

Humán neutrofil granulociták mikrovezikuláinak antibakteriális hatása

Doktori értekezés

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
Nyitrai Dr. Pap Erna egyetemi docens, Ph.D.

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

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

Budapest
2014

BEVEZETÉS

Keringő fehérvérsejtjeink között a legnagyobb arányban előforduló sejtjeink, a neutrofil granulociták (polimorfonukleáris sejtek, PMN) alapvető résztvevői szervezetünk immunrendszerének. Elsőként érkeznek a fertőzés helyére, ahol legfőbb célpontjaikat baktériumok és egysejtű gombák jelentik. Célpontjaikat mintázatfelismerő, valamint opszonin receptoraikkal ismerik fel. Baktériumölő mechanizmusuk a klasszikus felfogás szerint a támadandó részecske bekebelezésén (fagocitózisán), majd annak sejten belül, fagolizoszómában történő elpusztításán és lebontásán alapul. A baktériumok fagolizoszómában való elpusztításában alapvető szerepet játszik a granulocita NADPH oxidáz, mely enzimkomplex szuperoxid aniont termel a fagolizoszómális lumen felé. Ennek hiányában bizonyos baktériumok (pl. *Staphylococcus aureus*) eliminációja zavart szenved, szemben pl. az *Escherichia coli* eliminációjával. E mellett ismert egy extracelluláris antibakteriális mechanizmusuk is, melynek során a neutrofil granulocita különböző antimikrobiális hatású fehérjék kíséretében leadja nukleáris DNS-ét az extracelluláris tér felé, mely DNS az extracelluláris térben mintegy hálót alkotva csapdába ejti mind a kórokozókat, mind az antimikrobiális fehérjéket, melyek így hosszan kifejthetik hatásukat az immobilizált mikrobákra.

A közelmúltban felismert extracelluláris vezikulák foszfolipid kettősréteggel határolt, citoszólikus és integráns membránfehérjéket, valamint különböző RNS-eket (m-, mi-, t-, r-,

avagy nem kódoló RNS szekvenciák) tartalmazó képletek. Méretül 10 nm és 4 μm között változik, termelésükre minden eddig vizsgált sejttípus képesnek mutatkozott. Osztályzásuk részint méretük, részint képződésükön alapul, a legkisebb méretű (10-100 nm közötti) exoszómák a multivezikuláris testek exocitózisával adódnak le, a 100-1000 nm közötti mikrovezikulák (MV) a plazmamembrán bimbózásával keletkeznek, míg az apoptotikus testek (1-4 μm) a sejtek apoptózisa során jönnek létre. Funkcióik nagyban függenek az őket létrehozó sejtől, így ezek 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, korábbi közlemények elsősorban ezek immunmoduláns hatásait vizsgálták.

A korábbi közlemények azonban kevésbé vizsgálták annak lehetőségét, hogy a különböző stimulusokra különböző összetételű és funkciójú szubcelluláris vezikulák keletkeznek-e, illetve arról sem rendelkezünk semmilyen információval, hogy a neutrofil granulocita eredetű vezikulák hatnak-e, hathatnak-e közvetlenül a baktériumok túlélésére.

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.

MÓDSZEREK

A neutrofil granulociták izolálása

Önkéntes, egészséges donoroktól származó friss, citráttal alvadásgátolt vérmintákból sűrűség alapján, Ficole-Paque grádiens segítségével különítettük el a neutrofil granulocitákat. A kinyert preparátum sejtszámát Bürker kamra segítségével, Türk-festéssel mértük, sejtösszetételét Giemsa-festéssel határoztuk meg.

Mikrovezikulák (MV) termeltetése és preparálása PMN-ekből

A mikrovezikulákat az őket termelő sejtektől, avagy a vérplazma sejtes elemeitől 5 perces, 500 g-s centrifugálással, valamint az ezt követő 5 µm-es szűrővel izoláltuk. Magukat a MV-okat egy újabb, 15700 g-s, 10 perces centrifugálással ülepítettük, majd ezeket friss médiumban felvéve alkalmaztuk kísérleteinkben.

A mikrovezikulák mennyiségének becslése – a fehérjemennyiség analízise

A MV-ok mennyiségének meghatározására kétféle módszert alkalmaztunk: fehérje tartalom változásának követését, valamint áramlási citométert. A vizsgált MV frakció fehérjetartalmának meghatározásához Bradford módszert alkalmaztunk. Irodalmi adatok alapján feltételezve, hogy az esetleges szolúbilis fehérjék az általunk használt szeparálási módszerrel nem ülepíthetőek, illetve áramlási citométerrel igazolva a preparátumok sejtmertességét, a mintákban mért, újonnan megjelent fehérje mennyiséget MV eredetűnek tartottuk. Bakteriális hatásra termelt MV 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.

A mikrovezikulák mennyiségének becslése – áramlási citométer alkalmazása

A MV mérettartományába eső, vezikuláris természetű, PMN eredetű események mennyiségét áramlási citométer segítségével vizsgáltuk. A detektált események vezikuláris természetét detergens (10% „Triton X 100” 5 perc, szobahőn, enyhe rázás) hozzáadásával igazoltuk. A mérettartományt (1 μm alatti események) részint endogén zöld fluorescens 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.

Baktériumok preparálása és opszonizálása

A baktérium preparátumainkat 150 perces, 37 °C-os, enyhe rázás melletti növesztést követően centrifugálással és mosással tisztítottuk, majd a minták koncentrációját fotométer segítségével, 600 nm-n mutatott optikai denzitásuk alapján állítottuk be. 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.

Baktérium túlélés vizsgálata

A baktérium túlélés vizsgálatához a laboratóriumunkban kifejlesztett félautomata baktérium eliminációs tesztet használtuk. Ennek során a baktériumokat PMN-nel, avagy MV-mal, 37 °C-n, enyhe rázás mellett, 30 percen át inkubáltuk, miközben a kísérlet kezdetén, majd minden 10. percben mintát vettünk. Ezen mintákat a további reakció leállítása érdekében jéghideg, 1 mg / ml saponin tartalmú HBSS médiumba helyeztük, majd -80°C-n feltártuk. Ezt követően egy 10 x hígítási lépést közbeiktatva minden mintát 10 x nagyobb térfogatú LB médiumba helyeztünk. Mintáinkat 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.

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 mintákat kis térfogatban felvéve előzetesen 96%-os alkohollal zsírmentesített fedőlemeze rétegeztük szobahőn, majd ülepedést követően mostuk őket. A MV-ok, illetve a PMN-ek fluoreszcens jelölése 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, vagy pedig az aspecifikus membránlipid jelölő PKH-2 festést használtunk (a gyártó előírásainak megfelelően). A myeloperoxidáz kimutatása, elhelyezkedésének vizsgálata szintén anti-humán monoklonális antitestek, illetve ezen antitestek elleni, fluoroforral konjugált másodlagos antitestek segítségével történt. Az aktint fluoroforral jelölt falloidin segítségével, a foszfadilil-szerint pedig fluoreszcensen jelzett Annexin V-tel mutattuk ki. Az autofluoreszcencia kizárásához nem jelölt mintát, az antitestek negatív kontrolljaként azonos izotípusú, de nem specifikus antitestek keverékét használtunk. A vizsgált minták vezikuláris természetét detergens alkalmazásával igazoltuk. A konfokális, illetve a konfokális videómikroszkópiás méréseket Zeiss LSM 510, illetve 710 konfokális mikroszkóppal végeztük. 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 felvételeket „ImageJ 1.41” program segítségével analizáltuk.

A szuperoxid termelés mérése

A neutrofilek extracelluláris szuperoxidtermelését a szuperoxid-diszmutázzal gátolható ferricitokró-m-c redukció alapján mértük többutas fotométerben, 550 nm hullámhosszon, citokró-m-c jelenlétében, 37 °C-on, HBSS médiumban. A háttértékek levonása után a kapott extinkcióértékeket a citokró-m-c abszorpciós koefficiense segítségével (21 mM-1cm-1) számoltuk át szuperoxid anyagmennyiségre.

Western blot

Western blot analízishez a MV-okat Laemli puffer segítségével lizáltuk, 15 perces 96 °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.

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 varianciánálízist végeztünk. A különbségeket akkor fogadtuk el szignifikánsnak, ha a „p” értéke kisebb volt, mint 0,05.

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].

Elektronmikroszkópia

A MV-kat az elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz 15700 g-s ülepítést 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% uranil-acetát és 50% etanol 30 perces kezelését

követően Taab 812 segítségével történt. 12 órás, 60 °C-on végzett polimerizációt követően történt a blokkok metszése, a minták vizsgálata Hitachi 7100-as elektronmikroszkóp, illetve Veleta, a 2k x 2k MegaPixel side-mounted TEM CCD kamera (Olympus) segítségével történt. A kapott felvételeket „Adobe Photoshop CS3”, valamint „Image J” szoftverek segítségével analizáltuk.

EREDMÉNYEK

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 granulomait, 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 építőjainak elhelyezkedése alapján) megegyezik a donor sejt membránjának irányultságával. Igazoltuk a komplement receptor 3 (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.

A humán 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.

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 telítődik, a NET kialakulása 2-4 óra alatt megy végbe. Eltér a két folyamat gátolhatósága 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 opsonizált részecskék hatására keletkeznek a hatást hordozó vezikulák.

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, a spontán formálódott MV (sMV) és a bMV viselkedése között ez a leglényegesebb eltérés. Az aggregáció abban az esetben is kialakult, amennyiben előlt 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 citoskeletális 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 – eleinte alacsony affinitású formájában van jelen, mely konformáció viszont a jelenlévő baktériumokkal kapcsolódva megváltozik, aminek következtében a CR3 ligandkötő affinitása megnő. Ez a folyamat ismerten 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,

elképzhetőnek 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.

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) baktériumtörzsszel 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 foszfatidil inozitol 3 kináz (PI3K) gátlása, valamint a glükóz megvonása egyaránt gátolta a fenti baktérium-vezikula kapcsolatot, 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.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

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