gyors ütemű fejlődése is megfigyelhető az evolúció során [2, 3]. A fenti két tényező (korai megjelenés és folyamatos fejlődés) együttes jelenléte folyamatos evolúciós kényszer, evolúciós hajtóerő meglétére utal [4].

Az immunrendszer összetettsége és sokrétűsége a fentieknek megfelelően a természetes szelekció során létrejött, egymásra épülő, véletlenszerű – de a mindenkori kihívásoknak és korlátoknak megfelelő, aktuálisan (és nem feltétlen hosszú távon) hasznos, avagy előnyös változások összességéből alakult ki [4]. Ebből a gondolatból több fontos következtetést lehet levonni:

I. Mivel az újonnan megjelenő tulajdonságok a már meglévő rendszerek fejlődésével, átalakulásával jönnek létre, érdemes vizsgálni az eredeti elemeket, illetve a változást indukáló evolúciós kihívás jellemzőit is, mivel alapvetően meghatározzák az új folyamat korlátait és előnyeit is.

II. Az evolúció során nem a legjobb megoldások, hanem a korábbi rendszerekhez képest aktuálisan hasznosabb folyamatok rögzültek – jellemzően a régebbi mechanizmus valamilyen szintű fennmaradása mellett. Az újabb mechanizmusok kialakulása és beépülése – jellegénél, „kiforratlanságánál” fogva – viszont rengeteg potenciális hibaforrást is belekódolt a rendszer működésébe, melyek ugyanúgy rögzülnek. Azaz az evolúció során kialakult rendszerek működése sose tökéletes – sőt, elvileg sem lehet az, viszont egy-egy feladat ellátására rendszerint többféle mód és mechanizmus is kialakulhatott.

III. Mivel egymással szemben fejlődő (evolválódó) élőlények csoportjairól van szó, fontos figyelembe venni reprodukciós sebességüket. Amelyik gyorsabb reprodukcióval rendelkezik, az elvileg nagyobb változékonyság létrehozására képes. Ezzel a hátránnyal a lassabban szaporodó élőlények oly módon vehetik fel a küzdelmet, hogy vagy a gyorsabban fejlődő entitások nem változó tulajdonságaira építenek, vagy maguk kifejlesztnek egy olyan mechanizmust, mely maga a gyorsan változó élőlényekhez hasonlatos sokféleség létrehozására képes.

Ezzel együtt érdemes belegondolni, hogy életünk során a szervezetünk hány milliárdszor találkozik különféle kórokozókka, hányszor keletkeznek benne daganatos sejtek, és mégis, az eseteknek a találkozásokhoz képest csak igen elenyésző, százalékelés hányadában okoz ez akár csak minimálisan észrevehető változásokat [5, 6]. Azaz pl. az emberi immunrendszer igen jó hatásfokúnak mondható.

1.2 Az immunrendszer általános szerveződése

Az ember immunrendszere a ma elfogadott nézetek szerint egy ősbib, „veleszületettnek”, vagy „természetesnek” nevezett részből, illetve egy – evolúciós mércével mérve – újabb (mintegy 5-600 millió éves) [2] „adaptívnek” nevezett részből tevődik össze. Mindkét rendszerhez tartoznak mind sejtés, mind oldott (szolúbilis, avagy humorális) elemek (**1. táblázat**).

	Adaptív immunrendszer	Veleszületett immunrendszer	Nem besorolt elemek
<i>Sejtés összetevők</i>	B limfociták T limfociták	Neutrofil granulociták Eozinofil granulociták Bazofil granulociták Makrofágok, Monociták Dendritikus sejtek	$\gamma\delta$ T-sejtek NK sejtek CD5 ⁺ B sejtek
<i>Szolúbilis elemek</i>	Immunglobulinok	Komplement rendszer Antibakteriális peptidek	Citokinek

1. táblázat: Az immunrendszer elemeinek besorolása. (Erdei Anna tankönyve [1] nyomán)

Igen fontos megjegyezni, hogy a két rendszer evolúciósan elég ideje van jelen ahhoz, hogy alkalmazkodjanak egymás jelenlétéhez, azaz működésükhöz fel- és

kihasználják a másik rendszer elemeit is (pl. immunglobulin receptorok a neutrofil granulocitákon és makrofágokon [7], avagy mintázatfelismerő receptorok a B limfocitákon [8]). A két rendszer együttes jelenléte bizonyos esetekben annyira átfed, hogy az illető sejttípust (pl. az NK-sejteket) vagy szolúbilis elemeket nehéz kétséget kizáróan besorolni.

Az immunrendszer két ága közt számos hasonlóságot találhatunk. Mindkét rendszer elemeire általánosan jellemző a nagyfokú mobilitás, melynek segítségével elemeik képesek eljutni a szervezet különböző pontjaira. Nagyon fontos, hogy mindkét rendszer képes az idegen behatolók és a nem megfelelően működő saját sejtek felismerésére és támadására, ugyanakkor a normál működésű sejtek tolerálására. Hasonlóan fontos tulajdonsága mindkét rendszernek a kommunikáció. Ez jellemzően ligandum-receptor alapon szerveződik, mely lehet sejt és sejt közötti közvetlen kapcsolat során létrejövő (pl. immunológiai szinapszis), avagy oldott ligandumokon, mint pl. citokineken vagy kemokineken keresztül megvalósuló folyamat. Napjainkban egyre több példát találunk egy újabb, kész fehérjék és/vagy nukleinsav egyik sejtről másik sejtre való átjuttatásán alapuló kommunikációs rendszerekre, az extracelluláris vezikulákra. Ezzel a témakörrel részletesebben külön fejezetben foglalkozok majd. Fontos további tulajdonsága az immunrendszer mindkét ágának, hogy bizonyos funkciók ellátására – eltérő hatékonysággal ugyan, de – jellemzően több mechanizmus is képes lehet [1, 6, 9]. Ezt a jelenséget hívjuk redundanciának.

Mely tulajdonságokban különbözik lényegesen az adaptív és a veleszületett immunrendszer? Az egyik alapvető különbség a „célpont” felismerésének elve: a veleszületett immunitás jellemzően evolúciósan jól konzervált, általánosan elterjedt, de épp ezért nem specifikus mintázatokat ismer fel. Kórokozók esetén „pathogen associated molecular pattern”-ről, PAMP-eknek, saját, de sérült sejtek estén „damage associated molecular patterns”-ről, DAMP-eknek nevezzük ezeket a mintázatokat. A fenti mintázatokat felismerő receptorok neve funkciójukból származik, mintázatfelismerő receptoroknak nevezzük őket („pattern recognition receptors, PRR) [10, 11]. Speciális tulajdonsága a PRR-eknek, hogy a sejtfelszíni receptorok mellett léteznek intracelluláris, illetve nem sejthez kötött (szolúbilis) változataik is [12, 13]. De melyek is ezek a mintázatok, illetve ezek mely tulajdonságán alapul a felismerés mechanizmusa? Kémiai szerkezetüket tekintve a PAMP-ok és a DAMP-ok igen heterogének, lehetnek lipidek,

szénhidrátok, nukleinsavak, avagy fehérjék, illetve ezek kombinációi is (pl. lipopoliszacharid, glükóz-amino-glikánok, duplaszálú RNS, RNS-immunglobulin komplex, lipoteikolsav, stb.). Ezért igen meglepő, hogy egy-egy konkrét PRR jellemzően több ligandum megfelelő affinitású felismerésére is képes. Ennek háttérében jelen ismeretünk szerint (szemben pl. az immunglobulinokkal) nem a fenti molekulák közti tényleges összetételbeli/szekvencia szerinti hasonlóság, hanem leginkább az adott molekulák által felvett térszerkezet és felszíni töltések elhelyezkedésének (mintázatának) hasonlatossága áll [14, 15].

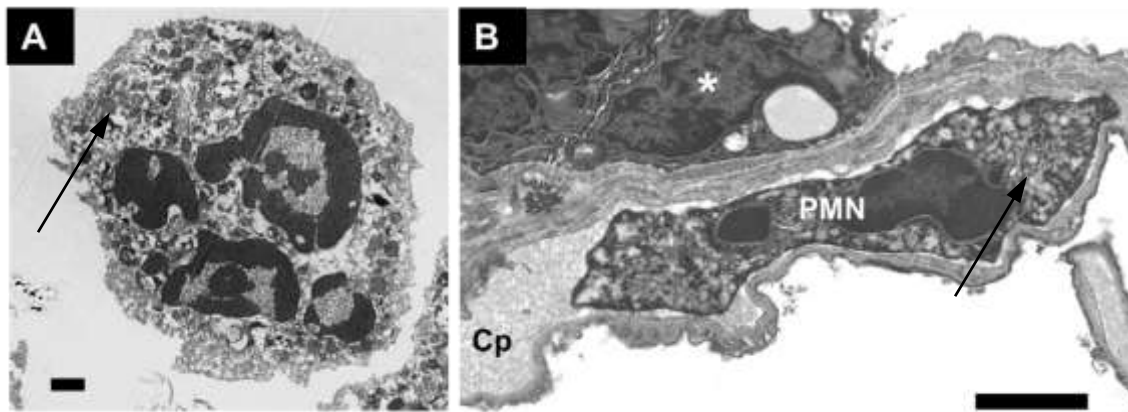
Az adaptív immunrendszer receptorai (B- és T-sejt receptorok, azaz BCR és TCR) egész más elv mentén jöttek létre az evolúció során. E receptorok sokkal kisebb méretű ligandumok felismerése képesek, sokkal nagyobb specificitással. Tehát egy-egy ilyen receptor, szemben a veleszületett immunrendszer receptoraival, jellemzően 1, esetleg néhány különböző ligandum felismerésére alkalmas. Viszont az ilyen receptorokból még az egyedfejlődés során, szomatikus génátrendeződéssel egy olyan széles paletta jön létre, mely bármely releváns kémiai szerkezet (fehérje, lipid, szénhidrát, nukleinsav, glikoproteinek, proteoglikánok, stb.), felismerését biztosíthatja, mégpedig specifikusan. Ily módon – elvileg – bármely újonnan kialakult (kórokozó vagy épp saját) jellegzetesség is felismerésre kerülhet a receptorok által. Mivel az adaptív immunrendszer esetében olyan sokféle mintázat/szekvencia felismerésére képesek, hogy abba jó eséllyel „saját”, nemhogy az adott fajra, hanem kifejezetten csak az adott egyedre jellemző ligandumok (pl. MHC szekvenciák) is beletartoznak, ezért biztosítani kell, hogy „saját” ligandumot célpontként ne ismerjen fel. Ez a szelekció azonban – az egyedre specifikusan jellemző szekvenciák miatt – kötelezően az egyedfejlődés során kell hogy végbemenjen. Az adaptív immunrendszer receptorai tehát egyénre jellemzőek, egy adott ligandum felismerése pedig két külön egyedben más és más jellegzetességek alapján történhet.

A felismerési mechanizmusok közötti különbségek az immunrendszer egészének további működésére is alapvető hatással vannak. Mivel a veleszületett rendszerhez tartozó elemek ligandumai az evolúció során rögzültek, a receptorokat hordozó sejtek/elemek többnyire további szelekciós/tanulási lépések nélkül, akár azonnal is képesek feladataik maximális ellátására. Ezen felül – mivel viszonylag kevés ligandum tartozik a konzervált mintázatok családjába – viszonylag kevés féle receptorral lefedhető a teljes felismerendő spektrum. Ily módon – többféle mintázatfelismerő receptort

hordozva – akár egyetlen sejt is képes lehet a legkülönbébb célpontok felismerésére. Amennyiben viszont pont a rögzült tulajdonságokban tér el egy kórokozó a szokványos mintázatoktól (pl. *Mycobacterium tuberculosis*), avagy elrejtí az a szervezet elől (pl. az obligát intracelluláris baktériumok, mint pl. a *Chlamydia* törzsek), a kórokozók felismerése a mintázatfelismerő receptorokon biztosan romlik, akár meg is hiúsulhat. Épp ezért fontos, hogy a veleszületett immunrendszer elemei – pl. immunglobulin receptorok segítségével – képesek nem konzervált mintázatok felismerésére is.

1.3 A neutrofil granulocita

A neutrofil granulocita (más néven polimorfonukleáris neutrofil sejt, PMN) az emberi fehérvérsejtek egyik legnagyobb számban előforduló sejtípusa. Működését tekintve a veleszületett immunrendszer típusos képviselőjének tekinthető, funkcióját tekintve a falósejtek közé sorolható. Fő célpontjait a baktériumok és egysejtű gombák adják [1]. A PMN-ek klinikai és immunológiai jelentőségét jól mutatja, hogy mind alulműködésük (mint pl. a neutropenia, vagy a krónikus granulomatózis betegség, azaz CGD, [16, 17]), mind túlműködésük (akut respiratorikus disztressz szindróma, ARDS [18, 19]) jellemzően súlyos, életet veszélyeztető állapotokhoz vezethet.



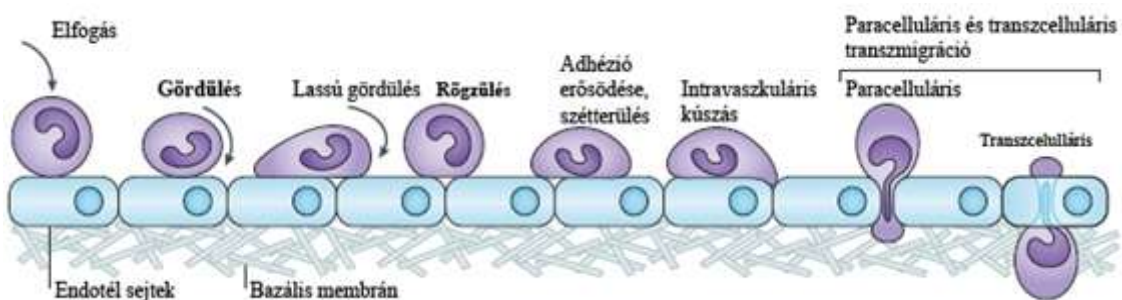
1. ábra. A neutrofil granulociták sejtalakjaik sokfélesége elektronmikroszkópos felvételeken. Az „A” panelen oldatban lebegő PMN-ről készült elektron mikroszkópos felvételt láthatunk. A szerző Kittel Ágnessel közös munkája. A „B” panelen egy PMN figyelhető meg az interstíciumban. Elektronmikroszkópos felvétel Burns közleményéből [20]. A jelölő mindkét felvételen 2 μ m, a nyilak pedig egy-egy PMN granulumra mutatnak. Érdeemes megfigyelni a gömbszerű és az elnyújtott forma közti eltéréseket.

1.3.1 A neutrofil granulociták általános jellemzése

A PMN-ek a keringésben mintegy 12-15 μm átmérőjű gömb alakú sejtek, melyek a szövetközi térben aktív helyváltoztatásra és extrém alakváltozásra is képesek. (**1.A és 1.B ábra**).

Az érett alakok – nevüknek megfelelően – soklebenyű és viszonylag nagy méretű sejtmaggal, valamint rengeteg neutrálisan festődő citoplazmatikus granulummal rendelkeznek. Érésük a csontvelőben történik mieloid progenitor sejtekből, jellemzően 9-12 nap alatt – az itt található sejtek képezik a PMN-ek ún. csontvelői készletét, „pool”-ját. Érésüket követően kerülnek a vérkeringésbe, itt nyugalmi körülmények között a fehérvérsejtek mintegy 40-60%-át teszik ki. Mindazonáltal – rácsálókon végzett mérések alapján – a keringésben található PMN-ek legfeljebb 2-5 %-t jelentik a szervezet teljes PMN készletének [21]. A PMN-ek a keringésben fiziológiás körülmények között emberben mintegy 12 órát töltenek, melyet követően kivándorolnak a szövetközi térbe, ahol apoptózis során eliminálódnak, maradványaikat jellemzően makrofágok veszik fel [22, 23]. A harmadik jelentős PMN készletet a marginális PMN-ek adják, ezek a neutrofilek a tüdő, a máj, valamint a vese ereiben kitapadva helyezkednek el, ahonnan viszont gyorsan mobilizálhatóak [21]. Energetikai szükségletüket jellemzően inkább anaerob módon, laktát képzésével fedezik [24].

A PMN-ek feladatukat tekintve professzionális falósejteknek tekinthetők, melyek elsődleges célpontjait leginkább a baktériumok és egysejtű gombák jelentik. A klasszikus elképzelés szerint a keringésben lévő PMN-eket amennyiben megfelelő ingerek (kemokinek, kemoattraktánsok, esetleg citokinek) érik, szelektínek és integrinek segítségével előbb gyengén, majd erősen kitapadnak a szintén szelektínek és adhezíneket kihelyező, „aktivált” endotél sejtekre, végül irányított és aktív folyamatok révén mintegy „átbújnak” az endotél sejtek rétegén [25, 26] (**2. ábra**). Mindeközben a PMN és az endotél kapcsolata folyamatosan fenntartja az érfal folytonosságát.

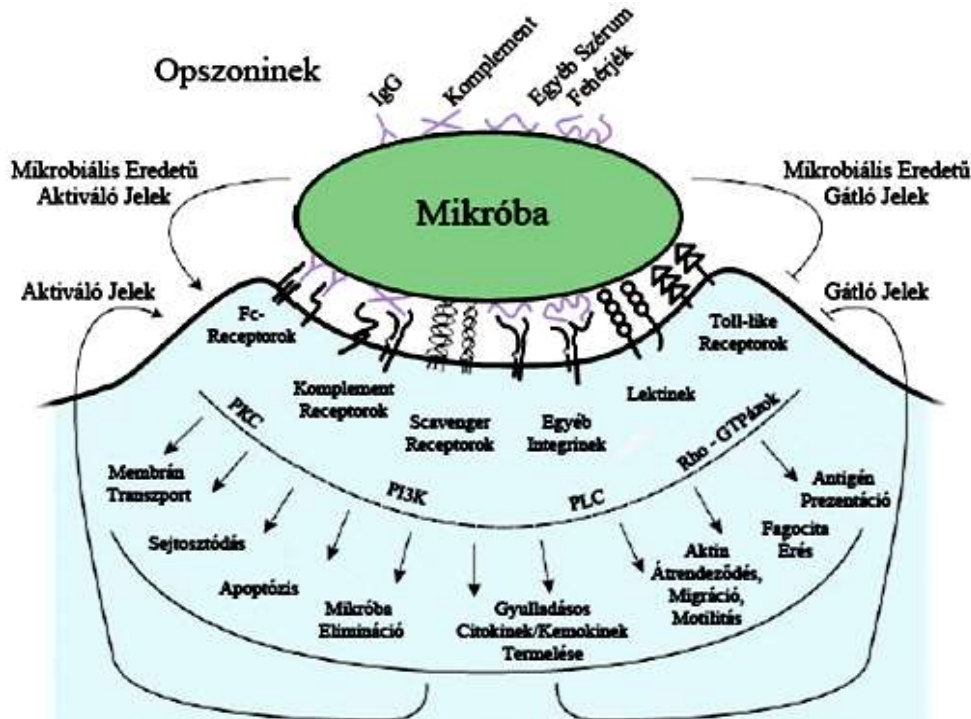


2. ábra: a PMN-ek érpályából való kilépése, illetve az abban részt vevő főbb sejtfelszíni elemek (Ley ábrájának módosítása [26])

Az érfalon való átjutást követően az intersticiális térben aktív kemotaxis útján, kemokin receptoraik segítségével keresik fel a kemotaktikus molekulák forrását. A szövetközi vándorlással párhuzamosan kezdik el előbb szekretoros vezikulumaik, majd tercier granulumaik ürítését is, az így leadott mátrix metalloproteázok (MMP-k), illetve neutrofil elasztáz (NE) molekulák nagyban segítik vándorlásukat [27]. A kemotaxis végén, a kemotaxis „célpontjában” aztán sejtfelszíni receptoraikkal (PRR-kel, Fc-receptorokkal és komplement receptorokkal, **2. táblázat, 3. ábra**) megkötik az idegen elemeket.

receptor neve	receptort alkotó fehérje	ligandum	jelátvitel indítása	következmény
<i>CR1</i>	CD35	C3b, C4b, iC3b		PKC ↑ PMN túlélés reaktív gyök termelés citokin termelés
<i>CR3 (MAC-1)</i>	CD11b- CD18	iC3b, ICAM-1, LPS, fibrinogén, ...	ITAM	Itsd.: FcR
<i>CR4</i>	CD11c- CD18	iC3b, fibrinogén		
<i>LFA-1</i>	CD11a- CD18	ICAM-1, 2, 3	SFK	PLCγ ↑: Itsd.: FcR
<i>Fc γ RI</i>	CD64	IgG	ITAM	PLCγ ↑ → DAG ↑ PKC ↑ → Itsd.: CR1 IP3 ↑ [Ca ⁺⁺] ↑ } PI3K ↑ → P-inozitol jelpályák ↑ } degranuláció, Rho/Rac ↑ → aktin átrendeződés } fagocitózis, } fagolizaszóma kialakulása
<i>Fc γ RII a</i>	CD32	IgG		
<i>Fc γ RIII</i>	CD16	IgG		
<i>Fc γ RII b</i>	CD32	IgG	ITIM	ITAM folyamatok gátlása
<i>TLR-ok</i> <i>C típusú lektinek</i>		di- és triacil-lipopeptidek, lipopeptidek, LPS, dsRNS, ssRNS, CpG DNS, RNS-immunglobulin komplex, flagellin, profillinszerű molekulák, peptidoglikán, heparán-szulfát,	IRAK	NFκB ↑ → fehérje expresszió változása
			ITAM	PI3K ↑ → Itsd.: FcR
<i>C5aR</i>	CD88	C5a		Ras/Rho és Rac ↑ } PLCβ ↑ } kemotaxis
<i>C3aR</i>		C3a		

2. táblázat: A PMN néhány sejtfelszíni receptora, illetve azok főbb jelátviteli pályái mai ismereteink szerint [28-34]. A rövidítések magyarázatát lásd a „Rövidítések jegyzékében”.



3. ábra A ligandum-receptor kötését követően aktiválódó főbb jelátviteli utak (Underhill [33] nyomán)

1.3.2 A PMN fagocitózisának menete

Mivel a dolgozatban bemutatott kísérletek értelmezéséhez nem szükséges feltétlenül, és mivel igen összetett, hatalmas irodalommal rendelkező téma, a fagocitózis, valamint a fagolizozóma kialakulását irányító jelátviteli útvonalak részletes és mély ismertetésétől eltekintek. Mindazonáltal a fagocitózis beindulásához, illetve a mikrobák elpusztításához szükséges alapvető folyamatokat szeretném vázlatosan tárgyalni.

1.3.2.a. A baktériumok opsonizációja

Mint a 2. táblázatban, illetve a 3. ábrán látható, a PMN-ek plazmamembránjában az idegent közvetlenül azonosító mintázatfelismerő receptorok (PRR-k) mellett igen nagy számban szerepelnek olyan receptorok is, amelyek az immunrendszer valamely szolúbilis eleme (mint pl. a komplement rendszer, és/vagy az immunglobulinok) által megjelölt, azaz opsonizált mikrobákat ismerik fel [1, 6, 35]. Az opsonizáció létrejöttében két alapvető, egymást segítő folyamat ismert. Az egyik a komplement rendszer aktiválódása, a másik specifikus immunglobulinok kötődése a mikrobák antigénjeihez.

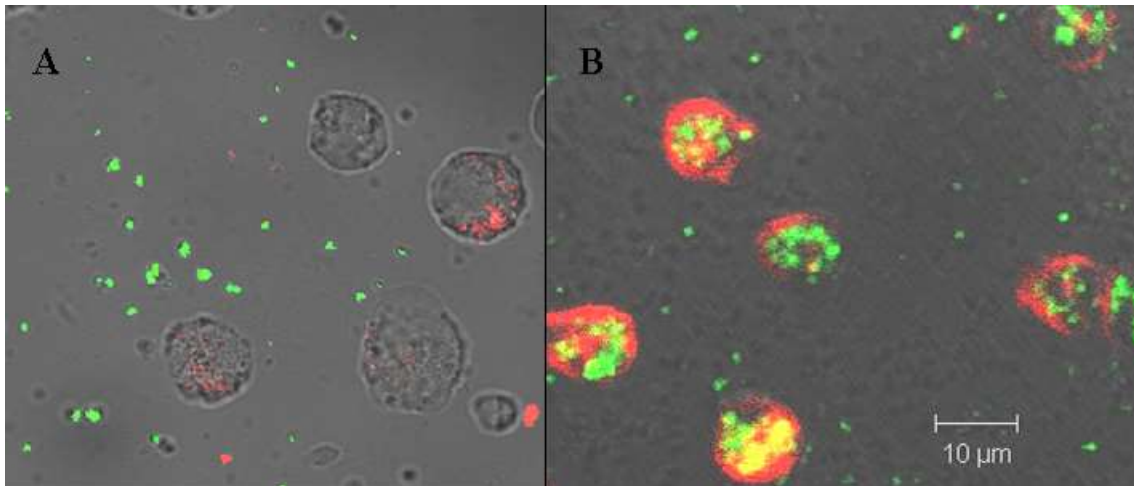
A komplementrendszer a vérben és a testnedvekben inaktív állapotban jelenlévő, egymást láncreakcióhoz hasonlóan, kaszkádként aktiváló proteáz pro-enzimek,

szabályzó molekulák, illetve bizonyos aktivált faktorokat megkötő receptorok összessége. Az összetevők túlnyomó része a májban termelődik. A kaszkád aktivációja jelen ismereteink szerint a felszíni antigént kötött antitesteken alapuló klasszikus módon, a mannózt kötő lektin (Mannose Binding Lectin, MBL) által elindított MBL-úton, valamint a – szialsav hiányában a mikrobák felszínéhez kötődő – C3, B és D komplement fehérjéken keresztül elinduló alternatív úton lehetséges. Mindhárom aktivációs út ugyanarra a közös útra fut össze, melynek lényege, hogy kialakul valamelyik, a C3-at hasító C3 konvertáz komplex. A C3 konvertázok a C3 hasítása következtében kialakuló aktív terméken, a C3b-n keresztül a C5 konvertáz létrejöttét indukálják, mely C5 konvertáz végül a C5 hasításával hozza létre az enzimatikusan szintén aktív C5b-t. Mivel egy-egy enzimkomplex jellemzően nem csak egy szubsztrátot hasít, a folyamat kinetikája exponenciális jelleget mutat. A komplement aktiválódásának három fő következménye ismert. Első a membránt támadó komplex (membrane attack complex, MAC) kialakulása, mely maga közvetlenül képes a mikrobák felszíni integritásának megtörésére, így azok elpusztítására. A másik következmény kemotaktikus hatású (de enzimatikusan inaktív) fragmentek, a C3a és C5a keletkezése, melyek alapvetőek – több más sejthez hasonlóan – a PMN-ek kemotaxisában. A harmadik következmény pedig mikroba jelölése, opszonizációja, ami a mikroba felszínéhez kötődő C3 fragmentumokon (C3b, iC3b, C3d) keresztül valósul meg. A mikrobák felszínén rögzült komplement molekulákat a megfelelő (C3R, C1R) receptorain keresztül igen nagy hatékonysággal képes kötni a PMN. A folyamat szelektivitását tehát a komplementrendszer, azon keresztül pedig végső soron vagy immunglobulinok, vagy evolúciósan jól konzervált mintázatokhoz (mannóz jelenléte, illetve szialsav hiánya) kötődő komplement fehérjék biztosítják [1, 6].

A specifikus immunglobulinok szintén képesek a mikrobák opszonizációjára, amennyiben megfelelő mennyiségben kötődnek a felszíni antigénekhez. A kötődést követően aztán két folyamat is elindulhat párhuzamosan. Egyrészt – mint fentebb is olvasható – a felszínhez kötődött immunglobulinok elindíthatják a komplementrendszer klasszikus aktivációs útvonalát. Ez utóbbi működés leginkább az IgM osztályú antitestekre jellemző. Másrészt a mikrobák antigénjeihez való kötődést követően a megfelelő antitest receptorokkal (Fc-receptorokkal) rendelkező sejtek közvetlenül is képesek felismerni a jelölt entitásokat. Ez utóbbi folyamat főleg az IgG osztályú antitestekre jellemző [1, 6].

1.3.2.b. A PMN főbb fagocitotikus receptorai

Maga a fagocitózis a fagocitálandó ágens megragadásával kezdődő, aktív citoszkeletális átrendeződéssel járó folyamat. Jellemző, hogy *in vivo* a PMN-ek egy-egy célpontjukat egyszerre többféle receptorukkal kötik [33], mely mechanizmus nem csak az azonosítás megfelelő precizitásában, hanem – különböző jelátviteli folyamatok együttes aktiválása miatt – a fagocitózis gyorsításában is alapvető szerepet játszik (**3. ábra, 2. táblázat**, [1, 36]). Fontos megjegyezni azt is, hogy az opszoninok hiánya – már csak a nagyobb mennyiségű receptor-ligand kölcsönhatás elmaradása miatt is – erőteljesen csökkenti a felismerés, és így a következményes fagocitózis hatékonyságát [35] – ez utóbbi megfigyelést saját kísérleteink is alátámasztották (**4. és 19.A ábra**).



4. ábra. Az opszonizáció szerepe a baktériumok fagocitózisában. A felvételeken endogén zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-t) termelő nem opszonizált (A), illetve opszonizált (B) *Staphylococcus aureus* (zöld) fagocitózisa látható CD11b elleni monoklonális antitesttel jelölt PMN (piros) által, 30 perc alatt, 37 °C-on. Transzmissziós fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételek. Saját felvétel.

Mindemellett meg kell említenem, hogy a különböző opszonin (azaz Fc- és komplement-) receptorok jelentősége a PMN esetén eltér [35, 37-39]. Ez utóbbi állítást támasztják alá azon megfigyelések, melyek szerint – a fent említett receptorok intracelluláris jelátviteli útvonalaiban található sok közös vonás ellenére – más és más, egyedi jellegzetességek figyelhetők meg a különböző opszoninok PMN-re gyakorolt hatásában. Röviden, felsorolásszerűen ismertetnék néhány kiragadott példát: az Fc-receptor közvetítette fagocitózis esetén a PMN-ek jellemzően álláb segítségével veszik

körbe célpontjukat, míg a komplement receptorok közvetítette fagocitózis esetén a bekebelezendő mikroba mintegy besüllyed a PMN membránjába [35]. A komplement ill. az Fc-receptorok intracelluláris jelátviteli útjaiban különbségek is kimutathatóak: előbbiekben a Rho, utóbbiakban a Cdc42 szerepe tűnt fontosabbnak [39]. *Ex vivo* vizsgálatok eltérést igazoltak a keringésben, illetve az interstíciumban található PMN-ek opszonin-receptor preferenciájában: intravaszkulárisan inkább az Fc-, az intersticiális térben pedig a komplement receptorok jelentősége tűnik nagyobbak [40].

Külön kell szólni egy meglehetősen speciális receptor, a CR3, más néven Mac-1, avagy $\beta 2$ integrin működéséről is. A CR3 két nem kovalensen kapcsolódó transzmembrán fehérjeláncból, a CD11b-ből és a CD18-ből felépülő heterodimer, mely az intracelluláris jelátvitelben alapvetően fontos, ITAM szekvenciát hordozó segédláncához (pl. DAP-12) kapcsolódik [41]. Működését tekintve – a többi β -integrinhez hasonlóan – alapvető szerepet játszik a PMN-ek és monociták endotélre való kitapadásában (pl. az ICAM-1 kötésén keresztül), de nagy affinitással köti az opszonizáló komplement elemeit (pl. iC3b) [41]. Ezen felül képes a Gram negatív baktériumok LPS-ének, a kollagén, az alvadási X-es faktor, a fibrin és a fibrinogén, illetve ciszteinben gazdag és denaturált fehérjék megkötésére is [42-48]. Sajnálatos módon viszont mind a mai napig nem tisztázott eléggé, hogy miként képes egy receptor ennyi különböző, azonosítható közös szekvenciával nem rendelkező ligandum megkötésére [49, 50]. A CR3 affinitása ligandjai iránt változhat, ebben egyértelműen igazolódott a PMN-t érő hatások szerepe. Ezek szerint meg kell különböztetni egy „inside-out” szignalizációs hálózatot, melynek keretében a sejtet érő (kemokin- és citokin receptorokon közvetített) hatások PLC γ és PKC aktiválódásán keresztül megváltoztatják a CD18 konformációját, így a ligandum kötési affinitását is. A másik mechanizmus, „outside-in” jelátviteli útvonal viszont a már aktiválódott (ligandumot kötött) komplement receptorokból indul ki, és Ras, PKC illetve PI3K aktiválódásán keresztül hat részint a sejtre, részint a konformációt még nem váltott CR3-ra [51, 52]. A CR3 egyedi klinikai jelentőségét jól mutatja, hogy a CD18 hiányában *in vivo* erősen csökken a PMN-ek kilépése az érpályából, mely kórkép „leukocyte adhesion deficiency syndrome 1” (LAD-1) néven ismert [53]. *In vitro* eredmények szerint CR3 hiányában igen nagy mértékben csökken a PMN-ek baktérium elimináló kapacitása [54].

1.3.2.c. A fagolizozóma jellemzése és a baktériumok elpusztítása

A fagocitózis intracelluláris irányításában részint tirozin kináz kaszkádok, részint kis G fehérjék vesznek részt (**2. táblázat**, [35, 36, 40, 55, 56]). Normál körülmények között maga a fagoszóma igen szorosan követi a fagocitált részecske méretét, azaz a szabad fagoszómalis tér igen kicsi [57]. Ennek egyenes következménye, hogy a valami módon ide kerülő molekulák és vegyületek lokális koncentrációja igen magas értékeket érhet el.

Azurofil (primer) granulomok	Specifikus (szekunder) granulomok	Zselatináz (tercier) granulomok	Szekretoros granulomok
MPO	Laktoferrin	Zselatináz	CR1
Neutrofil elasztáz	Katelicidinek	Leukolizin	CR3
Katepszin G	Lizozim	Lizozim	FPR
Proteináz 3	Kollagenáz	NRAMP1	CD14
Azurocidin	Leukolizin	PGRP	CD16
Defenzinek (HNP1-4)	Citokróm b558	Baktenecinek	
BPI	NGAL		

3. táblázat: a neutrofil granulocita granulumjainak jellemző összetevői

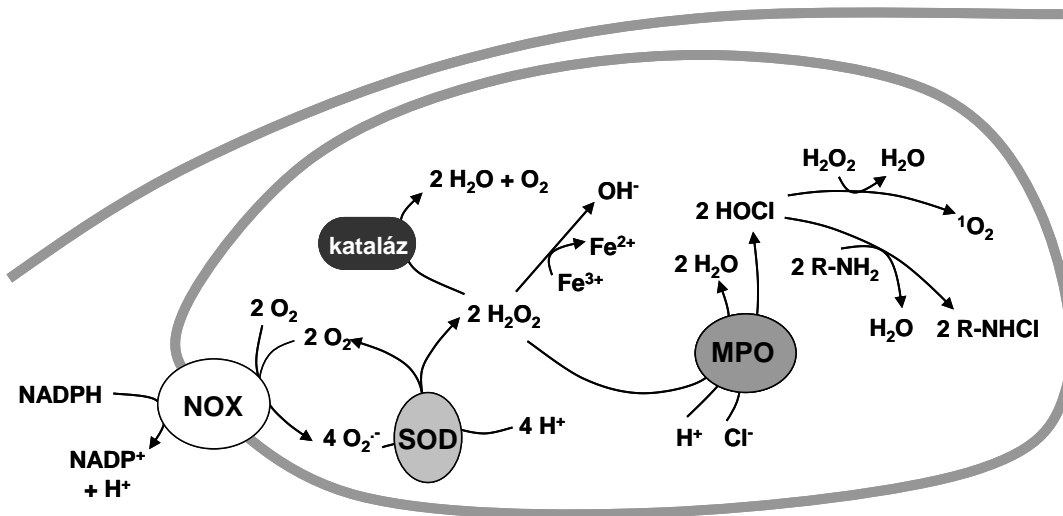
A fagocitózist követően indul be a fagoszóma érése. Ennek során a fagoszóma összeolvad előbb a szekretoros, majd a terciér, a szekunder, végül a primer granulumokkal [58], létrehozva a fagolizoszómát. A granulumok tartalma igen változatos és összetett (**3. táblázat**) [59, 60], zömmel közvetlen antibakteriális hatású peptideket/fehérjéket (katelicidinek, defenzinek, azurocidin, baktericid/permeanilizáló fehérje (BPI)), baktériumok bontásához szükséges enzimeket (lizozim, kollagenáz, zselatináz, elasztáz, mannozidáz), valamint különböző plazmamembrán receptorokat (pl. CR1, 3) tartalmaznak.

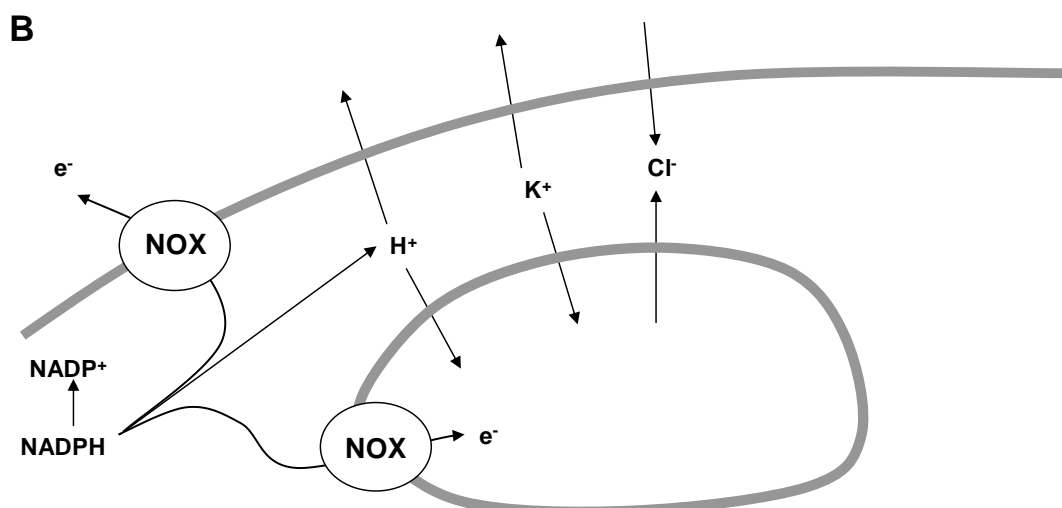
Ugyanakkor összetételük alapján sok egyéb, a direkt antimikrobiális hatásokon túlmutató folyamatban felmerült részvételük. A teljesség igénye nélkül bemutatnánk néhány példát ezekre is: a szekretoros vezikula és terciér granulum membránfehérjéi között integrineket, a szekunder és primer granulum fala szelektineket tartalmaz, melyek szerepet játszanak a diapedezisben [61]. Az azurocidin (primer granulum) kemotaktikus és immunrendszert aktiváló hatása bizonyított [62]. A szekretoros vezikula opiátjainak szignifikáns fájdalomcsillapító hatását ugyancsak igazolták [63, 64]. A szekunder és a primer granulumok nyomelemek (pl. vas) illetve – a baktériumok számára is fontos –

vitaminok (B_{12}) nagy mennyiségben való megkötésére alkalmas szállítófehérjéket is tartalmaznak, melyek a mikrobák osztódását szignifikánsan képesek gátolni [65]. A granulomok heparin kötő fehérjéik (HBP), illetve a vérlemezke aktiváló faktor (PAF) tartamuknál fogva hatással vannak az alvadási folyamatokra is [66, 67].

A fagolizoszóma kialakulásával együtt történik a fagocita NADPH-oxidáz citoplazmatikus és citoszólikus alegységeinek összeépülése is. E folyamat szabályozásában mai ismereteink szerint alapvető szerepet játszanak a Rac kis GTP-áz fehérjék [68-70]. A fagocita NADPH-oxidáz citoplazmatikus NADPH-ról szállít elektronokat fagolizozómális O_2 molekulákra, melyek így szuperoxid gyökké ($O_2^{\cdot-}$) alakulnak. Jól jelzi a folyamat intenzitását az ilyenkor tapasztalható drasztikus O_2 -fogyasztás növekedés, a „respiratory burst” [71]. A keletkezett szuperoxid gyök a granulomokból származó enzimek (szuperoxid diszmutáz és mieloperoxidáz) segítségével biztosítja a további reaktív oxigénszármazékok képződését [72-74]. (5.A ábra).

A





5. ábra: A PMN fagolizoszómája. „A”: a fagolizoszóma reaktív gyök termelő enzimrendszere. NOX: NADPH-oxidáz, SOD: szuperoxid diszmutáz, MPO: mieloperoxidáz, R-HNCl: klóramin, HOCl: hipoklóros sav, O_2^- : szuperoxid, H_2O_2 : hidrogén peroxid. „B”: a fagolizoszóma töltésvándorlásának lehetséges irányai. Laboratóriumunk közleménye [75] alapján készült ábrák.

A reaktív oxigén gyökök (ROS) jelentősége a mikrobák közvetlen eliminálásában igen összetett, mivel nem csak saját, közvetlen roncsoló hatásukkal vesznek részt a mikrobák elpusztításában, hanem szerepet játszanak az enzimatikus eliminációs mechanizmusok aktiválásában, illetve – áttételesen – még a kemotaxis indukciójában is [76]. Mindemellett a ROS-ok jelentősége függ az eliminálandó mikrobától [77, 78] is, mely különbség mögött (többek között) megtalálhatóak a mikrobának a reaktív gyököket bontó enzimrendszerei (pl. a *S. aureus* esetén a kataláz), vagy a mikroba egyedi érzékenysége (pl. Gram negatív, illetve pozitív sejtfal) [79, 80] is.

A reaktív gyökök tárgyalása esetén tehát meg kell különböztetni azok közvetlen, *in vitro* mérhető antibakteriális hatását, a PMN egyéb rendszereire gyakorolt hatását, illetve azt az állapotot, mikor *szisztémás* körülmények között, szervezeti szinten vizsgáljuk hatásukat.

A reaktív gyökök között egyértelműen a HOCl a leghatékonyabb, törzstől függően akár mikromoláros koncentrációban [80, 81] is erős baktericid hatással rendelkezhet, míg pl. a H_2O_2 vagy a O_2^- egyértelműen nagyságrendekkel kisebb direkt toxicitással bír [82, 83]. A fenti eredményekkel jól összezsengenek azon *in vitro* eredmények, melyek MPO-hiányos (tehát HOCl képzésére képtelen) emberek és egerek neutrofil granulocitái esetén az egészségeshez képest jóval lassabb ütemű baktérium eliminációról számoltak be

bizonyos baktériumtörzsek esetén [84]. Ugyanakkor a fenti gondolatmenetet érdekesen árnyalja az a tény, hogy – szemben a ROS termelésre képtelen NOX-hiányos (CGD) betegek egyértelmű klinikai manifesztációjával – az MPO hiányos (azaz hipoklóros sav (HOCl) termelésére képtelen) betegek alig mutatnak klinikai fenotípust [84, 85]. Ennek magyarázatában az irodalom mind a mai napig nem egységes, azonban több közlemény is utal rá, hogy MPO hiány esetén egerekben igen nagy mértékben fokozódik a kemokinek termelődése a gyulladás helyén, melynek következtében szignifikánsan több PMN és makrofág akkumulálódik a gyulladás helyén, azaz elképzelhető, hogy az ilyenkor tapasztalható minőségi deficitet mennyiségi válasz fokozásával oldja meg az immunrendszer.

A NADPH-oxidáz működése a ROS képzés mellett igen fontos az intracelluláris tér, valamint a fagolizoszóma lumen ionösszetételének, polaritásának és pH-jának szabályzásában is (**5.A és B ábra**). A reaktív gyökök képzése intracellulárisan protonok megjelenésével, a fagolizozómában pedig protonok felhasználásával és OH^- gyökök keletkezésével jár, mely folyamatokkal párhuzamosan – részint laboratóriumunk által is igazoltan – előbb K^+ , majd nagy mennyiségű proton áramlik a fagolizoszóma terébe, melynek következtében depolarizálódik a PMN [75, 86, 87]. További töltéskompenzáló ionként egyes szerzők felvetették a Cl^- lehetséges szerepét is [88]. Jól mutatja a szuperoxid termelés és a fenti ionáramok kapcsoltságát, hogy NADPH-oxidáz hiánya avagy inaktivitása esetén a utóbbi ionáramok jelentősen csökkennek [75, 87, 89], noha maguk az ionok bizonyítottan nem az oxidázon keresztül mozognak [86]. A két folyamat (az oxidáz aktiválódása valamint az iontranszport) nettó következménye a fenntartott elektrontranszport által biztosított folyamatos szuperoxid képződés, relatíve stabil, közel neutrális fagolizozómális és intracelluláris pH [90, 91], illetve a PMN depolarizációja mellett [87]. Megjegyzendő, hogy a fagolizoszóma pH-ja a granulocita NADPH-oxidáz hiányos, azaz elektrontranszportra, illetve szuperoxid képzésére képtelen PMN-ekkel rendelkező betegek esetén egyértelműen savanyúbb [90, 92]. Azaz a NADPH-oxidáz működésének egyik következménye valóban a töltéskompenzáció lehet. Mivel viszont a kompenzáló ionáramok mozgását nem csak az elektromos töltések (elektromos grádiens), hanem a koncentrációs viszonyok is (kémiai grádiens) nagyban meghatározzák [93], jogosan merül fel az az elképzelés, miszerint az extracelluláris tér összetétele – a

kompenzáló ionáramokra gyakorolt módosító hatásán keresztül – szignifikánsan befolyásolhatja a NADPH-oxidáz működését (is).

A NADPH-oxidáz működésének további, eddig kevésbé vizsgált aspektusa a granulum mátrixában kötött enzimek aktivációja és/vagy kötésből való felszabadítása [92, 94]. Az irodalom nem egységes a fenti jelenség tárgyalásában, az oxidáz működésének több következményét (K^+ beáramlása, pH változás, depolarizáció) is társították már a granuláris enzimek aktivációjával.

Mint látható tehát, a fagolizozómában egyszerre vannak jelen a NADPH-oxidázhoz köthető antibakteriális hatások (reaktív gyökök, megfelelő pH), illetve a granulumokhoz köthető fehérjék és peptidek (pl. enzimek és antimikrobiális peptidek). A ma elfogadott nézet szerint a két antimikrobiális arzenál jelentősége egy adott mikroba intracelluláris eliminálásában függ magától az eliminálandó mikrobától is. Míg gombák esetében egyértelműnek tűnik a HOCl vezető szerepe a károsításban [78, 85, 95], és *S. aureus* ölésében is igazolt az oxidáz fontossága, addig az *E. coli* eliminációja függetlennek mutatkozott a reaktív gyököktől [87, 92].

1.3.3 A PMN extracelluláris antimikrobiális hatásai: a „Neutrophil Extracellular Trap” (NET)

2004-ben jelent meg a „neutrofil extracellular trap”-et, a NET-et leíró első közlemény [96]. Az eredeti közlemény szerint a neutrofil granulocita IL-8, forbol-észter (PMA), avagy LPS indukció hatására a NADPH-oxidáz működése mellett a maghártyájának lebontását követő órákban leadja DNS-ét, hisztonjait, valamint bizonyos granuláris fehérjéit (főleg a neutrofil elasztázt, mieloperoxidázt, laktoferrint és katepszin G-t) az extracelluláris tér felé, mely folyamat végül a sejt pusztulásával zárul. Mindeközben a leadott anyagokból az extracelluláris térben kialakul egy fibrilláris-globuláris hálózat (a NET), mely antibakteriális hatással bír. Azaz egy speciális szervezésű programozott sejthalál – mintegy altruista módon – alapját képezi egy extracelluláris antibakteriális mechanizmus kialakulásának. Mára többé-kevésbé ismertek mind a NET-et létrehozó sejt jelátviteli folyamatai, mind a NET hatásának alapjai.

Az eredetileg ismertetett NET-képzési folyamat alapvetően a NADPH-oxidáz Raf-MEK-ERK kináz-kaszád útvonalának folyamatos aktivációján alapul, mely az

oxidáz hiányában nem is képes aktiválódni [97]. Egy 2010-ből származó tanulmány ugyanakkor oxidáz független NET-képzésről számolt be [98]. A NET képzési folyamat, mivel számos ponton szignifikánsan különbözik mind az apoptózistól, mind a nekrozistól, mára a nemzetközi irodalom által elfogadottan is a sejthalál új, egyedi formájaként tárgyalják, NET-ózis néven [99]. A különbségek közül kiemelendő, hogy a NET-ózison átesett, mag nélküli PMN-ek még képesnek mutatkoztak kemotaxisra és fagocitózis alapú baktérium eliminációra is [100].

A NET-ózis folyamán kialakuló „neutrofil extracellular trap” a DNS szálak alkotta (részben hisztonok által stabilizált) hálószerű szövetek és a fent említett antimikrobiális fehérjék komplexe. Antimikrobiális hatásának alapja a mikrobák immobilizációja [101-103], mely DNáz kezeléssel teljességgel felfüggeszthető [104-106]. És bár a kimutatott antimikrobiális fehérjék lokális koncentrációja igen magas értékeket érhet el, ezek hatását a NET-ben az újabb eredmények nem támasztották alá [107]. Ugyanakkor érdekes kísérletsorozattal igazolták, hogy a NET képes lehet a támadott baktériumok virulenciájának csökkentésére [100].

A NET *in vivo* relevanciájának megítélése nem egységes. Egyrészt többen is jól dokumentáltan igazolták a NET-re jellemző DNS fibrillumok és hisztonok jelenlétét gyulladásos szövetekben [108], valamint ezek lehetséges működését bakteriális fertőzés alatt [105], ugyanakkor kétségtelen tény, hogy a NET összetevői és a genny összetétele pontról pontra egyezik.

A NET megismerése kapcsán mindazonáltal kiemelném, hogy alapvetően formálta át a PMN-ekről alkotott tudományos képet. Egyrészt a NET képzését, a „NET-ózist” egy új, addig nem besorolt programozott sejteliminációs mechanizmusként lehet felfogni. Másrészt az addig kizárólag információhordozónak tekintett DNS-hez társít egy egészen új, és nem kissé meglepő funkciót. Harmadrészt a NET elveiben egy abszolút új antibakteriális mechanizmust is jelent, mely részben a baktériumok hálóba ragadásán, azaz immobilizációján alapul. Negyedrészt elveiben jelent újdonságot, hogy egy eddig obligát fagocitának gondolt sejttípus az extracelluláris térben is képes a kórokozók eliminálására.

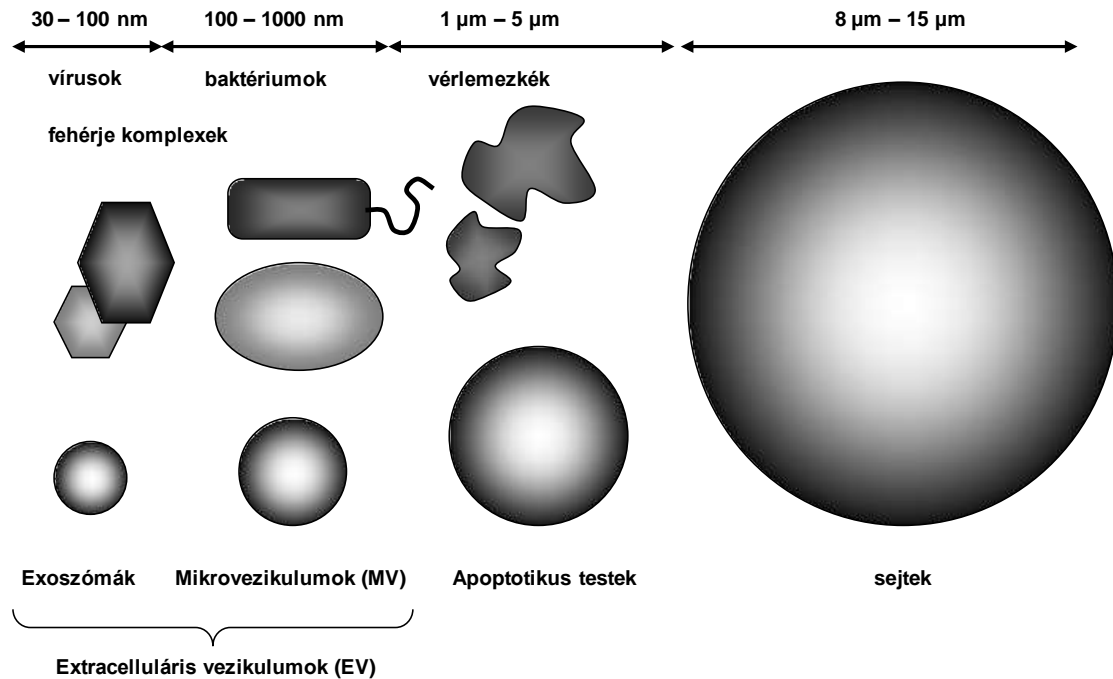
1.4 Az extracelluláris vezikulák (EV)

1.4.1 Általános jellemzés

Az extracelluláris, más néven szubcelluláris vezikulákról szóló első közlemények még az 1960-es és '70-as években jelentek meg [109, 110]. Azóta, különösen az elmúlt 10 évben exponenciálisan növekvő számú közlemény foglalkozik velük. Maguk az EV-k 30 nm és 4 µm közötti átmérővel rendelkező, foszfolipid kettős membrán által határolt, specifikus fehérje- és lipidösszetétellel jellemezhető képletek. Érdekes tulajdonsága az extracelluláris vezikuláknak, hogy igen sokszor találhatóak bennük különböző formájú RNS-ek, úgy mint mRNS [111], miRNS [112], r- és tRNS [113], valamint nem kódoló RNS szakaszok [114] is. A dolgozatban a továbbiakban az egységes nevezéktan érdekében – adott esetben az eredeti közleményekben szereplő nevezéktantól is eltérve – a kisebb méretű vezikulákat következetesen exoszómának, a nagyobb méretűeket mikrovezikulumnak, MV-knek fogom jelölni, az apoptotikus testek megnevezésén nem változtattam.

Mai ismereteink szerint minden eddig vizsgált sejttípus képesnek mutatkozott termelésükre. Osztályzásuk alapvetően méretük és keletkezésük alapján történhet: a kisebb, 30 nm-től mintegy 100 nm-ig terjedő exoszómák jellemzően multivezikuláris testekben keletkeznek, és ezek felnyílásával kerülnek az extracelluláris térbe [115, 116] (**6. ábra**). A nagyobb, 1 µm-ig terjedő, a szerzőtől függően mikrovezikulának (MV), ektoszómának, avagy mikropartikulának is nevezett képletek közvetlenül a plazmamebránból fűződnek le „blebbing”-gel (bimbózással) vagy „sheddinggel” (lemorzsolódással) [116-119] (**6. ábra**). Egy harmadik osztályukat jelentik az apoptotikus testek, ezek mérete jellemzően 1-4 µm körül van, és – nevüknek megfelelően – apoptotizáló sejtekből származnak. Egy adott extracelluláris vezikula csoportba sorolása a kurrens nemzetközi irodalomban történhet azok mérete, illetve keletkezése alapján is, de úgy tűnik, hogy egyre erőteljesebb a konszenzus, mely szerint a besorolást sokkal inkább érdemes a keletkezés (és az elválasztás) körülményei alapján megtenni, semmint méretük alapján, mivel az EV-k összeolvadása vagy éppen aprózódása (azaz méretük változása) igazolt folyamatnak tekinthető.

Nagyon fontos tulajdonsága az EV-knek, hogy (szemben a sejtes elemekkel) szervezetünk bármely helyére, bármely testfolyadékba és bármely testváladékba képesek eljutni [117, 120, 121], hatásuk így szervezetünkben bárhol érvényesülhet [122, 123]. Kijelenthető tehát, hogy az EV-k igen általános és gyakori jelenségnek számítanak.



6. ábra. Az extracelluláris vezikulumok csoportjai. Buzás Edit összefoglalója nyomán [116] készült ábra, nevezéktanában a jelen dolgozatban alkalmazotthoz igazítva.

Az EV-k biológia jelentősége kapcsán a legtöbb közlemény a sejtek közötti hírközlésben betöltött szerepet vizsgálja. Mára igazolódott, hogy ennek során nem csak ligandumok [124-126], hanem kész fehérjék (pl. receptorok) [127-129], sőt mRNS, és/vagy miRNS szállítását is végzik [128, 130]. E tulajdonságuk alapján az EV-k vizsgálata egyre nagyobb teret nyer a klinikai diagnosztikában is [121, 131, 132], mivel olyan sejtípusok működéséről és állapotáról nyerhetünk általuk információt, melyek egyébként rutinszerűen nem felkereshetőek. A sejtek közötti kommunikációban való részvétel mellett rengeteg más folyamatban is vizsgálják szerepüket. A teljesség igénye nélkül említeném meg az alvadási folyamatok gyorsításában [133, 134], a daganatos sejtek áttét képzésében [135], a tracheobronchiális epitelsejtek antivirális védekezésében [136], illetve a makrofágok antigén prezentációjában [137, 138] leírt eredményeket.

Az EV-k kutatásának egyik legkomolyabb kihívását elválasztásuk és azonosításuk jelenti. Az elválasztási technikák jelenleg két alapvető irányvonalat követnek. Az egyik megközelítés az EV-k fizikai tulajdonságain (mint például méret, tömeg, sűrűség) alapul. A MV-k viszonylag könnyen izolálhatóak ily módon, mivel a jóval nagyobb sejtektől méret szerinti szűréssel, a kisebb méretű (így kisebb tömegű) exoszómáktól pedig helyesen megválasztott centrifugálási paraméterekkel (15000 – 30000 g) jól elkülöníthetőek. Az ily módon készült preparátumok összetétele viszont nagyban függ a kiindulási minta összetételétől (pl. más sejtek, avagy indukáló ágensek jelenléte), ami – különösen vegyes összetételű kiindulási minta esetén – az eredmények igen gondos interpretációját teszi szükségessé. Az exoszómák ugyancsak szeparálhatóak centrifugálással, ezek a szolúbilis fehérjékkel, illetve fehérje- és immunkomplexek üleptethetőségével nagyságrendileg azonos, 80 000 – 120 000 g körüli tartományban ülepednek [118], ami egyben azt is jelenti, hogy a minta összetételének kontrollálása kiemelten fontos ezen esetekben is. A fenti szennyeződésektől való elkülönítésre ilyenkor jól alkalmazható a sűrűség grádiens segítségével történő üleptetés, mely módszerrel akár az exoszómák között is több populációt lehet elkülöníteni [139].

Megközelíthető az EV-k szeparálása valamely specifikus összetevőjük, mint például membránfehérjék vagy lipid összetevőik jelölése alapján is. Ilyenkor a szeparáláshoz alkalmazhatunk pl. immunprecipitációt, melynek során protein A-val borított mágneses, vagy éppen nagy tömegű gyöngyök segítségével izolálhatjuk a keresett EV-ket [117, 130]. Jelölhetjük a kiválasztott összetevőt fluoreszcensen is, például a membránfehérjéket antitestekkel, magát a lipid kettős membránt nem specifikus membránfestéssel (mint pl. a PKH család reagensei), vagy jelölhetünk jól meghatározott, az extracelluláris vezikulákban ismertén dúsuló lipideket, mint pl. a foszfatidil szerint (pl. Annexin V-tel). A fluoreszcens jelölésre pozitív populációt aztán áramlási citométerben működő „cell sorter”-ral, vagy speciális, kifejezetten az EV-k vizsgálatára kifejlesztett NanoSight készülékkel különíthetjük el [140].

A specifikus jelölésen alapuló elválasztási technikák egyben átvezetnek minket az EV kimutatásának kérdésköréhez is. Az EV-k jelenlétének, keletkezésének igazolására az egyik alapvető megközelítés azok láthatóvá tétele. Mivel viszont az EV-k (30 nm és 1000 nm közötti) mérettartománya csak részben esik a látható fényel még elérhető felbontásba, sokszor speciális megközelítéseket vagyunk kénytelen alkalmazni. A

nagyobb méretű MV-ok általában még éppen jól detektálhatóak áramlási citométerrel és megfelelő objektívvel rendelkező mikroszkópokkal, különösen ha fluoreszcensen is jelöljük őket [118, 141, 142]. A kisebb méretű exoszómák megjelenítésére pedig használhatunk speciális konfokális technikákat, mint pl. a Nanoscale Superresolution Microscopy-t [143], vagy NanoSight-ot, elektronmikroszkópos vagy akár atomerő mikroszkópos technikákat, avagy egész más elven alapuló eljárásokat, mint pl. dinamikus fényszóródási tesztek (Dynamic Light Scattering, DLS) [144-146]. Mivel ezen technikák ismerete dolgozatomban megértéséhez nem szükséges, részletesen nem kívánom ismertetni őket.

A preparált EV frakciók összetételének vizsgálata – főleg miRNS és mRNS tartalmuk felismerése óta – szintén igen dinamikus fejlődő tudományterület. A különböző proteomikai, lipidomikai és RNS profilt feltáró technikák ismertetése szintén nem lehet célja dolgozatomban, azt viszont érdemes megjegyezni, hogy a fenti technikákkal született eredmények alapvetőek (és mára már nem is nélkülözhetőek) az EV frakción végzett, azok esetleges biológiai funkcióinak vizsgálatára tervezett kísérletek tervezésében.

Az EV-kel kapcsolatos kutatásokban azonban sosem szabad megfeledkezni arról a tényről, hogy rendszerint igen kis méretű vezikulák nem egyszer igen kis mennyiségű mintájáról van szó, melyekben a folyamatos változást (pl. az EV-k összeolvadását, avagy aprózódását, vagy akár aggregálódását) sokszor nehéz kivédeni. Ily módon ezen tudományterületen különösen fontos a kiindulási körülmények (teljes vér, sejt kultúra, vagy sejt izolátum) helyes megválasztása, a preparátumok gondos előkészítése, illetve a kapott kísérleti eredmények gondos és óvatos értékelése. Mivel jellemzően a kísérleti eszközök mérési-felbontási határán mozgunk, fontos ezen határok kimérése az adott eszköznél, illetve ajánlott a különböző mérési technikák kombinált alkalmazása [118, 147]. Igen fontos kontrollt jelent a feltételezett EV-k igazolásában azok eliminálása valamely, a szerkezetüknek megfelelő módszerrel (pl. detergenssekkel) [140], illetve vezikuláris struktúrájuk igazolása elektron mikroszkópos technikákkal.

1.4.2 A PMN EV-i

A PMN eredetű EV-ről viszonylag hézagosszerű ismeretekkel rendelkezünk. Az első közlemények a kemotaktikus fMLP, illetve az autoimmun kórképekre jellemző anti-neutrofil citoplazma antitest (ANCA) hatását követően izolált exoszómáknak az endotél aktivációjában (IL-6, IL-8 szekréció, ICAM-1 expresszió) betöltött szerepét tárgyalták [148-150]. Igen sok ismeretet köszönhetünk Dr. Schifferli laboratóriumának [151-161]. Munkásságuk során alapvetően a PMN-ek által különböző hatásokra termelt EV-k más immunsejtekre (mint pl. monocitákra) gyakorolt hatásait, azon belül pedig jellemzően a citokin szekrécióban megnyilvánuló változásokat vizsgálták. Eredményeik alapján – több más, szintén PMN eredetű EV-k hatásaival foglalkozó közleménnyel összecsengően [162, 163] – a PMN által termelt EV-k más sejteken alapvetően aktivitást gátló hatású mediátorok és citokinek termelődését indukálták.

Más vizsgálatok a PMN-EV-k alvadási folyamatokra kifejtett hatásával foglalkoznak. Releváns közlemények mutatták be a PMN eredetű MV-ok endotél sejtekre gyakorolt aktiváló hatásait. Ezen vizsgálatok az endotél sejt kultúrákon részint az alvadási folyamatokat serkentő sejt felszíni változásokat, részint fokozott szöveti faktor leadást igazoltak [148, 149]. További közlemények *Meningococcus* infekcióban szenvedő betegek PMN eredetű EV-it vizsgálták, ezekben szöveti faktort igazoltak, illetve méréseik szerint az PMN EV-k fokozták a thrombin kialakulását [164]. Újabb közlemények a PMN-EV thrombocitákra kifejtett hatásait vizsgálták, eredményeik szerint részint PAF [165], részint β -integrinjeik (Mac-1 [166]) segítségével fokozták a thrombocita aktivációt.

Mint látható tehát, a neutrofil granulocita esetében az irodalmi adatok zömmel a kisebb, manapság exoszómálisnak (100 nm körüli) nevezett frakciót vizsgálták. Kevés adat szól a nagyobb, 1 μ m-ig terjedő mikrovezikuláris (MV) frakcióról, és alig rendelkezünk irodalmi adatokkal a keletkezést kiváltó stimulusok jelentőségéről. Mindemellett – nem csak a PMN-ek esetében, hanem általánosságban is – alig néhány közlemény foglalkozik annak lehetőségével, hogy az elválasztott vezikulum frakciók párhuzamosan esetleg többféle vezikulum populációt is tartalmazhatnak. És bár releváns információkkal rendelkezünk a PMN eredetű EV-k sejtek közötti kommunikáción túlmutató, közvetlenül kiváltott hatásairól (pl. szöveti faktor és felszín biztosítása a véralvadási kaszkádok elindításához [164]), korábban senki nem vizsgálta ezen vezikulák esetleges szerepét a PMN-ek legalapvetőbb funkciójában, a baktériumölésben.

A fenti gondolatmenetnek, illetve adatoknak megfelelően tűztük ki kutatási céljainkat.

2. Célkitűzések

- Célunk volt a neutrofil granulociták különböző biológiai/bakteriális, illetve farmakológiai hatásokra termelődött extracelluláris vezikulumainak mennyiségi és minőségi jellemzése.
- Vizsgálni kívántuk a neutrofil granulociták extracelluláris vezikulumainak a baktériumokra kifejtett hatását *in vitro* és *ex vivo* körülmények között.
- Vizsgálni kívántuk az extracelluláris ionkörnyezet/ionösszetétel változásának hatását a PMN intracelluláris, illetve MV-on alapuló antibakteriális kapacitására.

3. Módszerek

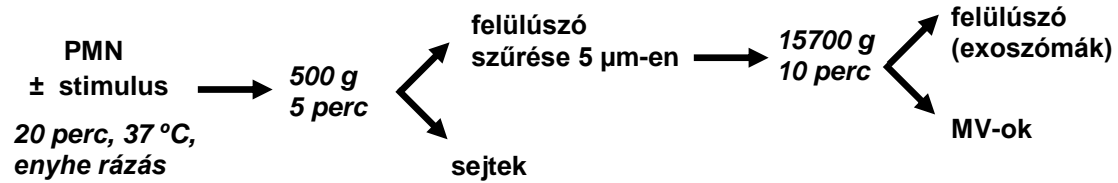
3.1 A neutrofil granulociták izolálása

Önkéntes, egészséges donoroktól származó friss, citráttal alvadásgátolt vérmintákat 30 percen át ülepitettük dextranszal, ami által a vörösvérsejtek nagy része elkülönült a fehérvérsejtektől. Ezt követően a különböző fehérvérsejteket sűrűségük alapján, Ficoll-Paque gradiens segítségével különítettük el egymástól. A megmaradt vörösvértest-szennyezést 30 másodperces hipozmotikus lízissel távolítottuk el mintáinkból. A kinyert preparátum sejtszámát Bürker kamra segítségével, Türk-festéssel mértük, sejtösszetételét Giemsa-festéssel határoztuk meg. Ez utóbbi szerint az izolált sejtek átlagosan 97%-ban neutrofil granulocitának bizonyultak, szennyezésként a leggyakoribb sejtípus vörösvértest (2%,) valamint eozinofil granulocita (0,3-0,7%) volt, monocitát ugyanakkor elvétele sem találtunk a sejtek között [87, 142]. A kinyert sejtek életképességét rutinszerűen mikroszkóp segítségével, Erithrosyn B membrán integritást igazoló festéssel ellenőriztük, mely módszert meghatározott időnként Annexin V és propidium iodid festéssel, áramlási citométer használatával validáltuk. Ez utóbbi módszereket a gyártók protokolljainak megfelelően végeztük. A szeparációt szobahőmérsékleten, pirogénmentes oldatokkal végeztük. A preparált sejtek – hacsak a kísérleti körülmények nem kívánták másképp – preparálásukat követően legfeljebb 2 órán belül felhasználásra kerültek. A sejtek életképessége ekkor – az általunk használt módszerekkel vizsgálva – szignifikánsan nem csökkent.

3.2 Mikrovezikulák (MV) termeltetése és preparálása PMN-ekből

Vizsgáltuk a PMN-ek spontán, illetve különböző aktivátorok hatására tapasztalható MV termelését. Ehhez 9×10^6 /ml sejtet inkubáltunk Hank's Balanced Salt-sodium-ban (HBSS-ben) a kísérletben jelzett ágenssel (**4. táblázat**) 500 μ l végtérfogatban a jelzett ideig, enyhe rázás mellett (80 ciklus/perc), 37 °C-n. Az inkubációt követően a mintákat a sejtes elemektől 5 perces, 4 °C-os, 500 g-s centrifugálással, illetve az ezt követő 5 μ m-es szűréssel (Millipore Millex SV 5 μ m) tisztítottuk meg. A minták sejtmentességét áramlási citométerrel, méret szerinti elkülönítéssel vizsgáltuk. A MV-okat a mintából egy újabb, 15700 g-s, 10 perces centrifugálással ülepitettük. Ezt az

üledéket az eredeti térfogatban, friss médiumban felvéve vizsgáltuk tovább. A preparálási szekvencia a **7. ábrán** látható.



7. ábra. A mikrovezikulák (MV) elválasztásának általunk alkalmazott szekvenciája.

agens neve	alkalmazott végkoncentráció	behatás ideje	hőmérséklet
spontán termelés	oldószer	20 perc	37 °C
forbol észter (PMA)[167]	100 nM	20 perc	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC: 29213) <i>Eserichia coli</i> (ATCC: ML-35) <i>Proteus mirabilis</i> (ATCC: 8259)	9 x 10 ⁷ /ml	20 perc	37 °C
- opszonizálással vagy a nélkül [87]			
zimosán [55]	100 ng/ml	20 perc	37 °C
fMLF [168]	1 µM	20 perc	37 °C
TNFα [168]	20 ng/ml	120 perc	37 °C
LPS [169]	100 ng/ml	120 perc	37 °C
CXCL-12 [170]	100 ng/ml	5 perc	37 °C

4. táblázat. Kísérleteink során a MV termelés kiváltásához használt ágensek alkalmazásának körülményei.

3.3 Mikrovezikulák preparálása humán plazmából

Ex vivo vizsgálatokhoz MV-okat részint egészséges donorok, részint klinikailag igazolt és releváns *Staphylococcus aureus* infekcióban szenvedő, szeptikus betegek vérplazmájából izoláltunk. Szeptikus betegek esetében a mintavétel – a betegek tájékozott beleegyezést követően, Egyetemünk Etikai Bizottságának engedélyével összhangban – Egyetemünk Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinikáján történt. A vérminták alvadását citráttal gátoltuk, a mintákat 4 °C-on szállítottuk laborunkba. Az *ex vivo* vizsgálatokhoz használt egészséges vérmintákat hasonló körülmények között, hasonló szállítási procedúrának vetettük alá, mint a szeptikus vérmintákat. A plazma MV frakciójának izolálása a plazma 500 g-vel történő ülepitését követően megegyezett a

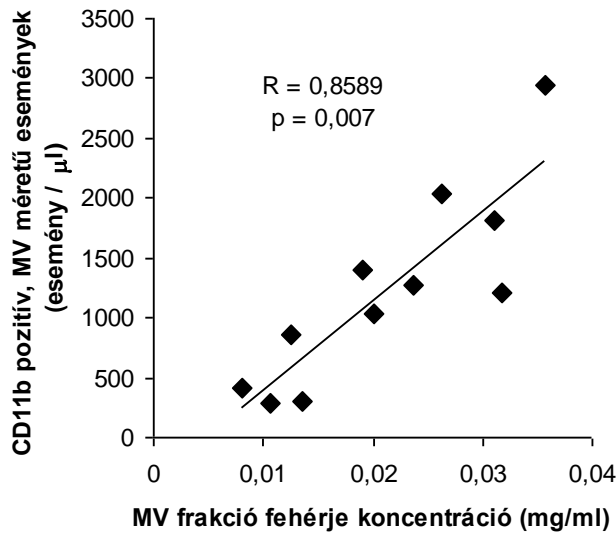
PMN-ből *in vitro* körülmények közti izolálás 500 g centrifugálási lépését követő szekvenciájával.

3.4 A mikrovezikulák mennyiségének becslése – a fehérjemennyiség analízise

A MV-ok mennyiségének meghatározására kétféle módszert alkalmaztunk. Egyik módszerünk lényege a vizsgált MV frakció fehérjetartalmának meghatározásán alapul, ehhez ismert mennyiségű albumin kalibráció alkalmazása mellett Bradford módszert alkalmaztunk. Irodalmi adatok alapján feltételezve, hogy az esetleges szolúbilis fehérjék az általunk használt szeparálási módszerrel nem ülepedhetnek, illetve áramlási citométerrel igazolva a preparátumok sejtmertességét, a mintákban mért, újonnan megjelent fehérje mennyiséget MV eredetűnek tartottuk. Bakteriális hatásra termelt MV (bacterial MV, bMV) esetén a felhasznált baktériummal megegyező mennyiségű és koncentrációjú, de csak baktériumot tartalmazó mintát hasonló szeparálási lépéseknek vetettünk alá, mint a MV-okat, majd mértük ezen (csak baktériumokat tartalmazó) minta fehérje mennyiségét is. Ez utóbbi értéket kivontuk a bakteriális hatásra termelt MV (bMV) minta mért fehérje mennyiségéből, így közelítve a valóban PMN eredetű fehérje mennyiséghez.

3.5 A mikrovezikulák mennyiségének becslése – áramlási citométer alkalmazása

A MV mérettartományába eső, vezikuláris természetű, PMN eredetű események mennyiségét áramlási citométer segítségével is vizsgáltuk. A detektált események vezikuláris természetét detergens (10% „Triton X 100” 5 perc, szobahőn, enyhe rázás) hozzáadásával igazoltuk. A mérettartományt (1 μ m alatti események) részint endogén zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-t) expresszáló *Staphylococcus aureus* segítségével, részint gyári méret-standardokkal igazoltuk. Az események (MV-ok) PMN-ből való származását a PMN komplement 3-as receptorának (CR3) egyik lánc, a CD11b elleni, monoklonális, primeren fluorofórral konjugált antitest segítségével vizsgáltuk. (Az antitestekkel kapcsolatos körülmények és kontrollok a fluoreszcens jelölési módszereket leíró alfejezetben találhatóak). A kétféle módszer eredményeit egymással szemben vizsgálva szignifikáns korrelációt tapasztaltunk (**8. ábra**).



8. ábra. Korreláció a Bradford módszerrel, illetve az áramlási citométerrel becsült MV mennyiség között. Az egyes pontok külön-külön kísérletek során, az aznap rendelkezésre álló sMV, pMV vagy bMV izolátumok közül véletlenszerűen kiválasztott minták párhuzamosan mért eredményeit tartalmazza.

3.6 Baktériumok preparálása és opszonizálása

Kísérleteinkhez használt meticillin szenzitív *S. aureus* törzs (ATCC: 29213) a Semmelweis Egyetem Mikrobiológiai Intézetének ajándéka, az endogén GFP-t expresszáló *S. aureus* törzs (USA 300) William Nauseef (Department of Internal Medicine, University of Iowa, College of Medicine, Iowa, USA) ajándéka laborunk számára. A baktérium törzseket (az USA 300 esetében chloramphenicol jelenlétében végzett szelektálást követően) 26% végkoncentrációjú glicerin, 4 % PBS, 70% Luria-Bertani (LB) élesztő kivonatban tároltuk -80°C -n, 1 ml-es adagokban. Napi méréseinkhez mindig 1 porció tartalmát használtuk, ezt 20 ml LB-ben, 3 órán át, erős keverés mellett 37°C -n inkubáltuk, majd jég hideg PBS-sel mostuk. Az utolsó mosást követően a baktériumokat HBSS (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na_2HPO_4 , 5,5 mM glükóz, 0.44 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgSO_4 , 4.2 mM NaHCO_3) pufferben vettük fel. A minta koncentrációját optikai denzitás alapján állítottuk be: az irodalom által elfogadott adatok alapján [87] 650 nm-en, 1 cm vastag baktérium tartalmú oldat $\text{OD}=1.0$ esetén 10^9 CFU/ml-es koncentrációjúnak tekinthető. Ez utóbbi összefüggést laboratóriumunk munkatársai korábban kioltás alapú csíraszámolási módszerrel is ellenőrizték.

A baktériumok opszonizációját legalább 3 egészséges donorból származó kevert vérszérummal végeztük, ehhez a baktériumokat 20 percen át inkubáltuk 10 v/v % vérszérummal 37 °C-n rázás mellett, majd PBS-sel mostuk és HBSS-ben vettük fel a mintákat.

3.7 Baktérium túlélés vizsgálata

A baktérium túlélés vizsgálatához a laboratóriumunkban korábbi témavezetőm, Dr. Rada Balázs, illetve általam kifejlesztett félautomata baktérium eliminációs tesztet használtuk [87]. Ennek lényege, hogy a baktériumokat (jellemzően 9×10^7 CFU / ml-es végkoncentrációban – az ettől való eltérést külön jelzem) 9×10^6 / ml koncentrációjú PMN-nel, avagy ugyanennyi PMN-ből szeparált MV-mal, néhány (külön jelzett) kísérletben pedig ettől eltérő mennyiségű MV-mal inkubáltuk minimum 0,6 ml ösztérfogatban, 37 °C-n, enyhe rázás mellett, 30 percen át. A támadandó baktériumok opszonizáltságát, avagy annak hiányát az adott kísérlet tárgyalásánál jelzem. A kísérlet kezdetén, majd minden 10. percben mintát vettünk, ezt – a további reakció leállítása érdekében – 10 x térfogatú jéghideg, 1 mg / ml saponin tartalmú HBSS médiumba helyeztük. A 30. perces (utolsó) mintavételt követően a PMN tartalmú mintákat (a PMN teljes baktérium ölési kapacitásának vizsgálata végett) fagyasztással (20 perc -80°C-n) feltártuk. A PMN baktérium ölésével való összehasonlíthatóság végett minden más (MV, kalibráció) mintát ugyanilyen kezelésnek vetettük alá. Ezt követően egy 10 x hígítási lépést közbeiktatva minden mintát 10 x nagyobb térfogatú LB médiumba (10g/l tryptone, 5g/l élesztő kivonat, 80 mM NaCl, 1 mM NaOH, desztillált vízzel hígítva, pH=7,4) helyeztünk. A fent alkalmazott protokoll a baktériumok életképességét méréseink szerint szignifikánsan nem befolyásolta. Mintáinkat végül 96 lyukú lemezen, ELISA fotométerben 37 °C-n rázás mellett inkubáltuk, miközben követtük a minták optikai denzitásának változását 620 nm-es hullámhosszon, jellemzően 8-10 órán át. A baktériumok mennyiségére az optikai denzitás változása alapján, a kalibráló (kizárólag baktériumot tartalmazó) minták segítségével következtettünk [87]. A könnyebb követhetőség érdekében minden kísérletben a kiindulási (0. perces) mintához képest, %-os arányban ábrázoltuk az adott mintavételi időpontban tapasztalható baktérium mennyiséget.

Belső kontroll gyanánt az adott minta hővel kezelt (100 °C, 10 perc), így antibakteriális hatással nem rendelkező változatát, illetve (újabb kontroll gyanánt) időnként az adott mintával megegyező tömegű albumint tartalmazó mintát használtunk. Ezen kontrollokban a baktériumok száma az inkubáció végén rendre meghaladta a kiindulási baktérium mennyiséget, viszont e két kontroll között szignifikáns eltérés méréseink szerint nem volt. Az antibakteriális hatás további (pozitív) kontrolljaként intakt PMN-ek baktérium elimináló képességét is vizsgáltuk ugyanazon a lemezen. A MV-ok antibakteriális hatásának méréséhez, illetve módosításához használt ágensek, valamint alkalmazásuk körülményeit az **5. táblázat** tartalmazza.

ágens neve	alkalmazott végkoncentráció	behátás ideje	hőmérséklet
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (opszonizálva vagy opszonizálás nélkül)	9 x 10 ⁷ /ml	30 perc	37 °C
Wortmannin (Sigma Aldrich)	300 nM	5 perc előinkubáció	37 °C
Cytochalasin B (CB) (Sigma Aldrich)	10 µM	5 perc előinkubáció	37 °C
Latrunculin A (Latr.A) (Sigma Aldrich)	10 µM	5 perc előinkubáció	37 °C
Jasplakinolide (jaspl.) (Sigma Aldrich)	1 µM	5 perc előinkubáció	37 °C
EDTA	1 mM	5 perc előinkubáció	37 °C
anti CD18, 6.7 klón, a CD18 funkcióját nem gátolja (Dako)	1 µg/ml	30 perc előinkubáció	37 °C
anti CD18, TS/1 klón, CD18 funkcióját gátolja (BioLegend)	5 µg/ml	30 perc előinkubáció	37 °C
Saponin	1 mg/ml	5 perc	szobahő
Triton X 100 a MV-ok feloldásához	10% (w/tv)	5 perc	szobahő

5. táblázat. A MV-ok, illetve PMN-ek antibakteriális hatásának vizsgálatához alkalmazott ágensek, valamint alkalmazásuk körülményei. Az alkalmazott ágensek a gyártó alkalmazási előíratainak megfelelően történt.

3.8 A MV-ok, valamint a PMN-ek fixálása és fluoreszcens jelölése fluoreszcens konfokális és videó mikroszkópiához

A vizsgálatokban a MV preparátumokat nem opszonizált *S. aureus* baktériumokkal (ezek jellemzően, de nem mindig endogén GFP-t expresszáló USA 300 *S. aureus* törzsbe tartoztak) inkubáltuk, majd az inkubációt követően a mintákat – az MV

preparálás utolsó centrifugálásával megegyező paraméterekkel – ülepítettük. A kísérleteinkben kontrollként alkalmazott, nyugvó PMN-eket 500 g-vel ülepítettük. A mintákat kis térfogatban felvéve előzetesen 96%-os alkohollal zsírmentesített fedőlemezekre rétegeztük szobahőn, majd ülepedést követően 3x PBS-sel mostuk őket. A MV-ok, illetve a PMN-ek fluoreszcens jelölése jellemzően a fedőlemezen zajlott. Amennyiben intravezikuláris/intracelluláris jelölést kívántunk alkalmazni, a mintát 0,5%-os „Triton X 100” 5 perces alkalmazásával permeabilizáltuk.

A MV-ok PMN eredetének igazolására jellemzően a CR3 valamely lánc (CD11b, illetve CD18) elleni monoklonális, primeren fluoroforral konjugált ellenanyagot (Dako, Németország, a jelölés körülményei: végkoncentráció: 1 µg/ml, 30 percen át, 37°C-on [142]), vagy pedig az aspecifikus membránlipid jelölő PKH-2 (Sigma, USA) festést használtunk (a gyártó előírásainak megfelelően). A myeloperoxidáz kimutatása, elhelyezkedésének vizsgálata szintén anti-humán monoklonális antitestek (Abcam, Egyesült Királyság; 4 µg/ml, 30 perc, 37°C), illetve ezen antitestek elleni, fluoroforral konjugált másodlagos antitestek segítségével (Invitrogen, USA; 4 µg/ml, 30 perc, 37°C) történt. Az aktínt fluoroforral jelölt falloidin segítségével (Invitrogen, USA; 0.1 wt/vol %, 30 perc, 37°C), a foszfátidil-szerint pedig fluoreszcensen jelzett Annexin V-tel (Beckton Dickinson, USA; alkalmazás a gyártó előírása szerint) mutattuk ki.

Kontrollként a bMV esetében a fenti kísérleteket oly módon is elvégeztük, hogy aktivációjuk előtt jelöltük a PMN-eket primeren fluoreszcens antitestekkel, majd ezt követően történt a MV-ok termeltetése és izolálása. Az izolált MV-kat pedig nem opsonizált baktériumokkal inkubáltuk, végül következett az ülepítés és fedőlemezekre való helyezés. Mivel ez utóbbi módszer sokkal nagyobb mennyiségű antitestet igényelt, illetve az antitestek sorsa (pl. antitest ligandumával együtt történő internalizációja, a fluorofor kiegészése, stb.), valamint az antitestek PMN-re gyakorolt hatása igen nehezen volt kontrollálható, így csak a legfontosabb körülmények kontrolljaként végeztük el őket. Ezen utóbbi módszerrel született eredményeik szerencsére jól korreláltak a reakció lezajlása után történt jelölések eredményeivel.

Az autofluoreszcencia kizárásához (a fluoreszcens jelölés negatív kontrolljaként) nem jelölt mintát, az antitestek negatív kontrolljaként azonos izotípusú, de nem specifikus antitestek keverékét használtunk. Pozitív kontroll gyanánt PMN-eket jelöltünk az adott jelölési metodikával (intracelluláris fehérjék esetén a fent leírt permeabilizálási módszerrel)

mellett). A vizsgált minták vezikuláris természetét – az áramlási citometriás mérésekhez hasonlóan – detergens alkalmazásával igazoltuk.

A konfokális, illetve a konfokális videómikroszkópiás méréseket Zeiss LSM 510, illetve 710 konfokális mikroszkóppal végeztük. Különböző jelölő anyagok együttes alkalmazása esetén a detektálási körülmények helyes megválasztását egyszeresen jelzett minták minden detektálási csatornában történő gerjesztésével igazoltuk. Mivel kísérleteinkben fluoreszcens technikával csak minőségi, és nem mennyiségi vizsgálatokat végeztünk, a gerjesztési és detektálási körülményeket úgy választottuk meg, hogy a fluoroforok kiégése (quenching-je) a minta vizsgálata alatt az eredeti detektált intenzitás legfeljebb 50 %-áig csökkenjen.

A videómikroszkópos felvételekhez a fedőlemezeket a MV-ok felhelyezése előtt BSA-val fedtük, magát a felvételt oldatban (HBSS) tartott MV-on, 37 °C-on, fűtött objektív és tárgyasztal mellett készítettük. A fixált minták esetében minden egyes fedőlemezen 9 különböző terület került vizsgálat alá, minden területen belül 3-3 régióról készítettünk felvételt. A felvételeket „ImageJ 1.41” program segítségével analizáltuk.

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok statisztikai analizését a következő módon végeztük: a felvételeket 3 kiértékelő egymástól függetlenül analizálta, majd a kapott eredményeket átlagoltuk. Az analizáló személyek nem rendelkeztek információval arról, hogy a vizsgált képek mely kísérlet eredményeként születtek. Aggregálódott MV-nak tekintettük azon MV-kat, ahol az aggregátum átmérője meghaladta a 1,5 µm-t, illetve aggregált baktériumnak tekintettük azon eseményeket, mely legalább egy MV-mal kapcsolatot létesített.

3.9 A szuperoxid termelés mérése

A neutrofilek extracelluláris szuperoxidtermelését a szuperoxid-diszmutázzal (12,5 µg/ml) gátolható ferricitokróm-c redukció alapján mértük többutas fotométerben, 550 nm hullámhosszon, 10⁶/ml koncentrációban, 100 µM citokróm-c jelenlétében, 37 °C-on, HBSS médiumban. A háttérértékek levonása után a kapott extinkcióértékeket a citokróm-c abszorpciós koefficiense segítségével (21 mM⁻¹cm⁻¹) számoltuk át szuperoxid anyagmennyiségre.

3.10 Western blot

Western blot analízishez 10^7 PMN aktivációját követően szeparáltunk MV-okat. A MV-okat Laemli puffer segítségével lizáltuk, 15 perces $96\text{ }^\circ\text{C}$ -os hőkezelést követően 10 (wt/vol) %-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, végül nitrocellulóz membránra blottoltuk. A nitrocellulóz membránt 1 órán át kezeltük 5 % albumint és 0,1 (wt/vol) % Tween 20-at tartalmazó PBS oldatban. Az immunreaktivitást laktoferrin esetén 1:1000-es hígítású poliklonális antitesttel, aktin esetén 1:10 000-es, mieloperoxidáz esetén 1:500-as hígítású monoklonális antitesttel, majd tormaperoxidázzal konjugált, 1:5000-es hígítású másodlagos antitesttel vizsgáltuk. Az antitestek kontrolljaként teljes PMN lizátumot, illetve izotípus elsődleges antitesteket alkalmaztunk. Az antitesteket 5% ovalbumint tartalmazó PBS-ben használtuk. Az immunreaktivitás mértékét denzitometriával vizsgáltuk, „ImageJ” program segítségével.

3.11 Statisztikai módszerek

A bemutatott kísérleteket legalább négy különböző donorból származó mintán végeztük el. A több mérés átlagát bemutató ábrákon a átlag szórását (SEM) tüntettük fel (az elemszám az ábraalírásban szerepel). Reprezentatív eredmény bemutatás esetén az általunk legjellemzőbbnek vélt eredményt szerepeltettük. A kapott eredményeket „Statistica 11” programmal értékeltük. Mivel azt az F próba minden bemutatott értéknél engedte, az eredményeket páros vagy kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. Amennyiben többféle körülményt hasonlítottunk össze egy kísérletsorozaton belül, egyszempontos variancianalízist végeztünk. A különbségeket akkor fogadtuk el szignifikánsnak, ha a „p” értéke kisebb volt, mint 0,05.

3.12 Dinamikus fényszórási teszt

A dinamikus fényszórási tesztek szobahőmérsékleten, ALV goniométer és MellesGriot diódalézer (hullámhossz: 457,5 nm) segítségével készültek. Az események átmérőjét szférikus közelítéssel számoltuk [118].

3.13 Elektronmikroszkópia

A MV-kat az elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz 15700 g-s ülepitést követően 4% paraformaldehid 60 perces alkalmazásával fixáltuk. A minták utófixálása

1%-os OsO₄ oldattal történt, szobahőn, 30 perces inkubációs idővel. A minták dehidrációja etanollal történt, a beágyazás 1% uranyl-acetát és 50% etanol 30 perces kezelését követően Taab 812 segítségével történt. 12 óras, 60 °C-on végzett polimerizációt követően történt a blokkok metszése, a minták vizsgálata Hitachi 7100-as elektronmikroszkóp, illetve Veleta, a 2k _ 2k MegaPixel side-mounted TEM CCD kamera (Olympus) segítségével történt. A kapott felvételeket „Adobe Photoshop CS3”, valamint „Image J” szoftverek segítségével analizáltuk.

3.14 A társszerzők közötti munkamegosztás

Az értekezésben az „Eredmények” fejezetben bemutatott kísérletek a szerző saját munkája során születtek. Az elektronmikroszkópos, valamint dinamikus fényszórási kísérletek természetesen az adott módszert igen jól ismerő társszerzők hathatós irányítása és felügyelete mellett készültek. A társszerzők kizárólagos munkája révén született (pl. proteomikai) eredményeket külön jelzem dolgozatomban.

4. Eredmények

Az irodalmi háttér ismertetése, illetve a célkitűzésben ismertetett gondolatmenetnek megfelelően először a keletkezett MV-ok mennyiségi és minőségi analizisét mutatom be, majd ezt követően lépek tovább a MV-ok lehetséges funkcióinak vizsgálatát szolgáló kísérletekre.

4.1 A keletkezett MV-ok alapvető jellemzése

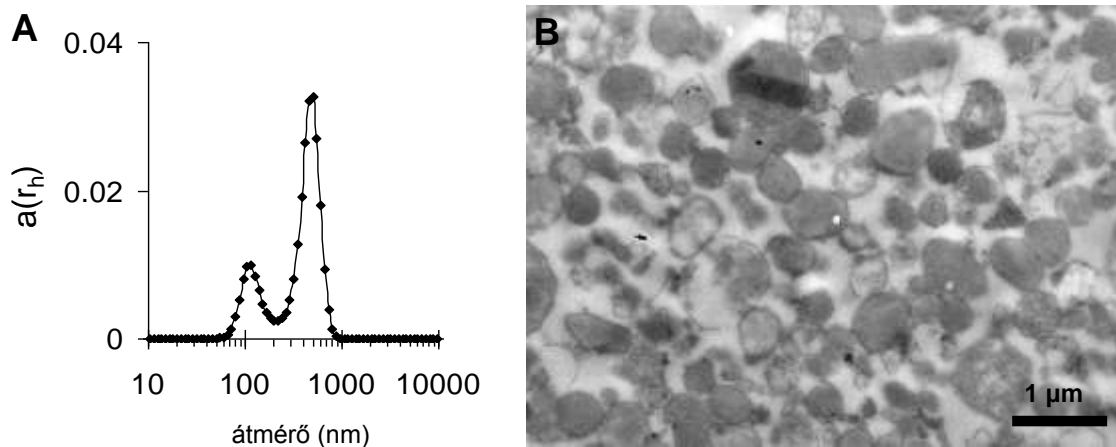
Első feladatként tehát vizsgálni kívántuk, hogy mely körülmények között, milyen hatásokra, milyen kinetikával termelnek a PMN-ek MV-okat. Ennek vizsgálatához viszont elengedhetetlen az is, hogy igazoljuk a kísérleteinkben detektált események valóban MV-ok, azaz vezikuláris természetű, foszfolipid kettős membránnal határolt struktúrák. A két gondolati kör (a vezikuláris természet, illetve a termelődés körülményeinek vizsgálata) szorosan összefügg, hiszen vizsgálni is csak olyat lehet, ami már megtermelődött. Ezért kísérleteim bemutatását a vezikuláris természet igazolását körüljáró kísérletek megbeszélésével kezdem, és kérem az olvasó szíves türelmét, mikor mintegy megelőlegezem, hogy a PMN – különböző aktiváló ágensek hatására – valóban nagy mennyiségben képes MV-k termelésére. A fejezet további részében – reményeim szerint – kielégítő válasszal tudok majd szolgálni a MV-k keletkezéséről is.

4.1.1 A MV-ok mérete

Kísérleteink tervezésének egyik legmeghatározóbb körülménye nyilvánvalóan a detektálható események mérete, hiszen – méretüknél fogva – egész más technikákkal vizsgálhatóak a MV-k, mint pl. az exoszómák. Így hát először az általunk elválasztott frakcióban található események méretének meghatározását biztosító kísérleteket mutatom be.

Az MV frakciókban található vezikuláris események méretének meghatározására többféle technikát is igénybe vettünk. Nagyobb mennyiségű, vezikuláris természetű minta méret szerinti vizsgálatának egyik legprecízebb módja a dinamikus fényszóródási tesztek (DLS, Dynamic Light Scattering,) alkalmazása. A DLS kísérletek Veres Dániel (Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet) segítségével készültek. Ezen

kísérletek eredménye – nagy meglepetésünkre függetlenül a termelést kiváltó tényezőtől – alapvetően két méretbeli populációt írt le MV frakcióinkban: a kisebb körülbelül 100 nm-es átmérővel, a nagyobb átlagosan 500 nm-es átmérővel rendelkezett (**9.A ábra**). A párhuzamosan, Kittel Ágnes (MTA, KOKI) segítségével elvégzett elektronmikroszkópos mérések szintén hasonló eredményre jutottak (**9.B ábra**), így igazoltuk, hogy detektált eseményeink zöme a 0,2 – 1 μm közötti tartományba esik, zömük pedig eléri, illetve meg is haladja a 0,5 μm -es átmérőt.

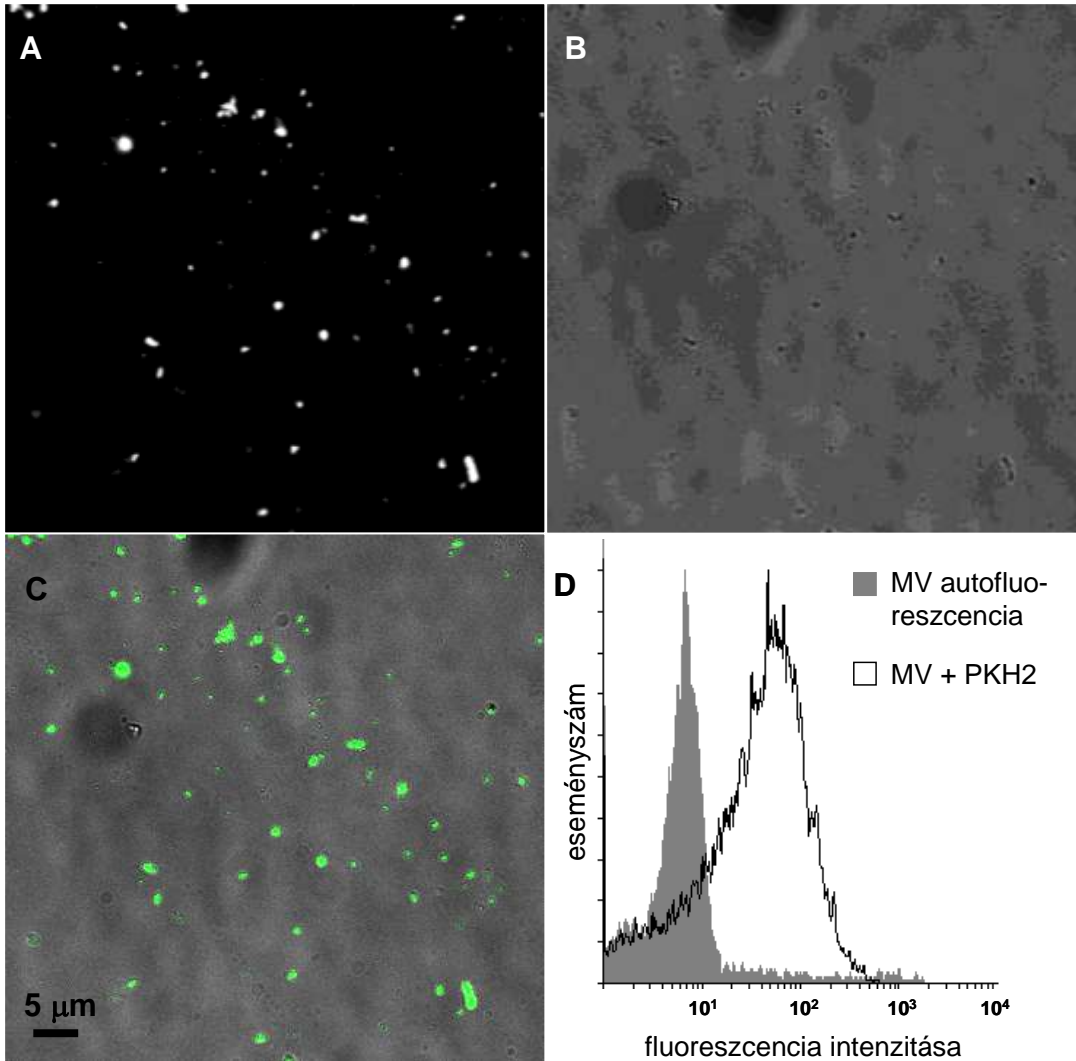


9. ábra. A MV-ok mérete. Az „A” ábra reprezentatív felvételt mutat MV-k dinamikus fényszórás alapján mért méret szerinti megoszlásáról. Az „x” tengelyen a méret, az „y” tengelyen az adott méretű MV-ok relatív mennyisége található. A „B” ábra MV-k reprezentatív elektron-mikroszkópos felvétele látható. Kittel Ágnes segítségével készült felvétel.

Mindemellett érdemes megfigyelni a reprezentatív elektronmikroszkópos felvételen a jól kivehető vezikuláris struktúrákat, illetve a vezikulák belsejében fellelhető elektrodenz bennéket. Ez utóbbi – irodalmi adatok alapján – alapvetően fehérjék vagy szénhidrátok jelenlétére utal. Fontosnak tartom annak megjegyzését is, hogy az általunk detektált vezikulák fél nagyságrenddel nagyobbak, mint a PMN-ek granuluma (**1.B ábra**).

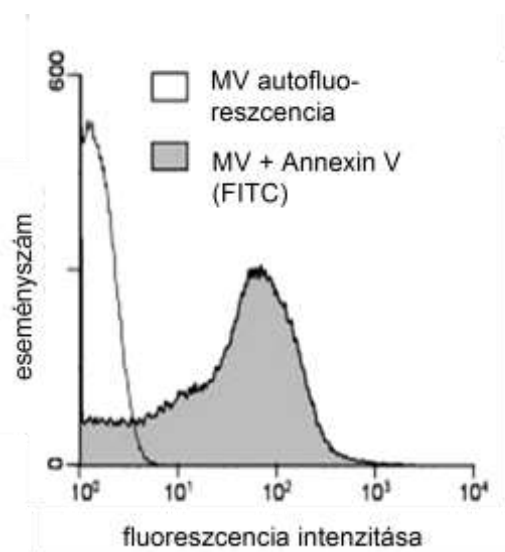
4.1.2 A MV-ok vezikuláris természetének igazolása

Mint látható tehát, a *nagyobb* méretű MV-aink mérete már belül esik a látható fényen alapuló kísérletes technikák elméleti feloldóképességén. Így a MV-ok további vizsgálatához – a jóval szélesebb körű vizsgálati-kísérletes lehetőségek miatt – fluoreszcens mikroszkópos és áramlási citometriás technikákat is igénybe vettünk (a Módszerek fejezetben leírt kontrollok mellett).



10. ábra. MV-k jelölése PKH festékekkel. Az „A” panel mutatja a PKH fluoreszcenciáját, a „B” panel pedig a fáziskontraszt felvételt. A „C” panel mutatja a két felvétel egyesített képét. Az ábra „D” részén egy reprezentatív, áramlási citométerrel végzett mérés eredménye látható. A MV-ok autofluorenciájával szemben a PKH-val jelölt minta egyértelmű pozitívást mutat.

Detektált eseményeink foszfolipid bilayer határoló membránjának igazolására többféle módszert is alkalmaztunk. Első megközelítés gyanánt fluoreszcensen jelzett, lipid kettősrétegbe interkalálódó jelölést, a PKH-2-t [171] használtuk. Mint a **10.A** és **10.C ábrán** látható, a festék egyértelműen jelölte mintáinkat konfokális mikroszkópos méréseinkben. Ehhez hasonló eredményt tapasztaltam áramlási citométer segítségével végzett méréseimben is (**10.D ábra**). Érdeemes megfigyelni a mikroszkópos felvételek esetén a fluoreszcens jelek, illetve a fáziskontraszt technikával kimutatott események együttállását, kolokalizációját is (**10.C ábra**).

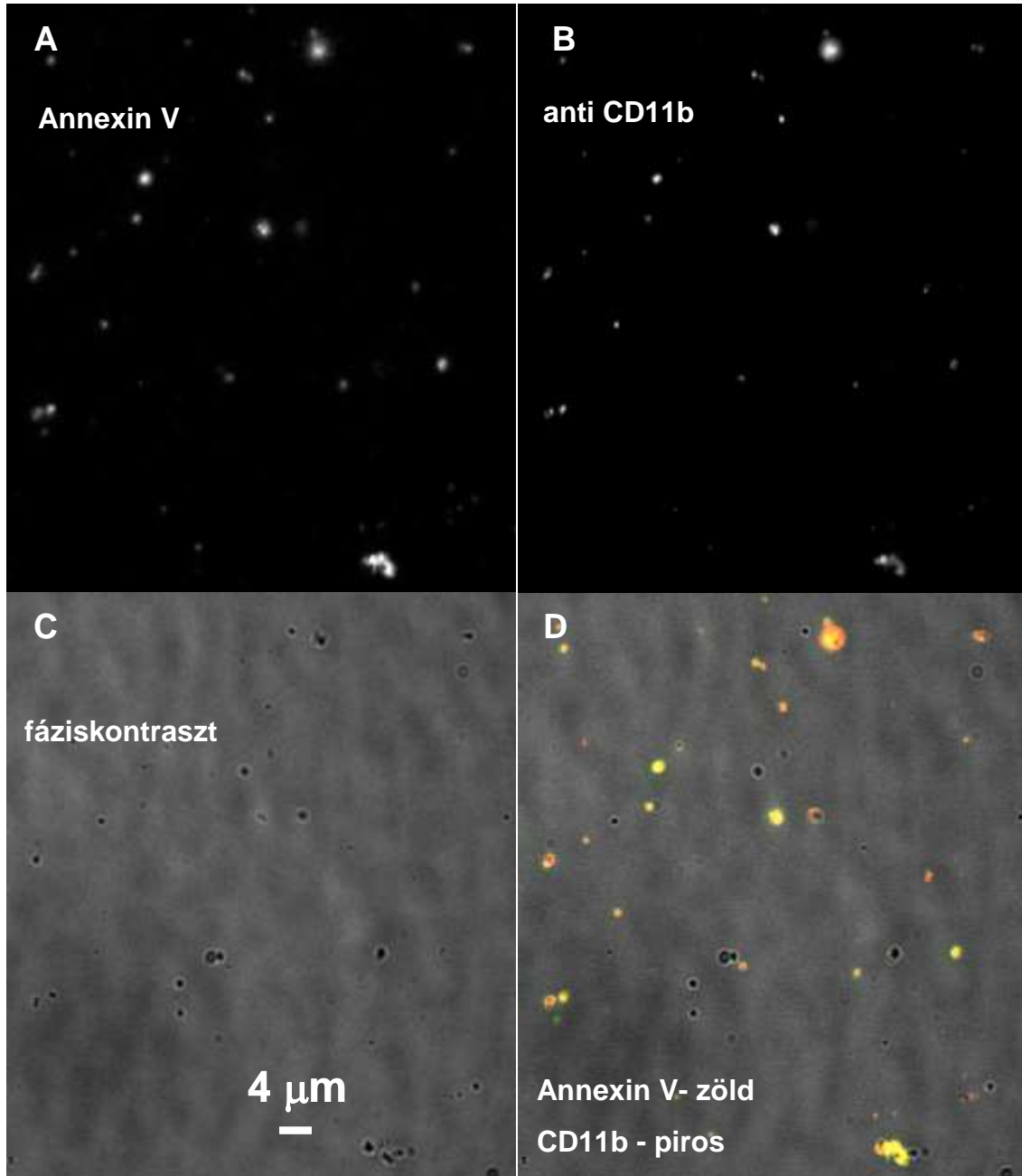


11. ábra. A MV-ok jelölése Annexin V-tel. Reprezentatív áramlási citometriás kísérlet.

A fenti lipid kettősréteg kimutatás mellett specifikus, membránra jellemző lipid kimutatási próbát is végeztünk. Mivel az irodalmi adatok alapján az EV-k lipid kettős membránjában erőteljes foszfatidil-szerin dúsulás jellemző, megpróbálkoztunk ennek specifikus kimutatásával. Ehhez fluoreszcensen jelzett Annexin V-t használtunk [172]. Mint a **11.** és a **12.A ábrán** látható, az irodalmi adatokkal összecsengően a MV-ok egyértelműen jelölődtek Annexin V-tel mind konfokális mikroszkóppal, mind áramlási citométerrel végzett vizsgálatainkban.

A lipid kettősréteg kimutatása mellett felmerült az a kérdés is, hogy a MV-k membránja vajon hasonló irányultsággal rendelkezik-e, mint a PMN-ek plazmamembránja, azaz hogy ami a PMN membránjának extracelluláris oldalán helyezkedik el, hasonlóan helyezkedik-e el a MV-okban. Ennek eldöntésére olyan transzmembrán fehérjéket specifikusan jelölő antitesteket használtunk, melyek az adott fehérjék extracelluláris epitópjait ismerik fel. Ehhez ígéretes célpontok voltak a PMN-ben nagy mennyiségben jelenlévő CR3 (Mac-1, β 2 integrin) láncai (CD11b és CD18), valamint a CD177. További előnye volt eme fehérjék kimutatásának, hogy együttes jelenlétük nagy specificitással igazolta, hogy az adott MV-ok valóban PMN eredetűek [173]. Mint a **12.B ábrán** látható, a MV-ok valóban jól jelölődnek CD11b elleni antitesttel. A fenti eredményekkel teljesen identikus eredményeket kaptunk amennyiben a CD11b helyett CD18, illetve CD177 elleni specifikus jelölést alkalmaztunk (**29.A ábra**). Azaz az általunk elvégzett vizsgálatok alapján a MV termelődése során megőrzi a sejt

membránjának irányultságát, illetve a vizsgált MV-ok valóban jó eséllyel a PMN-ekből származnak.

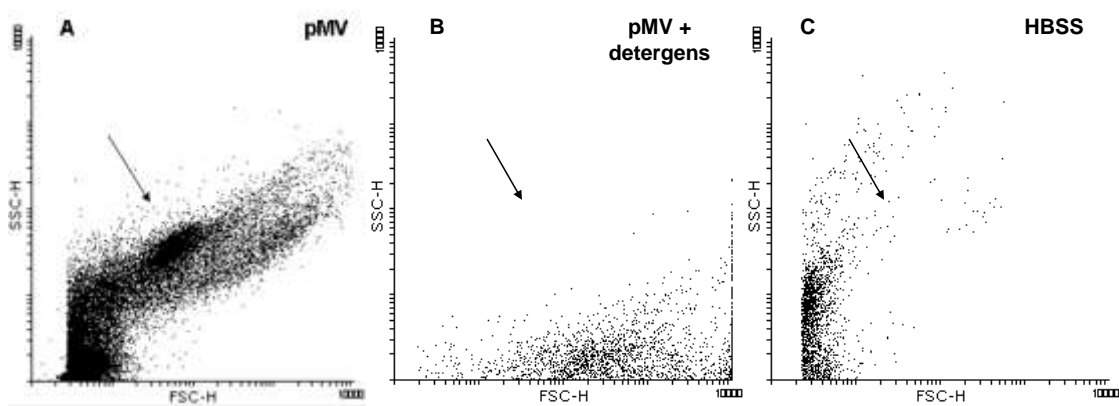


12. ábra. MV-ok lipid- és fehérje specifikus jelölése. Reprezentatív fluoreszcens konfokális mikroszkópos felvétel. A mintát egyszerre jelöltük Annexin V-tel (A), illetve humán CD11b elleni antitesttel (B). A „C” panel fáziskontraszt eljárással készült. A „D” panel a három felvétel egyesítésével készült.

Érdeemes megfigyelni azt is, hogy a CD11b jelölése jól kolokalizál az Annexin V pozitivitással (12.D ábra), igazolva, hogy *ugyanazon entitások* jelölődnek mind lipid-,

mind fehérjespecifikus markereinkkel. Hasonló eredményekre jutottunk CD18 és Annexin V, CD11b és PKH-2, valamint CD18 és PKH-2 kettős jelölése esetén is.

Mintáink vezikuláris természetének további, rutinszerűen is alkalmazható igazolásához, a fentiek mellett még egy módszert vezettünk be. Ennek alapja, hogy a lipid membránnal határolt MV-k detergens alkalmazásával jellemzően jól feloldhatóak. Ehhez szintén párhuzamosan alkalmaztunk mikroszkópos és áramlási citométeres technikákat. Mint látható a **13. ábrán**, detergens hatású szaponin vagy Triton hatására a fenti technikák által MV-ként azonosított események eltűntek.



13. ábra. Reprezentatív áramlási citometriás eredmények MV méret (FSC)- és granuláltság (SSC) szerinti eloszlásáról. „A”: MV-k detergens alkalmazása előtt, illetve „B”: MV-ok detergens (10% Triton X 100, 5 perc) alkalmazása után. A „C” panel csak az oldószert (HBSS) tartalmazó mintát mutatja. A nyíl jelöli a fluoreszcens lipid jelölés (PKH-2) alapján azonosított MV frakciót.

Összefoglalva tehát eddigi eredményeinket, különböző membránlipid jelölések mellett detergens segítségével is igazoltuk MV-ainkban a lipid bilayer jelenlétét, a kiválasztott membránfehérjék extracelluláris epitópjainak vizsgálatával igazoltuk, hogy a MV membránja megőrizte a donor sejt membránjának irányultságát. Ezen felül bemutattuk, hogy a lipid-, illetve fehérje specifikus jelöléseink együttesen jelennek meg az általunk vizsgált MV-okon. Fenti eredményeinket a továbbiakban is felhasználtuk az általunk vizsgált események vezikuláris természetének rutinszerű igazolására.

4.2 A MV-ok keletkezésének vizsgálata

A következő témakör, amivel részletesebben foglalkoztunk, az a MV termelődését meghatározó aktivátorok kérdésköre. Ehhez természetesen elengedhetetlen a keletkezett MV-ok mennyiségének meghatározása. A MV-ok mennyiségének követésére (a

Módszerekben leírt kontrollok figyelembevételével) kétféle módszert használtunk párhuzamosan:

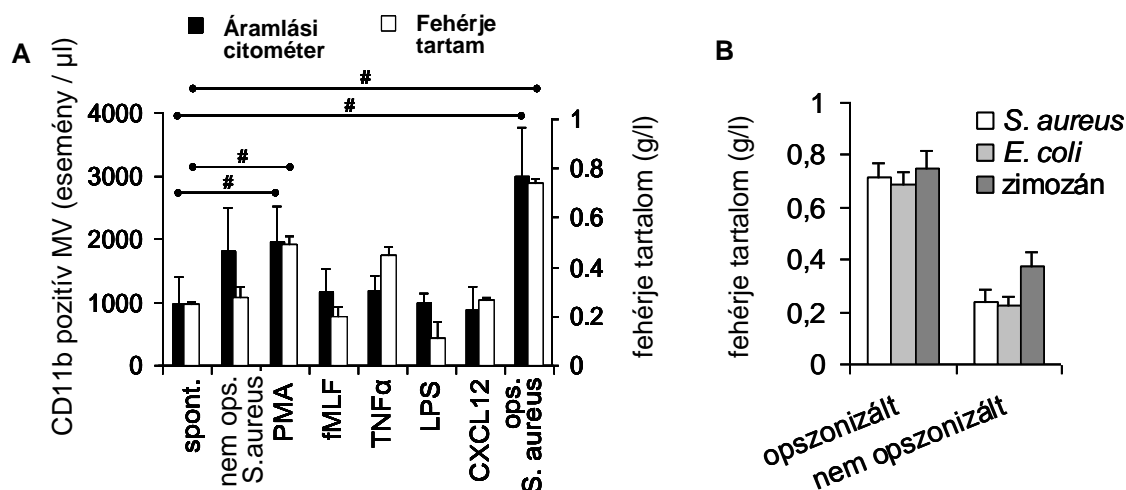
1. a MV preparátum vezikuláris eredetű fehérjetartalmának vizsgálatát, illetve
 2. áramlási citométerrel mérhető, MV méretű, PMN eredetű eseményszámának mérését.
- Az áramlási citométerrel végzett kísérletek zömét munkatársammal, Lőrincz M. Ákossal közösen végeztük.

4.2.1 Az MV termelést kiváltó ágensek

Először tehát a különböző ágensek hatására fellépő MV termelést vizsgáltuk (**14.A ábra**). Az adott ágens esetén a szükséges koncentrációt és inkubációs időt a PMN megfelelő szintű aktivációjához a szakirodalom szerint szükséges idő alapján állapítottuk meg (Módszerek fejezet).

Első kiemelő megfigyelésünk, hogy a PMN-ekből izolált MV frakcióban (a módszerek ismertetésekor leírt kontrollokat figyelembe véve) mindenféle aktiváció nélkül is találtunk MV-nak megfelelő entitásokat. A továbbiakban ezen MV frakciót „spontán termelődött” azaz sMV frakciónak neveztük el. Az sMV-k jelenlétét fluoreszcens- és elektronmikroszkópos vizsgálataink is megerősítették – ezen kísérleteket a következő fejezetben tárgyalom majd.

Mint látható, a különböző PMN-t aktiváló ágensek hatására a spontán MV termeléshez képest a legnagyobb mértékű növekedést opsonizált *S. aureus* hozzáadásával értük el (**14.A ábra**). Az így nyert vezikulum populációt hívtuk a továbbiakban „bakteriális hatásra termelt MV”-nak, azaz „bMV”-nek. Látható továbbá, hogy a PKC aktivátor forbol észter (phorbol myristate acetate, PMA) alkalmazásával szintén szignifikáns eltérést tapasztaltunk az sMV-hez képest mindkét detektálási módszer esetén. A PMA hatására keletkezett MV populációt – a bMV és sMV analógiájára – „pMV”-re kereszteltük el.



14. ábra. A MV-ok termelődésének vizsgálata. „A”: Az MV frakcióban – különböző ágensek hatására – tapasztalható fehérje tartalom, valamint MV méretű, PMN eredetű vezikuláris események mennyiségének változását mutatja. Az MV termelés indukciójához használt anyagok koncentrációját a Módszerek fejezetben tüntettem fel. „B”: opszonizált, illetve nem opszonizált *S. aureus*, *E. coli*, illetve zimosán hatására tapasztalható fehérje mennyiség változása az MV frakcióban. n=4, SEM. #: p<0,05, a jelzett értékek között.

Megfigyelhető továbbá az is, hogy az egyéb termelést indító stimulusk, mint a nem opszonizált *S. aureus*, a kemotaktikus hatású bakteriális tripeptid fMLF, a bakteriális sejtfal alkotó LPS, a citokin TNF α , illetve az IL-8 receptor agonista CXCL-12 alkalmazása esetén vagy nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést a becsült MV számban az sMV frakció vezikulumtartalmához képest, vagy a kétféle módszer jóval kevésbé koherens eredményt mutatott (pl. nem opszonizált *S. aureus* esetén). Tekintve, hogy a két detektálási mód között statisztikailag erős korrelációt tapasztaltunk (Módszerek fejezet), felmerül, hogy a két módszer eredményei között mutatkozó eltérés talán a szeparált MV-ok mérete és fehérje tartalma közti arány megváltozása miatt léphetett fel. De mivel a legnagyobb mennyiségi változást nem ezen mintáknál tapasztaltuk, továbbá a MV mennyiségének változása pMV és bMV esetén sokkal koherensebb volt, így további kísérleteinkhez alapvetően ezen aktivátorokat használtuk, így eme különbség magyarázata a tovább nem vizsgált aktivátorok esetén továbbra is nyitott.

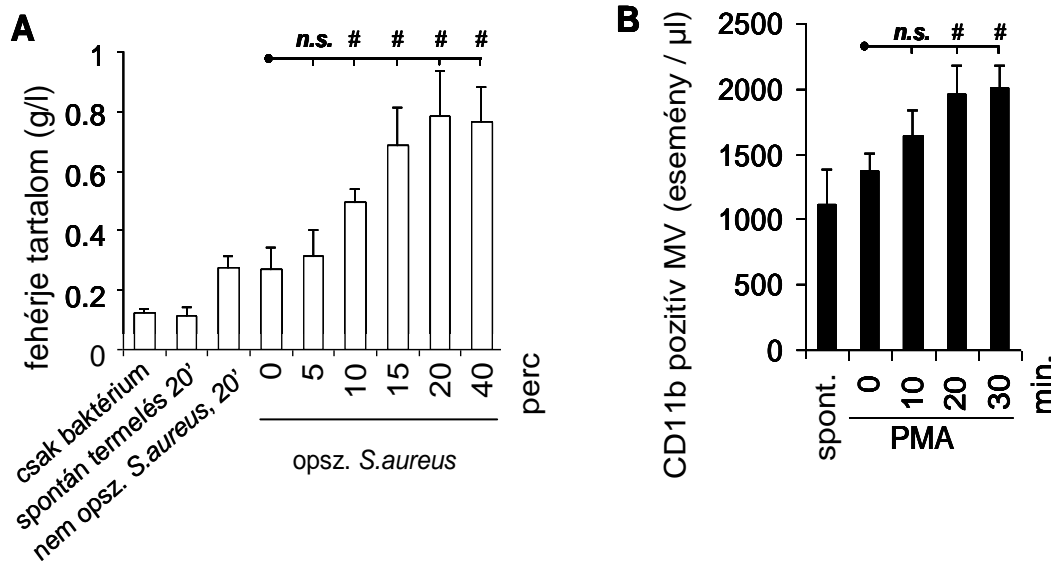
Kiemelném, hogy a PMN *S. aureus* hatására fellépő MV termelése alapvetően függött az opszonizáció meglététől. Ezért tehát vizsgálni kívántuk magának az opszonizációnak, illetve ezáltal az opszonin receptoroknak a szerepét a MV-termelésben. Ennek modellezéséhez az *in vitro* körülmények között az NF κ B útvonalon keresztül [174]

steril gyulladást indukáló, és mindemellett jól fagocitálható zimoszánt (azaz élesztő sejtfa kivonatot, β glukánt) [175] használtunk opszonizálással, illetve anélkül. Mint látható a **14.B** ábrán, opszonizáció nélkül zimoszán hatására a PMN erőteljesebb MV termelést mutatott, mint nem opszonizált baktérium hatására, viszont az opszonizáció alkalmazása a zimoszánon, illetve a különböző baktériumokon eltüntette a különbséget az indukáló ágensek hatása között. Hasonló eredményeket tapasztaltunk áramlási citometriás méréseinkben is. Azaz felmerül, hogy az MV-termelés fokozásában – a fagocitózishoz hasonlóan – az opszonin receptorok meghatározóbbak, mint a mintázatfelismerő receptorok.

4.2.2 Az MV termelés kinetikája

Vizsgálni kívántuk az optimális behatási időt is a pMV, illetve a bMV esetében. Mint a **15. ábrán** látható, mind az opszonizált *S.aureus* (**15.A ábra**), mind a PMA (**15.B ábra**) hatására keletkezett MV-ok becsült mennyisége – detektálási módszertől függetlenül – telítési kinetikát követett, mely a telítést az indukciót követő 20. percben biztosan elérte. Így további kísérleteinkben jellemzően 20 perces aktiváció alatt termelődött MV-okat használtunk. Fontos kiemelni, hogy e telítési kinetika *mindkét* stimulus esetében jelentkezett, illetve hogy ezt *mindkét* módszerrel igazolni tudtuk. Érdeemes megfigyelni azt is, hogy a 0. perces mintához képest legkorábban a 10. percben tapasztalunk szignifikáns eltérést a MV-ok mennyiségében.

A fenti kísérletsorozat egyrészt azt mutatja, hogy a bMV és a pMV frakció esetén egyaránt jelen van egy „alap”, eleve meglévő MV populáció, és ehhez adódik hozzá az indukció hatására keletkező MV-k csoportja. Másrészt pedig a kimutathatóan telítődő kinetika indirekten utal az MV-termelést irányító intracelluláris jelátviteli utak és az új MV-ok definitív keletkezéséhez szükséges folyamatok meglehetősen rövid, eredményeink szerint percekben mérhető időtényezőjét is. Ezen pontok a MV keletkezését vizsgáló, immáron intracelluláris jelátviteli folyamatokat követő jövőbeni kísérletek alapját (és egyben kontrollját) jelenthetik.

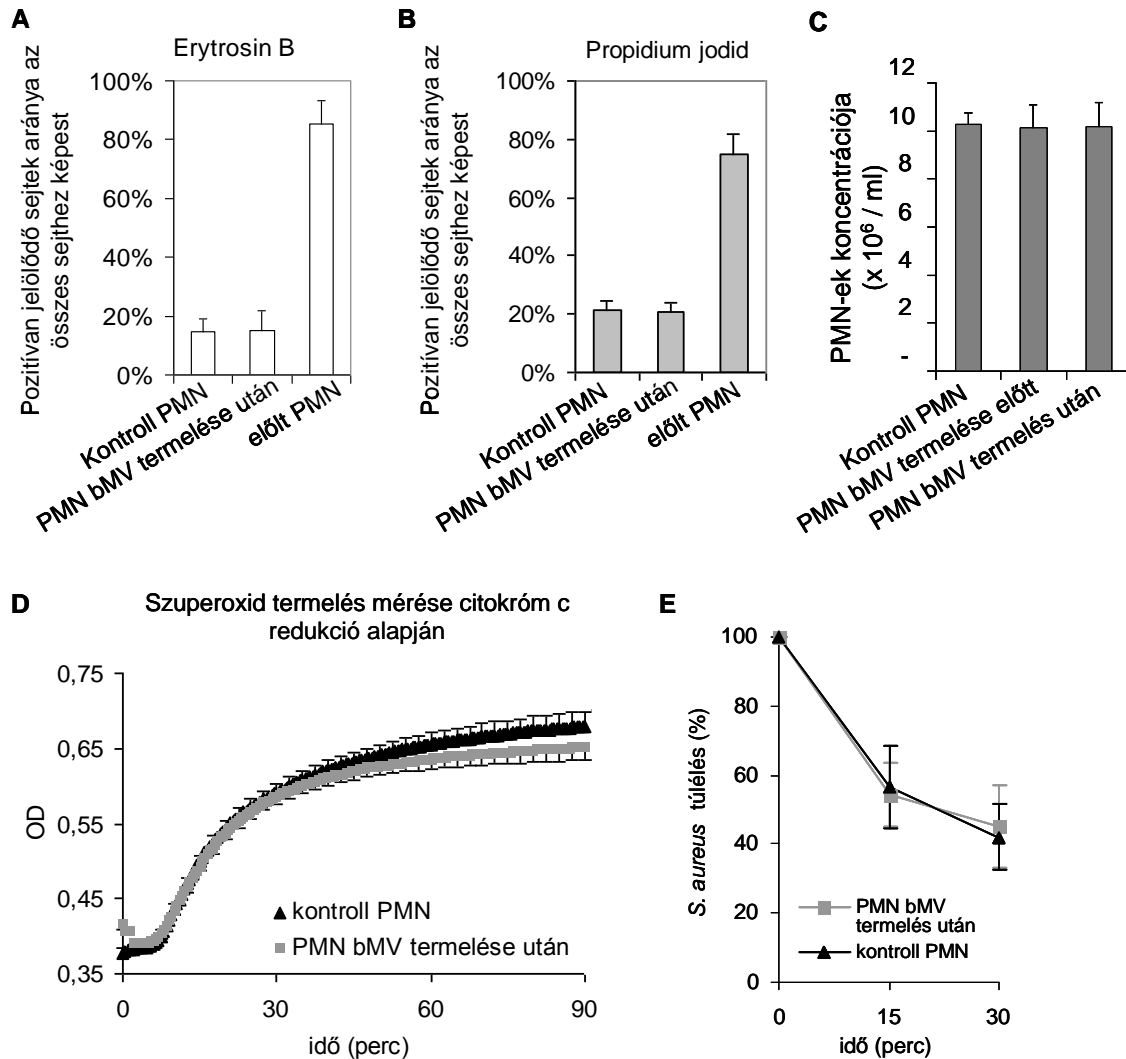


15. ábra: A bMV és a pMV termelődésének kinetikája. Az „A”panel a kizárólag baktériumot tartalmazó mintából preparált MV frakció, az aktivátor nélkül kezelt (azaz sMV) minta, valamint a jelezett módon kezelt baktériummal a jelzett ideig tartó együttes inkubációt követően szeparált MV frakciók fehérje tartalmát mutatja, azaz az itt bemutatott fehérje mennyiségek a PMN-ből, valamint a baktériumokból származó fehérjék mennyiségének összegét mutatják. Ahhoz, hogy kizárólag a PMN eredetű fehérjék mennyiségét becsülhessük, a bakteriális hatással létrehozott minták fehérje tartalmából kivontuk a csak baktériumot tartalmazó kontroll minta fehérje tartalmát (mely módszerrel valószínűleg valamelyest alulbecsüljük a PMN eredetű fehérjék mennyiségét). A további ábrákon a bakteriális hatásra termelt MV frakciók nettó (azaz baktériumtól mentes) fehérje koncentrációját mutatom. A „B”panel PMA hatására a jelzett idő alatt keletkezett, áramlási citométerrel detektálható, PMN eredetű, mikrovezikula méretű eseményeket mutatja. n=4, SEM. #: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$

4.2.3 A PMN az MV termelést követően

Vizsgálni kívántuk továbbá azt a kérdést is, hogy az általunk vizsgált MV-ok élő, avagy haldokló és/vagy szétesett PMN-ekből keletkeztek-e. Ehhez vizsgálat alá vettük magukat a MV termelésen átesett PMN-eket. Mint a **16. ábrán** látható, a bMV termelés 20 perce nem változtatott sem a PMN-ek rutinszerű vitális festődésekkel szembeni jelölődésén (**16.A ábra**: Erytrosin B festés a membrán integritás vizsgálatára, **16.B ábra**: Propidium jodid jelölés az extracellulár térből hozzáférhető DNS jelölésére), sem a PMN-ek számán (**16.C ábra**). Mi több, a bMV termelésen átesett PMN-ek szubmaximális, PMA hatására adott szuperoxid termelése (**16.D ábra**), illetve opszonizált *S. aureus* eliminációs képessége (**16.E ábra**) szintén nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll PMN-ekhez képest.

Azaz kijelenthető, hogy a PMN-ek MV termelésüket követően az általunk használt tesztek alapján sem mennyiségükben, sem funkcionalitásukban, sem vitalitásukban nem mutatnak lényeges eltérést a kiindulási állapotukhoz képest.



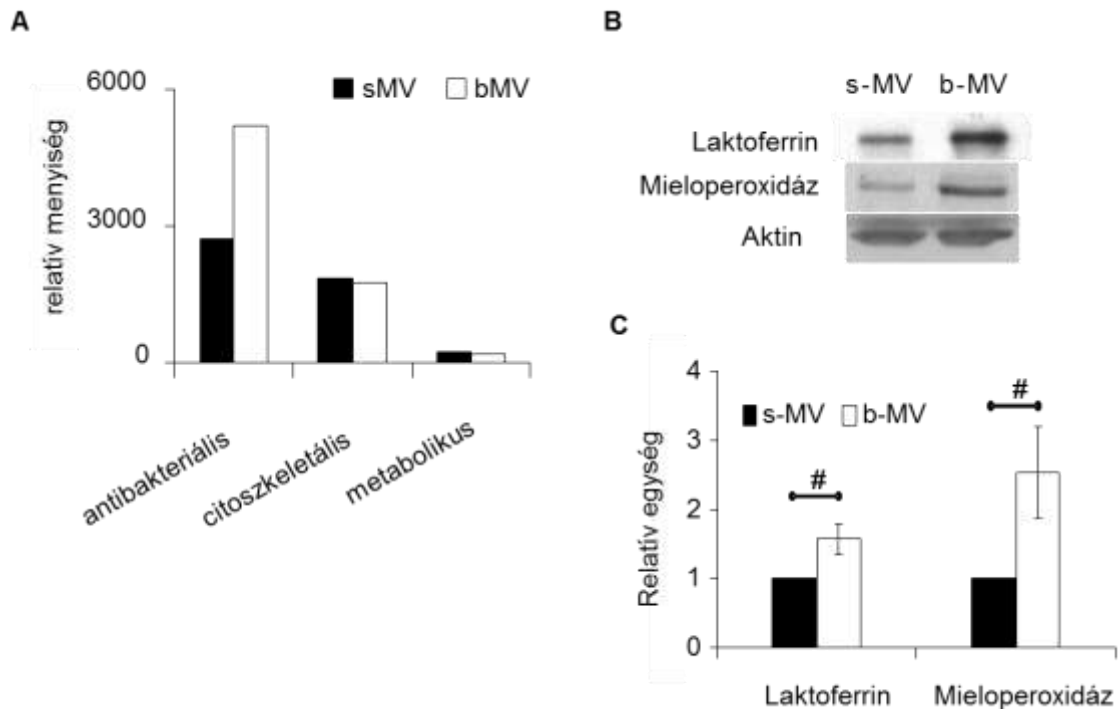
16. ábra. PMN-ek bMV termelés után. „A”: Erytrosin B festés, „B”: propidium jodid festés, „C”: abszolút sejtszám változása. Az A, B, C mérések áramlási citométer segítségével készültek. „D”: PMN szuperoxid termelése citokróm c redukció alapján, 100 nM végkoncentrációjú PMA stimulus hatására. „E”: PMN-ek opsonizált *S. aureus*-szal szemben mutatott baktérium eliminációs kapacitása 30 perc alatt. n=4, SEM.

4.3 A keletkezett MV-ok minőségi összetétele

Irodalmi adatok alapján az általunk vizsgált MV-okban az általunk eddig kimutatott fehérjéken túl igen sok egyéb fehérje jelenléte volt valószínűsíthető. A kérdés megválaszolására a nemzetközi irodalomban mára már alapvetőnek számít proteomikai vizsgálatok elvégzése. A proteomikai vizsgálatok elvégzéséhez laborunk együttműködést kezdett Ken McLeish professzor laboratóriumával (University of Louisville, USA). Mivel a proteomikai méréseket nem magam végeztem, ezek menetéről, illetve kísérletes

kontrolljairól nem kívánok részletekbe bocsátkozni, megelégszem az együttműködő laboratórium által szolgáltatott eredmények rövid bemutatásával. Az eredmények ismertetése részleteiben megtalálható közleményünk [142] szuppletumában.

Mint a **17.A ábrán** látható, egységnyi MV tömegre vetítve a bMV-ben az sMV-hez képest egyértelműen nagyobb mennyiségben detektálhatóak antibakteriális hatású fehérjék, ezzel szemben sem a citoskeletális elemek, sem a metabolizmusban részt vevő fehérjék mennyiségében nem mutatkozott eltérés. Az antibakteriális fehérjék mennyiségében megmutatkozó különbség alapvetően a bMV-ben eleve legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjék, jelesül a laktoferrin, a mieloperoxidáz (MPO), illetve a defensin 3 kifejezett dúsulásának volt köszönhető.



17. ábra. A bMV és az sMV fehérje összetételének összehasonlítása. Az „A” panelen a bMV és az sMV proteomikai analízise alapján igazolt fehérjék funkciójuk alapján történt csoportosítása látható. Az y tengelyen egységnyi MV tömegben található, a jelzett funkcióval rendelkező fehérjék össz mennyisége látható. A „B” panelen azonos tömegű MV minták laktoferrin, mieloperoxidáz, illetve aktin Western Blot-os analízise látható. A „C” panel a „B” panelen látható Western blot kísérletek denzitometriás kiértékelését mutatja. n=4, SEM, #: p < 0,05

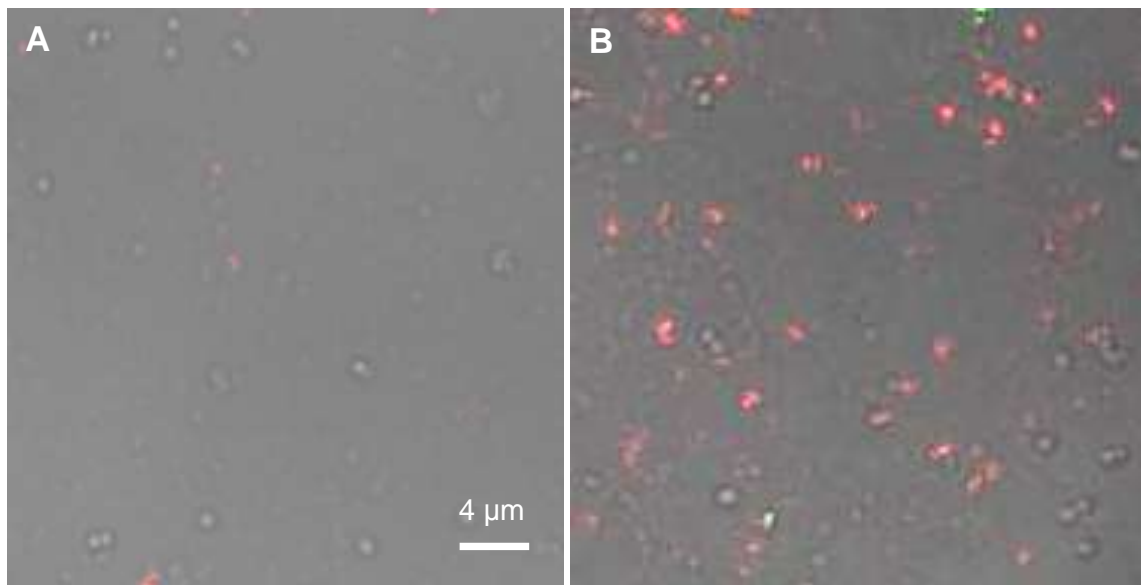
A legnagyobb mennyiségben jelenlévő antibakteriális fehérjék közti mennyiségi különbséget, illetve a citoskeletális elemek közel azonos mennyiségben való jelenlétét az sMV és a bMV kapcsán, mint a **17.B** és **17.C ábrán** látható, Western blot analízis

segítségével is sikerült igazolni. Ezen felül erőteljes dúsulást mutatott a bMV-ben az sMV-hez képest a CD11b és a CD18 (azaz a CR3 két lánc) is.

Összességében tehát kijelenthető, hogy a PMN termelte MV-ok összetétele kísérleteinkben függött től, hogy spontán, avagy opsonizált baktériumok hatására keletkeztek-e.

További fontos kérdés volt számunkra, hogy hol is helyezkednek el a fent jelzett antibakteriális fehérjék a MV-okon belül. A kérdés jelentőségét az adta, hogy amennyiben ezen fehérjéket a MV-ok külső oldalán, mintegy a membránra tapadva találjuk, úgy jogosan merült volna fel annak lehetősége, hogy ezen fehérjék a MV termelés során esetleg felszabaduló granulumból származnak. Ezzel szemben a amennyiben a vezikulákon belül találjuk a keresett fehérjéket, az véleményünk szerint inkább amellet szól, hogy az adott fehérjék a MV-k képződése során kerülnek valamely mechanizmussal a MV-okba.

A fenti kérdés eldöntéséhez (mint az antibakteriális fehérjéket legnagyobb mennyiségben tartalmazó MV-eket) a bMV mintákat választottuk, ezekben jelöltük a MPO-t specifikusan felismerő antitestekkel a MV-ok permeabilizálása mellett, illetve permeabilizálás nélkül.



18. ábra. MPO kimutatása bMV-ben. Reprezentatív felvételek. Az „A” felvétel a MV-ok permeabilizálása nélkül, a „B” felvétel a MV-ok permeabilizálását követően készült. A MPO ellenes antitestet vörös fluoreszkáló másodlagos antitest jelöli.

Mint a **18. ábrán** látható, a MPO-t specifikusan felismerő antitestek a permeabilizált MV-kat erősebben jelölték, ami a mellett szól, hogy az MPO a vezikulákon belül található. Ugyanezen a módon vizsgáltuk az aktin elhelyezkedését is a MV-okban, és ezen vizsgálatainkban – az MPO-val megegyező módon – kizárólag a MV-ok permeabilizálását követően jelölődött az aktin.

4.4 A MV-ok egy lehetséges funkciójának vizsgálata – a PMN eredetű MV-ok baktériumokra gyakorolt hatása

Az egyértelműen detektált mennyiségi és minőségi eltérések a különböző MV frakciók között egyenesen vezettek tovább annak a kérdésnek a felvetéséhez, mi szerint az összetételbeli eltérésekhez kapcsolhatók-e funkcionális különbségek is. Mivel a proteomikai analízis alapján a bMV-ben található fehérjék igen nagy része antibakteriális hatásáról ismert, és mivel pont ezek dúsultak az sMV-vel szemben a bMV-ben, logikus következtetéseként adódott a MV-ok esetleges antibakteriális hatásának vizsgálata. Ezen vizsgálatok bemutatásakor a következő logikát követem:

1. Először is vizsgálni kívántuk, hogy tapasztalható-e a MV-frakciókat alkalmazva antibakteriális hatás, és amennyiben igen, az vajon mennyiben köthető magukhoz a MV-okhoz, avagy esetleg valamiféle szolubilis ágens hatását tapasztaljuk az adott izolátumban.
2. A következő kérdéskör azzal foglalkozik, hogy a tapasztalt hatás mennyiben függ a támadandó baktériumok jellemzőitől.
3. A harmadik kísérletsorozat pedig azt próbálja majd megvizsgálni, hogy a tapasztalt hatás a MV-ok mely tulajdonságain alapulhat.

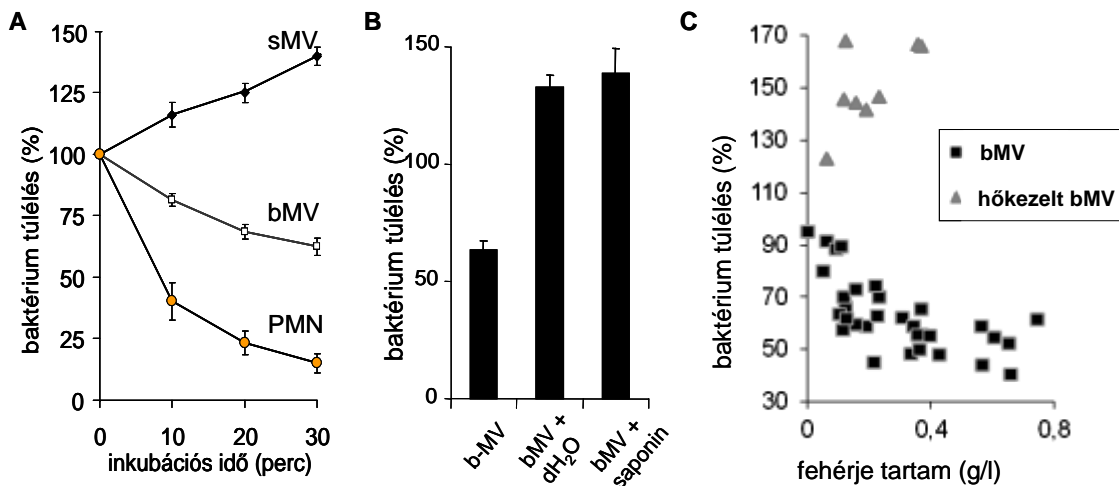
4.4.1 Az antibakteriális hatás és a MV-ok vezikuláris természetének kapcsolata

A fenti gondolatmenetnek megfelelően – a Módszerekben leírt negatív és pozitív kontrollok figyelembevételével – vizsgáltuk a MV frakciók baktérium túlélésre kifejtett hatását.

A **19.A ábra** baktérium túlélési tesztek alapján mutatja a jelzett ágensnek az opszonizált *S. aureus* túlélésére gyakorolt hatását. A PMN hatásával való összehasonlíthatóság érdekében ezen tesztekben egységnyi PMN, illetve *ugyanennyi*

PMN-ből szeparált MV hatásait vizsgáltuk. Magában a tesztben az idő függvényében az osztódni képes baktériumok számának változását lehet leolvasni.

Jól látható az ábrán az osztódóképes baktériumok számának csökkenése intakt PMN és – nagy meglepetésünkre – bMV frakció esetén is, ezzel szemben az sMV frakció és baktérium inkubációja esetén növekvő baktériumszám volt tapasztalható. Ez utóbbi növekmény háttérében véleményünk szerint (tápanyagforrásként) az sMV-k fehérje tartalma állhat. A továbbiakban – az egyszerűbb átláthatóság kedvéért – baktériumölési tesztek esetén az adott mintákban a kísérlet végén, a 30. percben található osztódásra képes baktériumok aránya szerepel a kiindulási baktériumszámhoz képest.



19. ábra. MV frakciók baktériumokra gyakorolt hatásának alapvető feltételei. Az itt bemutatott túlélési tesztekben a támadandó baktérium opszonizált *S. aureus* volt. Az „A” panel típusos baktérium túlélési tesztek eredményeit mutatja. Az egyes minták egységnyi mennyiségű PMN-t, illetve ugyanennyi PMN-ből elválasztott MV-t tartalmaztak. Látható, hogy a PMN és a bMV esetében a kiindulási értékhez képest az idő előrehaladtával csökken, míg az sMV esetében növekszik a baktériumok száma. n=47, SEM. A „B” panel bMV desztillált vízzel, illetve saponinnal destruált mintáinak a baktérium túlélésre gyakorolt hatását mutatja. n=4, SEM. A „C” panel egyedi kísérletek bMV frakcióinak fehérje tartalma, azaz (a Módszerekben leírtaknak megfelelően) MV tartalma, illetve a minták baktérium túlélésre gyakorolt hatása közötti összefüggést ábrázolja. n=47.

A fenti eredmények kapcsán első, és talán legfontosabb kérdésként azt kívántuk vizsgálni, hogy a tapasztalt antibakteriális hatás mennyiben függ a MV-ok szerkezeti (vezikuláris) épségétől. Ennek tisztázására detergens alkalmazásával, illetve hipozmotikus lízissel, desztillált víz segítségével felbontottuk a MV-kat. A lízis megtörténtét áramlási citométerrel és mikroszkópos vizsgálatokkal ellenőriztük. Ezt

követően vizsgáltuk a lizált MV-kat tartalmazó frakciók antibakteriális hatását. Kontrollként a MV-kat destruáló eljárások direkt baktérium károsító hatását is vizsgáltuk. Mint a **19.B ábrán** látható, a MV-ok eliminálása tökéletesen kivédte az MV frakció antibakteriális hatását, mi több, a baktériumok ezen mintákban növekedésnek indultak. Ezen eredményeink alapján tehát felvethetjük, hogy a bMV frakció antibakteriális hatásának szükséges és alapvető feltétele a MV-ok szerkezeti épsége.

A kérdést igyekeztünk megválaszolni oly módon is, hogy nem elimináltuk, hanem épp ellenkezőleg, fokoztuk a bMV-k mennyiségét. Mert amennyiben a fenti állítás igaz, úgy a bMV-k számának emelésével egyre fokozódó antibakteriális hatást kellene tapasztalnunk. Mint a **19.C ábrán** látható, ez a hatás valóban be is következett, nagyobb mennyiségű bMV jelenlétében romlott a baktériumok túlélése, míg a bMV-k hővel való destruálása és denaturálása kivédte az antibakteriális hatást.

Összességében tehát úgy gondoljuk, hogy a detektált antibakteriális tulajdonság alapvetően függ a MV-ok fizikai épségétől.

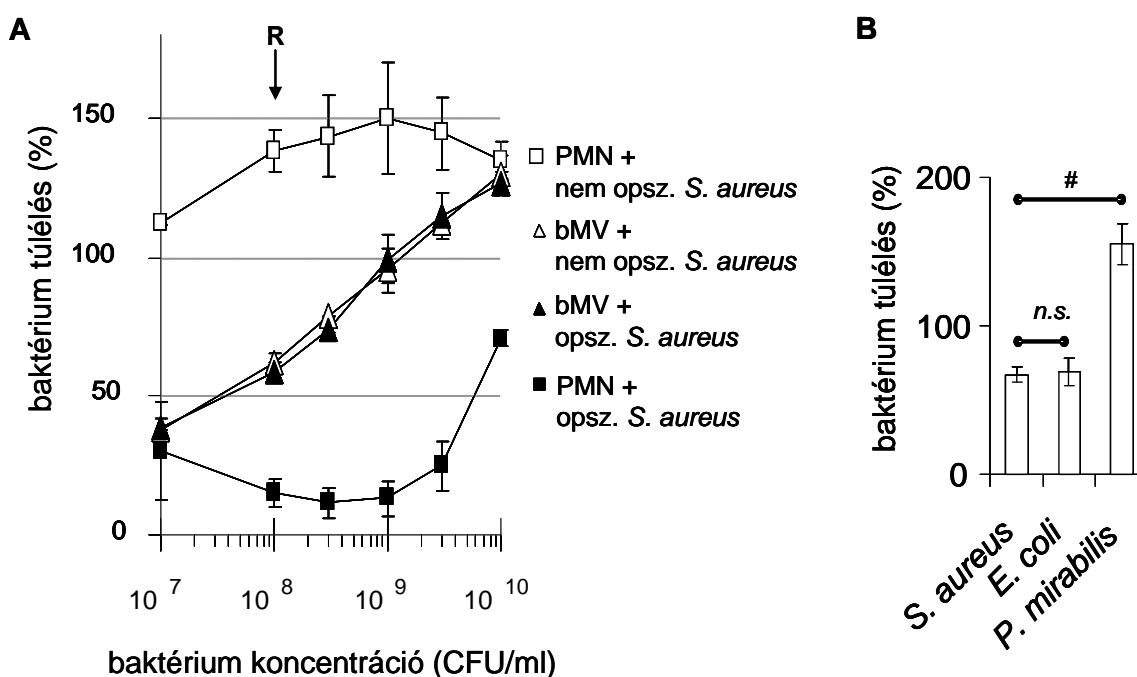
4.4.2 Az antibakteriális hatás és a támadandó baktériumok jellemzőinek kapcsolata

A bMV frakció tehát – szemben pl. az sMV-vel – antibakteriális hatással rendelkezik, mely hatás alapvetően függ a vezikulák épségétől. E jelenség további vizsgálatában alapvetően két úton indulhattunk el. Egyrészt vizsgálhattuk magának a támadandó baktériumnak, illetve a baktériumot meghatározó tényezőknek (mennyiség, opszonizáció, rajzási képesség) a szerepét a bMV-vel való interakcióban. A másik oldalról szemlélve pedig vizsgálhattuk a bMV-k különböző összetevőinek jelentőségét, illetve magát a baktérium-vezikulum interakciót is. Ebben a fejezetben az előbbi, baktériumokkal foglalkozó kérdéskört kívánom ismertetni.

Mint az előző fejezetben bemutattam, az általunk rutinszerűen használt baktérium túlélési tesztekben (melyekben a bakteriális végkoncentráció 10^8 bakt. / ml) a bMV hatása jól igazolhatónak bizonyult. Ez az eredmény azonban igen kevés információval szolgál a bMV antibakteriális hatásának kapacitásáról, azaz arról az értékről, hogy mennyi baktériummal is képes szembeszállni a bMV. Nem elhanyagolható szempont az sem, ezen kérdés megválaszolásával arra is választ kaphatunk, hogy a PMN teljes kapacitásához képest vajon mekkora is a MV-ok jelentősége. Mivel az általunk rutinszerűen használt baktérium túlélési tesztekben a PMN teljes antibakteriális

kapacitásának csak egy töredékét használjuk ki, a feltett kérdések megválaszolásához egyaránt meg kell határozni a bMV-k és a PMN-ek maximális antibakteriális kapacitását.

A fenti gondolatmenet mellett a bMV-baktérium interakció egy további lehetséges tényezőjének, a támadandó baktériumok opszonizációjának szerepét is vizsgálni kívántuk, természetesen ugyancsak a PMN-hez hasonlítva. E gondolat alapját az a már ismertetett eredmény adta, miszerint a MV-ok meglehetősen mennyiségben hordozzák a CR3-t (12.B ábra).



20. ábra. A MV és a PMN antibakteriális hatása a baktériumok jellemzőinek függvényében. Az „A” panelen egységnyi PMN, illetve ugyanannyi PMN-ből szeparált bMV antibakteriális hatásának függése látható részint a támadandó baktériumok koncentrációjától, részint azok opszonizációjától. Az „R” a rutinszerűen használt baktérium koncentrációt jelöli. A „B” panel ugyanakkora mennyiségű bMV antibakteriális hatását mutatja a feltüntetett baktériumokkal szemben. Ezen kísérletben szintén opszonizált baktériumokat használtunk. n=4, SEM, #: p < 0,05

A fenti kérdéseket megválaszoló kísérletek kivitelezéséhez – korábbi méréseinkhez hasonlóan – egységnyi PMN-t, illetve ugyanannyi PMN-ből szeparált MV-t használtunk. A kísérletek során a PMN és bMV szám változtatás nélkül hagyása mellett az inkubált baktérium mennyiségét növeltük.

Mint a 20.A ábrán látható, az általunk alkalmazott körülmények között a PMN opszonizált *S. aureus* elleni kapacitása (■) igen nagy, a telítés 3×10^9 / ml-es baktérium koncentrációnál érik el a sejtek. Ehhez képest a bMV-k kapacitása (▲) igen kicsi, már 10^8

baktérium / ml-es értéknél telítődik. Azaz opsonizált baktériummal szemben az egységnyi PMN-ből izolált bMV a PMN-hez képest valóban csak töredék antibakteriális kapacitással rendelkezik. Amennyiben viszont nem opsonizált baktériummal szemben vizsgáljuk az antibakteriális kapacitásokat, jól látható, hogy a bMV (Δ) kapacitása nem tér el az opsonizált baktérium ellen tapasztalt kapacitástól. Fontos megfigyelésünk, hogy nem opsonizált baktériumokkal szemben a PMN nem mutat antibakteriális hatást, így a bMV-k hatása minden általunk vizsgált körülmény között erősebbnek bizonyult opsonizálatlan baktériumokkal szemben, mint a PMN-eké (\square).

Azaz a következő állításokat fogalmazhatjuk meg:

1. a bMV hatása *függetlennek* bizonyult a támadandó baktérium opsonizációjától! Ez a tulajdonsága a bMV-nek élesen eltér a PMN-től!
2. a PMN baktériumölésében valóban kiemelkedő szerepe van az opsonizációnak. Amennyiben viszont a PMN-t a bMV-hez viszonyítjuk, úgy egyértelmű, hogy nem opsonizált baktériumok ellen az egységnyi PMN-ből termelődött bMV messze hatékonyabb, mint maga a PMN.

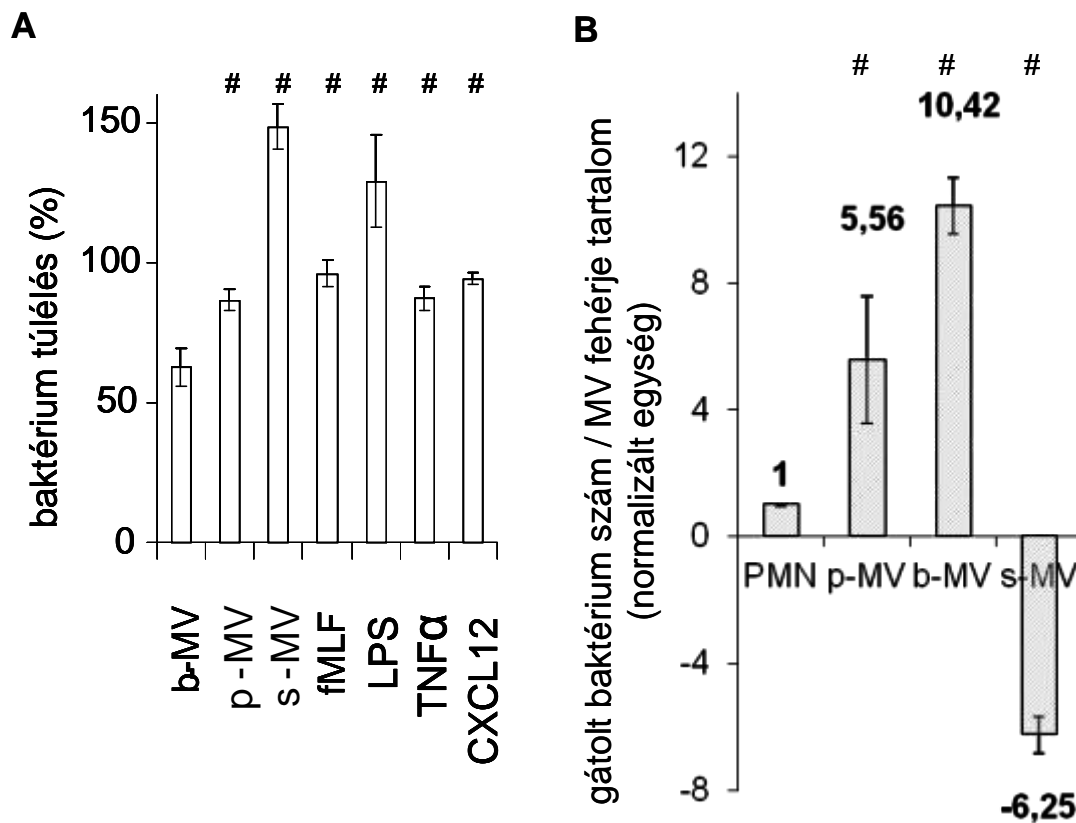
A fenti eredmények mellett vizsgálni kívántuk, hogy a detektált antibakteriális kapacitás vajon csak *S. aureus* ellen nyilvánul-e meg, avagy a bMV egyéb baktériumtörzsek ellen is hatással bír-e. Mint a **20.B ábrán** látható, az opsonizált *S. aureus* hatására termelődött MV-ok *Escherichia coli* (továbbá *Bacillus subtilis* és *Pseudomonas aeruginosa*) ellen szintén hatékonyan mutatkoztak, míg – a rajzásra képes – *Proteus mirabilis* ellen nem mutatott antibakteriális kapacitást. Azaz vizsgálataink szerint elég széles a bMV-k repertoárja a támadandó baktériumokkal szemben.

4.4.3 A MV-ok antibakteriális hatását meghatározó tényezők

A baktériumok és a tapasztalt antibakteriális hatás közti kapcsolat vizsgálatát követően szeretném ismertetni a MV-k egyes jellemzőinek az antibakteriális hatásban betöltött szerepét is.

4.4.3.a. Különböző MV-ok antibakteriális tulajdonságának összehasonlítása

Mivel a bMV-k (szemben pl. az sMV-vel, **19.A ábra**) szignifikáns negatív hatást mutattak a baktériumok túlélésére, vizsgálni kívántuk, hogy a MV-ok mely összetevőin nyugszik ez a hatás. E vizsgálatokhoz először azt kívántuk eldönteni, hogy az antibakteriális tulajdonság mennyiben egyedi, avagy éppen általános jellemzője különböző PMN eredetű MV-oknak. Ahhoz viszont, hogy ezt megtehesük, figyelembe kell vennünk, hogy az egyes aktivátorok hatására eltérő mennyiségű MV termelődhet.



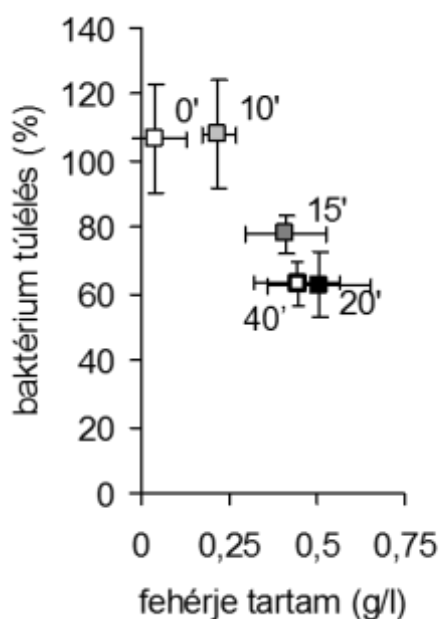
21. ábra. Különböző hatásra termelődött MV-ok antibakteriális hatásának összehasonlítása. Az „A” panel az *S. aureus* túlélését mutatja a jelzett stimulus hatására keletkezett, ugyanakkora tömegű fehérjét tartalmazó MV-mal történt 30 perces inkubációt követően. $n=4$. A „B” panel a jelzett minta egységnyi fehérjetömegére normált, a PMN-hez viszonyított, korábbi kísérleteink alapján számított antibakteriális kapacitását mutatja. A gátolt baktériumok számát a kizárólag HBSS-t tartalmazó oldattal szemben határoztuk meg. $n=4$, SEM #: $p < 0,05$. A szignifikanciát az „A” panelen a bMV-re, a „B” panelén pedig a PMN-re vonatkoztatva jelöltem.

Amennyiben tehát a MV-okat kívánjuk összehasonlítani, célszerű azokat azonos mennyiségben alkalmazni. Azaz – az előző fejezetben ismertetett kísérletekkel szemben – nem az egységnyi PMN-ből szeparálható MV-okat, hanem valóban egységnyi MV-ot (leginkább egységnyi fehérjét) tartalmazó minták összehasonlítására van szükség. Ezen kísérletek során az adott napon termelt bMV minták fehérje koncentrációjának megfelelő

koncentrációban alkalmaztuk az egyéb hatásra keletkezett MV-okat. Mint látható a **21.A ábrán**, a bMV mintáinkhoz képest minden más MV szeparátum szignifikánsan kevésbé gátolta a *S. aureus* növekedését, sőt, bizonyos MV-ok esetén (LPS-MV, sMV) kifejezett osztódást mutattak a baktériumok. Azaz a PMN eredetű MV-ok antibakteriális hatása – a MV-ok összetételéhez hasonlóan – *függést mutat* a kiváltó stimulustól. Azaz felmerül, hogy a specifikus hatás meglétéért esetleg a bMV-ben specifikusan dúsuló fehérjék hatása is felelős lehet.

A specifikus fehérjék dúsulásának jelentőségére utalnak azon számításaink is, melyekben a MV-ok és a – rengeteg egyéb funkciójú fehérjét is tartalmazó – PMN-ek antibakteriális hatásait egységnyi fehérjetömegükre normálva hasonlítottuk össze. Ezen számításaink során a kizárólag baktériumot tartalmazó minta, valamint a vizsgált minta baktérium tartalma közti különbséget (azaz a baktérium szám változását a kontrollhoz képest) osztottuk a vizsgált MV avagy PMN fehérje tartalmával. A **21.B ábrán** a fenti módon számolt adatokat ábrázoltam, a PMN értékéhez viszonyítva. Látható, hogy a PMN egységnyi fehérje tömegre eső antibakteriális hatásához képest már a pMV is szignifikánsan nagyobb kapacitással rendelkezik, a bMV normált antibakteriális kapacitása pedig egy nagyságrenddel magasabb, mint a PMN-é. Azaz a bMV fehérjéinek egységnyi tömege jóval erőteljesebben hat a baktériumokra, mint akár a PMN, akár a pMV. Ezzel szemben az sMV esetén erőteljes baktérium osztódást tapasztaltunk (mint azt a negatív antibakteriális hatás mutatja).

Mint már korábban bemutattam, a bMV-k keletkezése telítési kinetikát mutat, mely a kiváltó inger megjelenését követő 20. percben eléri a maximumot (**15.A ábra**). Fontos kérdés, hogy a bMV hatásában alapvetőnek tűnő fehérje dúsulás is lépést tart-e ezzel a folyamattal, avagy a két folyamat eltérő kinetikát követ. Ennek eldöntésére a bMV termelődése közben vettünk MV mintákat, és vizsgáltuk ezen minták fehérje tartalma és antibakteriális hatása közötti összefüggést.



22. ábra. A bMV termelődése során izolált MV-ok antibakteriális hatásának vizsgálat. Az „x” tengelyen a MV frakciók fehérje tartalma (azaz a MV-ok mennyisége), az „y” tengelyen azok antibakteriális hatása látható. Az egyes pontoknál található számok a bMV termelődését kiváltó inger PMN-hez adása óta eltelt (percekben mért) időt mutatja. n=4, SEM.

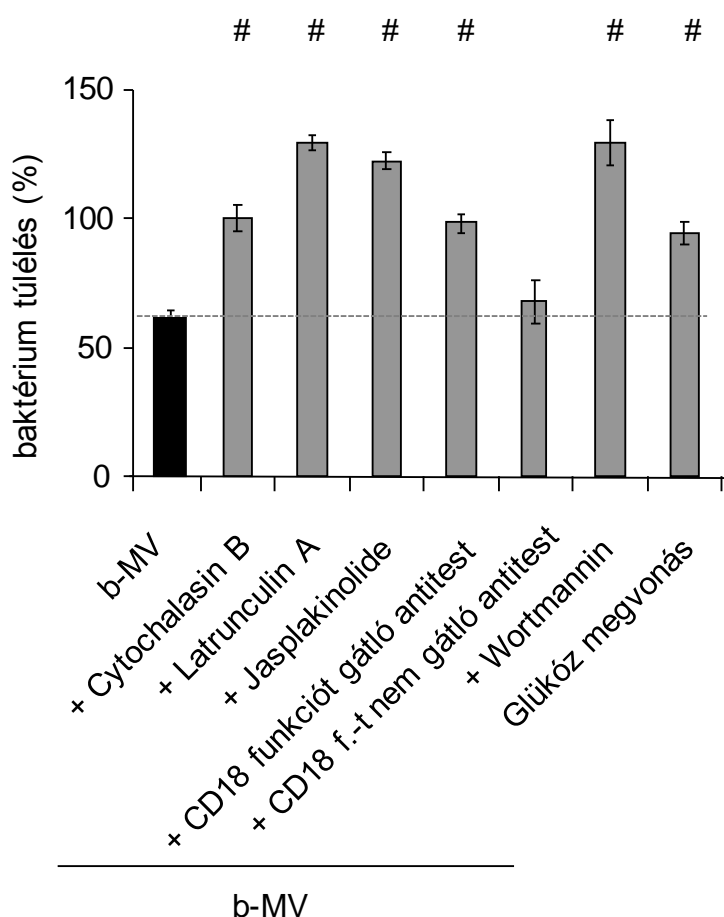
Mint a **22. ábrán** megfigyelhető, az bMV termelés beindulását követő 10. percben már szignifikáns mértékben fokozódik a MV termelés, azonban ezek a „korai” MV-ok nem rendelkeznek antibakteriális hatással. Ezzel szemben a 15. perces minta már jól mérhető hatással bír a baktériumok túlélésre, a 20. és 40. perces MV-ok közt pedig eltérést a mért paraméterekben nem tapasztaltunk. Azaz nézeteink szerint valóban fennáll egy különbség a MV-ok képződésének, illetve a hatásukban szerepet játszó fehérjék MV-ba kerülésének kinetikája között, azonban ez a különbség igen hamar kiegyenlítődik. A fenti eredmények (pl. a 0' és 10' perces minták összehasonlítása pl. a 15 perces mintával) alátámasztják azt az elképzelést is, miszerint az általunk vizsgált MV populációk ténylegesen eltérő tulajdonságú MV populációból tevődnek össze. Az egy populáción belüli különböző MV-ok vizsgálata jelenleg is folyik laboratóriumunkban.

Összességében tehát az általunk használt kísérletes körülmények között az egységnyi PMN-ből keletkezett bMV az egységnyi PMN-hez képest kisebb, de azzal még így is összemérhető antibakteriális hatással bír opszonizált *S. aureus*-szal szemben. Amennyiben viszont egységnyi fehérje tartalomra vonatkoztatjuk az antibakteriális kapacitásokat, a bMV hatása – számítás alapján – egy nagyságrenddel erősebb, mint a

PMN-é, és jócskán meghaladja a többi MV-ét is. Ez utóbbi eredmény alapján – különösen a proteomikai eredmények fényében – elképzelhető, hogy a bMV keletkezése esetében a PMN mintegy specifikusan „csomagolja” az antibakteriális eszközöket.

4.4.3.b. A MV-ok fehérjéinek egyedi szerepe az antibakteriális hatásban

A bMV frakció többi MV frakcióhoz képest tehát egyedi antibakteriális hatással bír. Az antibakteriális hatás további, részletesebb vizsgálatához kétféle megközelítést alkalmaztunk. Egyrészt – a proteomikai analízis során nyert ismeretek alapján kiválasztott – fehérjék farmakológiai gátlását terveztük, másrészt pedig vizsgálni kívántuk, hogy vajon miért szükséges a MV strukturális épsége, azaz hogy van-e közvetlen kapcsolat a MV-ok és a támadandó baktériumok között. Ebben a fejezetben a farmakológiai vizsgálataink eredményeit szeretném összefoglalni.



23. ábra. A bMV antibakteriális hatásának változása gátlószerek mellett. Az egyes gátlószerek célpontjait a szövegben jeleztem, alkalmazásuk körülményeit – irodalmi adatok alapján meghatározva – a Módszerek fejezetben jeleztem. $n=4$, SEM, #: $p < 0,05$. A szignifikanciát a bMV-vel szemben vizsgáltuk.

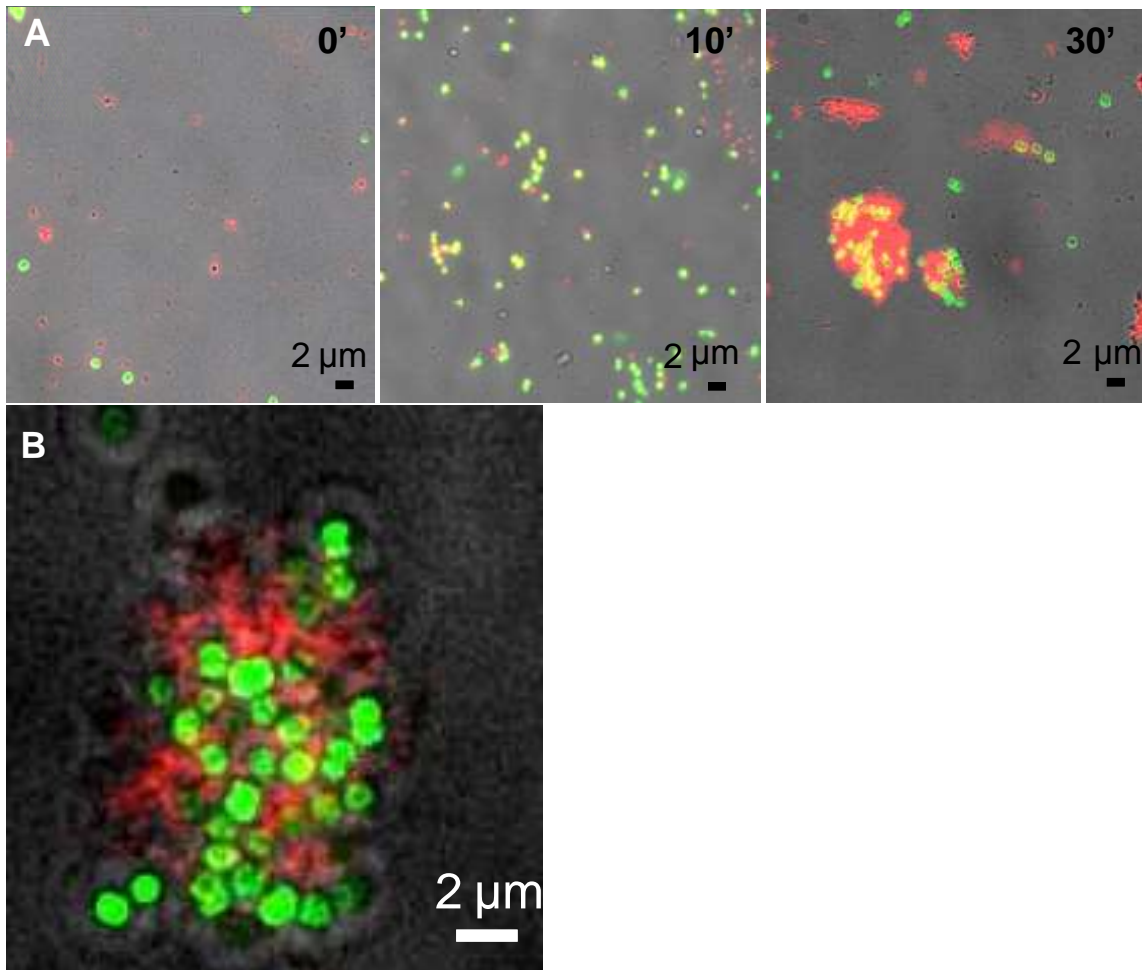
A proteomikai és Western blotos vizsgálatok nagy mennyiségű citoskeletonális fehérje jelenlétére utaltak, ezért vizsgáltuk, hogy mennyiben igényli az antibakteriális hatás az aktív citoskeletonális működéseket. Ehhez a bMV-eket a következő gátlószerekkel kezeltük a baktériumokkal való inkubáció előtt: az aktin polimerizáció épülő (pozitív) végének gátlására Cytochalasin B-t [140] és Latrunculin A-t [176], a leépülő (negatív) vég gátlására pedig Jasplakinolide-t [177]. Mint a **23. ábrán** látható, mindhárom vegyület hatására erősen csökkent az antibakteriális hatás.

Az aktív citoskeletonális működésre utaló eredmények miatt vizsgáltuk a MV-k energiaigényét is. A proteomikai analízis több, a sejtek energetikai háztartásával kapcsolatos enzimet igazolt a MV-okban, megpróbálkoztunk a glükóz megvonásával. Ezen beavatkozás szintén gátolta a bMV-k antibakteriális hatását. Mivel a PMN jelátviteli folyamataiban alapvető szerepet játszik a foszfatidil-inozitol 3 kináz (PI3K), ennek gátlószere, a Wortmannin-t [178] szintén kipróbáltuk, ekkor szintén csökkent antibakteriális hatást tapasztaltunk. A CR3 (Mac-1, $\beta 2$ integrin) gátlása akár közvetlenül, CD18 alegységének antitesttel (TS/1. klón) kivitelezett gátlásával, akár a Ca^{++} és Mg^{++} EDTA-val való kelálásán alapuló gátlásával [179] – a fentiekhez hasonló módon – szintén kivédte az antibakteriális hatást. Ezzel szemben a CD18 funkcióját nem gátló, de magát a fehérjét jelölő antitest (6.7-es klón) nem gátolta a bMV hatását.

A fenti eredmények szerint tehát elképzelhető, hogy az antibakteriális hatáshoz szükséges a MV-ok citoskeletonális elemeinek aktív átépülése. Ezen felül szükséges lehet az antibakteriális hatás kiváltásában a CR3 egyik lánc, a CD18 is.

4.4.3.c. Az MV-baktérium interakció anatómiája

Mivel – mint korábban bemutattam – az antibakteriális hatás kapcsolatot mutatott a MV-ok épségével/intaktságával is, vizsgálni kívántuk, hogy van-e, található-e direkt kapcsolat a MV-ok és a baktériumok között. Ehhez fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, a Módszerek fejezetben szereplő metodikát követve.



24. ábra. A bMV-k és a baktériumok interakciója inkubációjuk alatt. Az „A” panel 3 felvételén nem opsonizált, endogén GFP-t termelő *S. aureus* (zöld), illetve CD11b elleni antitesttel jelölt bMV-k (piros) viselkedése figyelhető meg, a felvételeken jelezett ideig tartó inkubáció végén. A „B” felvétel 1µm-es szeletvastagsággal mutatja a baktériumok (zöld) és bMV-k (piros) aggregátumát. Konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvétel.

Mint az **24.A ábra** mutatja, az inkubáció előrehaladtával a bMV-k és a *Staphylococcusok* között előbb kolokalizáció, majd aggregáció (összetapadás) mutatkozott. Az aggregátumok vékony szeletű (1 µm-es) konfokális mikroszkópos vizsgálata (**24.B ábra**) egyértelműen elkülönülő vezikulákat és baktériumokat igazolt, azaz nem összeolvadást és nem vezikulumba való belépést tapasztaltunk.

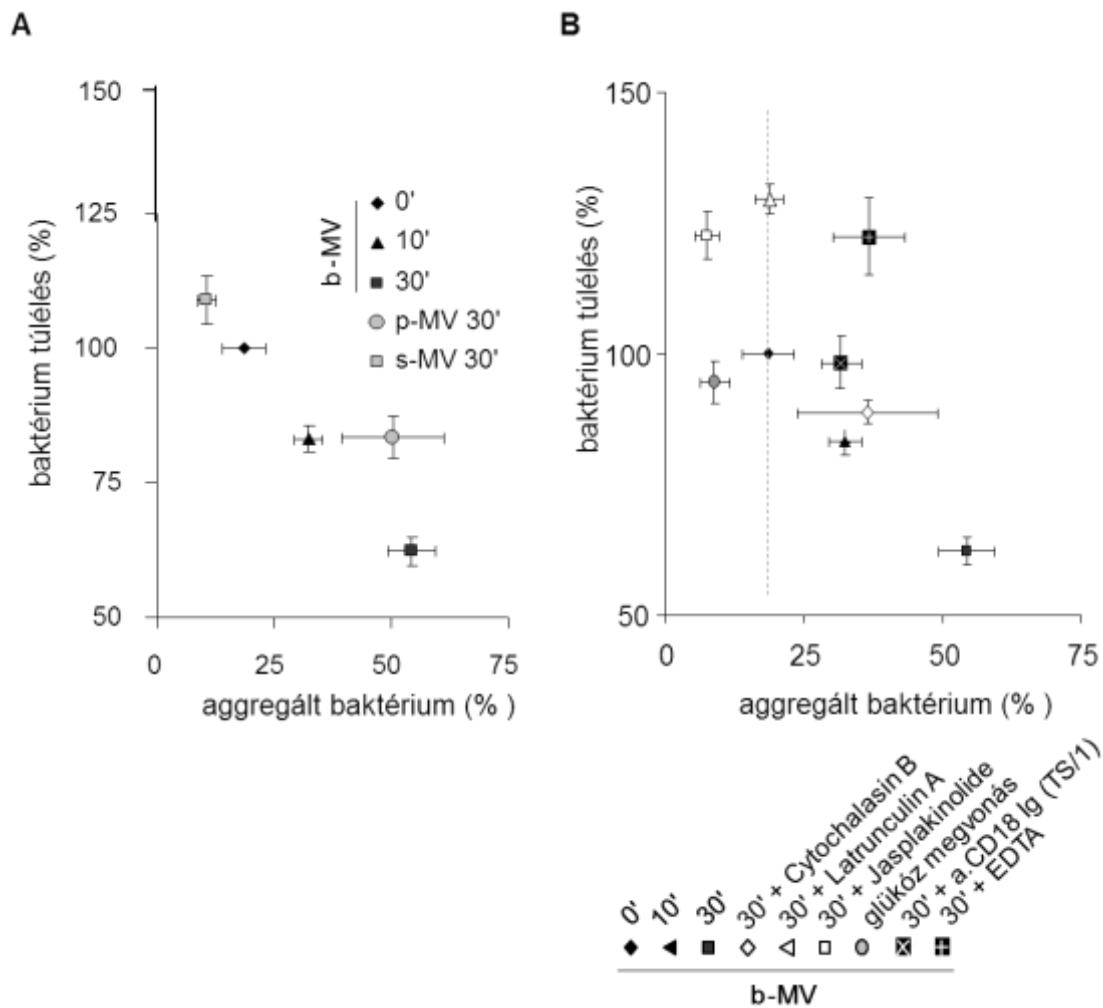
Hasonló együttállások kialakulását tapasztaltuk – az alkalmazott kísérleti körülmények között baktericid koncentrációjú – aziddal kezelt, méréseink szerint osztódásra képtelen *S. aureus*-ok és normál bMV-k, illetve *E. coli* és normál bMV-k között. Ugyanakkor kizárólag bMV-t, vagy kizárólag baktériumot tartalmazó mintákban a fent bemutatotthoz hasonló aggregátumok keletkezése elmaradt. Szintén nem

tapasztaltunk aggregátumképződést lizált bMV-eket és intakt *Staphylococcus*-okat, avagy *P. mirabilis*-t és intakt bMV-t tartalmazó mintákban sem. Azaz a mikroszkópban látott aggregátumok ténylegesen csak intakt bMV és baktérium együttes jelenlétében jöttek létre, az aggregátumok létrejötte ugyanakkor nem függött a baktériumok életképességétől. Érdekes megfigyelés, hogy a bMV *E. coli*-val, illetve *P. mirabilis*-szal való aggregátumképzése, illetve a bMV-k korábban már tárgyalt antibakteriális hatása ugyanezen baktériumokra jó korrelációt mutatott (**20.B ábra**). Fontos kiemelni azt is, hogy sem az sMV, sem a pMV baktériumokkal történt inkubációja során nem tapasztaltuk hasonló aggregátumok kialakulását.

4.4.3.d. A baktériumok aggregálódása és az antibakteriális hatás közötti kapcsolat vizsgálata

Adódik tehát a felvetés, hogy ezen aggregátumok esetleg szerepet játszhatnak a bMV-k antibakteriális hatásában. Amennyiben viszont az aggerálódásnak szerepe van az antibakteriális hatás létrejöttében, összefüggést kell tudnunk kimutatni az aggregátumba kerülő baktériumok száma, illetve az antibakteriális hatás között. A felvetett összefüggés vizsgálatához elvégeztük mikroszkópos felvételeink statisztikai analízisét, melynek során – többek között – vizsgáltuk, hogy a baktériumok mekkora hányada található aggregátumokban.

Aggregált baktériumnak tekintettük azon baktériumokat, melyek legalább egy MV-mal kapcsolatot létesítettek. Következő lépésként hasonlítottuk ezen statisztikai eredményeinket a párhuzamosan végzett baktérium túlélési tesztekben kapott eredményekkel (**25.A ábra**). Mint látható, bMV esetében minél több baktérium került az adott mintában az aggregátumokba, annál kevesebb osztódásra képes baktériumot mutattak a túlélési tesztek. Érdekes eredményt mutat a pMV, mely a bMV-hez hasonló mennyiségben kötött baktériumokat, azonban antibakteriális hatása mégis elmarad a bMV-é mögött. Külön felhívnam a figyelmet, hogy már a 0. perces bMV minta nagyobb arányú aggregálódó baktériumot mutat, mint az sMV 30. perces mintája. Ezt leginkább talán kísérletechnikai okokkal magyarázhatjuk, de elképzelhető az is, hogy a bMV ennyivel nagyobb affinitással ragadja meg a baktériumokat.



25. ábra. MV-ok antibakteriális hatása, illetve az aggregált baktériumok mennyisége közötti összefüggés. Az „A” panel a bMV, az sMV és a pMV által aggregált baktériumok aránya, illetve a baktériumok túlélése közti kapcsolatot mutatja, a „B” panel pedig a korábban már ismertetett, a bMV előkezelését követően annak antibakteriális funkcióját gátló vegyületek hatását mutatja. $n=4$, SEM.

Összességében tehát a fenti statisztikai vizsgálataink alapján a bMV-k antibakteriális hatása, illetve az aggregátumokba került baktériumok mennyisége között szép korrelációt tapasztaltunk: ahogy egyre nagyobb mennyiségben kerültek a bMV-vel kapcsolatba a baktériumok, úgy csökkent az osztódó baktériumok mennyisége. Speciálisan mutatkozott a pMV helyzete, mely a fenti adataink alapján hasonló mértékben képes baktériumok megragadására, azonban nem volt képes azokon kellően hatékony támadására.

Hogy a bMV baktérium megragadási képességében szereplő fehérjék kérdésében tisztábban lássunk, megvizsgáltuk a korábban már ismertetett, a bMV előkezelése esetén funkciót gátló szerek hatását a baktériumok aggregációjára. Mint a **25.B ábrán** látható,

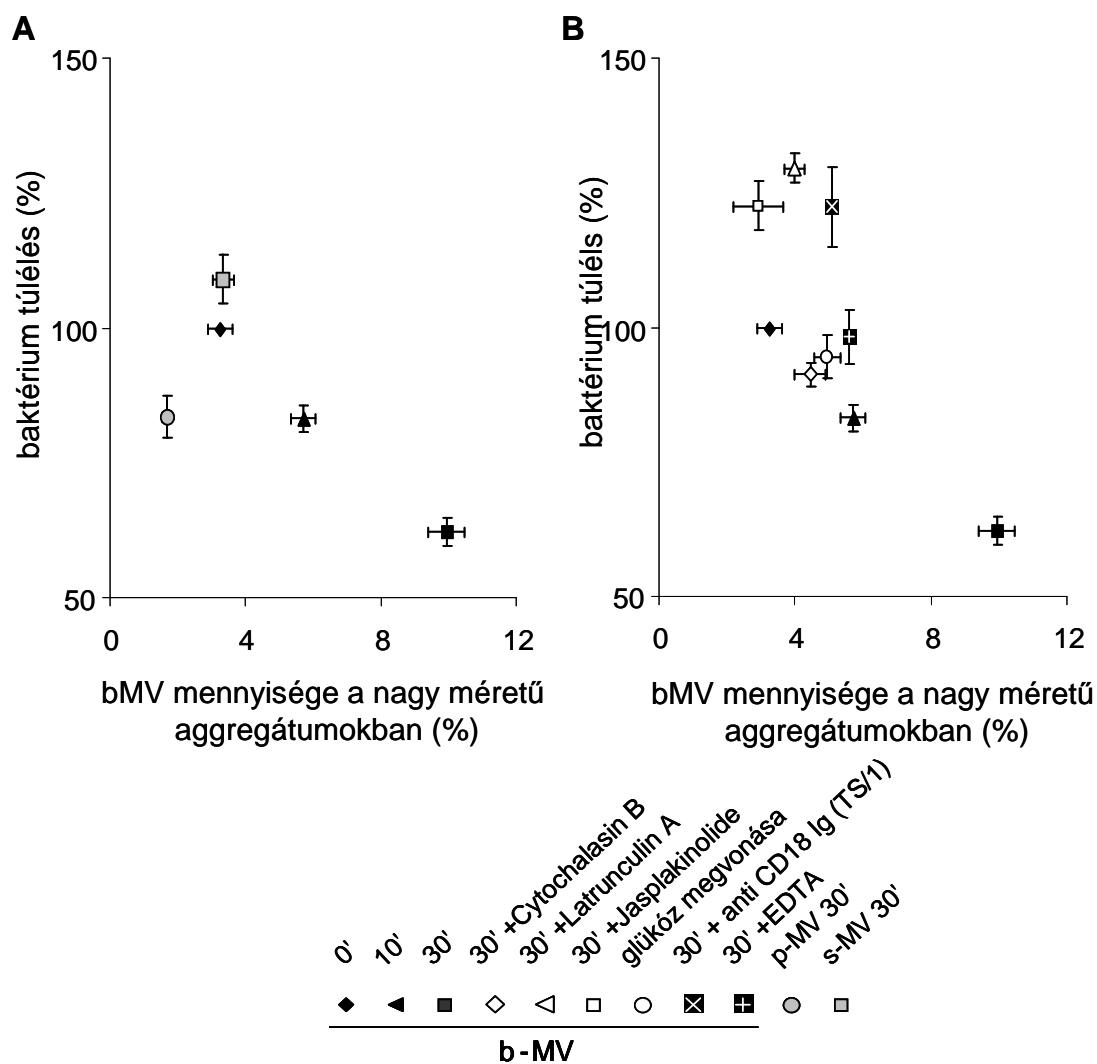
mindegyik kezelés csökkentette a 30 perc alatt aggregált baktériumok mennyiségét. Azaz az alkalmazott gátlószerek valóban csökkentették a baktériumok bMV általi megragadását, melynek ütemében csökkent a MV-ok antibakteriális hatása. Azonban szeretném felhívni arra is a figyelmet, hogy mind a Latrunculin, mind a Jasplakinolide, mind pedig a Ca^{++} és Mg^{++} megvonás a várhatónál, azaz az aggregált baktériumok mennyiségéhez képest erősebben csökkentette az antibakteriális hatást. Tehát az aktin gátlása, illetve a Ca^{++} és Mg^{++} megvonása a fenti hatáson túl is gátolta az antibakteriális hatás kialakulását. Ezen különbségek okát még nem ismerjük, felderítése jelenleg is kutatásaink tárgyát képezik.

4.4.3.e. A aggregált MV-ok mennyisége és az antibakteriális hatás közötti kapcsolat

Még egy fontos körülményre szeretném felhívni az olvasó figyelmét. Mint a mikroszkópos felvételeken is látszik, nem csak a megragadott baktériumok mennyisége, hanem az aggregátumok mérete, illetve az abban található MV-ok mennyisége is növekszik az inkubáció során a bMV esetén. Mivel az antibakteriális hatás hordozója vélhetőleg a MV, a továbbiakban vizsgálni kívántuk az aggregátumokban található MV-k mennyisége és az antibakteriális hatás közötti kapcsolatot is (**26. ábra**).

A statisztikai analízishez a következő feltételrendszert állítottuk fel: nagy méretű aggregátumnak tekintettük azon eseményeket, ahol az átmérő meghaladta a $1,5 \mu\text{m}$ -t, valamint bMV-t és baktériumot egyaránt tartalmazott. Amint az a **26.A ábrán** látható, a bMV 30 perces inkubációs mintáiban detektálható nagy méretű aggregátumok mennyiségéhez képest minden vizsgált körülmény esetén szignifikánsan kevesebb volt a hasonló méretű együttállások mennyisége. Mi több, más MV frakciók (sMV, pMV) estében nem tapasztaltuk nagy aggregátumok előfordulását. Tehát a nagy aggregátum létrehozása – az antibakteriális hatáshoz hasonlóan – egyedi jellegzetessége a bMV-knek. Külön kiemelném a pMV-t, mely (mint korábban bemutattam) hasonló mértékben köti a baktériumokat, mint a bMV, viszont nagy méretű aggregátumokat egyáltalán nem képez.

Amennyiben a már korábban is használt gátlószerek hatását vizsgáljuk (**26.B ábra**), úgy kijelenthetjük, hogy mindegyik gátlószer esetén csökkent a nagy méretű aggregátumok mennyisége, mely jelenség csökkenésnél viszont *erősebben* csökkent az antibakteriális hatás Latrunculin, Jasplakinolide, illetve a Ca^{++} és Mg^{++} megvonás esetén.



26. ábra. Az aggregátumban található MV-ok, illetve az antibakteriális hatás közötti összefüggés. Az „A” panelen a bMV különböző idejű inkubációs idejű mintái, a pMV és az sMV található, míg a „B” panelen a különböző gátlószerekkel kezelt bMV minták találhatóak. A jelmagyarázat mind a két panelre vonatkozik. n=4, SEM.

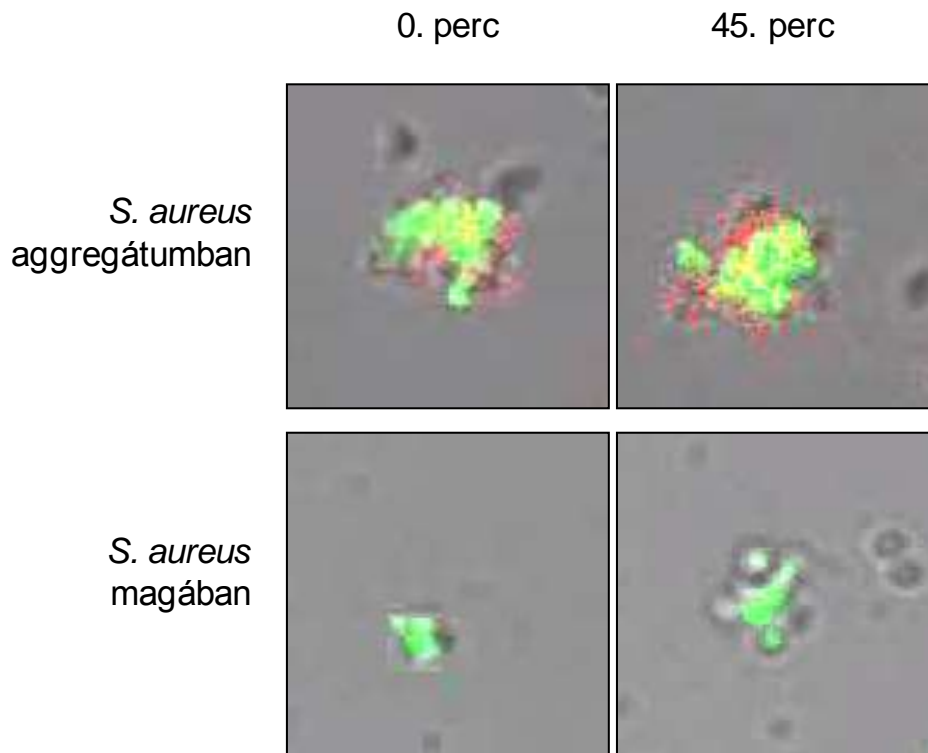
Azaz azt is kijelenthetjük, hogy a bMV antibakteriális hatása nem csak attól függ, hogy mennyi baktérium kerül kapcsolatba a bMV-vel, hanem attól is, hogy 1-1 baktériumra hány bMV (azaz talán mennyi antibakteriális fehérje) fejt ki hatását. Az alkalmazott gátlószerek hatásának elemzése pedig arra utal, hogy az egy baktériumra jutó bMV mennyiségének csökkentése javította a baktériumok túlélését. Mindezekon túl – korábbi adatokhoz hasonlóan – az aktin citoskeleton gátlása, illetve a kétértékű kationok megvonása a várhatónál nagyobb mértékben javított a baktériumok helyzetén.

Tehát mikroszkópos és baktérium túlélési tesztheinket összefoglalva, adataink alapján felvetődik, hogy az antibakteriális hatást nem csak az aggregálódott baktériumok

száma jellemzi, hanem az aggregátumban található MV-ok mennyisége is. Speciális a pMV helyzete, mely bár jól köti a baktériumokat, nagy méretű együttállások mégsem jellemzik.

4.4.3.f. A bMV-baktérium interakció időbeni követése

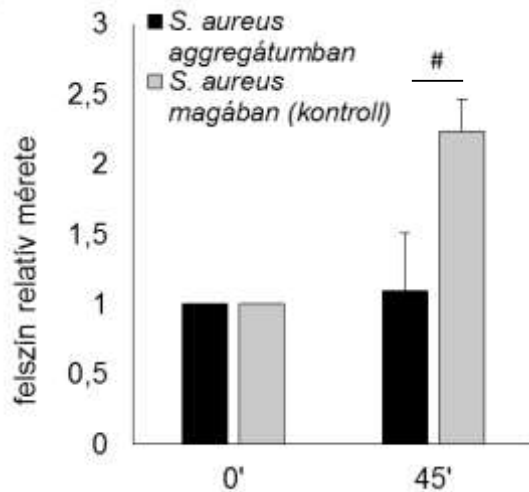
A fenti vizsgálatokra alapozva tehát megpróbáltuk közvetlenül is igazolni az aggregátumok antibakteriális hatását. Ennek vizsgálatához először bMV-t és baktériumokat aggregáltattunk, majd az aggregátumok kialakulását követően a mintákat fluoreszcens videomikroszkóp segítségével, a baktériumok osztódásához ideális körülmények (Luria Bertani baktérium növesztő médiumban, 37 °C-n) között követtük folyamatosan 45 percen (azaz körülbelül 2,5 osztódási cikluson) át.



27. ábra. Az aggregátumok baktérium osztódást gátló hatása. Video mikroszkópos kísérletek során az inkubáció első és utolsó pillanatában készült felvételek. Mint a kizárólag baktériumot tartalmazó mintákban látszik, az alkalmazott körülmények kedveznek a baktériumok (zöld) osztódásának, ennek ellenére nem tapasztalható osztódás a *Staphylococcusok* bMV-vel (piros) képzett aggregátumaiban. n=14.

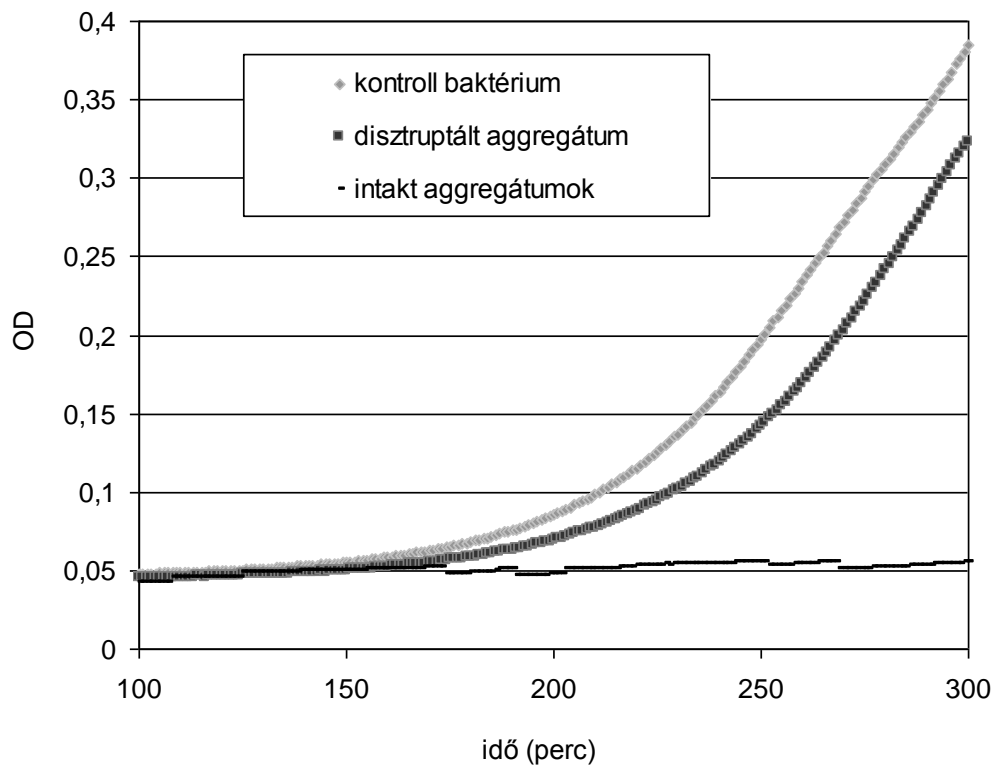
Kontrollként kizárólag baktériumot tartalmazó, a vizsgált mintákhoz hasonló szeparáción átesett mintákat használtunk. Mint a **27. ábra** mutatja, a csak baktériumot tartalmazó mintában 45 perc alatt jól láthatóan szaporodásnak indultak a baktériumok,

míg a BMV-vel összetapadt *Staphylococcusok* nem mutatták jelét az osztódásnak. A fenti videomikroszkópos mérések statisztikai analízise igazolta a felvételek alapján született benyomásunkat, mint az a **28. ábrán** látható.



288. ábra. A 27. ábrán bemutatott aggregátumok keresztmetszeti felszínének változása 45 perc alatt, a kiindulási méreteikhez képest. Az analízis ImageJ szoftver segítségével történt. n=14, SEM. #: p<0,05

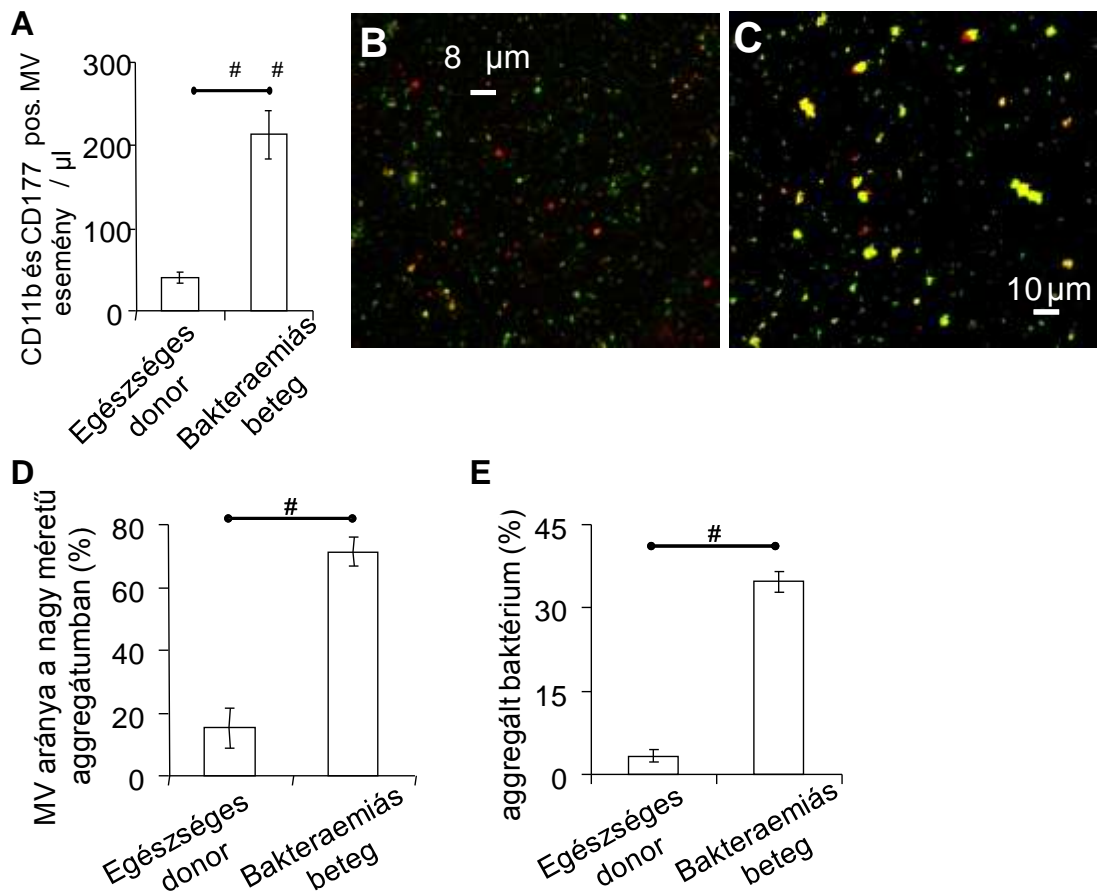
Vizsgáltuk továbbá, hogy a fenti antibakteriális hatás vajon bakteriosztatikus, avagy baktericid-e. Ennek eldöntésére előbb mechanikai behatással (ultrahang alkalmazásával) felbontottuk az aggregátumokat (mely körülményt mikroszkóp segítségével igazoltuk), majd vizsgáltuk a mintákban lévő baktériumok növekedésének ütemét. A kapott eredmények alapján az aggregátumból felszabadult baktériumok – mégha némileg csökkent mértékben is – képesek voltak a szaporodásra, ami inkább a BMV-k bakteriosztatikus hatására utalt (**29. ábra**).



299. ábra. Az osztódó baktériumok mennyiségének változása az idő függvényében a bMV-baktérium aggregátumok ultrahanggal történt feltárását, avagy egyben hagyását követően. A kontroll baktériumok hasonló izolálási lépéseken és ultrahangos kezelésen esettek át, mint az aggregátumokba került társaik. A baktériumok növekedését az LB médium optikai denzitásának változása mutatja. Reprezentatív görbe.

4.5 MV-ok *ex vivo* vizsgálata

Eddigi vizsgálatainkat egészséges donorok véréből izolált PMN-ekből nyert MV-kal, *in vitro* körülmények között végeztük. Azonban kíváncsiak voltunk, hogy vajon az élő szervezetben is találunk-e hasonló jelenségekre és folyamatokra utaló nyomokat. A kérdés megválaszolására *ex vivo* kísérleti rendszert állítottunk fel, ebben részint egészséges önkéntesek, részint klinikailag igazolt friss *S. aureus* infekcióban szenvedő betegek vérplazmájából izoláltuk a MV frakciót. Ezt követően – az irodalom által a leginkább PMN specifikus markernek tartott – CD11b-CD177 kettős jelöléssel vizsgáltuk a preparátumokban a PMN eredetű események számát.



30. ábra. Egészséges és bakteraemiás betegek plazmájának MV-ai. Az „A” panel a CD177 és CD11b kettősen pozitív, azaz jó eséllyel PMN eredetű MV-ok mennyiségét mutatja egészséges donorok, illetve bakteraemiás betegek vérplazmájában. A „B” panelen egészséges donor, a „C” panelen bakteraemiás beteg vérplazmájából szeparált, CD11b-vel jelzett MV-ok (piros) és endogén GFP-t termelő *S. aureus* (zöld) közötti interakciót mutatja 30 perces 37°C-on végzett inkubációt követően. Reprezentatív fluoreszcens konfokális mikroszkópos felvételek. A „D” és az „E” panel a fenti módon készült felvételek statisztikai analízisét mutatja. A „D” panelen az aggregátumban lévő MV-ok arányát, az „E” panelen pedig az aggregátumokba került baktériumok arányát mutatja. n=12, SEM, #: $p < 0,05$.

Mint az **30.A ábra** mutatja, az egészségesekhez képest a *Staphylococcus* infekcióban szenvedők esetében jóval több (véltetőleg) PMN-eredetű MV-t tudunk izolálni. Vizsgáltuk továbbá, hogy miként viselkednek a plazmából preparált MV-ok baktériumok jelenlétében. Mint az **30.C ábrán** látható, a bakteraemiás (széptikus) betegek CD11b-pozitív MV-ai hasonló aggregátumokat hoztak létre, mint a bMV-k, ezzel szemben az egészséges donorok MV-ai nem mutattak aggregálódási hajlamot a *Staphylococcus*-okkal (**30.B ábra**). A fenti felvételek statisztikai analízise (**30.D és E ábrák**) megerősítette a reprezentatív felvételek sugallta benyomást, azaz a betegek plazma MV-ai képesek voltak aggregálódni a baktériumokkal, és képesek voltak nagy

MV tartamú aggregátumok képzésére is, szemben az egészséges donorok plazma MV-ival. Tehát az akut *Staphylococcus* fertőzésben szenvedő betegek plazmájából szeparált MV-ok a bMV-hez, az egészséges donorok hasonló MV-ai az sMV-hez hasonló viselkedést mutattak *Staphylococcus*-ok ellen.

4.6 Az extracelluláris ionösszetétel szerepe a *S. aureus* elleni antibakteriális folyamatokra

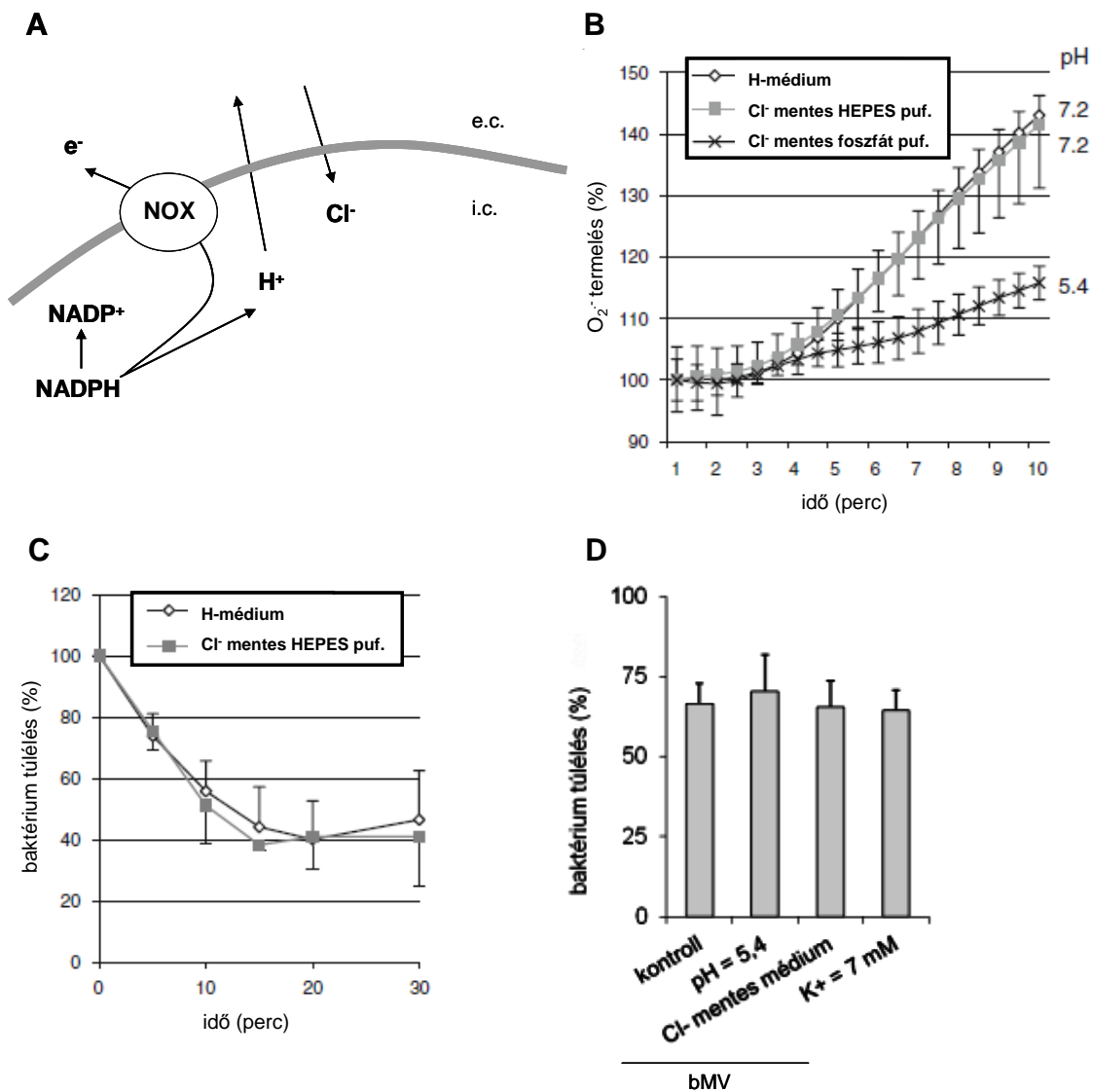
A *S. aureus* fagocitózison alapuló, intracelluláris eliminációja laborunk korábbi munkássága alapján alapvetően függ a NADPH-oxidáz adekvát működésétől. Szintén korábbi adat, hogy az oxidáz működésének obligát feltétele az általa szállított elektronok plazmamembránon való átáramlását kompenzáló ionáramok (H^+ , Cl^- és/vagy K^+) megléte (Irodalmi háttér és az **5.B ábra**). A kompenzáló ionáramok megléte és nagysága igen nagy mértékben függ a fagolizoszóma, így áttételesen az extracelluláris tér ionösszetételétől.

Ugyanakkor a MV-ok aggregáció képzésében az aktív citoskeletális változásokon, illetve a CR3 működésén felül szerepe lehet a felszíni töltésének is, (hasonlatosan pl. a mintázatfelismerő receptorok ligandum kötéséhez). A sejtek és MV-ok felszíni töltése függ az extracelluláris ionösszetételtől is, az extracelluláris ionkörnyezet változása viszont jellemző velejárója súlyos fertőzések állapotoknak. Amennyiben tehát az extracelluláris környezet jelentősen befolyásolja a PMN és a bMV antibakteriális hatását, úgy ennek lehet klinikai jelentősége. Így tehát vizsgálni terveztük ezen hatások szerepét a PMN, illetve a MV-ok antibakteriális hatásaiban.

Munkatársaim eredményei alapján [75, 87] az extracelluláris K^+ koncentráció változtatása, illetve a K^+ ionofór valinomycin alkalmazása jól detektálható befolyással bírt a fagolizoszóma össztöltésének (polaritásának) változására, azonban a PMN-ek szuperoxid termelését, illetve opszonizált *S. aureus* elimináló képességét egyáltalán nem volt képes befolyásolni. Ez alapján vetettük fel, hogy a K^+ ion szerepe vélhetőleg elenyésző az oxidáz elektrogenitásának kompenzálásában, így a *S. aureus* intracelluláris elpusztításában [87].

A fenti eredmények logikus továbbgondolása volt az a kísérletsorozat, melyben a protonkoncentráció, illetve a Cl^- koncentráció változtatásával igyekeztünk tisztázni ezen ionok szerepét a NADPH-oxidáz töltéskompenzációjában, illetve az intracelluláris tér

polaritásában. Ahhoz, hogy a töltéskompenzációt egyszerűen vizsgálhassuk, olyan szuperoxid termelést fokozó anyagot kerestünk, melynek hatására a szuperoxid termelés kellően nagy mérvű, és leginkább az extracelluláris tér felé irányul, azaz az elektronok mozgása és a töltéskompenzáló ionok mozgása egyaránt az intracelluláris tér és az extracelluláris tér között valósul meg.



301. ábra. A PMN és a bMV működése változó extracelluláris környezetben. Az „A” panel mutatja a NADPH-oxidáz elektrogenitását kompenzáló feltételezett ionáramokat extracelluláris irányú szuperoxid termelés esetén. e.c.: extracelluláris tér, i.c.: intracelluláris tér. A „B” panel a PMN szuperoxid termelésének, a „C” panel a PMN antibakteriális hatásának függését mutatja az inkubációs közeg (tehát az extracelluláris tér) Cl⁻ koncentrációjától, illetve a közeg pH-jától. A „D” panel a bMV antibakteriális hatásának függését mutatja az extracelluláris tér összetételétől. n=4, SEM.

Ennek modelljét a **31.A ábra** mutatja. Ezen kívánalmaknak a PKC aktivátor PMA hatására fellépő szuperoxid termelés maradéktalanul megfelelt. A PMN-ek szuperoxid termelését citokróm c redukción alapuló módszerrel követtük.

A fenti modell alapján tehát, amennyiben valóban jelentős a Cl^- ionok töltéskompenzáló szerepe, és csökkentjük az extracelluláris tér Cl^- koncentrációját, úgy az elmaradó töltéskompenzáció miatt csökkenő szuperoxid termelést kellene tapasztalnunk. Hasonló megfontolás szerint amennyiben fontos a töltéskompenzációban a protonok szerepe, és gátoljuk a protonok áramlását (pl. a proton koncentráció emelésével), úgy csökkenő mértékű szuperoxid termelést kell tapasztalnunk. Ez utóbbi körülményt nagy pufferkapacitású HEPES oldattal, illetve alacsony pufferkapacitású foszfát pufferrel vizsgáltuk.

Mint a **31. B ábrán** látható, a Cl^- ion elhagyása az inkubációs oldatból (azaz a Cl^- töltéskompenzációjának gátlása) egyáltalán nem befolyásolta a keletkezett szuperoxid mennyiségét, amennyiben normális volt az extracelluláris pH, azaz a protonok áramlása rendben végbemehetett. Ezzel szemben az alacsony pufferkapacitású környezetben a H^+ koncentráció emelkedésével párhuzamosan csökkent szuperoxid termelést tapasztaltunk. Ez alapján kijelenthettük, hogy a NADPH oxidáz töltéskompenzációjában a Cl^- ionok szerepe vagy jól kompenzálódik egyéb ionokkal, vagy elenyésző. Ezzel szemben a protonok áramlásának gátlása a működő oxidázt is tartalmazó membrán két oldala között erőteljesen gátolta az enzim működését. Ennek hátterében állhat az extracelluláris acidózis miatt csökkenő elektrokémiai grádiens következtében lassuló proton töltéskompenzáció, avagy esetleg az intracelluláris acidózis, avagy az alacsony pH által gátolt proton pumpák működésének csökkenése is [180].

A fenti megközelítésen túl vizsgálni kívántuk, hogy befolyásolhatja-e a Cl^- ion valamely egyéb módon (pl. a depolarizáción keresztül) a PMN baktériumölését. Mint a **31.C ábra** mutatja, a Cl^- mentes, de nagy pufferkapacitású közegben a PMN a kontrollhoz teljesen hasonló mértékben ölte az *S. aureus*-okat, szemben az alacsony pufferkapacitású (tehát gátolt szuperoxid termelésű) mintákkal [88].

Így tehát véleményünk szerint az extracelluláris Cl^- ionok nem játszanak kiemelt szerepet a PMN NADPH-oxidázának működésében és baktériumölésében, az extracelluláris proton koncentráció emelése (acidózis) viszont gátolta a PMN működését. Az eddigi gondolatmenetet továbbgondolva vizsgáltuk, hogy a fenti mértékben

megváltoztatott extracelluláris ionösszetételnek van-e hatása a bMV-k antibakteriális hatására. E vizsgálataink háttérében az az elképzelés állt, miszerint a bMV-baktérium interakció kialakulásában esetleg szerepet játszhatnak elektrosztatikus kölcsönhatások is. Ennek megfelelően vizsgáltuk, hogy az extracelluláris környezet K^+ , H^+ , illetve Cl^- koncentrációja befolyással van-e a bMV-k antibakteriális hatására. Természetesen más ionok (pl. Ca^{++} , Mg^{++} , szerves kat- és anionok), illetve a MV felszíni polaritásának vizsgálata is felmerült, az ezzel kapcsolatos kísérletek jelenleg is folynak laboratóriumunkban. A Cl^- és K^+ ionnal kapcsolatos eredményeinket a **31.D ábra** mutatja. Látható, hogy a bMV működésére egyik vizsgált körülmény sem volt hatással, mely eredmények közül külön kiemelném, hogy – szemben a PMN-nel – acidózis esetén sem tapasztaltunk hatáscsökkenést.

Összefoglalva, a PMN és a bMV hatása között újabb különbséget tudtunk megfigyelni, amennyiben a PMN működését már gátló pH értéken a bMV antibakteriális hatása még megmaradt. A Cl^- és K^+ ionok koncentrációjának változtatására viszont mind a PMN, mind a bMV érzéketlennek bizonyult.

5. Megbeszélés

Az emberi neutrofil granulociták extracelluláris vezikuláiról már korábban is ismert volt, hogy hatással rendelkeznek mind endotél, mind monocita és makrofág sejtekre. Mindemellett munkám kezdetekor semmilyen információval nem rendelkezünk a PMN eredetű EV-knek a neutrofilek fő célpontjaira, azaz a baktériumokra kifejtett esetleges hatásairól.

Eredményeink szerint a perifériás vérből szeparált humán neutrofil granulociták mind spontán, mind pedig a legkülönbébb stimulus hatására termelnek extracelluláris vezikulákat. Meghatároztuk ezek méretét, mely alapján a vizsgált extracelluláris vezikulák a mikrovezikulák közé sorolhatóak, méretük tehát fél nagyságrenddel haladta meg a PMN granulumait, egy nagyságrenddel az exoszómák méretét. Érdekes módon méretük függetlennek bizonyult a termelődésüket kiváltó stimulustól. Ezen uniformizáltság mögött a PMN MV termelési mechanizmusának jellemzőin túl elképzelhető, hogy a MV szeparálás fizikai hatásai is megtalálhatóak. Igazoltuk, hogy az általunk vizsgált vezikulákat foszfolipid kettős membrán határolja, illetve hogy ezen membrán irányultsága (a transzmembrán fehérjék építőpjainak elhelyezkedése alapján) megegyezik a donor sejt membránjának irányultságával. Igazoltuk a CR3 két láncának (CD11b és CD18) nagy mennyiségű jelenlétét a vizsgált MV-ok membrájában. A szeparált MV-k mennyiségét, illetve fehérje összetételét alapvetően meghatározta a termelődésüket kiváltó inger. A termelést kiváltó ingerek közül ki kell emelni az opszonizált *S. aureus* jelentőségét, hiszen olyan vezikula populáció (bMV) keletkezését indukálja, mely szignifikáns antibakteriális hatással rendelkezik.

A PMN és a bMV antibakteriális mechanizmusa között számos különbséget sikerült igazolnunk. Az első markáns különbség a baktériumok opszonizációjának szükségességében rejlett: a PMN-nel szemben a bMV hatása egyáltalán nem függött a támadandó baktérium opszonizáltságától. Jelentős különbség mutatkozott a baktériumok és bMV-k közti interakció természetében is, amennyiben a PMN fagocitálja, majd a fagolizozómában támadja a baktériumokat, szemben a bMV-vel, mely a felszínéhez kötve aggregálja a baktériumokat. Eltérést mutatott a PMN, illetve a bMV működésének függése a pH-tól is, hiszen a bMV (a PMN NADPH-oxidázt gátló) savanyú pH-n is megőrizte működőképességét. Különbség mutatkozott az antibakteriális hatás jellegében

is, hiszen a PMN baktericid hatásával szemben a bMV inkább bakteriosztatikusnak tekinthető. Ugyanakkor az extracelluláris klorid ion megvonása nem befolyásolta sem a PMN, sem a bMV antibakteriális hatását. Véleményünk szerint a PMN esetében a klorid ion megvonása nem volt képes érdemben befolyásolni a NADPH-oxidáz működését, így az ettől függő intracelluláris baktériumölési mechanizmusokat sem.

Mint az irodalmi háttér tárgyalása során ismertettem, a PMN *S.aureus* eliminációja nem elképzelhető a fagocita NADPH-oxidáz működése nélkül. Ezért az oxidáz jelentőségét is vizsgáltuk kísérleteink során, viszont az ezzel kapcsolatos eredmények részletes ismertetését munkatársam, Lőrincz M. Ákos doktori értekezésében tervezzük. Röviden annyit viszont szeretnék jelezni, hogy eredményeink több irányból is igazolják, hogy a bMV hatása független az oxidáz működésétől.

	PMN	NET	bMV
ROS termelés szükségessége	+	+	-
DN-áz érzékenység	-	+	-
Opszonizáció szükségessége	+	-	-
Intakt vezikuláris szerkezet	+	-	+
Fagocitózis szükségessége	+	-	-
Citoszkeletális rendszer épsége szükséges	+	-	+
Glükóz jelenléte	-	-	+
Hatásának kialakulásához szükséges idő	azonnali	2-4 óra	20 perc
Granuláris fehérjék szükségessége	+	+	+
Antibakteriális hatás	Baktericid	Baktericid/ Bakteriostatikus	Bakteriostatikus
pH érzékenység	+	nem ismert	-

6. táblázat. A PMN, a bMV és a NET antibakteriális hatása közötti főbb különbségek.

Az eddig egyetlenként ismert PMN eredetű extracelluláris antibakteriális mechanizmus, a Neutrofil Extracellular Trap (NET) szintén számos ponton különbözik a bMV-k hatásmechanizmusától. Fontos különbség a jelenség kialakulásához szükséges idő: míg a bMV képződése 20 perc alatt telitődik, a NET kialakulása 2-4 óra alatt megy végbe. Eltér a két folyamat gátlhatósága is: a bMV működése felfüggeszthető az aktin-citoszkeleton, illetve a CR3 gátlásával, valamint a vezikulák struktúrájának károsításával, mely hatások nem befolyásolják NET-et. Különbség mutatkozik a folyamat elindulásában is: a NET képződés LPS és PMA hatására lesz a legnagyobb mértékű, a MV-ok közül

viszont az opszonizált részecskék hatására keletkeznek a hatást hordozó vezikulák. A bMV, a PMN és a NET közötti különbségeket kiemelve a **6. táblázat** mutatja.

A bMV antibakteriális hatása tehát elég sok ponton eltér a neutrofil granulocita eddig ismert antibakteriális mechanizmusoktól. Maga a bMV-függő antibakteriális hatás véleményünk szerint sok tényezőtől függ. Eddigi munkánk során ezen faktorok közül kettő hatását vizsgáltuk részletesen: a MV-ok és a baktériumok közti kapcsolatot, illetve a bMV-kben specifikusan dúsuló antibakteriális fehérjéket. A bMV és a baktérium közötti direkt kapcsolat, az aggregálódás jelentőségét jól mutatja az a megfigyelés, mely szerint az aggregátumban lévő baktériumok osztódása elmarad a kontrollhoz viszonyítva. A bMV-k és baktériumok összetapadása, illetve annak elmaradása jól korrelált a tapasztalt antibakteriális hatással, az sMV és a bMV viselkedése között ez a leglényegesebb eltérés. Az aggregáció abban az esetben is kialakult, amennyiben elölt baktériumot inkubáltunk bMV-vel, elmaradt viszont, mikor a baktériumok magukra hagyva, osztódásukhoz ideális körülmények között kerültek vizsgálatra, illetve akkor is, mikor megszüntettük a MV-ok struktúrájának épségét. Az aggregáció kialakulása gátolható volt a CR3 ($\beta 2$ integrin, Mac-1), a PI3K, illetve citoszkeletális elemek gátlásával, valamint glükóz megvonásával is. A gátlószerek hatásának értelmezése kapcsán emlékeztetnék azon tanulmányokra, melyek szerint a CR3 konformációját (ez által affinitását) „inside out” jelátviteli utak is befolyásolják. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a bMV-ken a CR3 konformációja – monocitákhoz hasonlóan [52] – eleinte alacsony affinitású formájában van jelen, mely konformáció viszont a jelenlévő baktériumokkal kapcsolódva megváltozik, aminek következtében a CR3 ligandkötő affinitása megnő. Ez a folyamat ismertén aktin-citoszkeleton rendszer függő, melynek működése energiát is igényel. Ez esetben érthetővé válna, hogy miért befolyásolja a bMV antibakteriális hatását a citoszkeleton gátlása, avagy a glükóz megvonása.

Szintén erős korrelációt tapasztaltunk az aggregátumba került MV-k mennyisége, illetve a MV-k hatása között. A hatás jelentőségére hívja fel a figyelmet a pMV és a bMV közötti különbség, elképzelhetőnek tartjuk, hogy a pMV gyengébb hatásának egyik okát az adott aggregátumban egy baktériumra jutó MV-ok számának különbségében kell keresni. A nagy méretű aggregátumok kialakulása jól gátolható volt ugyanazon körülményekkel, melyek a baktérium megkötését is gátolták. E gátló hatás mögött – azon feltételezésből kiindulva, hogy előbb bMV-baktérium interakció alakul ki, majd ehhez

kapcsolódnak újabb baktériumok és MV-ok – véleményünk szerint a baktériumok megragadásának elmaradása állhat. Erre utal az a megfigyelés is, hogy a magukra hagyott MV-ok nem képeznek aggregátumokat.

A bMV antibakteriális hatásának másik fontos összetevője lehet a bMV-kre jellemző antibakteriális fehérjék dúsulása. Véleményünk szerint ezen fehérjék megjelenése a MV-okban aktív folyamatok eredménye (mint erre indirekten a keletkező bMV-k fehérje tartalma és hatásuk közti összefüggés, illetve a MPO intravezikuláris elhelyezkedése is utal). Ezen fehérjék véleményünk szerint felelősek lehetnek az antibakteriális hatásért is, amennyiben az aggregátumban igen magas lokális koncentrációt érhetnek el. E kérdés tisztázására jelenleg is folynak laboratóriumunkban kutatások.

Ex vivo vizsgálataink során egészséges donorok, illetve *S. aureus* fertőzésben szenvedő betegek vérplazmájában sikeresen izoláltunk PMN eredetű MV-okat. Ezek mennyisége többszörösen nagyobb volt a betegekben, baktériumokkal szemben tanúsított viselkedésük (aggregátum képző hajlama) pedig nagyban hasonlított egészségesek esetén az sMV, a betegek esetén pedig a bMV *in vitro* viselkedésére. Tekintve más kutatócsoportok eredményeit is [164], elképzelhetőnek tarjuk, hogy az általunk *in vitro* indukált MV-okhoz hasonló vezikulák *in vivo* is megjelennek.

Összességében tehát kutatásaink során az emberi neutrofil granulociták egy korábban nem ismert extracelluláris antibakteriális mechanizmusát tártuk fel, melynek működése független a támadandó baktériumok opszonizációjától.

6. Következtetések

Doktori munkám során a neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulák egy csoportjának, a mikrovezikuláknak mennyiségi, minőségi és funkcionális vizsgálatát végeztem, különös tekintettel ezen vezikuláknak a baktériumokra kifejtett hatására. Vizsgáltam továbbá az extracelluláris ionkörnyezet szerepét a neutrofil granulocita, illetve a fenti mikrovezikuláknak a baktériumokra kifejtett hatására. Munkám során a következő megállapításokra jutottam:

- A humán neutrofil granulocita spontán is termel mikrovezikulákat, azonban ezek mennyisége és összetétele is változik, amennyiben a sejtet meghatározott külső ingerek érik. Kiemelt jelentősége van ezen ingerek között opsonizált részecskék bekebelezésének, mivel az ilyen hatásra termelődött MV-ok nagy mennyiségű antibakteriális fehérjét tartalmaznak. Az általunk alkalmazott ágensek a neutrofilek életképességét nem befolyásolták a mikrovezikulák termelése során.
- Az opsonizált *Staphylococcus aureus* hatására keletkezett mikrovezikulák antibakteriális hatással rendelkeznek. Hatásuk vizsgálataink szerint bakteriosztatikus, független a támadandó baktériumok opsonizációjától, valamint többféle (de nem az összes) baktériumtörzssel szemben igazolható. Az antibakteriális hatás alapja a mikrovezikulák és a baktériumok összetapadása. Minél több baktérium kerül ilyen kapcsolatba, illetve minél több vezikula található egy-egy baktériummal összetapadva, annál erősebb az antibakteriális hatás. A komplement receptor 3, az aktin-citoszkeleton, illetve a PI3K gátlása, valamint a glükóz megvonása egyaránt gátolta a fenti baktérium-vezikula kapcsolat, valamint az antibakteriális hatás kialakulását. Mindemellett hasonló jellegű és viselkedésű mikrovezikulák jelenlétét sikerült igazolni *Staphylococcus aureus* infekcióban szenvedők vérplazmájában. A neutrofil granulociták mikrovezikulái egy korábban nem leírt extracelluláris antibakteriális mechanizmussal rendelkeznek.

- Az extracelluláris ionkörnyezetben jelentős klorid-ion megvonása nincs hatással sem a neutrofil granulociták NADPH-oxidázának, sem intracelluláris, sem mikrovezikulákon alapuló antibakteriális mechanizmusainak működésére. Az extracelluláris acidózis ugyanakkor hatékonyan gátolja a NADPH-oxidáz működését, a mikrovezikulákét viszont nem.

Összefoglalás

Keringő fehérvérsejtjeink között a legnagyobb arányban előforduló sejtjeink, a neutrofil granulociták alapvető résztvevői szervezetünk immunrendszerének. Elsőként érkeznek a fertőzés helyére, ahol legfőbb célpontjaikat baktériumok és egysejtű gombák jelentik. Baktériumölő mechanizmusuk a támadandó részecske bekebelezésén (fagocitózisán), majd annak sejten belül, fagolizoszómában történő elpusztításán és lebontásán alapul.

A közelmúltban felismert extracelluláris vezikulák termelésére minden eddig vizsgált sejttípus képesnek mutatkozott. Funkcióik nagyban függenek az őket létrehozó sejttől, így igen változatosak lehetnek. Ismert szerepük a sejtek közti hírközléstől kezdve különböző RNS-ek szállításán át komplett fehérjék transzportjáig, a véralvadási folyamatok elindításában és modulálásában, csakúgy mint például daganatos sejtek áttétképzésében. Ugyanakkor a neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulákról igen kevés ismerettel rendelkezünk.

Munkám során a neutrofil eredetű extracelluláris vezikulák egy alpopulációjával, a mikrovezikulákkal foglalkoztam. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a PMN különböző hatásokra különböző összetételű és funkciójú mikrovezikulákat termel. Az opszonizált részecskék fagocitózisát követően keletkezett mikrovezikulák speciális tulajdonsága, hogy többféle baktérium növekedését is gátolják. Ezekben a vezikulákban antibakteriális fehérjék és felszíni integrinek dúsulását is igazoltuk. A mikrovezikulák antibakteriális hatása a baktériumok és a mikrovezikulák közvetlen kapcsolatán alapul, azonban – szemben a neutrofil granulocita működésével – független a támadandó baktériumok opszonizációjától, illetve az extracelluláris acidózistól. A vezikulák nem opszonizált baktériummal szemben mutatott antibakteriális hatása meghaladja a PMN ugyanezen kapacitását. A fenti eredmények mellett nagy számban sikerült kimutatnunk bakteriális fertőzésben szenvedő betegek vérplazmájából neutrofil eredetű mikrovezikulákat, melyek vizsgálataink szerint sok hasonlóságot mutattak az *in vitro* antibakteriális hatást mutató mikrovezikulákkal.

Összességében tehát munkánk során a neutrofil granulocita egy eddig nem ismert, extracelluláris baktérium növekedést gátló mechanizmusát írtuk le.

Summary

Human neutrophilic granulocytes are the most abundant leukocytes in our blood. These cells play fundamental role in the immune system. They are the first to migrate to the site of infections, where their main function is to eliminate microorganisms (such as bacteria and fungi). The process involves engulfment and segregation of the microorganisms intracellularly, in phagolysosomes.

In recent years the existence and effects of cell-derived extracellular vesicles (e.g. exosomes and microvesicles) have been revealed in several physiological functions, depending mainly on the type of their original cell. The importance of these vesicles have been demonstrated in intercellular communication, transfer of different type of RNA or proteins, modulation of haemostasis, or in metastatization of tumour cells. Neutrophilic granulocytes were also shown to create such particles, but little is known about their functions.

Our aim was to investigate neutrophilic granulocyte-derived extracellular vesicles. We observed that composition and function of the produced vesicles highly depends on the stimulant of the PMN. One type of investigated particles, the microvesicles produced upon opsonized bacterial stimuli represents specific accumulation of antibacterial proteins, and also a significant effect on bacterial survival. This antibacterial effect requires direct bacteria-vesicle interaction, but it is independent from opsonisation of bacteria and also from acidosis of the extracellular environment. The antibacterial capacity of these vesicles against opsonin free bacteria exceeded the capacity of PMN. We were able to detect a large number of neutrophil derived microvesicles in the blood plasma of bacteremic patients. *Ex vivo* these vesicles formed large aggregates with bacteria, similar to *in vitro* generated microvesicles.

Taken together, in our experiments we described a new extracellular bacteriostatic mechanism of neutrophilic granulocytes.

Irodalomjegyzék

1. Erdei, A., *Immunológia*. 2012.
2. Bailey, M., Z. Christoforidou, and M. Lewis, *Evolution of immune systems: specificity and autoreactivity*. *Autoimmunity reviews*, 2013. **12**(6): p. 643-7.
3. Boehm, T., *Evolution of vertebrate immunity*. *Current biology : CB*, 2012. **22**(17): p. R722-32.
4. Maynard-Smith, J. and E. Szathmáry, *Az evolúció nagy lépései*. 1997.
5. Kopper, L. and Z. Schaff, *Patológia* 2006.
6. Murphy, K.C., *Janeway's Immunobiology, 8th Edition*. 8th ed. 2011.
7. Schubert, J., M. Hundt, and R.E. Schmidt, *Fc gamma receptor mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils (PMN)*. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 1992. **40**(1): p. 65-6.
8. Liu, D., A.M. Rhebergen, and S.C. Eisenbarth, *Licensing Adaptive Immunity by NOD-Like Receptors*. *Frontiers in immunology*, 2013. **4**: p. 486.
9. Cichocki, F., E. Sitnicka, and Y.T. Bryceson, *NK cell development and function - Plasticity and redundancy unleashed*. *Semin Immunol*, 2014.
10. Cooper, M.D. and B.R. Herrin, *How did our complex immune system evolve?* *Nature reviews. Immunology*, 2010. **10**(1): p. 2-3.
11. Lee, M.S. and Y.J. Kim, *Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space*. *Mol Cells*, 2007. **23**(1): p. 1-10.
12. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. *Nature*, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
13. Fraser, D.A. and A.J. Tenner, *Directing an appropriate immune response: the role of defense collagens and other soluble pattern recognition molecules*. *Current drug targets*, 2008. **9**(2): p. 113-22.
14. Beutler, B. and E.T. Rietschel, *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 169-76.
15. Weber, J.R., et al., *Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein*. *Immunity*, 2003. **19**(2): p. 269-79.
16. Dinauer, M.C., *The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1993. **30**(4): p. 329-69.
17. Newburger, P.E. and D.C. Dale, *Evaluation and management of patients with isolated neutropenia*. *Semin Hematol*, 2013. **50**(3): p. 198-206.

18. Chopra, M., J.S. Reuben, and A.C. Sharma, *Acute lung injury:apoptosis and signaling mechanisms*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(4): p. 361-71.
19. Dal Nogare, A.R., *Adult respiratory distress syndrome*. Am J Med Sci, 1989. **298**(6): p. 413-30.
20. Burns, A.R., C.W. Smith, and D.C. Walker, *Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung*. Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 309-36.
21. Pruchniak, M.P., M. Arazna, and U. Demkow, *Life of neutrophil: from stem cell to neutrophil extracellular trap*. Respiratory physiology & neurobiology, 2013. **187**(1): p. 68-73.
22. Kobayashi, S.D., et al., *Neutrophils in the innate immune response*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(6): p. 505-17.
23. Kennedy, A.D. and F.R. DeLeo, *Neutrophil apoptosis and the resolution of infection*. Immunologic research, 2009. **43**(1-3): p. 25-61.
24. Beck, W.S., *Occurrence and control of the phosphogluconate oxidation pathway in normal and leukemic leukocytes*. The Journal of biological chemistry, 1958. **232**(1): p. 271-83.
25. Cid, M.C., et al., *Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions*. Arthritis and rheumatism, 2000. **43**(1): p. 184-94.
26. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
27. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature reviews. Immunology, 2007. **7**(9): p. 678-89.
28. Dixit, N. and S.I. Simon, *Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 188.
29. Schymeinsky, J., A. Mocsai, and B. Walzog, *Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 262-73.
30. Watzl, C. and E.O. Long, *Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells*. Curr Protoc Immunol, 2010. **Chapter 11**: p. Unit 11 9B.
31. Nusbaum, P., et al., *Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization*. Biochemical Society transactions, 2004. **32**(Pt3): p. 477-9.

32. Erttmann, S.F., N.O. Gekara, and M. Fallman, *Bacteria Induce Prolonged PMN Survival via a Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C- and Protein Kinase C-Dependent Mechanism*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87859.
33. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annual review of immunology, 2002. **20**: p. 825-52.
34. Rabiet, M.J., E. Huet, and F. Boulay, *The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview*. Biochimie, 2007. **89**(9): p. 1089-106.
35. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2003. **5**(14): p. 1299-306.
36. Lee, C.Y., M. Herant, and V. Heinrich, *Target-specific mechanics of phagocytosis: protrusive neutrophil response to zymosan differs from the uptake of antibody-tagged pathogens*. Journal of cell science, 2011. **124**(Pt 7): p. 1106-14.
37. Arbo, A., N. Pavia-Ruz, and J.I. Santos, *Opsonic requirements for the respiratory burst of neutrophils against Giardia lamblia trophozoites*. Archives of medical research, 2006. **37**(4): p. 465-73.
38. Youinou, P., et al., *Pathogenic effects of anti-Fc gamma receptor IIIb (CD16) on polymorphonuclear neutrophils in non-organ-specific autoimmune diseases*. Autoimmunity reviews, 2002. **1**(1-2): p. 13-9.
39. Caron, E. and A. Hall, *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1717-21.
40. Suzuki, T., et al., *Interaction of non-adherent suspended neutrophils to complement opsonized pathogens: a new assay using optical traps*. Cell Res, 2006. **16**(11): p. 887-94.
41. Schymeinsky, J., et al., *A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo*. Blood, 2009. **114**(19): p. 4209-20.
42. Davis, G.E., *The Mac-1 and p150,95 beta 2 integrins bind denatured proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion*. Exp Cell Res, 1992. **200**(2): p. 242-52.
43. Garnotel, R., et al., *Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95)*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5928-34.
44. Walzog, B., et al., *The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen*. Exp Cell Res, 1995. **218**(1): p. 28-38.
45. Loike, J.D., et al., *The role of protected extracellular compartments in interactions between leukocytes, and platelets, and fibrin/fibrinogen matrices*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **667**: p. 163-72.

46. Ross, G.D. and V. Vetvicka, *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(2): p. 181-4.
47. Kellersch, B. and W. Kolanus, *Membrane-proximal signaling events in beta-2 integrin activation*. Results Probl Cell Differ, 2006. **43**: p. 245-57.
48. Schober, J.M., et al., *Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4457-65.
49. Ross, G.D., J.A. Cain, and P.J. Lachmann, *Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b*. J Immunol, 1985. **134**(5): p. 3307-15.
50. Thornton, B.P., et al., *Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18)*. J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1235-46.
51. Tan, S.M., *The leucocyte beta2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties*. Biosci Rep, 2012. **32**(3): p. 241-69.
52. Flannagan, R.S., et al., *Dynamic macrophage "probing" is required for the efficient capture of phagocytic targets*. J Cell Biol, 2010. **191**(6): p. 1205-18.
53. Bowen, T.J., et al., *Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein*. J Pediatr, 1982. **101**(6): p. 932-40.
54. Anderson, D.C. and T.A. Springer, *Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins*. Annu Rev Med, 1987. **38**: p. 175-94.
55. Csepanyi-Komi, R., et al., *ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutrophilic granulocytes*. Blood, 2012. **119**(2): p. 573-82.
56. Moskwa, P., et al., *Participation of Rac GTPase activating proteins in the deactivation of the phagocytic NADPH oxidase*. Biochemistry, 2002. **41**(34): p. 10710-6.
57. Winterbourn, C.C. and A.J. Kettle, *Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **18**(6): p. 642-60.
58. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
59. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.

60. Rittner, H.L., et al., *CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(8): p. 1021-32.
61. Lee, W.Y., et al., *In vitro neutrophil transepithelial migration*. Methods in molecular biology, 2006. **341**: p. 205-15.
62. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system*. Journal of leukocyte biology, 2009. **85**(3): p. 344-51.
63. Brack, A., et al., *Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells*. Pain, 2004. **112**(3): p. 229-38.
64. Rittner, H.L., et al., *Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2006. **20**(14): p. 2627-9.
65. Zarembek, K.A., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes inhibit Aspergillus fumigatus conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion*. Journal of immunology, 2007. **178**(10): p. 6367-73.
66. de Gaetano, G., C. Cerletti, and V. Evangelista, *Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction*. Haemostasis, 1999. **29**(1): p. 41-9.
67. Downing, L.J., et al., *Neutrophils are the initial cell type identified in deep venous thrombosis induced vein wall inflammation*. ASAIO journal, 1996. **42**(5): p. M677-82.
68. Abo, A., et al., *Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 668-70.
69. Hall, A., *Ras-related GTPases and the cytoskeleton*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(5): p. 475-9.
70. Roberts, A.W., et al., *Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense*. Immunity, 1999. **10**(2): p. 183-96.
71. Dahlgren, C. and A. Karlsson, *Respiratory burst in human neutrophils*. Journal of immunological methods, 1999. **232**(1-2): p. 3-14.
72. Foote, C.S., T.E. Goyne, and R.I. Lehrer, *Assessment of chlorination by human neutrophils*. Nature, 1983. **301**(5902): p. 715-6.
73. Thomas, E.L., M.B. Grisham, and M.M. Jefferson, *Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils*. J Clin Invest, 1983. **72**(2): p. 441-54.
74. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.

75. Rada, B., et al., *Role of Nox2 in elimination of microorganisms*. Seminars in immunopathology, 2008. **30**(3): p. 237-53.
76. Homme, M., et al., *Myeloperoxidase deficiency in mice exacerbates lung inflammation induced by nonviable Candida albicans*. Inflamm Res, 2013. **62**(11): p. 981-90.
77. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of Staphylococcus aureus by neutrophils*. Infection and immunity, 1996. **64**(9): p. 3512-7.
78. Aratani, Y., et al., *Severe impairment in early host defense against Candida albicans in mice deficient in myeloperoxidase*. Infection and immunity, 1999. **67**(4): p. 1828-36.
79. Tirali, R.E., et al., *Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro*. Aust Endod J, 2013. **39**(1): p. 15-8.
80. Gray, M.J., W.Y. Wholey, and U. Jakob, *Bacterial responses to reactive chlorine species*. Annu Rev Microbiol, 2013. **67**: p. 141-60.
81. Mohammadi, Z. and S. Shalavi, *Antimicrobial activity of sodium hypochlorite in endodontics*. J Mass Dent Soc, 2013. **62**(1): p. 28-31.
82. Touati, D., *The molecular genetics of superoxide dismutase in E. coli. An approach to understanding the biological role and regulation of SODS in relation to other elements of the defence system against oxygen toxicity*. Free Radic Res Commun, 1989. **8**(1): p. 1-9.
83. Janssen, R., et al., *Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of Salmonella typhimurium*. Microbes Infect, 2003. **5**(6): p. 527-34.
84. Nauseef, W.M., *Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency*. Journal of molecular medicine, 1998. **76**(10): p. 661-8.
85. Lanza, F., *Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency*. Journal of molecular medicine, 1998. **76**(10): p. 676-81.
86. DeCoursey, T.E., D. Morgan, and V.V. Cherny, *The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels*. Nature, 2003. **422**(6931): p. 531-4.
87. Rada, B.K., et al., *Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2947-53.
88. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. Annual review of immunology, 2005. **23**: p. 197-223.
89. Rada, B.K., et al., *Calcium signalling is altered in myeloid cells with a deficiency in NADPH oxidase activity*. Clin Exp Immunol, 2003. **132**(1): p. 53-60.

90. Segal, A.W., et al., *The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH*. Nature, 1981. **290**(5805): p. 406-9.
91. Jankowski, A., C.C. Scott, and S. Grinstein, *Determinants of the phagosomal pH in neutrophils*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(8): p. 6059-66.
92. Reeves, E.P., et al., *Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 291-7.
93. Fonyó, A., *Az orvosi élektan tankönyve*. 2014, Budapest.
94. Vethanayagam, R.R., et al., *Role of NADPH oxidase versus neutrophil proteases in antimicrobial host defense*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28149.
95. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
96. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
97. Bianchi, M., et al., *Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis*. Blood, 2009. **114**(13): p. 2619-22.
98. Pilszczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
99. Remijsen, Q., et al., *Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 581-8.
100. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
101. Young, R.L., et al., *Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of Pseudomonas aeruginosa: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23637.
102. Khatua, B., K. Bhattacharya, and C. Mandal, *Sialoglycoproteins adsorbed by Pseudomonas aeruginosa facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9*. Journal of leukocyte biology, 2012. **91**(4): p. 641-55.
103. Menten-Dedoyart, C., et al., *Neutrophil extracellular traps entrap and kill Borrelia burgdorferi sensu stricto spirochetes and are not affected by Ixodes ricinus tick saliva*. Journal of immunology, 2012. **189**(11): p. 5393-401.
104. Jenne, C.N., et al., *Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(2): p. 169-80.
105. McDonald, B., et al., *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 324-33.
106. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1386-93.

107. Menegazzi, R., E. Decleva, and P. Dri, *Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore?* Blood, 2012. **119**(5): p. 1214-6.
108. Bruns, S., et al., *Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA.* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000873.
109. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma.* British journal of haematology, 1967. **13**(3): p. 269-88.
110. Slavkin, H.C., et al., *Matrix vesicle heterogeneity: possible morphogenetic functions for matrix vesicles.* Fed Proc, 1976. **35**(2): p. 127-34.
111. Batagov, A.O. and I.V. Kurochkin, *Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions.* Biol Direct, 2013. **8**: p. 12.
112. Huang, X., et al., *Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing.* BMC Genomics, 2013. **14**: p. 319.
113. Pigati, L., et al., *Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells.* PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13515.
114. Kogure, T., et al., *Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339: A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer.* Genes Cancer, 2013. **4**(7-8): p. 261-72.
115. Stoorvogel, W., et al., *The biogenesis and functions of exosomes.* Traffic, 2002. **3**(5): p. 321-30.
116. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
117. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses.* Nature reviews. Immunology, 2009. **9**(8): p. 581-93.
118. Gyorgy, B., et al., *Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters.* Blood, 2011. **117**(4): p. e39-48.
119. Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi, *Shedding microvesicles: artefacts no more.* Trends in cell biology, 2009. **19**(2): p. 43-51.
120. Camussi, G., et al., *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication.* Kidney international, 2010. **78**(9): p. 838-48.
121. Nomura, S., Y. Ozaki, and Y. Ikeda, *Function and role of microparticles in various clinical settings.* Thrombosis research, 2008. **123**(1): p. 8-23.

122. Gyorgy, B., et al., *Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49726.
123. Willekens, F.L., et al., *Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2141-5.
124. Calzolari, A., et al., *TjR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 21): p. 4486-98.
125. Clayton, A. and Z. Tabi, *Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **34**(3): p. 206-13.
126. Viaud, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4942.
127. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. Nature cell biology, 2008. **10**(5): p. 619-24.
128. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nature cell biology, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
129. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
130. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nature cell biology, 2007. **9**(6): p. 654-9.
131. Peters, D.L. and P.J. Pretorius, *Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour*. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2011. **412**(11-12): p. 806-11.
132. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovascular research, 2003. **59**(2): p. 277-87.
133. Puddu, P., et al., *The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases*. The Canadian journal of cardiology, 2010. **26**(4): p. 140-5.
134. Muller, I., et al., *Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003. **17**(3): p. 476-8.
135. Kahlert, C. and R. Kalluri, *Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis*. Journal of molecular medicine, 2013. **91**(4): p. 431-7.

136. Kesimer, M., et al., *Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2009. **23**(6): p. 1858-68.
137. Bhatnagar, S., et al., *Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3234-44.
138. Bhatnagar, S. and J.S. Schorey, *Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(35): p. 25779-89.
139. Aalberts, M., et al., *Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans*. Biology of reproduction, 2012. **86**(3): p. 82.
140. !!! INVALID CITATION !!!
141. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
142. Timar, C.I., et al., *Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes*. Blood, 2013. **121**(3): p. 510-8.
143. Takasaki, K.T., J.B. Ding, and B.L. Sabatini, *Live-cell superresolution imaging by pulsed STED two-photon excitation microscopy*. Biophysical journal, 2013. **104**(4): p. 770-7.
144. Kittel, A., A. Falus, and E. Buzas, *Microencapsulation technology by nature: Cell derived extracellular vesicles with therapeutic potential*. European journal of microbiology & immunology, 2013. **3**(2): p. 91-6.
145. Gyorgy, B., et al., *Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube*. Thrombosis research, 2014. **133**(2): p. 285-92.
146. Sharma, S., et al., *Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 2011. **27**(23): p. 14394-400.
147. Leong, H.S., et al., *Validation of flow cytometric detection of platelet microparticles and liposomes by atomic force microscopy*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2011. **9**(12): p. 2466-76.
148. Mesri, M. and D.C. Altieri, *Endothelial cell activation by leukocyte microparticles*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4382-7.

149. Mesri, M. and D.C. Altieri, *Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23111-8.
150. Hong, Y., et al., *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(1): p. 49-62.
151. Daniel, L., et al., *Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis*. Kidney Int, 2006. **69**(8): p. 1416-23.
152. Eken, C., et al., *Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 817-24.
153. Eken, C., et al., *Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages*. J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39914-21.
154. Eken, C., et al., *Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages*. Immunobiology, 2013. **218**(3): p. 382-92.
155. Gasser, O., et al., *Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils*. Exp Cell Res, 2003. **285**(2): p. 243-57.
156. Gasser, O. and J.A. Schifferli, *Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2543-8.
157. Hess, C., et al., *Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4564-73.
158. Sadallah, S., et al., *Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6543-52.
159. Sadallah, S., C. Eken, and J.A. Schifferli, *Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(5): p. 1316-25.
160. Sadallah, S., C. Eken, and J.A. Schifferli, *Ectosomes as immunomodulators*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(5): p. 487-95.
161. Sadallah, S., C. Eken, and J.A. Schifferli, *Ectosomes as modulators of inflammation and immunity*. Clin Exp Immunol, 2011. **163**(1): p. 26-32.
162. Duarte, T.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation*. Tuberculosis (Edinb), 2012. **92**(3): p. 218-25.
163. Dalli, J. and C.N. Serhan, *Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators*. Blood, 2012. **120**(15): p. e60-72.

164. Nieuwland, R., et al., *Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 930-5.
165. Watanabe, J., et al., *Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(35): p. 33161-8.
166. Pluskota, E., et al., *Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles*. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2327-35.
167. Smith, R.J., J.M. Justen, and L.M. Sam, *Function and stimulus-specific effects of phorbol 12-myristate 13-acetate on human polymorphonuclear neutrophils: autoregulatory role for protein kinase C in signal transduction*. *Inflammation*, 1988. **12**(6): p. 597-611.
168. Schumann, M.A., C.C. Leung, and T.A. Raffin, *Activation of NADPH-oxidase and its associated whole-cell H⁺ current in human neutrophils by recombinant human tumor necrosis factor alpha and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(22): p. 13124-32.
169. Ocana, M.G., et al., *Autoregulation mechanism of human neutrophil apoptosis during bacterial infection*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(7): p. 2087-96.
170. Pelus, L.M., et al., *The CXCR4 agonist peptide, CTCE-0021, rapidly mobilizes polymorphonuclear neutrophils and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood and synergizes with granulocyte colony-stimulating factor*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(3): p. 295-307.
171. Punzel, M. and A.D. Ho, *Divisional history and pluripotency of human hematopoietic stem cells*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001. **938**: p. 72-81; discussion 81-2.
172. Pigault, C., et al., *Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes*. *J Mol Biol*, 1994. **236**(1): p. 199-208.
173. Muschter, S., T. Berthold, and A. Greinacher, *Developments in the definition and clinical impact of human neutrophil antigens*. *Curr Opin Hematol*, 2011. **18**(6): p. 452-60.
174. Sato, M., et al., *Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A*. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 417-25.
175. Lee, C.Y., M. Herant, and V. Heinrich, *Target-specific mechanics of phagocytosis: protrusive neutrophil response to zymosan differs from the uptake of antibody-tagged pathogens*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 7): p. 1106-14.
176. de Oliveira, C.A. and B. Mantovani, *Latrunculin A is a potent inhibitor of phagocytosis by macrophages*. *Life sciences*, 1988. **43**(22): p. 1825-30.

177. Holzinger, A., *Jasplakinolide: an actin-specific reagent that promotes actin polymerization*. *Methods Mol Biol*, 2009. **586**: p. 71-87.
178. Powis, G., et al., *Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase*. *Cancer Res*, 1994. **54**(9): p. 2419-23.
179. Jakus, Z., et al., *Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins*. *Trends in cell biology*, 2007. **17**(10): p. 493-501.
180. El Chemaly, A. and N. Demaurex, *Do Hv1 proton channels regulate the ionic and redox homeostasis of phagosomes?* *Molecular and cellular endocrinology*, 2012. **353**(1-2): p. 82-7.

Saját közlemények jegyzéke

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR and Ligeti E, *Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes*. Blood, 2013. **121**(3): p. 510-8.

IF: 9.898

Rada B, Hably C, Meczner A, **Timar C**, Lakatos G, Enyedi P and Ligeti E, *Role of Nox2 in elimination of microorganisms*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(3): p. 237-53.

IF: 2.971

Egyéb publikációk:

Jani PK, Kajdacs E, Megyeri M, Dobo J, Doleschall Z, Futosi K, **Timar CI**, Mocsai A, Mako V, Gal P and Cervenak L, *MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: a novel link between complement system and neutrophil granulocytes*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87104.

IF: 3.730

Timar CI, Lorincz AM and Ligeti E, *Changing world of neutrophils*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2013. **465**(11): p. 1521-33

IF: 4.866

Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, **Timar C** and Ligeti E, *Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2947-53.

IF: 9.782

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni Ligeti Erzsébet Professzor Asszonynak, hogy már tudományos diákkörösként laborjába fogadott, alakította szemléletemet, megismertette és megszerettette velem a kutatómunkát

Külön szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Spät András akkori, valamint Dr. Hunyadi László jelenlegi intézetvezetőnek, akik lehetővé tették kutatásaimat, kérdéseikkel és meglátásaikkal végig inspiráltak annak során.

Hálával tartozok Dr. Lőrincz M. Ákosnak a közösen, nagyszerű hangulatban, már tudományos diákkörös hallgató kora óta végzett kutatómunkáért, a rengeteg ötletért és kritikus szemléletéért.

Külön köszönettel tartozok Dr. Iványi Zsoltnak a betegmintákkal kapcsolatos rengeteg segítségért, valamint segítő, szemléletemet formáló meglátásaiért, széles körű gondolataiért.

Köszönettel tartozom Dr. Kittel Ágnesnek az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott nagyszerű segítségéért, valamint Veres Dánielnek a dinamikus fényszórási mérésekben nyújtott elengedhetetlen segítségéért, valamint Dr. Ken McLeish-nek a proteomikai mérések elvégzéséért.

Kiemelten szeretnék köszönetet mondani Dr. Buzás Editnek, valamint Dr. Nagy Györgynek témám kutatása során adott ötleteikért és folyamatos támogatásukért.

Szeretném megköszönni Dr. Rada Balázsnak, Dr. Káldi Krisztinának és Dr. Sirokmány Gábornak, hogy már tudományos diákkörös éveim alatt is segítettek munkám és hogy oly sokat tanulhattam tőlük az évek során.

Köszönet illeti tudományos diákkörös hallgatóimat, Vályi-Nagy Annát, Mák Ádámot és Lipták Ritát az izgalmas közös munkáért és rengeteg inspirációért, amit tőlük kaptam

Köszönet illeti Dr. Csépanyi-Kömi Rolandot, Dr. Geiszt Miklóst, Dr. Mócsai Attilát, Dr. Patryk Moskwát, Dr. Jakus Zoltánt, Horváthné Seres Erzsébetet, Fedina Editet, Járay Györgyit és Tóth-Kun Reginát segítségükért és azért a vidám légkörért, melyben dolgozhattam.

És természetesen köszönet illeti a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetének valamennyi munkatársát a sok segítségért és a jó hangulatért.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatai