

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

2008

MUDr. Jitka BRÁZOVÁ

Disertační práce  
Oborová rada Imunologie

# Imunitní systém u pacientů s cystickou fibrózou

MUDr. Jitka Brázová

Školitelka: prof. MUDr. Anna Šedivá, CSc.  
Ústav imunologie UK, 2. LF a FN Motol

## PODĚKOVÁNÍ

### Upřímně děkuji

Své školitelce, prof. MUDr. Anně Šedivé, CSc. za vedení, rady a nápady při realizaci všech projektů v oblasti studia imunitního systému u pacientů s cystickou fibrózou. Ráda bych také paní profesorce poděkovala za její vstřícný postoj k rozvíjení mé klinické praxe, zvláště v oblasti cystické fibrózy.

Všem ostatním kolegům z Ústavu imunologie za cenné rady, podporu a spolupráci v laboratoři i mimo ni.

Doc. MUDr. Věře Vávrové, DrSc. a MUDr. Janě Bartošové za laskavé přijetí a uvedení do klinické praxe v oblasti cystické fibrózy a za možnost náležet k týmu lidí, který se stará o děti s cystickou fibrózou.

Chtěla bych také poděkovat za finanční podporu ze strany 2. lékařské fakulty UK, Fakultní nemocnice Motol (Interní granty 9717 a 9755), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (VZ 0021620812 a grant GAČR 310/03/H147) a Ministerstva zdravotnictví (granty IGA NI 7486-3 a NR 8458-5).

V neposlední řadě děkuji svým nejbližším - manželovi a celé rodině za podporu a pochopení pro mou práci.

# OBSAH

TÉMA A CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE .....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	7
Úvod .....	10
1.1 Klinická a genetická charakteristika onemocnění .....	10
1.1.1 Historie .....	10
1.1.2 Molekulárně genetická a patofyziologická charakteristika CF .....	11
1.1.2.1 Gen <i>CFTR</i> , protein CFTR .....	11
1.1.2.2 Mutace <i>CFTR</i> genu .....	12
1.1.2.2.1 Mutace F508del .....	12
1.1.2.2.2 Původ jednotlivých mutací .....	13
1.1.2.2.3 Výhody nosičů mutací v <i>CFTR</i> genu .....	14
1.1.2.2.4 Patogenetické třídy mutací <i>CFTR</i> genu .....	15
1.1.3 Laboratorní diagnostika CF .....	16
1.1.4 Klinický obraz CF .....	16
1.1.5 Léčba .....	18
1.1.5.1 Genotypově specifická farmakoterapie CF .....	19
1.1.5.2 Genová terapie .....	19
2 Imunitní systém u cystické fibrózy .....	20
2.1 Přehled poznatků v dané oblasti .....	20
2.1.1 Vrozená imunita .....	20
2.1.2 Vrozené imunitní reakce lokální .....	21
2.1.3 Vrozené imunitní reakce systémové .....	24
2.2 Specifické, získané imunitní reakce .....	25
2.2.1 Specifické reakce humorální – protilátky .....	25
2.2.2 Specifické reakce humorální - autoprotilátky .....	26
2.2.3 Specifické reakce buněčné – T lymfocyty .....	26
2.3 Regulační mechanismy imunity .....	27
2.3.1 Cytokiny .....	27
2.4 Regulační úloha T lymfocytů .....	28
3 Zkoumání imunitního systému CF pacientů na vlastním souboru .....	29
3.1 Cytokinový profil u CF pacientů .....	34
3.1.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	35
4 Korelace genotypu s fenotypem – vliv genetických modifikátorů na průběh onemocnění .....	36
4.1 Přehled poznatků v dané oblasti .....	36
4.2 Transformující růstový faktor beta 1 .....	38
4.2.1 TGF-beta 1 a CF .....	38
4.2.2 Vlastní pozorování .....	39
4.2.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	40
4.3 Manózu vážící lektin (MBL) .....	40
4.3.1 MBL a CF .....	42
4.3.2 Vlastní pozorování .....	44
4.3.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	44
4.4 Surfactant protein D (SP-D) .....	45
4.4.1 SP-D a CF .....	47
4.4.2 Vlastní pozorování .....	48
4.4.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	48
4.5 Leukotrien B4 (LTB4) .....	49
4.5.1 LTB4 a CF .....	50
4.5.2 Vlastní studie .....	50
4.5.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	51
5 Studium interakce infekce a imunitního systému u CF .....	53
5.1 Přehled poznatků v dané oblasti .....	53
5.1.1 Dendritické buňky (DC), Toll-like receptory (TLR) .....	53
5.1.2 Bakterie a respirační infekce .....	54

5.1.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55
5.1.2.2	Průběh <i>P. aeruginosa</i> infekce .....	58
5.1.2.3	Diagnostika <i>P. aeruginosa</i> infekce .....	59
5.1.2.3.1	Mikrobiologická diagnostika – mikroskopie, kultivace .....	60
5.1.2.3.2	Molekulárně genetické metody .....	60
5.1.2.3.3	Serologie .....	61
5.1.3	Komplex <i>Burkholderia cepacia</i> .....	62
5.1.4	Dendritické buňky u pacientů s cystickou fibrózou .....	64
5.1.5	Vlastní pozorování .....	65
5.1.5.1	Metodika přípravy z monocytů derivovaných DC .....	65
5.1.5.2	Vlastní studium DC u CF pacientů .....	66
5.1.5.2.1	Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	68
5.1.6	Úloha TLR4 v patogenezi respiračního onemocnění u CF .....	68
5.1.7	Přehled poznatků o TLR u CF .....	68
5.1.8	Vlastní pozorování .....	69
5.1.8.1	Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	70
6	Diagnostická aplikace v klinice - protilátky proti <i>P. aeruginosa</i> .....	71
6.1	Přehled poznatků v dané oblasti.....	71
6.2	Přehled poznatků v serologii infekce <i>P. aeruginosa</i> u CF .....	71
6.3	Vlastní studie .....	72
6.3.1	Závěry .....	73
6.3.1.1	Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou .....	75
7	Závěr.....	76
8	LITERATURA .....	79
9	Publikace autorky .....	91

## TÉMA A CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Předkládaná disertační práce shrnuje výsledky komplexního klinicko-imunologicko-molekulárně-genetického studia imunitního systému pacientů s cystickou fibrózou (CF). Tato disertační práce je seřazena do šesti na sebe navazujících odborných kapitol, které pojednávají o následujících tématických okruzích:

1. Shrnutí dosavadních poznatků o molekulárně genetické a klinické patogenезi CF.
2. Shrnutí dosavadních poznatků z oblasti studia imunitního systému u pacientů s cystickou fibrózou.
3. Zkoumání imunitního systému CF pacientů na vlastním souboru – přehled.
4. Shrnutí dosavadních poznatků o genetických modifikátorech klinického průběhu CF.
5. Shrnutí dosavadních poznatků z oblasti studia interakce imunitního systému a infekce.
6. Klinická aplikace imunologických metod – stanovení titrů protilátek proti *Pseudomonas aeruginosa*.

Práce si v úvodní přehledné kapitole neklade za cíl shrnout danou problematiku do detailů. Zaměřuje se spíše na zajímavosti vyplývající ze základní genetické poruchy genu pro cystickou fibrózu. Pro větší přehlednost a menší náročnost jsou informace předkládány formou tabulek, obrázků a grafů.

S výjimkou úvodních dvou přehledných kapitol je každá kapitola zakončena souhrnem vlastních dosažených výsledků. Třetí kapitola otevírá problematiku studia imunitního systému na pracovišti autorky. Dosažené a publikované výsledky jsou stručně popsány v jednotlivých kapitolách této disertační práce a diskutovány ve srovnání s poznatky ze světové literatury. Pouze dosud nepublikované výsledky, které jsou v současné době připravovány do tisku, jsou podrobně shrnuty v textu a doplněny příslušnými tabulkami a grafy.

Vlastní publikace jsou zahrnuty ve zvláštní publikační příloze (kap. 9.) a jsou členěny podle jednotlivých kategorií (zahraniční, domácí, další aktivity spojené s tématem této disertační práce), společně s příslušnými impakt faktory. Ostatní citovaná odborná literatura je uvedena na konci disertační práce v samostatné literární příloze (kap. 8.).

Předložené výsledky disertační práce by nebyly možné bez úzké spolupráce v rámci 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Praze Motole a to hlavně s Centrem Cystické Fibrózy Pediatrické kliniky, dále s Ústavem biologie a lékařské genetiky a s Ústavem mikrobiologie a virologie.

Řešená problematika je také spojena s předchozími a současnými výzkumnými grantovými projekty, jichž byla nebo doposud je předkladatelka této disertační práce spoluřešitelkou. Interní grant FN Motol č. 9717 (autorka disertace byla jeho spoluřešitelkou) byl oceněn Cenou Ředitele FN Motol jako nejlepší Interní grant za rok 2003. Domácí publikace v časopise Alergie (spoluautorství předkladatelky této práce) byla oceněna cenou za nejlepší původní práci pro rok 2004.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABPA	Alergická bronchopulmonální aspergilóza; onemocnění vyvolané <i>Aspergillus fumigatus</i> často asociované s CF
ANCA	Antineutrophil cytoplasmic antibodies: protilátky proti cytoplasmě neutrofilů
APC	Antigen presenting cell: buňka prezentující antigen
ARO	Anesteziologicko-resuscitační oddělení
ATP	Adenosintriphosphat: adenosintrifosfát
BAL	Bronchoalveolar lavage: bronchoalveolární laváž
BPI	Bactericidal permeability increasing protein: baktericidní a permeabilitu zvyšující protein
CD	Cluster of differentiation: diferenciační antigen
CF	Cystická fibróza
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator: transmembránový regulátor vodivosti iontů při cystické fibróze
CIK	Circulating Immunocomplexes: cirkulující imunokomplexy
CRP	C - reaktivní protein
CT	Computer tomography: počítačová tomografie
DC	Dendritic cell: dendritická buňka
DHA	Docosahexaenic acid: kyselina dokosahexaenová
DIOS	Distal intestinal obstructive syndrom: syndrom obstrukce distálního úseku střeva; komplikace spojená s CF u starších dětí a dospělých
DNA	Deoxyribonucleic acid: deoxyribonukleová kyselina
Dnáza	Enzym štěpící DNA
EBC	Exhaled breath condensate: Kondenzát vydechovaného vzduchu
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay: enzymová imunosorbentní analýza
ENaC	Epithelial sodium channel: epiteliální sodíkový kanál regulovaný CFTR
EPA	Eicosapentaenic acid: Kyselina eikosapentaenová
ET12	První popsáný epidemický kmen komplexu <i>B. cepacia</i> ; vyskytuje se hlavně v Kanadě a Velké Británii
FEV1	Forced expiratory volume in 1 second: jednovteřinová vitální kapacita (objem vzduchu usilovně vydechnutý za první vteřinu po začátku výdechu)
FISH	Fluorescent in situ hybridization: fluorescenční hybridizace in situ



FVC	Forced vital capacity: usilovně vydechnutá vitální kapacita
GIT	Gastrointestinal tract: gastrointestinální trakt
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor: faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HLA	Human leucocyte antigen: hlavní lidský (histokompatibilní) antigen
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulín (třídy IgG, A, M, E, podtřídy IgG1-4)
IL	Interleukin
i.v.	Intravenózní, nitrožilní
IVS-8 T(n)	Sestřihová varianta polypyrimidínového traktu intronu 8 <i>CFTR</i> genu
LBP	Lipopolysaccharid binding protein: protein vážící LPS
LPS	Lipopolysaccharid = endotoxin Gram negativních bakterií
LTB4	Leukotrien B4
MASP	MBL-associated serine protease: serinová proteáza asociovaná s MBL
MBL	Mannose binding lectin: lektin vážící manózu
MEF	Maximal expiratory flow: maximální výdechová rychlost (maximální výdechový proud vzduchu) na 25-50 % vitální kapacity
MHC	Major histocompatibility complex: hlavní histokompatibilní komplex
MPO	Myeloperoxidáza
n-3 PUFA	n-3 polynenasycené mastné kyseliny
NF-kappaB	Nukleární faktor – kappaB
OMIM	Online mendelian inheritance in man; online databáze lidských genů a genetických onemocnění
ORCC	Outwardly rectified chloride channel: další chloridový kanál regulovaný CFTR
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern: specifické struktury patogenních mikroorganismů
PCR	Polymerase chain reaction: polymerázová řetězová reakce
PHA	Phytohemagglutinin: fytohemagglutinin
PI / PS	Pankreaticky insuficientní / suficientní
PMN	Polymorfonukleár, neutrofilní leukocyt
PR3	Proteináza 3
PRR	Pathogen recognition receptor: receptor rozpoznávající specifické struktury patogenů
rhDNáza	Rekombinantní lidská DNáza; lék s mukolytickým účinkem používaný u CF

RSV	Respirační a syncytiální virus
RTG	Rentgen
SD	Standard deviation: standardní odchylka
SP-D	Surfaktant protein D
TGF-beta	Transforming growth factor beta: transformující růstový faktor beta (1-3)
Th	T helper cell: pomocný T-lymocyt
TLR	Toll-like receptors: receptory ze skupiny Toll
TNF	Tumor necrosis factor: faktor nekrotizující nádory
WHO	World health organisation: Světová zdravotnická organizace

# Úvod

Cystická fibróza (CF; OMIM) je jednou z nejčastějších závažných autozomálně recesivních monogenních chorob s incidencí přibližně 1 na 2500 novorozenců (1-3). Pro CF, jakožto multisystémovou exokrinopatii, je typické chronické progresivní onemocnění sino-pulmonálního a gastrointestinálního systému, včetně postižení vývoje mužského reprodukčního traktu.

CF významně zkracuje délku života nemocných.

Je léčitelným, ale dosud ne zcela vyléčitelným onemocněním.

CF trpí na celém světě přibližně 80 000 nemocných (v ČR je přes 500 nemocných), přičemž toto číslo nezahrnuje pacienty z rozvojových zemí, kde CF není dosud správně diagnostikována.

## 1.1 Klinická a genetická charakteristika onemocnění

### 1.1.1 Historie

*Již ve Středověku se tradovalo, že kojenec, jehož pot chutná slané je "očarován" a "odsouzen k rychlé smrti".* Hledání pověr a lidových písní, které se týkaly začarovaných dětí a slané chuti jejich potu, se věnoval např. Dr. Busch z Rostocku (4). Uvedené rčení odráží dva základní klinické znaky CF: zvýšenou koncentraci chloridů v potu a časnou kojeneckou mortalitu (5).

První patologicko-anatomickou zprávu, popisující těžké změny na pankreatu u 11leté „začarované“ kachetické dívky, popsal v roce 1595 Pieter Pauw, profesor botaniky a anatomie v Leidenu (6, 7).

CF byla jako samostatná klinická jednotka poprvé popsána americkou patoložkou D. Andersenovou teprve v roce 1938. Toto onemocnění nazvala "cystic fibrosis of the pancreas", termín, později zkrácený na "cystic fibrosis" (8). V německy a francouzsky mluvících zemích se posléze ujalo v lékařské terminologii synonymum CF - "mukoviscidóza". Tento název odráží přítomnost vysoce vazkého hlenu ("mucus viscosus") v plicích nemocných.

Do poloviny padesátých let minulého století většina dětí umírala do 2 let věku.

Autozomálně recesivní povaha CF byla rozpoznána v roce 1946 rozsáhlým studiem rodokmenů rodin pacientů s CF (9).

V roce 1985 byl gen CF lokalizován na chromozom 7 (10). Bližším mapováním byla lokalizace CF genu upřesněna a v roce 1987 byl kandidátní gen CF lokalizován do oblasti 7q31.3 (11).

V roce 1989 se poprvé podařilo klonování genu CF včetně stanovení přesné sekvence nukleotidů jeho exonů a intronů (12).

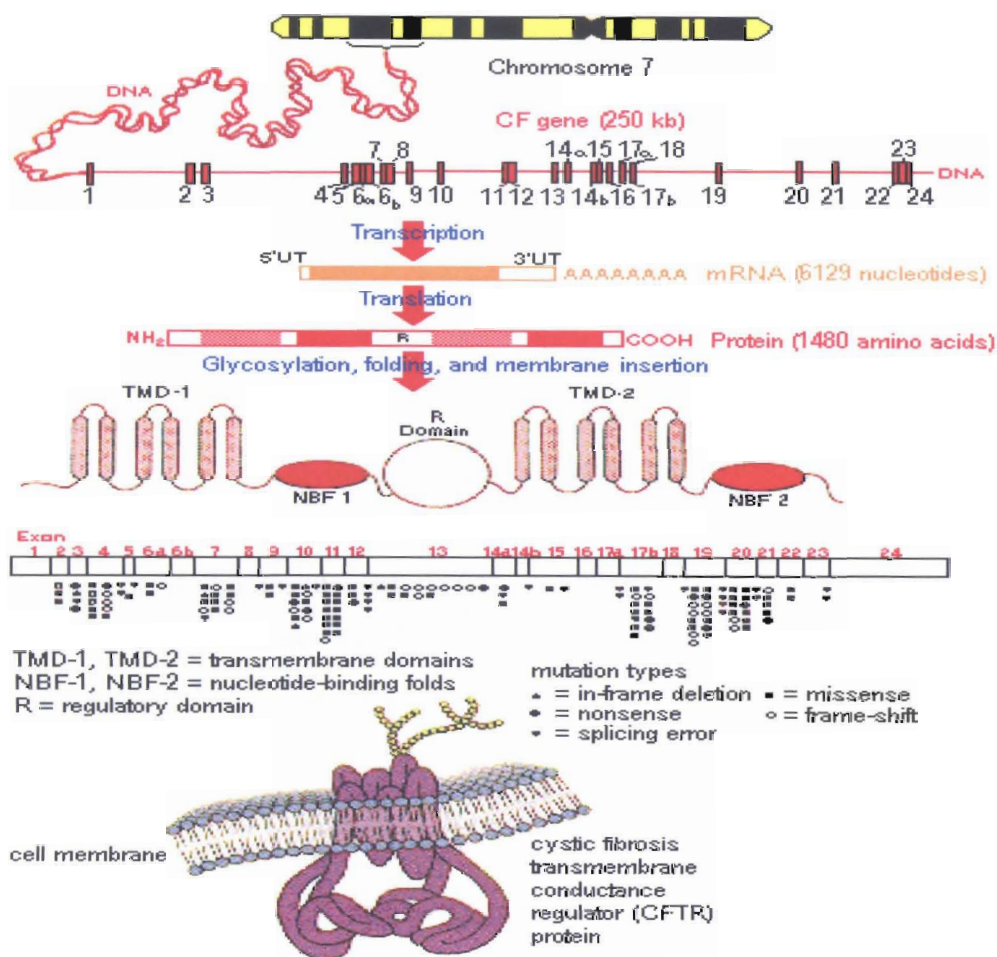
V československé odborné literatuře se objevily první kazuistiky CF brzy po 2. světové válce. První pacient s CF byl diagnostikován na 2. dětské klinice Univerzity Karlovy v Praze v květnu roku 1946 a již v roce 1948 profesor Švejcar a spol. podrobně popsali první soubor pacientů s CF. Průkopníkem moderní léčby CF je v České republice od šedesátých let minulého století Doc. MUDr. Věra Vávrová, DrSc.

### 1.1.2 Molekulárně genetická a patofyziologická charakteristika CF

Ústřední roli v patogenezi CF, jakožto primárně monogenního onemocnění, má kauzální *CFTR* gen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, tj. volně přeloženo regulátor transmembránové vodivosti iontů) (12) a jeho genový produkt CFTR protein. Hlavním patogenetickým rysem CF je progresivní multisystémová exokrinopatie daná porušeným transportem iontů a vody přes epiteliální bariéry. Sekundárně tato porucha způsobuje i poruchy vrozené a/nebo získané imunity chránící epiteliální povrchy a vyústující v chronický zánět, jehož hlavním rysem je progresivní fibrotizace postižených cílových orgánů.

#### 1.1.2.1 Gen *CFTR*, protein CFTR

Gen *CFTR* má 27 exonů a rozprostírá se v oblasti přibližně 250 kb dlouhé (detailně je jeho současná klasifikace, terminologie a charakteristika uvedena na webové stránce [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) – OMIM) (12). Genový produkt, který je kódován tímto genem, CFTR protein, se skládá z 1 480 aminokyselin a patří do nadrodiny tzv. „ATP-binding cassette“ transmembránových transportních proteinů (obr. č. 1.1). CFTR protein plní především funkci chloridového kanálu, ale také reguluje i další chloridové, např. outwardly rectified chloride channels (ORCC) nebo sodíkové (epithelial sodium (Na<sup>+</sup>) channels (ENaC)) kanály (3, 12). Dosud však není přesně známo, jaké genetické a negenetické faktory regulují transkripci *CFTR* genu, který patří mezi „housekeeping“ geny (3).



Obr. č. 1.1 Od *CFTR* genu k proteinu (Zielenski, 2000)

### 1.1.2.2 Mutace *CFTR* genu

Do současné doby bylo nalezeno více než 1300 alterací nukleotidové sekvence *CFTR* genu v různých světových populacích. Jedná se prakticky pouze o mutace germinální, protože somatické mutace (časté např. u nádorů) nebyly v genu *CFTR* dosud popsány.

Mutace v *CFTR* genu jsou tedy „ancestrální“ povahy a jsou proto přenášeny z generace na generaci. Germinální de novo mutace (časté např. u autozomálně dominantních onemocnění) jsou v *CFTR* genu velmi vzácné. Aktuální stav distribuce mutací v *CFTR* genu je uveden v pravidelně aktualizované mutační databázi vedené torontskou pracovní skupinou ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)).

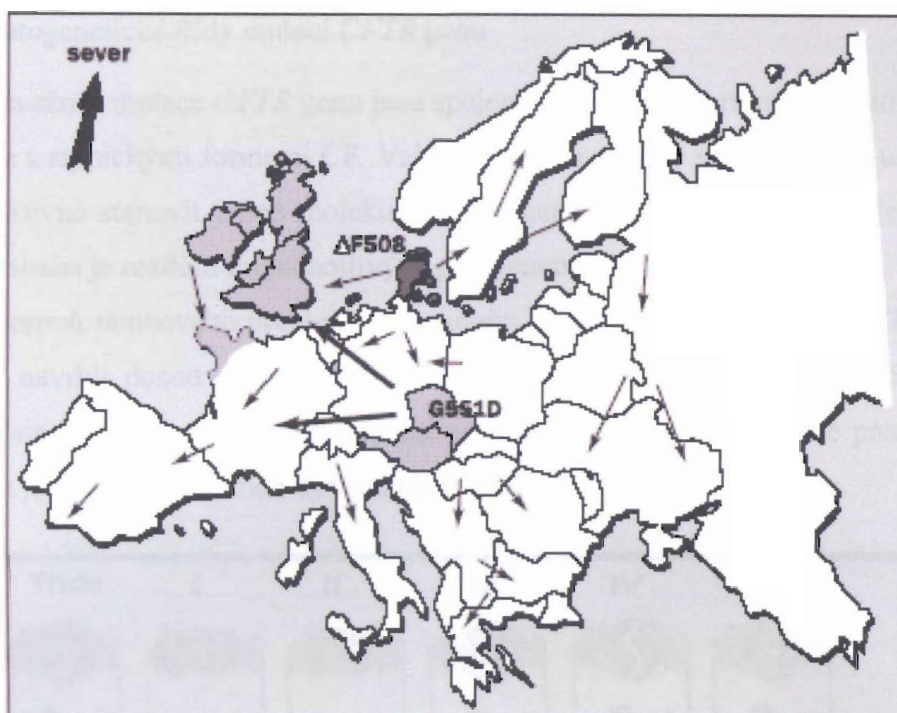
#### 1.1.2.2.1 Mutace F508del

Základní a nejčastější mutací *CFTR* genu je delece 3 pb, která vede ke ztrátě fenylalaninu („F“ v jednopísmenném kódu aminokyselin) na pozici 508 proteinu CFTR – F508del (13). Nachází se v exonu 10 *CFTR* genu a porušuje tak funkci klíčové domény proteinu CFTR-

NBD1. Tato mutace je více než 50 000 let stará a má jeden společný původ (14). Nachází se celosvětově v průměru na 66 % všech CF chromozomů u všech dosud testovaných pacientů s CF (15-17). V České Republice se tato mutace nachází u 71 % pacientů.

#### 1.1.2.2.2 Původ jednotlivých mutací

U většiny jednotlivých mutací *CFTR* genu byl haplotypovou analýzou jejich intragenového pozadí pomocí markrů nalezen jejich společný původ (14). Tak lze objektivně sledovat populační genetické a historické vazby, které utvářely současný genofond evropských populací (15). Srovnávací analytická studie potvrdila např. keltský původ mutace G551D, dokumentovanou historicky a archeologicky prokázanou keltskou etnogenezí v České republice a severním Rakousku (18). Svědčí o tom také prokázaný zvýšený výskyt této mutace v oblastech s perzistencí keltského etnika v západní Evropě (19) tj. v Bretani, Irsku, na Britských ostrovech a v severním Rakousku (15, 18, 20) (obr. č. 1.2). O slovanském původu naší populace svědčí to, že druhou nejčastější mutací *CFTR* genu u českých CF pacientů je delece *CFTR*dele2,3(21kb) (21). Tato mutace je přítomna pouze na těch územích střední, východní a jižní Evropy, kam ve druhé polovině prvního tisíciletí našeho letopočtu migrovaly slovanské kmeny ze severovýchodu (18, 19). Mutace 2143delT se vyskytuje relativně často u nás, v Polsku a Rusku a patří mezi další slovanské mutace (15, 16). Výsledky genetických studií prokazují prakticky shodnou prevalenci hlavních historických populací na našem území, tj. slovanského a keltského etnika. Jihoevropské etnické vlivy v naší současné populaci jsou reprezentovány výskytem mutací G542X a N1303K, které jsou časté ve středomoří. Mutace G542X je asociována s Feničany (22) a prokazuje významné migrační vlivy proti proudu velkých evropských řek (v důsledku tehdejšího silného zalesnění celé Evropy) především z jihu na sever Evropy, tj. v případě českých zemí např. po Dunaji a jeho přítocích. Nález Ashkenazi-židovských mutací W1282X a 3849+10kb C-T (15) svědčí o prokazatelné přítomnosti židovského etnika u nás, tak jako i v jiných zemích střední, východní a jižní Evropy, a to i přes rozsáhlé negativní změny v jeho genofondu v důsledku nacistického Holocaustu. Genetická a etnická charakteristika nejčastějších mutací u českých pacientů s CF rovněž potvrzuje, že naše země byla křižovatkou všech hlavních historických migrací severo-j jižních a západo-východních (18).



Obr. č. 1.2 Celoevropská populační distribuce některých mutací *CFTR* genu (Macek M, 2000)  
 Keltové postupně osídlili střední a západní Evropu, Britské ostrovy a Iberský poloostrov. Migrace keltských kmenů trvaly až do konce 6. století př. n. l. Germánští útočníci s sebou přinesli další alelu cystické fibrózy, „nordickou“ mutaci F508del. Čeští Keltové zachovali etnickou identitu až do 2.- 4. století n. l., v Bretani se keltské osídlení zachovalo až do 6. st. n. l. Na Britských ostrovech odolávali Keltové tlaku římského impéria a nordickým nájezdům nejdéle, ale nakonec se část keltských kmenů přestěhovala zpět do Bretaně.

#### 1.1.2.2.3 Výhody nosičů mutací v *CFTR* genu

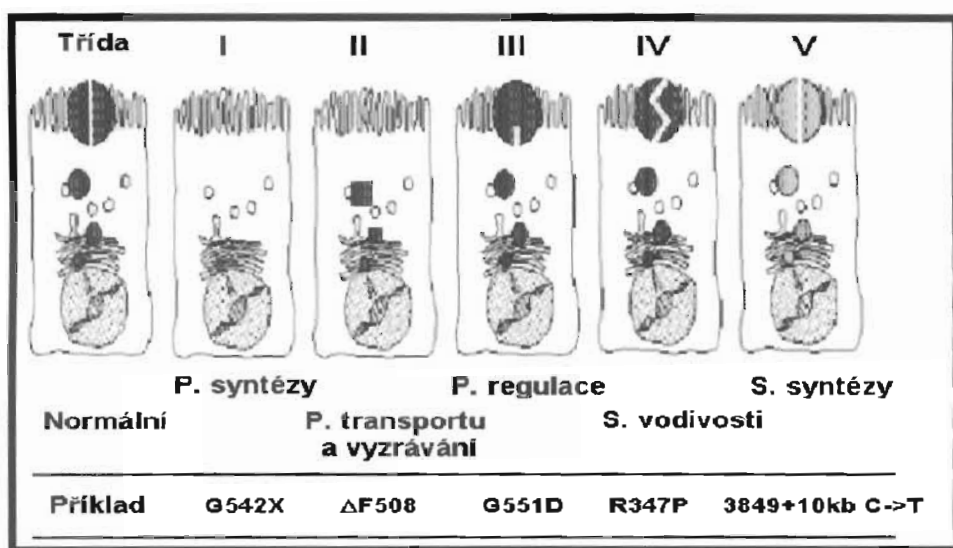
Zajímavým jevem jsou výhody nosičů mutací *CFTR* genu – „heterozygote advantage“ (četnost nosičů CF v obecné populaci je 1 na 25 jedinců). Na myších modelech byla objektivně potvrzena zvýšená odolnost nosičů CF k průjmovým onemocněním způsobených bakteriálními enterotoxiny, které stimulují sekreci iontů střevní sliznice („chloride-secreting diarrheas“) (23). Uplatňuje se zde efekt dávky CFTR proteinu na apikální membráně, kdy nosiči závažných mutací v *CFTR* genu ze tříd I.-III. (viz. níže), mají pouze poloviční odpověď na enterotoxinovou stimulaci. To jim umožňovalo lepší šance na přežití např. v období epidemie cholery ve srovnání s normálními jedinci, kde je příslušná odpověď na enterotoxinové podněty dvojnásobná.

V poslední době se také prokázalo, že CFTR protein funguje jako internalizační receptor nejen pro *Pseudomonas aeruginosa*, ale i pro *Salmonella typhmuriium* (24, 25). Mechanismus selekční výhody v této souvislosti předpokládá rezistenci nosičů CF k salmonelózám.

#### 1.1.2.2.4 Patogenetické třídy mutací *CFTR* genu

Klinicky “závažné” mutace *CFTR* genu jsou spojeny s klasickou formou CF, zatímco “mírné” mutace spíše s atypickými formami CF. Vzhledem k tomu, že je velmi obtížné u jednotlivých mutací objektivně stanovit jejich molekulární patogenezi, a tak předpovědět jejich klinický dopad, byla snaha je rozdělit do jednotlivých patogenetických tříd (3, 17, 26).

K získání alespoň rámcového přehledu o funkčním dopadu různých mutací *CFTR* genu Tsui a spol. (17) navrhli dosud stále platnou základní patogenetickou klasifikaci 5 tříd mutací *CFTR* genu na základě expresními studiemi potvrzeného a/nebo modelově předpověděného mechanismu jejich molekulárních dysfunkcí (Obr. č. 1.3).



Legenda: P – porucha funkce, S – snížení funkce *CFTR* proteinu; Tsui 1995, Zielenski 2000

Obr. č. 1.3 Patogenetické třídy mutací *CFTR* genu (upraveno dle Tsui 1995, Zielenski 2000)

V souhrnu jsou patogenetické třídy I.-III. spojeny s minimální aktivitou a/nebo nepřítomností *CFTR* proteinu, a tak s klasickou formou CF, tj. se zvýšenými koncentracemi chloridů v potu, exokrinní pankreatickou insuficiencí, progresivním sino-pulmonálním onemocněním a mužskou neplodností. Tyto první 3 třídy jsou také spojeny s velmi malou variabilitou klinického průběhu CF (3). Mutace ze tříd IV.-V. jsou spojeny s velkou variabilitou klinického průběhu CF a oproti třídám I.-III. často s mírnějším průběhem onemocnění např. v podobě pankreatické sufficience pacientů (2).



### 1.1.3 Laboratorní diagnostika CF

Klinické podezření na CF (viz. Tab. 1.1) je vždy třeba potvrdit laboratorně. Základním vyšetřením je potní test spočívající v stimulaci pocení pilokarpinovou iontoforézou, sběru potu a následném změření koncentrace chloridů v potu. Pro CF svědčí koncentrace chloridů v potu nad 60 mmol/l (je potřeba získat min. 100 mg potu a pozitivní test je potřeba minimálně 2x opakovat), hodnoty 30 – 60 mmol/l jsou pokládány za hraniční. Test je nutné provádět v laboratoři, která provádí min. 250 vyšetření ročně.

Pro stanovení diagnózy CF jsou potřeba tato dg. kritéria (27-32):

jeden a/nebo více charakteristických klinických příznaků,

- nebo pozitivní rodinná anamnéza,
- nebo pozitivní výsledek novorozeneckého screeningu (grantový projekt stanovující koncentraci imunoreaktivního chymotripsinogenu v krvi novorozenců probíhal v letech 2004 – 6 v Čechách)

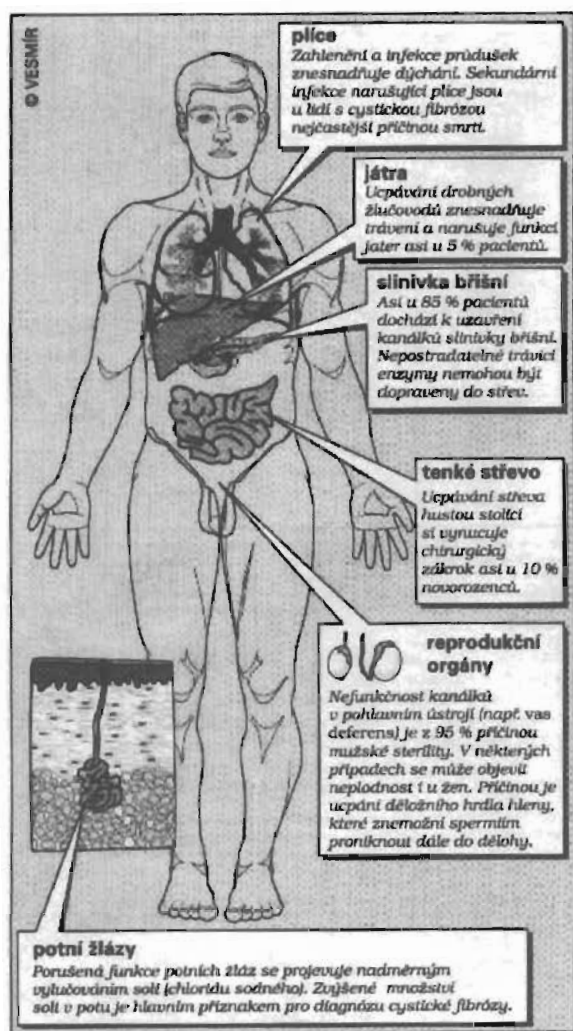
laboratorní průkaz abnormality *CFTR* genu spočívající

- ve zvýšené koncentraci chloridů v potu,
- nebo v identifikaci dvou mutací *CFTR* genu
- nebo v *in vivo* zjištěné poruše transportu iontů na nosním epitelu (v současné době se v ČR neprovádí).

### 1.1.4 Klinický obraz CF

Tento obraz je charakterizován postižením čtyř systémů (viz. Obr. č. 1.4).

1. **chronické respirační onemocnění** (chronický kašel, chronická sinusitida, chronická kolonizace nebo infekce pro CF specifickými mikroby, typické RTG změny, obstrukce dýchacích cest, paličkovité prsty)
2. **gastrointestinální onemocnění** (insuficience zevní sekrece pankreatu přítomná u 85 % pacientů; poruchy střev – mekoniový ileus, DIOS, prolapsy rekta, projevy malabsorbce a porucha motility; porucha jater a žlučových cest; porucha stavu výživy)
3. **příznaky ze ztráty solí** (akutní hypoelektrolytémický šok, chronická metabolická alkalóza)
4. **obstruktivní azoospermie.**



Obr. č. 1.4 Klinický obraz CF (Vávrová, 2000)

Tab. č. 1.1 Příznaky upozorňující na diagnózu CF

<b>Chronické sinopulmonální onemocnění s perzistující kolonizací nebo infekcí mikroby typickými pro CF</b> ( <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> v mukózní i nemukózní formě, komplex <i>B. cepacia</i> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>• endobronchální onemocnění manifestující se chronickým kašlem s produkcí sputa, obstrukcí dých. cest spojenou s hvízdáním a hyperinflací, charakteristickými RTG změnami (bronchiektázie, atelektázy, hyperinflace, infiltráty), paličkovitými prsty</li> <li>• chronické onemocnění vedlejších dutin nosních (nosní polypy, pansinusitida prokázaná RTG nebo CT vyšetřením)</li> </ul>
<b>Onemocnění gastrointestinálního traktu a porucha stavu výživy</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• střevní postižení (mekoniový ileus, mekoniová zátka, syndrom obstrukce distálního střeva (DIOS), prolaps rekta)</li> <li>• postižení pankreatu (insuficience zevní sekrece pankreatu, recidivující pankreatitidy)</li> <li>• jaterní postižení (fokální biliární nebo multilobulární cirhóza)</li> <li>• porucha stavu výživy</li> <li>• ne prospívání (proteinová a kalorická malnutrice)</li> <li>• hypoproteinémie s edémy</li> <li>• komplikace z deficitu vitamínů</li> </ul>
<b>Syndrom ztráty soli</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• akutní ztráta soli</li> <li>• chronická metabolická alkalóza</li> </ul>
<b>Obstrukční azoospermie u mužů</b>

### 1.1.5 Léčba

Cílem nejmodernější léčby je především zmenšení obtíží, které s sebou toto celoživotní onemocnění přináší a zlepšení kvality života nemocných jedinců. Léčba CF je komplexní, intenzivní a dlouhodobá (viz. tab. č. 1.2).

Tab. č. 1.2 Přehled terapeutických postupů u CF

Patologie	Cíl léčby	Současné možnosti	Budoucnost
CFTR gen	Náhrada normálním genem	Klinické studie I.-II. fáze	Genová terapie
CFTR protein	Náhrada proteinu „Úprava“ terciární konformace Zesílení funkce proteinu	Žádné	Náhrada syntetickými proteiny, chaperony, chem. stabilizace, inhib. fosfodiesterázy
Porucha transportu Cl <sup>-</sup>	Alternativní sekrece Cl <sup>-</sup> Blokáda reabsorpce Na <sup>+</sup>	Inhalačně ATP/UTP Inhalačně Amilorid	?
Viskózní hlen	Snížení viskozity hlenu	rhDNáza I, hypertonická sůl, mukolytika	?
Plicní obstrukce	Zlepšení clearance	Fyzioterapie a bronchodilatancia	?
Infekce	Kontrola bakteriální a virové replikace	Antibiotika, virostatika, antinykotika, vakcinace, imunoglobuliny	Pseudomonádové a jiné vakcíny
Mekoniiový ileus / DIOS	Urgentní odstranění obstrukce	Operace, invazivní RTG clearance	?
Chronická sinusitida	Odstranění obstrukce, kontrola infekce	Operace, invaz. odsátí, antibiotika, virostatika	Vakcinace
Nosní polypóza	Odstranění polypů	Operace	?
Potní žláza	Zabránění ztrátám solí	Suplementace solí	?
CF diabetes mellitus	Normoglykemie	Inzulín	?
Hepatobiliární onemocnění	Kompenzace biliární cirrhózy	Žlučové kyseliny, hepatoprotektiva	Trasplantace jater
Špatný stav výživy	Úprava malnutrice	Dietoterapie a nutriční suplementace	?
Pankreatická insuficience	Pan. suplementace	Pankreatická substituce	?
Chronický zánět	Snížení imunitní odpovědi	Kortikoidy, antirevmatika	Proteázové inhibitory, imunomodulancia
Ireverzibilní plicní fibróza	Náhrada zničené tkáně	Bilaterální trasplantace plic	?

Legenda: Upraveno dle Hodson 2007, Bush 2005, Cutting 1996, Welsh 1999, Welsh et al. 1995, 2001

### 1.1.5.1 Genotypově specifická farmakoterapie CF

Na základě znalostí molekulární patogeneze spojené s jednotlivými mutacemi *CFTR* genu byly vyvinuty i s ohledem na jednotlivé třídy „genotypově specifické“ terapeutické postupy (33-36). Vzhledem k tomu, že optimální terapie zahrnuje jak obnovení funkce chloridového kanálu, tak i zaměření na další regulační funkce *CFTR* proteinu, terapie zaměřené pouze na zvýšenou expresi mutovaného *CFTR* proteinu *in vivo* nemusí být vždy účinná.

U nonsense mutací, jako je např. mutace G542X, je možné použít aminoglykosidová antibiotika (např. gentamycin), k modulaci přeskočení exonů *in vivo* (“exon-skipping“) při sestřihu *CFTR*-mRNA (37-39). Přesný mechanismus modulace transkripce, translace a proteosyntézy určitými typy antibiotik dosud není přesně znám, ale jejich kauzální léčebné dopady byly zkoušeny v klinické praxi (35). Naopak u mutací, které umožní intracelulární transport mutovaného *CFTR* proteinu na apikální membránu (např. u mutace G551D), byla s určitým úspěchem použita analoga ATP v podobě inhalační léčby pomocí uridintrifosfátu UTP (2).

### 1.1.5.2 Genová terapie

Kauzální léčba CF na úrovni *CFTR* genu v podobě somatické genové terapie by mohla pacienty s CF zbavit jejich příznaků nápravou porušené funkce *CFTR* genu, pokud by byla použita v nejranějším, optimálně prenatálním, stadiu rozvoje CF (34, 36, 40-56). Klinické využití genové terapie naráží dosud na řadu nevyřešených problémů jako např. genotoxicita vektoru, jejich nízká účinnost, nespecifický tkáňový tropismus a jejich imunogenní potenciál, obzvláště při opakované aplikaci (34, 36, 40-56). Je rovněž velmi obtížné zajistit trvalou expresi všech genově terapeutických konstruktů.

Somatická genová terapie je proto teprve ve fázi intenzivního laboratorního a klinického výzkumu. Používá jak virové (adeno-asociované viry a adenoviry), tak i syntetické vektory (lipozomy a DNA-protein komplexy apod.). V budoucnu by tato terapie mohla umožňovat kauzální léčbu této jinak dosud paliativně léčitelné choroby, pokud se podaří především vyřešit problematiku imunitní odpovědi na přítomnost exprimovaného, nemutovaného *CFTR* proteinu a příslušných vektorů.

Genová terapie nebude zřejmě “samospasitelná“, ale bude spíše součástí komplexního terapeutického přístupu k nemoci. Vzhledem k reálné možnosti genové terapie je proto nezbytné pacienty s CF v současné době léčit standardními postupy co nejlépe, aby se genové terapie dožili v optimálním zdravotním stavu.

## 2 Imunitní systém u cystické fibrózy

Onemocnění dýchacích cest a plic je nejzávažnějším projevem CF. Určuje průběh a prognózu a zodpovídá za 90 % úmrtí na tuto chorobu. Pacienti s CF trpí chronickými, nejčastěji bakteriálními, respiračními infekcemi. Nejzávažnější jsou infekce způsobené Gram negativními tyčemi *Pseudomonas aeruginosa* a bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*. Eradikace těchto patogenů při chronické infekci prakticky není možná a velká pozornost je věnována mechanismům, které zvyšují patogenicitu těchto mikroorganismů, i když uspokojivé vysvětlení chronické perzistence bakteriální infekce právě těmito specifickými bakteriemi a neschopnosti imunitního systému pacientů je eliminovat doposud neexistuje. Kromě vlivu řady genetických faktorů, které mohou modifikovat průběh onemocnění, se na variabilitě klinických projevů podílí také složka imunity (27, 57, 58).

Imunitní systém u pacientů s CF je všeobecně zkoumán hlavně v souvislosti s infekčními komplikacemi. Pozornost je soustředována hlavně na počáteční reakce imunitního systému u CF pacientů při prvních kontaktech s bakteriemi. V rámci těchto iniciálních fází imunitní reakce hraje důležitou roli i lokální obrana na sliznicích respiračního traktu. Děti ani dospělí pacienti s CF netrpí imunodeficitem, který by přispíval k chronické kolonizaci bakteriemi. Naopak se ukázalo, že imunitní systém reaguje adekvátně na přítomnost infekce, nicméně modifikované prostředí dané základní patogenezí CF znemožní eradikaci pro CF specifických patogenů (59).

U pacientů s CF, stejně tak jako u zdravých jedinců, funguje imunitní systém jako souhrn regulovaných imunitních reakcí, které jsou zahájeny složkami vrozené imunity a následovány reakcemi specifických složek imunitní odpovědi. Změny v imunitním systému CF pacientů jsou dány sekundárně vlivem průběhu onemocnění.

### 2.1 Přehled poznatků v dané oblasti

#### 2.1.1 Vrozená imunita

Součástí vrozené imunity jsou charakterizovány nespecifickou, ale velmi rychlou a účinnou obranou proti infekci. V případě CF jsou tyto složky intenzivně zkoumány, neboť se ukazuje, že právě tato větev imunity může být klíčová, a to z důvodu modifikovaného CF prostředí prvního kontaktu imunitního systému s patogenem (59). CF pacienti jsou stejně jako jejich zdraví vrstevníci vystaveni mnoha patogenům přítomným v 10.000 litrech denně

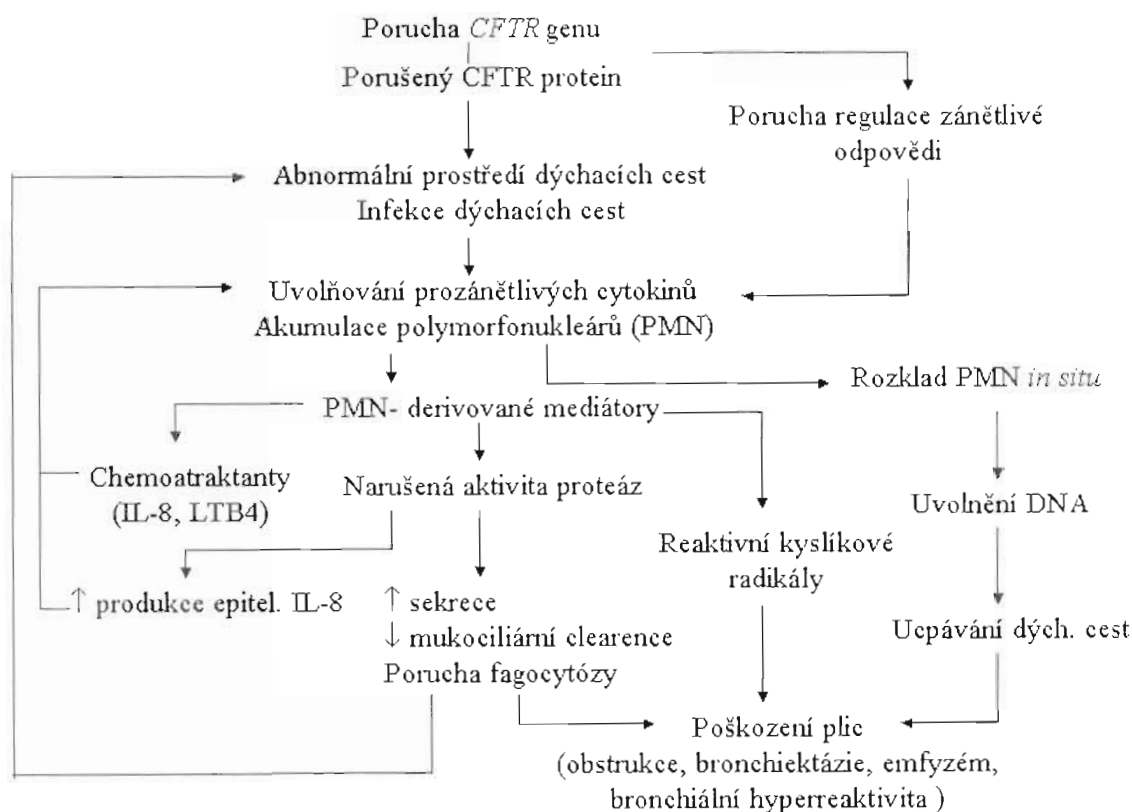
vdechovaného vzduchu. První reakce se ale u CF odehrávají za naprosto patologických okolností v mikroprostředí sliznic respiračního traktu s dominancí vazkého hlenu pokrývajícího tyto sliznice. Složky vrozené imunity při těchto prvních kontaktech s patogenem jednak zajišťují bariérovou ochranu organismu, dále také určují směr, kterým se bude ubírat následná specifická imunitní odpověď. V respiračním traktu je první bariérová funkce zajištěna několika velmi účinnými mechanismy, z nichž pouze některé mají čistě imunitní funkci. V první řadě nastupují procesy mukociliární clearance, které jsou zásadně porušeny v prostředí CF plic. Takováto porucha velmi výrazně ovlivňuje další, nyní již imunitně zprostředkované pochody, které probíhají na povrchu sliznice. Na tomto rozhraní působí jednak buňky nesoucí imunitní funkce, jednak humorální komponenty, sekretované na povrch sliznice. Z buněk jsou to zejména plicní makrofágy, neutrofilové, ale ve významné míře také epitelální buňky. Všechny tyto buněčné složky, hlavně makrofágy a neutrofilové, mají za úkol rozpoznat, pohltit a zpracovat patogeny, které se v tomto prostředí nacházejí (60). Navíc všechny tyto buňky, včetně epitelů, sekretují imunologicky aktivní látky do daného mikroprostředí. Tyto látky mají výrazné antimikrobiální účinky. Jsou to většinou peptidy či proteiny, které inhibují patogeny a zasahují do následné imunitní reakce (61). Antimikrobiální peptidy jsou významnou, evolučně velmi starou součástí obrany organismu. Mezi celou škálou takových látek jsou jedny z nejlépe charakterizovaných lokálně působících defensinů a kathericidinů (62). Obě tyto kategorie jsou velmi intenzivně zkoumány v souvislosti s CF a chronickou plicní infekcí.

### 2.1.2 Vrozené imunitní reakce lokální

#### **Lokální antimikrobiální peptidy, defensiny a kathericidiny**

Defensiny se rozlišují na alfa a beta defensiny (62-67). První jsou sekretovány neutrofilové, beta defensiny jsou hlavně produkty epitelů a submukózních žláz. Kathericidiny jsou takéž nacházeny na povrchu epitelální vrstvy, kam jsou sekretovány při zánětu. Dle některých prací je účinnost těchto antimikrobiálních látek v prostředí CF plic snížena (65). Nicméně mechanismy, které vedou k této poruše v první linii obrany, nejsou zcela jasné. V tomto směru existují dvě hypotézy, které přisuzují snížení účinnosti vysokému obsahu soli ve vazkém hlenu, či snížené produkci těchto látek poškozenými buňkami sliznic. Kombinace těchto faktorů není vyloučena. Každopádně první kontakty imunitního systému s patogeny v CF plicích vedou ke zcela neefektivní eradikaci těchto mikroorganismů a ovlivňují negativně další kroky v kaskádě imunitních reakcí.

V této souvislosti je třeba zmínit možnou "imunologickou" úlohu vlastního CFTR. CFTR slouží jako specifický receptor jednak pro *P. aeruginosa*, jednak pro LPS odvozený z řady typických G<sup>-</sup> patogenů (24). Při základní patologii CFTR proteinu potom dochází ke zvýšené náloži patogenů a LPS v místě zánětu a k enormnímu zvýšení zátěže imunitního systému (68). Všechny tyto okolnosti vedou k zánětlivým procesům a posléze dospějí do stadia chronického zánětu v plicích CF pacientů. Tento stav je charakterizován trvalým influxem hlavně neutrofilů a makrofágů do místa zánětu, infiltrací sliznice, sekrecí řady imunologicky velmi aktivních látek s dominancí cytokinů a posléze k destrukci sliznice. Lokální destrukce je v bludném kruhu imunitních reakcí potencována působky sekretovanými přítomnými infiltrujícími buňkami, jakou jsou proteázy a oxidanty. Destrukce buněk v místě zánětu včetně epitelii vede k uvolnění obsahu těchto buněk včetně DNA, která dále přispívá k viskozitě sekretu.

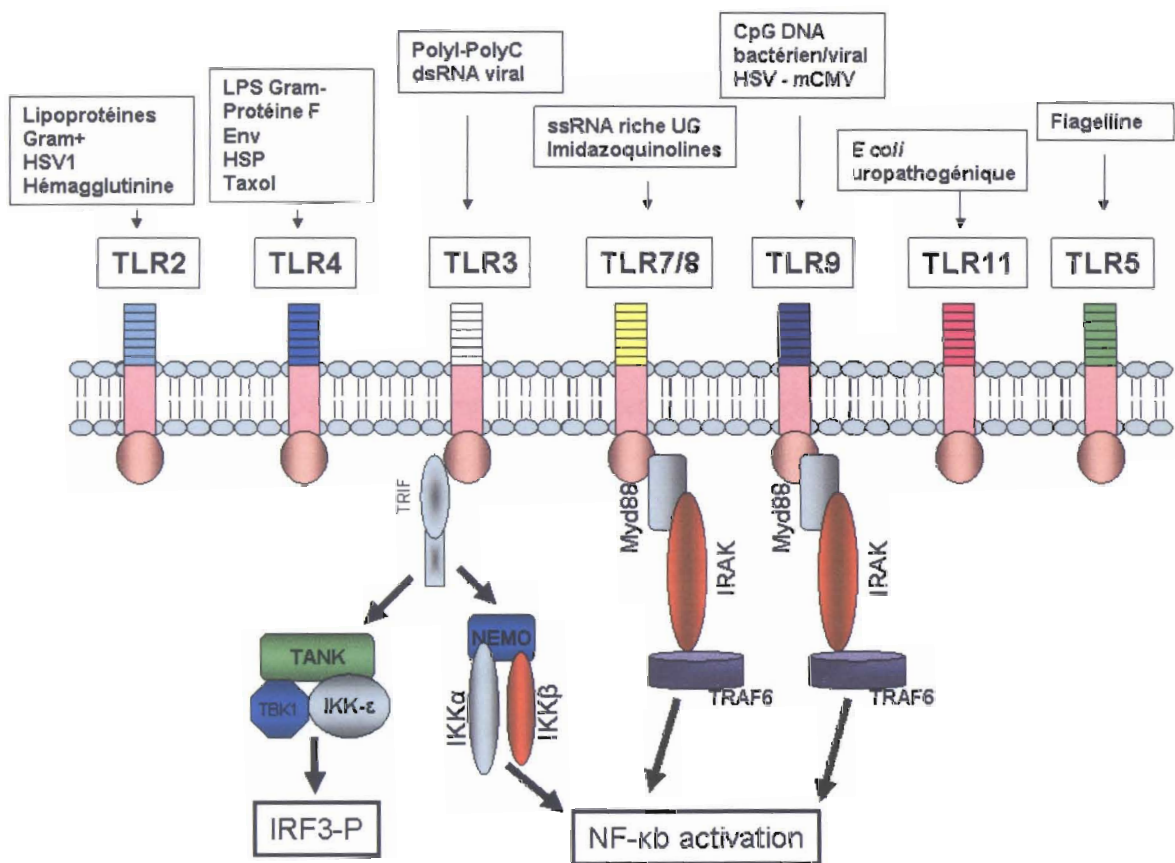


Obr. č. 2.1 Zánětlivá odpověď u CF – Bludný kruh (Upraveno dle Rose)

### Komplex rozpoznávající lipopolysacharid (LPS)

Lipopolysacharid (nazývaný také endotoxin) je jedním z nejdůležitějších hráčů ve vztahu k imunitním reakcím u CF. LPS je virulentním faktorem G<sup>-</sup> bakterií, typických patogenů

u CF. LPS je významným stimulem imunitního systému v produkci prozánětlivých cytokinů, proteáz, eikosanoidů a reaktivních kyslíkových radikálů a dusíkatých látek (69). Reakce imunitního systému proti LPS jsou tedy zásadní pro eradikaci infekce. V poslední době byly ozřejmány molekulární vazby LPS na buňku (70). LPS je rozeznáván komplexem molekul, mezi nimiž jsou zásadní molekuly CD14 ve formě solubilní či membránové (na povrchu makrofágů, neutrofilů, lymfocytů a žírných buněk), lipopolysacharid binding protein (LBP) (71) a zástupci rodiny Toll-like receptorů (TLR). TLR je relativně nedávno objevená skupina receptorů, které zajišťují první kontakt buněk organismu s celou škálou mikroorganismů (72-74). V současné době je známo jedenáct zástupců této skupiny (viz. Obr. 2.2, 2.3).

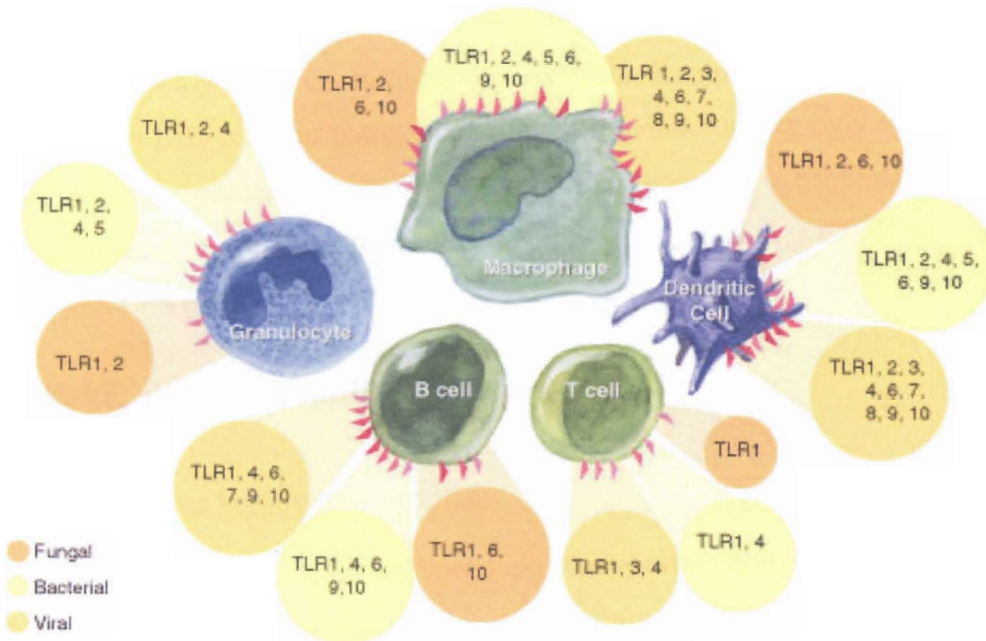


Obr. č. 2.2 Rodina Toll-like receptorů (Akira, 2002)

Jednotliví členové rozpoznávají poměrně specificky určité typy struktur pocházejících z patogenů, z nichž pro CF jsou významné molekuly TLR4, respektive TLR2, rozpoznávající LPS, a TLR5, reagující na flagelin bakterií. Komplex CD14, LBP a TLR4 je nyní předmětem velmi aktivního výzkumu, zahrnujícího zkoumání reakcí vyvolaných vazbou *P. aeruginosa* či



*B. cepacia*. Detailní pochopení těchto vazeb a jejich odlišného charakteru u CF přinese velmi důležité poznatky pro patogenezi chronické infekce u CF. Tyto vazby vedou v buňkách imunitního systému i v dalších buňkách včetně epitelů k signalizaci a následné produkci dalších důležitých molekul. Mezi tyto molekuly patří i cytokiny (viz. níže).



Obr. č. 2.3 Rodina Toll like receptorů (Akira, 2002)

### 2.1.3 Vrozené imunitní reakce systémové

Mezi vrozenými imunitními mechanismy systémovými humorální povahy nese klíčovou úlohu systém komplementu. Systém komplementu je složitým komplexem základní kaskády komplementu a řady regulačních složek. V celém tomto systému je popsána řada vrozených i získaných patologií, nicméně žádná z těchto situací nebývá spojována s CF. U pacientů s CF se sice nenalezly příčinné poruchy komplementového systému, nicméně výzkum poslední doby ukazuje, že určitou roli v patogeneze chronické infekce bude komplement u CF hrát. Tato úloha je nyní spojována s MBL proteinem syntetizovaným v játrech. Patří do skupiny lektinů podílejících se na specifické vazbě k různým cílovým molekulám (tzv. pattern recognition receptors) a je schopný se efektivně vázat na polysacharidové struktury na povrchu mikrobů (na povrchu např. *Staf. aureus*, *B. cepacia* komplex, ale nikoli *P. aeruginosa*, také viz. tab. č. 4.1) (75, 76). Do stejné velké rodiny patří i výše popsané TLR. MBL bakterie buď neutralizuje a/nebo je opsonizuje aktivací komplementu, pomocí tzv. lektinové cesty. V závislosti na individuálních polymorfismech genu pro *MBL* u daného jedince (popsáno i u CF pacientů) jsou dány sérové hladiny tohoto lektinu. Jednotlivé takové

varianty jsou potom spojeny s různou odpovědí na infekci. U CF jsou ve zvýšené míře přítomny varianty vedoucí k deficienci MBL a k porušené neutralizaci lipopolysacharidů a dalších toxických substancí uvolňovaných z patogenních mikrobů a tím k nepříznivému průběhu chronických infekcí (75-78).

Přestože poruchy v samotné kaskádě komplementu nebyly u CF popsány, komplement se jistě účastní v patologických procesech imunokomplexových. Komplement u CF je aktivován hlavně bakteriemi či LPS z těchto patogenů. Samotné imunokomplexy byly ve zvýšené míře nalezeny u některých pacientů s CF, a to zvláště u pacientů s probíhající artritidou. V některých případech byly imunokomplexy nalezeny u pacientů s CF i ve sputu, kde obsahovaly přímo LPS (79).

## 2.2 Specifické, získané imunitní reakce

### 2.2.1 Specifické reakce humorální – protilátky

Protilátky jsou nejdůležitější složkou specifické humorální imunity. U dětí s CF byly protilátky detailně vyšetřovány. Protilátky jsou součástí imunitního systému, které vykazují nejvýraznější dynamiku v průběhu dětství. U dětí s CF je dynamika změn titrů protilátek shodná se zdravými dětmi. V novorozeneckém věku jsou hladiny IgG vysoké, dané mateřskými transplacentárně přenesenými imunoglobuliny IgG. Přenesené protilátky jsou postupně odbourány a přibližně od 6. měsíce věku stoupá celková hladina IgG daná již vlastní produkcí dítěte. Hladiny IgA a IgM jsou naopak zpočátku velmi nízké a postupně s věkem narůstají. Deficience v protilátkovém systému nebyly u pacientů s CF nalezeny, kromě několika studií, které dokumentují přechodné snížení IgG<sub>2</sub> v prvních letech života (80). U CF platí všeobecně zcela opačný trend, a to s věkem postupný rozvoj hypergamaglobulinémie prakticky ve všech třídách Ig. Takové zvýšení imunoglobulinů je patrné od raného dětství, dále se neustále stupňuje až do dospělosti, kdy nacházíme velmi vysoké hodnoty všech tříd Ig (viz. obr. č. 3.1). Pacienti s CF také velmi dobře reagují na specifické antigeny. Konkrétně protilátková odpověď na *P. aeruginosa*, která byla intenzivně zkoumána, je velmi dobrá a téměř všichni pacienti vytvoří vysoké hladiny protilátek proti tomuto mikroorganismu. Nicméně přes adekvátní protilátkovou reakci nedochází k eradikaci patogenu (81). Některé studie prokazovaly snížení opsonizačních vlastností těchto přirozeně vytvořených protilátek u CF pacientů. Tvorbu účinnější imunitní odpovědi se nyní snaží některé skupiny dosáhnout vakcinací proti *P. aeruginosa* v raném věku, v době pokud možno před kolonizací touto bakterií (82). Testují se jak vakcíny proti jednotlivým antigenům

*P. aeruginosa* (monovalentní vakcíny), tak proti více antigenům najednou (polyvalentní vakcíny) (83-85). Další možností je pasivní imunizace v podobě ústních kloktadel obsahujících Y imunoglobuliny, což jsou slepičí protilátky proti *P. aeruginosa* (86).

### 2.2.2 Specifické reakce humorální - autoprotilátky

CF je dědičně podmíněné onemocnění, jehož patogenese se primárně odvíjí od porušené funkce *CFTR*. Poruchy imunity při CF jsou sekundární, vyplývající ze změněného prostředí, ve kterém se odehrávají imunitní reakce. Opakovaně dokumentovaná pozitivita autoprotilátek u pacientů s CF je tedy překvapivým nálezem. Část pacientů s CF má přechodně nebo dokonce opakovaně až trvale pozitivní nález protilátek nazývaných ANCA, antineutrophil cytoplasmic antibodies (87, 88). ANCA protilátky zahrnují obecně celé spektrum protilátek s různou specificitou. Největší význam hrají ANCA v diagnostice a v patogenese onemocnění ledvin, konkrétně jsou pozitivní u Wegenerovy granulomatózy či mikroskopické polyangiitidy. Byly popsány i další asociace ANCA, například u části pacientů s revmatoidní artritidou či autoimunitní hepatitidou. Jejich pozitivita u části pacientů s CF je opakovaně doložena, byl nalezen i cílový antigen ANCA protilátek u CF, jímž je baktericidii/permeabilitu zvyšující protein, BPI (71, 89). BPI je mikrobicidní protein vylučovaný z granul neutrofilů, nalezený i v epiteliích, který s velkou afinitou váže LPS. ANCA protilátky u CF mohou blokovat BPI a tak přispívat k horší reaktivitě vůči LPS a k nepříznivému průběhu typických infekcí u CF. Toto negativní působení ANCA protilátek bylo opakovaně popsáno (90, 91). Nicméně patogenese ANCA u části pacientů s CF není stále zcela vyjasněna.

### 2.2.3 Specifické reakce buněčné – T lymfocyty

U pacientů s CF nebyly nalezeny žádné významné poruchy buněčné imunity. Ve starších pracích jsou popisovány sekundární změny v parametrech buněčné imunity způsobené činností enzymů, uvolněných z nahromaděných neutrofilů v místě zánětu. Tyto enzymy, hlavně elastáza a alkalická proteáza, přispívají k utlumení buněčné imunity štěpením povrchových molekul lymfocytů (92). Nicméně takové přímé snížení buněčné odpovědi nebylo později doloženo. V poslední době se práce věnují spíše regulační úloze buněčné imunity. Poruchy regulace buněčné odpovědi ve smyslu Th1 či Th2 větve jsou popsány níže v souvislosti se sekretovanými cytokiny. Úloha T lymfocytů jako klíčových buněk specifických imunitních reakcí není u CF ještě dobře objasněna. V jedné práci je popsána depozice CD45+CD4+RO paměťových T lymfocytů v plicích v místě chronického zánětu

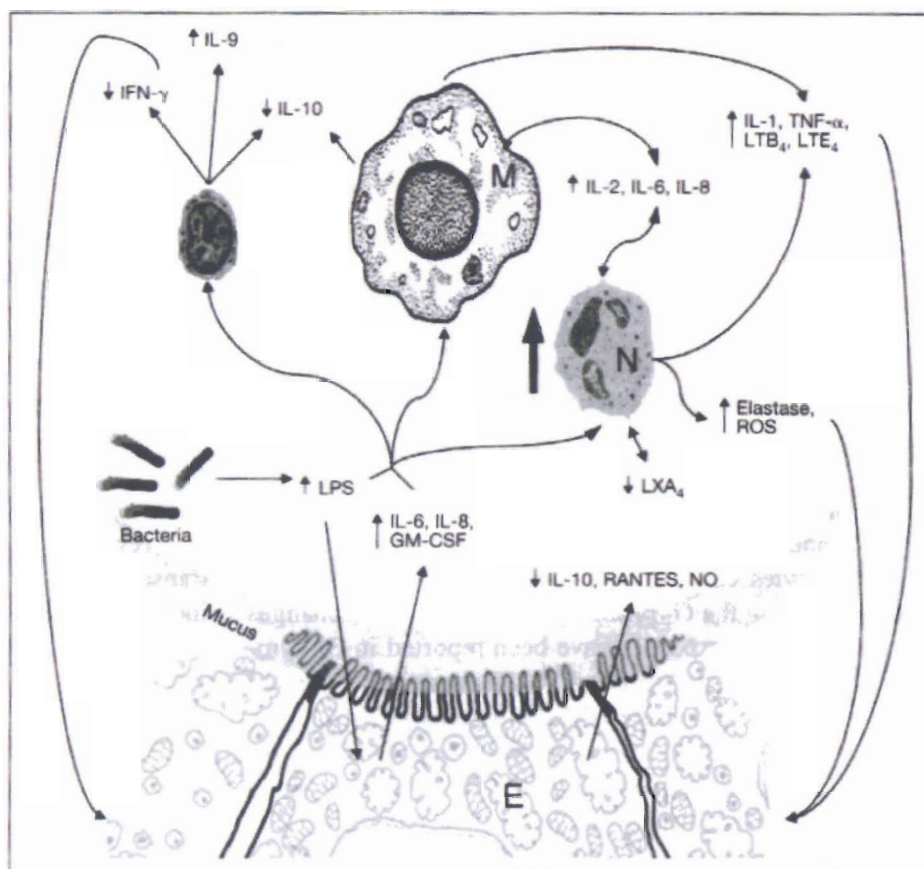
a snížení této populace v periférii (93). Taková situace jenom dokládá sekundární charakter většiny změn v imunitních reakcích, nacházených u CF. Infiltrující T lymfocyty mohou být jenom odrazem chronického zánětu v plicní tkáni, zároveň však také svojí aktivitou mohou řídit a určovat směry dalších imunitních reakcí a ovlivňovat další průběh zánětu.

## 2.3 Regulační mechanismy imunity

### 2.3.1 Cytokiny

Cytokiny jsou zásadní regulační mediátory imunitních reakcí, které hrají důležitou úlohu v prostředí chronického zánětu u CF (94, 95). Patogeny nebo jejich působky i látky tělu vlastní významně stimulují produkci cytokinů u CF pacientů (96, 97). V patogenezi CF zánětlivých procesů jsou diskutovány hlavně prozánětlivé cytokiny IL-1, TNF-alfa, chemokin IL-8, dále regulační cytokiny IFN-gama, TGF-beta1, IL-10 a IL-4 (95, 96, 98-103). Produkce prozánětlivých cytokinů je většinou u CF zvýšena a udržována bludným kruhem chronické infekce, neefektivně eradikované imunitním systémem. Opakovaně byly popsány zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů v supernatantech BAL u CF pacientů s chronickou *G*<sup>-</sup> infekcí (94, 97, 98). Zvláště IL-8 svým chemoatraktivním působením přispívá k influxu neutrofilů do místa zánětu, s následnými dalšími negativními důsledky v podobě uvolnění enzymů z granul neutrofilů a tím potencování postupné destrukce sliznice dýchacích cest (104). Chronická aktivace prozánětlivých mechanismů s vysokou produkcí cytokinů může vést až k celkovému poškození organismu. Byla popsána asociace vysokých hladin TNF-alfa s kachexií a osteoporózou u CF pacientů (105). Produkce protizánětlivých cytokinů je v CF prostředí také alterována. Snížená koncentrace IL-10 v BAL CF pacientů a snížená schopnost T-lymfocytů produkovat tento cytokin dokazuje narušenou schopnost imunitního systému u CF pacientů kontrolovat chronický zánět (106, 107). Regulační cytokiny IFN-gama a IL-4 byly zkoumány hlavně z pohledu regulace specifické imunitní odpovědi směrem Th1 či Th2 (108). Z obecného pohledu regulace imunitní odpovědi je Th1 směřovaná reakce charakterizována aktivací buněčné odpovědi a sekrecí IFN-gama jako klíčového cytokinu, zatímco Th2 odpověď je dominantně protilátková spojená se sekrecí IL-4. U CF pacientů je tato polarizace taktéž ovlivněna chronickou infekcí, pacienti s chronickou infekcí *P. aeruginosa* vytvářeli převážně Th2 orientovanou odpověď. TGF-beta1 má zvláštní postavení pro svou úlohu v potencování fibrotických procesů, které jsou jedním ze základních znaků cystické fibrózy. V současné době se na TGF-beta1 pohlíží jako na jeden z možných

modifikujících genetických faktorů průběhu CF, neboť různé polymorfismy genu pro *TGF-beta1* mohou být spojeny s odlišným průběhem onemocnění (109, 110).



Obr. č. 2.4 Cytokinová dysregulace v patogenzi chronického zánětu u CF (v Bush, 2005)

## 2.4 Regulační úloha T lymfocytů

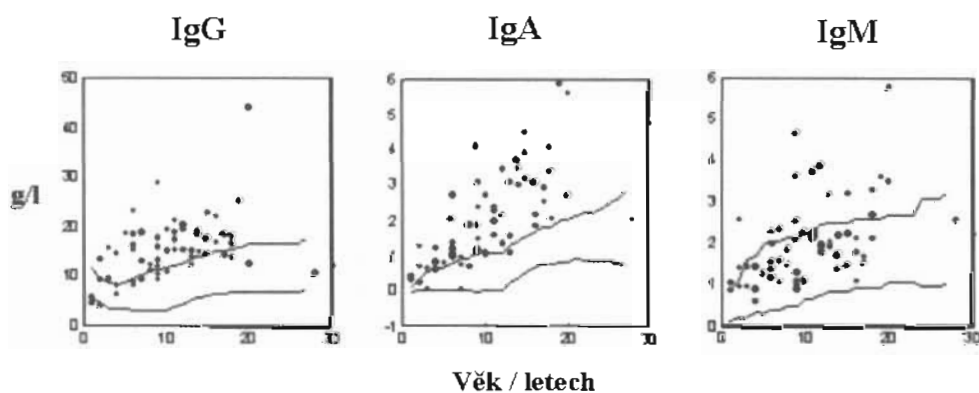
Významná je také regulační úloha T lymfocytů. Ta je spojena s cílenou sekrecí cytokinů, popsaných výše (111). T lymfocyty mohou také regulovat imunitní reakce přímo, a to přímým kontaktem s dalšími buňkami a tkáněmi účastnicími se imunitní odpovědi. Tyto reakce jsou velmi komplexní, probíhají hlavně v lymfatických uzlinách. Zde se T lymfocyty setkávají s buňkami prezentujícími antigen, z nichž nejdůležitější jsou dendritické buňky, které jsou v dnešní době intenzivně zkoumány (viz. dále kap. č. 5.1). V lymfatických uzlinách jsou i B lymfocyty, které se také účastní komplexní imunitní odpovědi a posléze produkují příslušné protilátky. Tyto reakce jsou obecně platné. Jejich průběh u CF však může být modifikován základním onemocněním, chronickým zánětem a tím vysokou náloží antigenů, dále povahou probíhající infekce a řadou dalších vlivů (27, 97). Poznání těchto pochodů specificky u CF může v budoucnu vést k navržení léčby zahrnující i hledisko imunitní odpovědi na infekci u CF.

### 3 Zkoumání imunitního systému CF pacientů na vlastním souboru

Studium imunitního systému u CF je na našem pracovišti jedním z dlouhodobých projektů. Imunitní systém u CF pacientů byl a je analyzován ve všech aspektech. Stále nejasná otázka patofyziologie chronické infekce významně ovlivňující morbiditu i mortalitu u CF pacientů při primárně plně funkčním imunitním systému nás vedla k intenzivnímu zkoumání možných poruch v imunitním systému těchto chronicky nemocných pacientů.

Studium imunitního systému jsme začali komplexním vyšetřením všech složek imunitního systému jak jeho humorální, tak buněčné složky.

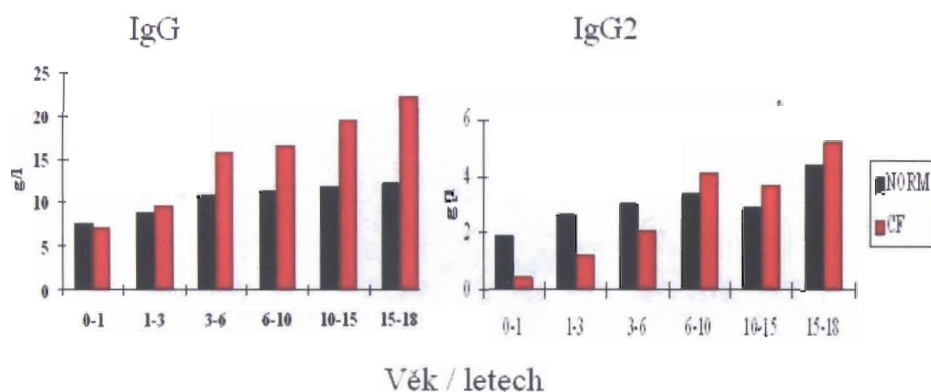
V souladu se světovou literaturou jsme nenalezli žádnou primární poruchu v imunitním systému CF pacientů s výjimkou přechodné hypogamaglobulinémie zvláště v podtřídě IgG2 v prvních letech života (viz. obr. č. 3.2). Všechny další změny v imunitních parametrech jsou považovány za sekundární. Nejvýznamnějším jevem je s věkem se rozvíjející až extrémní hyperimmunoglobulinémie doprovázená zvýšenou hladinou cirkulujících imunokomplexů (viz. obr. č. 3.1). Hyperimmunoglobulinémie koreluje s horším průběhem plicního onemocnění a chronickým neutrofilním zánětem v poškozené plicní tkáni.



Obr. č. 3.1 Hladiny Ig u CF pacientů v porovnání s kontrolami v závislosti na věku. Věkově vázané normy jsou označeny plnou čarou (reprezentující průměrné hodnoty  $\pm 3$  SD).

Ve srovnání se neCF dětskou populací jsme zjistili lehkou celkovou hypogamaglobulinémií v raném dětství (nejvíce v 1. – 3. roce života), následovaná typickou hyperimmunoglobulinémií v pozdějších věkových obdobích. Nejvíce se toto snížení promítá do podtřídy IgG2. Právě tyto protilátky hrají významnou roli v obraně proti G<sup>-</sup> bakteriím včetně *P. aeruginosa*, jež je hlavním patogenem u CF. Tento deficit by mohl v raném dětství u CF pacientů přispívat

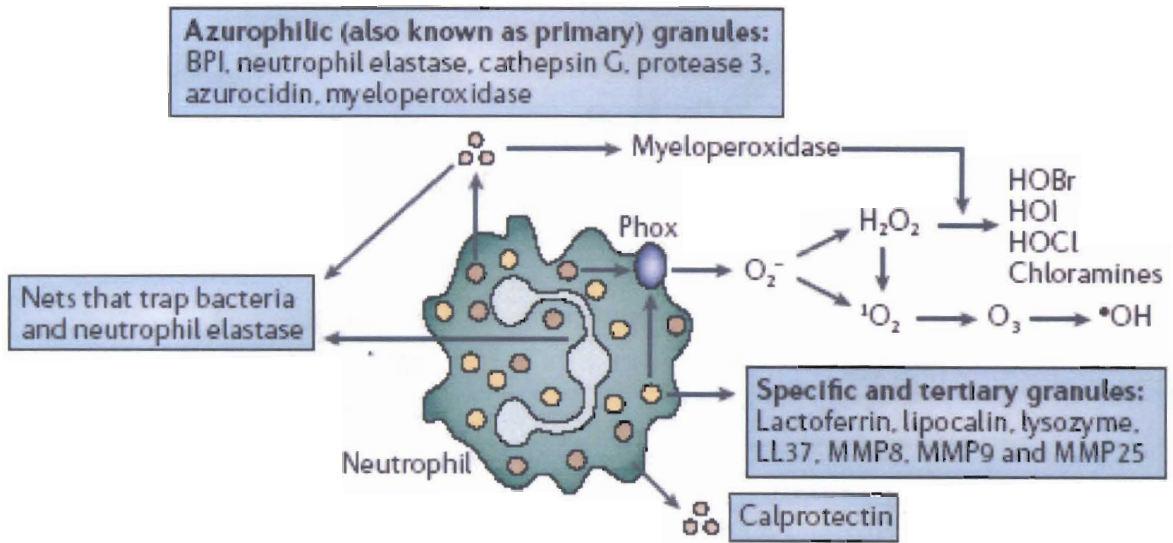
k pozdější chronické kolonizaci tímto patogenem. Na základě těchto zjištění sledujeme pravidelně stav imunity u malých CF pacientů a při potvrzení deficience v oblasti imunoglobulinů zahajujeme substituci.



Obr. č. 3.2 Srovnání hladin celkového IgG a podtřidy IgG2 u CF pacientů a kontrol v závislosti na věku

V roce 1996 byla poprvé publikována překvapivá informace o přítomnosti ANCA protilátek u pacientů CF (112). ANCA autoprotiátky jsou důležitým diagnostickým prvkem u vaskulitid. Dále byly ANCA popsány u některých u autoimunitních onemocnění, u nespecifických střevních zánětů a revmatoidní artritidy (113). ANCA jsou protilátky namířené proti součástem neutrofilů – proti proteináze 3 u Wegenerovy granulomatózy, méně specifické jsou např. u mikroskopické polyangiitidy, kde jsou namířené proti myeloperoxidáze. Cílový antigen ANCA protilátek u CF je BPI, patřící k baktericidní výbavě neutrofilů (viz. obr. č. 3.3). BPI velmi účinně neutralizuje bakteriální LPS a hraje tak zásadní úlohu v obraně proti  $G^-$  bakteriím, včetně *P. aeruginosa*. BPI hraje zásadní roli v baktericidních funkcích. Uplatňuje se jak při vazbě na pohlcovanou bakterii, tak v uvolněné formě při opsonizaci bakterie (87, 89, 114-116). BPI je velmi úzce spojen s LBP. Na rozdíl od LBP, není BPI trvale přítomen ve tkáních a vazba endotoxinu  $G^-$  bakterií není spojena s aktivací TLR4 a vytvořením komplexu LPS-LBP-CD14 (71).

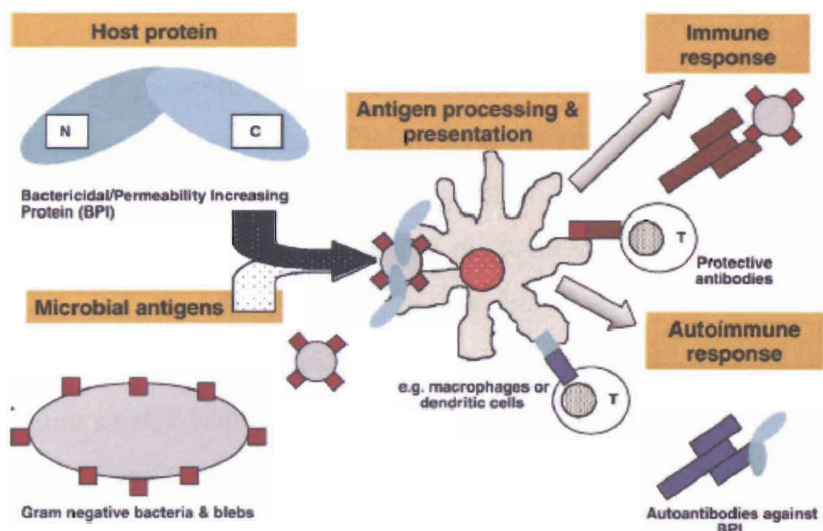
Možná blokáda BPI ANCA protilátkami by mohla přispět k patogenezi chronické *P. aeruginosa* infekce u CF dětí. I v našich pokusech byla prokázána zvýšená pozitivita ANCA protilátek namířených proti BPI u CF pacientů a to již v prvním roce života, tedy v období bez přítomnosti chronické infekce (88, 117). V menší míře byly nalezeny hraniční či mírně pozitivní protilátky proti PR3, které byly závislé na věku CF pacientů (přítomné u CF dětí od deseti let).



Obr. č. 3.3 Anti-mikrobiální agens produkovaná neutrofily (Nathan C, 2006)

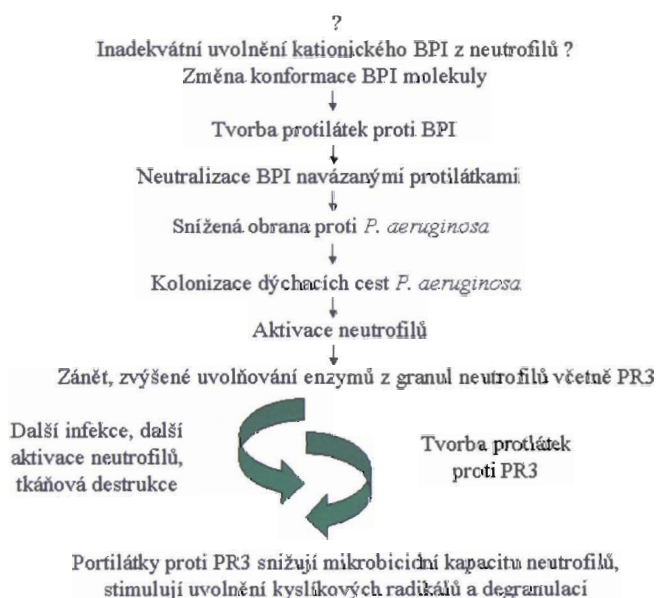
Otázka vzniku BPI ANCA protilátek není dosud objasněna. První zvažovanou možností byly molekulární mimikry. Mapování epitopů u pacientů s BPI ANCA protilátkami ukázalo velmi podobné BPI epitopy s povrchovými molekulami *P. aeruginosa* a *E. coli* (116). Molekulárními mimikry však není snadné vysvětlit většinu reakcí spojených s BPI ANCA. Další možný mechanismus podílející se na vzniku BPI ANCA u CF pacientů je spojen s dendritickými buňkami, nejúčinnějšími antigen prezentujícími buňkami (podrobně viz. kap. 5.1). BPI nejenom zabíjí  $G^-$  bakterie a neutralizuje jejich endotoxin, ale také tvoří komplexy s endotoxinem a některými povrchovými bakteriálními proteiny. Tyto komplexy mohou být DC pohlceny a následně prezentovány v komplexech s MHC II. Následná stimulace T lymfocytů vede nejenom k tvorbě ochranných protilátek proti bakteriálním antigenům, ale také k produkci autoreaktivních protilátek proti BPI (viz. obr. č. 3.4). Pravděpodobnost indukce autoimunitní reakce vůči BPI je jistě nízká vzhledem k předpokládanému počtu T lymfocytů opouštějících thymus rozpoznávajících epitopy BPI, ale ve specifickém případě CF při masivní a prolongované prezentaci BPI je nutno zvážit i možné selhání imunitní tolerance (118).





Obr. č. 3.4 Možný mechanismus propojení mezi  $G^-$  infekcí a vznikem BPI ANCA protilátek (Schulz H, 2007)

Možný algoritmus, jímž se ANCA protilátky podílejí na opakovaných a často až chronických infekcích u CF shrnuje následující obrázek. (viz. č. 3.5).



Obr. č. 3.5 Úloha ANCA protilátek v patofyziologii chronického zánětu u CF pacientů

BPI jako vysoce kationický protein by byl ve zvýšené míře uvolňován z granul neutrofilů u CF dětí, u kterých je v membráně přítomen mutovaný CFTR. CFTR je exprimován hlavně v buňkách epitelu, ale určitá hladina mRNA kódující CFTR byla nalezena i v neutrofilech. Po uvolnění z granul neutrofilů může BPI indukovat tvorbu ANCA protilátek, které zablokují jeho funkci a přispívají tak k bludnému kruhu chronického zánětu u CF. Do celého procesu negativně zasahují i protilátky proti PR3 snižující baktericidní schopnost neutrofilů.

Nález ANCA u CF dětí společně se snížením IgG2 jako jediného TH1 kontrolovaného izotypu u nejmladších CF pacientů nás následně vedla k vyšetření cytokinového profilu těchto pacientů s předpokládanou nerovnováhou TH1 x TH2 cytokinového profilu ve prospěch TH2. V našem souboru se TH1 x TH2 nerovnováhu nepodařilo prokázat, ale významným objevem byla skupina CF pacientů neschopná adekvátně reagovat na stimulaci sekrecí IL-4 (TH2) a IFN-gamma (TH1). Zhoršení funkce plic v čase v této skupině bylo statisticky významné oproti skupině CF pacientů, která adekvátně reagovala na stimulaci produkcí testovaných cytokinů srovnatelnou s neCF kontrolami (viz. dále kap. 3.1.1, (108)).

V souladu s aktivním výzkumem ve světě, který intenzivně hledal další genetické vlivy modifikující průběh základního onemocnění, jsme se rozhodli taktéž u našich pacientů vyšetřit polymorfismy dalších genů mimo *CFTR* ((119), další viz. kap. 4.1). Faktory, které jistě ovlivňují imunitní odpověď jsou ty, které regulují směr imunitní reakce. Cytokiny jsou takovou klíčovou složkou regulace imunity. Rozhodli jsme se u našich CF pacientů sledovat polymorfismus genů několika cytokinů, a to hlavně *TGF-beta1* (viz. kap. 4.2). *TGF-beta1* byl vybrán jako klíčový gen v tomto kontextu pro jeho známý a popsáný efekt v procesu fibrotizace.

Dále jsme naši pozornost zaměřili na MBL, který je součástí nespecifické větve imunitní reakce, zvláště v systému aktivace komplementu a v prvních krocích imunitní odpovědi vůči infekci. V souvislosti s CF byl popsán jako gen a protein modifikující průběh onemocnění.

Detaily výzkumu polymorfismu cytokinových a dalších kandidátních genů modifikujících průběh základního onemocnění jsou popsány níže (viz. kap. 4.3).

V průběhu našeho studia faktorů modifikujících průběh onemocnění jsme narazili i na další molekuly. Naši pozornost zaujaly proteiny surfaktantu, zvláště SP-D, který má imunologické funkce a místo působení v plicích, tudíž by mohl hrát roli v klinice CF. Zaměřili jsme se na jeho stanovení v BAL, v místě patogenetické reakce (viz. níže kap. 4.4).

Další faktor, kterému jsme věnovali naši pozornost byl LTB4, který je jedním z metabolitů kyseliny arachidonové. LTB4 se významně podílí na potenciaci neutrofilního zánětu, působí jako mocný chemoatraktant neutrofilů do místa zánětu a indikuje produkci kyslíkových radikálů. Zajímala nás korelace koncentrací LTB4, počtu neutrofilů v materiálech z dolních dýchacích cest a hlavně korelace těchto parametrů s tíží bronchopulmonálního onemocnění (viz. níže kap. 4.5).

Při komplexním řešení problematiky CF jsme se začali intenzivně zabývat také stěžejními buňkami imunitní reakce, dendritickými buňkami, u CF pacientů. Zvláště jsme se zaměřili na

jejich specifikaci u CF pacientů a na jejich interakci s infekčními agens. V této situaci jsme zkoumali bakterie z *B. cepacia* komplexu a jako modelovou situací jsme využili mutantních kmenů *P. aeruginosa*. Ve stejné oblasti jsme studovali i TLR receptory, důležité struktury v iniciaci imunitní dopovědi a v reakci na infekci (viz. níže kap. 5.1.6).

Výsledky našeho zkoumání imunitního systému CF pacientů vedly až ke klinické aplikaci našich poznatků v podobě serologické diagnostiky infekce *P. aeruginosa* - vyšetřování titru protilátek proti *P. aeruginosa*. Toto vyšetření je zvláště přínosné u neexpektorujících CF pacientů, tedy těch, kteří neprodukují sputum, nejčastěji malých dětí s CF, kde serologie může významně přispět k včasné diagnóze *P. aeruginosa* infekce a napomoci časné, razantní terapii s cílem eradikovat tohoto patogena (viz. kap. č. 6).

### 3.1 Cytokinový profil u CF pacientů

Výsledky studia cytokinového profilu u CF pacientů shrnuje publikace, která vyšla v roce 2005 v *Clinical Immunology* (viz. LT příloha A2). Publikace byla citována dalšími autory v impaktovaných časopisech.

Cílem projektu byla potenciální Th1 x Th2 nerovnováha u pacientů s CF, s předpokládanou převahou Th2 buněčné odpovědi u CF pacientů.

Dle produkce jednotlivých cytokinů v *in vitro* systému LPS/PHA stimulovaných buněk došlo k rozdělení pacientů na 2 skupiny: “nízké producenty”, produkující nízké hladiny cytokinů (IFN $\gamma$  10.0-200.0 pg/ml, IL-4: 0.0-0.3 pg/ml) a “vysoké producenty”, produkující vysoké hladiny testovaných cytokinů srovnatelné s kontrolní skupinou (IFN $\gamma$  500.0-2000.0 pg/ml a IL-4 1.0-200.0 pg/ml). U pacientů s nízkou produkcí cytokinů došlo ke zhoršení funkce plic (parametr FEV $_1$  poklesl o 11.2 %) v porovnání se skupinou pacientů produkujících vyšší hladiny cytokinů během 3 let trvání studie ( $p < 0.01$ ). Ve skupině CF pacientů produkujících vysoké hladiny testovaných cytokinů bylo pouze 13 ze 32 pacientů chronicky kolonizováno *P. aeruginosa*, oproti skupině pacientů s nízkou produkcí, kde bylo 10 z 16 pacientů chronicky kolonizováno. Posun ve směru Th2 buněčné odpovědi byl pozorován pouze u pacientů s chronickou kolonizací *P. aeruginosa* ve skupině pacientů produkujících vyšší hladiny testovaných cytokinů. ANCA autoprotiilátky byly nalezeny pouze ve skupině pacientů s vyšší produkcí testovaných cytokinů.

Optimální cytokinové prostředí je velmi důležité v obraně proti infekci a nerovnováha, příp. nedostatečná produkce důležitých cytokinů ovlivňuje závažnost postižení funkce plic a tedy morbiditu i mortalitu těchto pacientů.

### 3.1.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Závěry této práce jsou v souladu se světovou literaturou, co se týče pozorované Th2 převahy u části pacientů s chronickou kolonizací *P. aeruginosa*. Rozdílná schopnost produkovat dostatečné koncentrace Th1 (IFN $\gamma$ ) i Th2 (IL-4) cytokinů mezi CF pacienty nebyla v odborné literatuře dosud publikována. Významné zhoršení funkce plic asociované s nedostatečnou cytokinovou odpovědí, popř. nerovnováhou mezi produkcí prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a snažším získáním chronické G<sup>-</sup> infekce, bylo opakovaně popsáno (101, 106, 107, 111).

## 4 Korelace genotypu s fenotypem – vliv genetických modifikátorů na průběh onemocnění

### 4.1 Přehled poznatků v dané oblasti

Skutečnost, že závažnost základního onemocnění nelze jednoznačně vysvětlit pouze typem a lokalizací mutací *CFTR* genu vedla k úvahám o tom, že ji mohou ovlivnit mimo intragenových faktorů, jako je například splicing varianta IVS-8 T(n) (120), i další geny (121). Postupně se ukázalo, že protein *CFTR* ovlivňuje i jiné membránové kanály (např. *ENaC* nebo *ORCC*). *CFTR* rovněž transportuje další molekuly (jako například ATP), které mohou hrát důležitou roli v imunitních mechanismech a/nebo v mukociliární clearance (122). Přítomnost tzv. modifikujících genů prokázaly experimenty na myších modelech CF (123).

Z tohoto důvodu se v současné době intenzivně pátrá po analogických modifikujících genech i u lidí. U nemocných s CF se tyto modifikátory hledají tzv. asociačními studii, jejichž podstatou je korelace jednotlivých klinických znaků CF se specifickými genotypy kandidátních modifikujících genů, na pozadí jednotného genotypu genu *CFTR* (nejčastěji F508del/F508del homozygoti) a oproti kontrolnímu souboru. Tyto studie mají však dosud kontroverzní charakter a někdy si dokonce vzájemně protirečí (124). Rozdíly ve výsledcích jednotlivých studií lze mimo jiné vysvětlit různým věkem studovaných pacientů, neboť variabilita průběhu CF se zvětšuje s věkem. Výsledky srovnání variant modifikujících genů se závažností CF mohou být tedy různé u stejných pacientů v dětství a v dospělosti (125). Důležité jsou i přesně stanovené klinické parametry užitá pro posouzení závažnosti onemocnění, etnický původ nemocných a dále genotyp *CFTR* genu. Rozdílná situace nastává, studují-li se pouze homozygoti pro mutaci F508del v *CFTR* genu nebo další, daleko méně časté genotypy. Nicméně velice přesné výsledky v tomto ohledu poskytují komparativní studie (dizygotních) sourozenců a především pak dvojčat, které jsou konkordantní nebo diskordantní pro extrémní varianty průběhu CF (126, 127).

Jako možné modifikující faktory se mohou uplatnit proteiny, které přímo nebo nepřímo interferují s *CFTR*. Dalšími kandidáty jsou proteiny, které se obecně uplatňují v transkripci nebo sestřihu všech proteinů, ale i v sekundárních projevech CF jako je zánět nebo imunitní odpověď. Jejich studium se stalo obtížnější, než se původně předpokládalo, protože se ukázalo, že působení takových molekul je tkáňově nebo orgánově specifické (3).

Jedním z prvních jednoznačně identifikovaných modifikátorů je gen *CFMI* podílející se na vzniku mekoniového ileu, který našla mezinárodní kolaborativní studie vedená torontskou skupinou Zielenski a spol. (128). Tento gen se nachází na dlouhém raménku chromozomu 19 (lokus 19q13) a kóduje draselný kanál *KCNN4*, který je exprimován v distálním ileu. Jeho přesná patogenetická role při rozvoji mekoniového ileu však nebyla jednoznačně stanovena a dosud se přesně nepodařilo stanovit asociované genotypy genu *CFMI*. Původně předpokládanou patogenetickou roli časté mutace v genu pro hemochromatózu u homozygotů pro mutaci F508del *CFTR* genu s mekoniovým ileem (129) se však v následujících studiích nepodařilo potvrdit.

V posledních letech se především intenzivně pátrá po genech, které působí jako modifikátory plicního postižení, které je zodpovědné za většinu morbidity a mortality u CF. Z důvodu komplexity patogeneze sino-pulmonálního onemocnění u CF a pouze 60% asociace sino-pulmonálního postižení u CF a základní mutace v *CFTR* genu (130, 131) se v současné době předpokládá, že modulující efekt nemá pouze jeden gen, ale předběžně se zkouší více než 100 kandidátních genů, které mohou ovlivnit výskyt a průběh infekce a chronického zánětu (110, 132-135).

Problematika studia polymorfizmů 10 genů (gen kódující manózu vázící lektin, alfa-1 antitrypsin, tumor nekrotizující faktor alfa, transformující růstový faktor betal, glutathion-S-transferázu, beta2 adrenergní receptor, angiotensin I konvertující enzym, syntetáza 3 endoteliálního oxidu dusnatého, interleukin-10) a jejich předpokládaný (dle předešlých asociačních studií, které prokázaly že se v patogenezi CF postižení uplatňují) vliv na fenotyp CF se stala předmětem mezinárodní multicentrické studie, jejíž výsledky publikoval Drumm a spol. v *New England Journal of Medicine* na podzim roku 2005. Do studie bylo zařazeno 808 CF F508del homozygotních pacientů. Statisticky signifikantní korelace mezi genovým polymorfismem a fenotypem CF byla prokázána pouze u TGF-betal. Byla nalezena asociace mezi polymorfismem *TGF-beta1* genu (kodon 10 a promotorová oblast na pozici -509) a tíží postižení respiračního traktu u CF pacientů (110).

Dalším dříve testovaným kandidátním genem modifikujícím průběh CF bylo studium polymorfizmů v HLA antigenech II. třídy (136).

Důležitým závěrem Drumm a spol. multicentrické studie a dalších shrnujících přehledů na toto téma je, že fenotyp CF je dán kombinací základní mutace v *CFTR* genu a dále spolupůsobením dalších genetických faktorů a mnoha dalších negenetických činitelů včetně vlivu prostředí (27).

## 4.2 Transformující růstový faktor beta1

Transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta, TGF-beta) je členem rodiny transformujících růstových faktorů. U lidí jsou popsány 3 isoformy tohoto cytokinu: TGF-beta1, 2, 3. Gen pro každý z nich je uložen na jiném chromozomu. Nejvíce zkoumaným je TGF-beta1, který je uložen na chromosomu 19q13. TGF-beta1 se nejvíce účastní imunitních procesů a jeho polymorfismy byly nejčastěji u CF studovány.

TGF-beta1 je multifunkční cytokin regulující proliferaci a diferenciaci širokého spektra buněk jak *in vivo*, tak *in vitro* (137). TGF-beta1 je produkován řadou buněk v různých orgánech, kde ovlivňuje růst buněk, diferenciaci, apoptózu, buněčnou migraci, účastní se mnoha imunitních mechanismů a ovlivňuje tvorbu extracelulární matrix (138, 139). Jeho produkce je individuálně různá (140, 141) a částečně závisí na dvou variantách genu *TGF-beta1* na pozicích +869 a +915 (tj. kodónů 10 a 25). Bialelická varianta „T“ nebo „C“ na pozici +869 genu *TGF-beta1* vede ke „střídání“ leucinu a prolinu, zatímco varianta „G“ nebo „C“ na pozici +915 vede k alternativní přítomnosti argininu nebo prolinu. U obou polymorfismů alela kódující prolin je spojena s nižší syntézou TGF-beta1 *in vitro* a *in vivo*. Protein TGF-beta1 produkováný buňkami bronchiálního epitelu stimuluje proliferaci fibroblastů. Z tohoto faktu vyplývá, že „silní producenti“ TGF-beta1 tvoří signifikantně více fibrotické tkáně v plicích v odpovědi na četné spouštěče zánětu jako je například záření, chemoterapie nebo transplantace (140, 142, 143). Porušená regulace produkce TGF-beta1 byla popsána v asociaci s aterosklerózou (144, 145), s nádorovými (146-148) a autoimunitními onemocněními (149, 150).

### 4.2.1 TGF-beta1 a CF

O přesné úloze TGF-beta1 v patogenezi CF je známo velmi málo.

Drumm a spol. publikoval výsledky výše zmíněné multicentrické studie v *New England Journal of Medicine* (studium polymorfizmů 10 CF modifikujících kandidátních genů včetně TGF-beta1). V případě TGF-beta1 byla u 808 CF F508del homozygotních pacientů nalezena asociace mezi polymorfizmem *TGF-beta1* genu (promotorová oblast na pozici -509 a kodon 10) a tíží postižení respiračního traktu u CF (110).

Arkwright a spol. (109) zjistili, že „produkuující“ genotyp kodónu 10 (opačný genotyp než publikovali Drumm a spol.) je spojen s rychlejším zhoršováním funkce plic a s plicní fibrózou. Tento genotyp byl rovněž asociován s dvojnásobně zvýšeným rizikem poklesu

FEV<sub>1</sub> pod 50 % a FVC pod 70 % normy především u mladších pacientů ve srovnání s dětmi s nízkou produkcí TGF-beta1. Průkaz plicní fibrózy je u CF obtížný, protože je zde úzká korelace mezi obstrukční a restriktivní poruchou. Uvedení autoři nenašli korelaci mezi genotypem kodónu 25 a přežíváním nebo funkcí plic. Pacientů s nízkou produkcí TGF-beta1 však bylo málo, protože z populačně genetického hlediska převažuje (v 87 %) genotyp spojený s vysokou produkcí TGF-beta1. Tito autoři však rovněž poukazují na svou dřívější studii, při které našli mezi nemocnými podstupujícími transplantaci plic signifikantně vyšší podíl pacientů, kteří byli silnými producenty pro oba kodóny TGF-beta1. Histologický průkaz plicní fibrózy byl signifikantně vyšší pro kodón 10 ( $p < 0.004$ ) než pro kodón 25 ( $p < 0.02$ ). Konečně u belgických a českých nemocných s CF byl také prokázán vztah TGF-beta1 a závažnosti plicního onemocnění (151).

Rozdílné výsledky jednotlivých studií dokládají nutnost studia kandidátních chorobu modifikujících genů pomocí multicentrických studií, kde se sníží riziko chybného závěru dané malým počtem pacientů v testovaném souboru a dále je možné ve studiích použít shodnou metodiku (152).

#### 4.2.2 Vlastní pozorování

CF pacienti mají vysokou fenotypickou variabilitu. Vzhledem k roli transformující růstového faktoru beta1 v profibrotických a procesech jsme si jej zvolili jako jeden z kandidátních faktorů ovlivňující průběh onemocnění.

Výsledky shrnující danou problematiku jsou diskutovány v článku, který byl publikován v *Clinical Immunology* (viz. LT příloha, kap. 7, A1).

Cílem studie bylo stanovení vlivu genového polymorfismu *TGF-beta1* na fenotyp CF.

U CF pacientů jsme našli podobnou frekvenci polymorfismů jako u kontrolní skupiny s výjimkou nižší frekvence T/T homozygotů na pozici +869, kodon 10 ( $p < 0.02$ ) a vyšší frekvence G/C heterozygotů na pozici +915, kodon 25 ( $p < 0.03$ ). Produkce TGF-beta1 (ng/ml) měla velký rozptyl u kontrol a ještě větší u CF pacientů. Nekolonizovaní pacienti produkují méně TGF-beta1, mají lepší funkci plic a lepší stav výživy v porovnání s pacienty chronicky kolonizovanými *P. aeruginosa*. Nejnižší produkci TGF-beta1 a nejhorší funkci plic však mají pacienti kolonizovaní bakteriemi komplexu *B.cepacia* ( $p < 0.0015$ ). CF pacienti s *TGF-beta1* genotypem TT (kodon 10) / GG (kodon 25) měli častěji s CF asociované postižení jater a s CF asociovaný diabetes.



Žádný z testovaných polymorfismů nebyl spojen se změnou produkci TGF-beta1. Pacienti se velmi liší v produkci tohoto cytokinu bez ohledu na genotyp. Se zhoršenou funkcí plic byly spojeny jak velmi vysoké, tak velmi nízké hladiny TGF-beta1.

#### 4.2.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Dosud publikované práce na téma asociace polymorfizmů *TGF-beta1* genu a tíží zvláště plicního postižení u CF pacientů přinesly opakovaně zcela protichůdné závěry (109, 110, 153). Závěry naší práce nepotvrdily asociaci určitých polymorfizmů *TGF-beta1* s plicním postižením u CF pacientů. Důvodem tohoto rozdílného závěru může být problém malého počtu pacientů v této studii. Byla však nalezena asociace jaterního a endokrinního postižení pankreatu s konkrétními polymorfizmy *TGF-beta1* ve shodě s dřívější prací Arkwrighta a spol. (153). Rozdílná frekvence polymorfizmů *TGF-beta1* ve zdravé a CF populaci dosud publikována nebyla. Dosud nepublikováno je také pozorování velmi nízkých koncentrací TGF-beta1 u CF pacientů chronicky kolonizovaných komplexem *B. cepacia* činící tyto pacienty zranitelnějšími při akutní exacerbaci chronické G<sup>-</sup> infekce.

### 4.3 Manózu vážící lektin (MBL)

Manózu vážící lektin (mannose-binding lectin, ve starší literatuře též MBP – Mannose-binding protein či Mannan binding protein) je důležitý protein vrozeného imunitního systému (75, 76, 154). Patří do skupiny sérových proteinů podílejících se na specifické vazbě k různým cílovým molekulám (tzv. pattern recognition molecules) a je schopný se efektivně vázat na polysacharidové struktury na povrchu bakterií, virů a hub (viz. tab. 4.1). MBL bakterie buďto neutralizuje a/nebo je opsonizuje aktivací komplementu, pomocí tzv. lektinové cesty. MBL patří do skupiny plasmatických kolektinů (C-typ lektinu s kolagenu-podobnou doménou) a je syntetizovaný v játrech. MBL je shodný s C1q složkou v klasické aktivaci komplementu (viz. obr. 4.3).

Sérová hladina MBL je geneticky determinována (viz. obr. č. 4.1). *MBL2* gen je lokalizován na chromosomu 10q11.2-q21 (*MBL1* je inaktivní pseudogen) (78). Deficit, resp. snížená hladina MBL je způsobena strukturálními mutacemi v kodonech 52, 54 a 57 prvního exonu genu *MBL*. Tyto mutace se označují písmeny „D“ (vzácnější), „B“ (v Evropě nejčastější, zastoupena asi u čtvrtiny Evropanů) a „C“ (častá na africkém kontinentu); společný název těchto tří variant je „O“, zatímco normální alela se nazývá „A“. Každá ze 3 variant snižuje množství funkčních podjednotek MBL u nosičů 5-10x. Výsledné koncentrace proteinu MBL

se liší v populaci více než tisícinásobně, což prokazují kombinace dnes již sedmi popsaných haplotypů spojených s různými formami genu *MBL*.

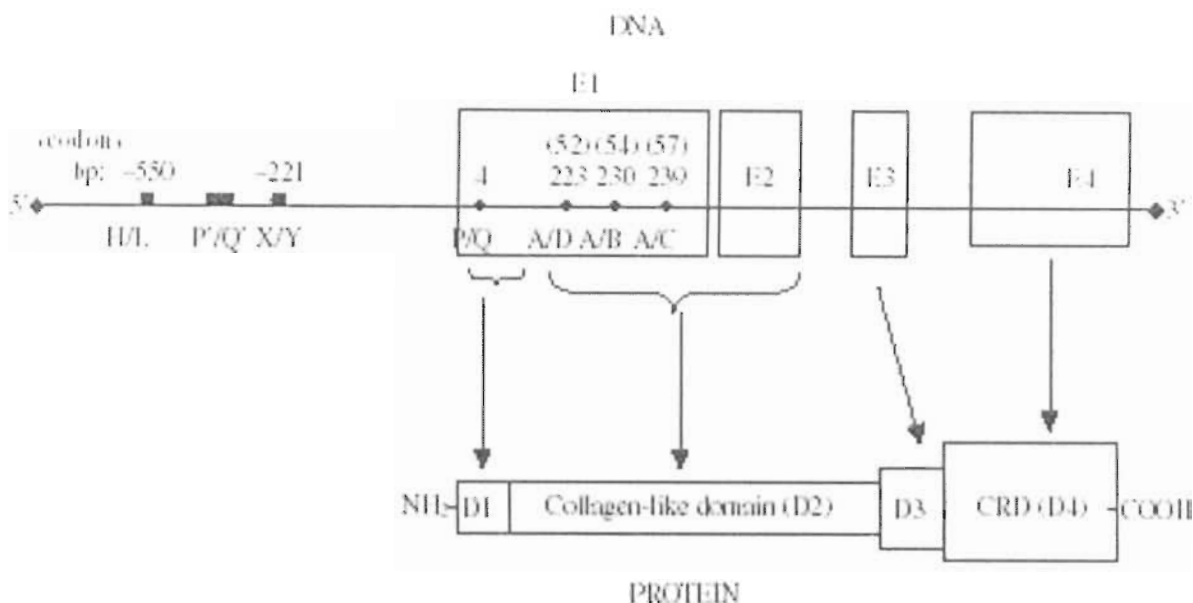
Nezanedbatelný vliv na sérovou hladinu MBL má také polymorfismus v promotorové oblasti genu *MBL*. Popsané varianty jsou označovány -550 H/L, -221 X/Y a +4 P/Q, přičemž běžně se vyskytují promotorové haplotypy LXP, LYP, LYQ a HYP. Haplotyp HYP je spojen s normální až vysokou hladinou MBL, naopak haplotyp LXP určuje významně sníženou hladinu MBL (75, 155).

V souhrnu asi 10 % populace s nejnižšími hodnotami MBL je pokládáno za „MBL insuficientní“ a má sklon k častým infekcím, způsobeným především extracelulárními patogeny, ale i k chorobám neinfekční povahy (76).

Na plazmatickou koncentraci MBL však mají vliv i negenetické faktory. Osoby s nízkým cirkulujícím MBL jsou zranitelnější vůči různým infekcím u řady klinických stavů, zejména je-li tento stav kombinovaný se sekundárním imunodefektem. Deficit MBL je rovněž důležitý rizikový faktor u kojeneckých infekcí, u osob léčených chemoterapií nebo po transplantacích. Snížení aktivity MBL také ovlivňuje průběh různých závažných nemocí jako je například meningokoková seps, chronická revmatoidní artritida, jaterní cirhóza nebo může být i příčinou opakovaných potratů (154).

Tab.č. 4.1 Manózu vážící lektin a surfaktant protein D a A interagují s širokým spektrem patogenů (upraveno dle Kilpatrick, Clark a Wright)

Mikroorganismus	Vazba MBL	Vazba SP-D	Vazba SP-A
<b>Baktérie:</b>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+	+
<i>Streptococcus</i> sk. A	+	?	+
<i>Streptococcus</i> sk. B	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	?	+	+
<b>Viry:</b>			
Influenza A	+	+	+
RSV	+	+	+
CMV	+	?	+
HISV	+	?	+
Rotavirus	?	+	?
<b>Houby:</b>			
<i>Pneumocystis carinii</i>	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+



Obr. č. 4.1 MBL - struktura *MBL2* genu a proteinu (Kilpatrick DC, 2002)

#### 4.3.1 MBL a CF

Problematika studia polymorfizmů 10 genů (včetně *MBL*) a jejich předpokládaný (dle předešlých LT údajů) vliv na fenotyp CF se stala předmětem mezinárodní multicentrické studie, jejíž výsledky publikoval Drumm a spol. v *New England Journal of Medicine* na podzim roku 2005. V případě *MBL* nebyla u 808 CF F508del homozygotních pacientů nalezena asociace mezi polymorfizmem *MBL2* genu a tíží postižení (se zaměřením na postižení respiračního traktu) u CF (110).

Ke stejnému závěru, tedy nenalezli žádnou asociaci mezi *MBL2* genotypem a CF fenotypem, dospěli Carlsson a spol. (156). U 112 CF pacientů vyšetřili *MBL2* a *MASP-2* genotyp (serinová proteáza asociovaná s *MBL*) a změřili sérové hladiny *MBL* a *MASP-2*. U 27 *MBL* insuficientních CF pacientů chronicky kolonizovaných *S. aureus* bylo výrazné postižení funkce plic. Pacienti s CF měli celkově vyšší hladiny sérového *MBL* korigované dle základního *MBL2* genotypu v porovnání s kontrolami.

V kontrastu s předešlými dvěma pracemi jsou následující poněkud starší práce:

Vliv variability aktivity *MBL* na průběh CF sledovali Garred a spol. (77), kteří prokázali, že pacienti s jednou „defektní“ kopií *MBL* (A/0) měli o 11 %, nemocní se 2 kopiemi (0/0) dokonce o 25 % nižší hodnoty funkce plic než homozygoti s genotypem A/A. Nemocní s nízkými hladinami *MBL* měli již v 8 letech mírně snížené hodnoty funkčního vyšetření plic a do 16 let věku u nich došlo k dalšímu významnému zhoršení, zatímco u nemocných s normální hladinou *MBL* byly plicní funkce relativně konstantní. Statisticky signifikantně nižší hodnoty funkce plic u homozygotů pro mutaci F508del genu *CFTR* s variantními alelami

MBL ve srovnání s nemocnými s normálním MBL našli i Gabolde a spol. (157) a Buranawuti a kol. (158).

Kolaborativní studie Yarden a spol. (151), na které se podílelo i pražské Centrum Cystické Fibrózy, rovněž prokázala, že alela „0“ MBL proteinu predisponuje k celkově závažnějšímu průběhu sino-pulmonálního onemocnění. Původně mírný vliv u dětí se však zesiluje se stářím pacientů.

Je zajímavé, že ani normální hladiny MBL nezabrání chronické bakteriální kolonizaci. Tato skutečnost se vysvětluje tím, že se MBL syntetizuje výhradně v játrech a dostává se tak do lokalizovaného zánětlivého ložiska až relativně pozdě. Garred a spol. našli MBL protein ve sputu pouze u 4 ze 100 vyšetřených, přičemž všichni měli navíc genotyp „A/A“.

Studie (78) prokázala, že z deseti nemocných infikovaných *B. cepacia* byli 4 heterozygoti a 3 homozygoti variantních alel genu *MBL*, což svědčí o velkém riziku této infekce při snížené „ochranné“ aktivitě MBL proteinu. Vzhledem k tomu, že *B. cepacia* vyvolává vyšší stupeň zánětu u nemocných s CF než *P. aeruginosa*, MBL je v dýchacích cestách prokazován u těchto pacientů v časnějších stádiích. Davies a spol. (159) prokázali, že MBL se váže k *B. cepacia* a zahajuje tak aktivaci komplementu. *In vivo* to může vést buď přímé destrukci mikroba nebo k jeho fagocytóze. „MBL deficitní“ nemocní mají vyšší riziko infekce *B. cepacia* a měli by tedy profitovat z budoucí možnosti tzv. „MBL terapie“. Terapeutické podávání MBL by mohlo u CF zlepšit funkci plic a nebo jater. Možné riziko této terapie však spočívá v komplementem zprostředkovaném poškození hostitele (160). Podávání purifikovaného MBL u nemocných s jeho deficitem, kteří trpěli těžkým, rychle se zhoršujícím, plicním onemocněním, již zkoušeli Garred a spol. (77). Velké naděje se vkládají do rekombinantní formy proteinu MBL, kde je teoreticky možné modifikovat komplement aktivující domény a snížit tak i rizika této terapie. V souhrnu je však nutno vyčkat na další studie, především pak u pacientů infikovaných *B. cepacia*, které by komplexně zhodnotily výhody a nevýhody této formy substituční léčby.

Gabolde (157) potvrdil asociaci tíže jaterního postižení u 216 CF pacientů homozygotních pro F508del s polymorfismem genu pro *MBL*. Signifikantně vyšší výskyt jaterní cirhózy byl u CF pacientů s homozygotní či heterozygotní mutací *MBL2* genu. Imunodeficitní stav způsobený variantními alelami *MBL* vede k vyššímu poškození jaterního parenchymu hepatotoxickými viry či bakteriemi, které může nakonec vyústit až v jaterní cirhózu.

### 4.3.2 Vlastní pozorování

Vzhledem k roli MBL v nespecifických imunitních mechanismech a k popsané asociaci insuficience MBL a zvýšené vnímavosti k infekcím jsme si jej zvolili jako jeden z možných faktorů ovlivňující průběh onemocnění.

Výsledky byly prezentovány ve formě přednášky a posteru na domácích i zahraniční konferenci (viz. kap. 7) a v současné době je připravován anglický článek s touto problematikou.

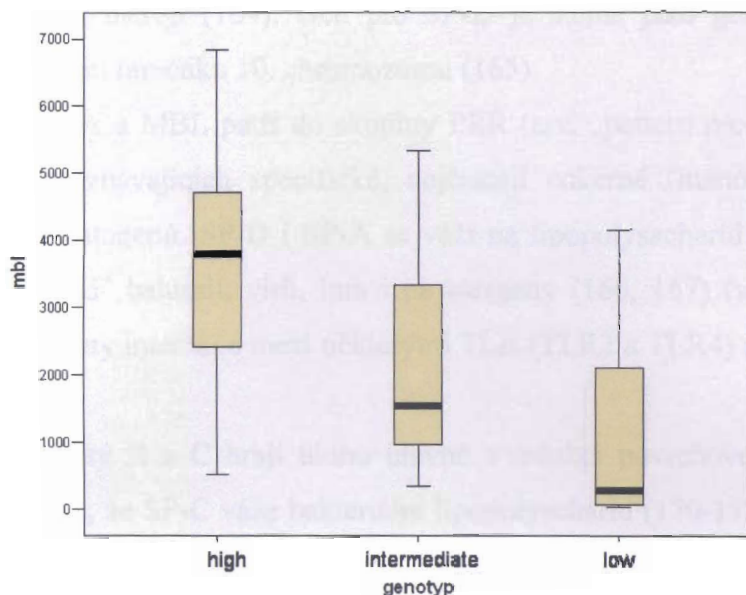
Cílem studie bylo stanovení vlivu genového polymorfismu *MBL* na fenotyp CF.

U CF pacientů jsme našli podobnou frekvenci polymorfismů jako u kontrolní skupiny. Sérová koncentrace MBL silně korelovala s polymorfizmem *MBL2* genu (funkční gen). Sérové koncentrace MBL se velmi lišily, jak u CF (průměr = 2747, S.D. = 1875), tak u kontrol (průměr = 3047, S.D. = 1777). Produkce MBL byla po korekci dle genotypu u CF pacientů celkově vyšší než u zdravých kontrol, ale MBL insuficientní CF pacienti měli nižší sérové koncentrace MBL v porovnání s MBL insuficientními kontrolami (ale bez statistické signifikance). Hladiny MBL v supernatantech BAL korelovaly primárně s aktuálním klinickým stavem pacientů, s výší zánětlivých parametrů (CRP, neutrofilie v krvi i BALu). Avšak i MBL insuficientní pacienti byli schopni reagovat výrazným zvýšením produkce MBL při jeho akutní potřebě při akutní exacerbaci chronické  $G^-$  infekce. MBL insuficientní CF pacienti chronicky kolonizovaní *S. aureus* měli horší funkci plic než MBL suficientní jedinci (výsledky nedosahující statistické signifikance). CF pacienti kolonizovaní  $G^-$  bakteriemi (*P. aeruginosa*, komplex *B. cepacia*) měli horší funkci plic bez ohledu na *MBL2* genotyp. Sérové hladiny MBL byly asociovány s testovanými polymorfizmy *MBL2* genu. Pacienti s CF se významně liší v tíži plicního poškození i v dalších klinických aspektech bez ohledu na genotyp *MBL*. Na závažnosti plicního poškození se u CF spolupodílí mnoho faktorů, jak genetických, tak negenetických, včetně vlivů prostředí.

#### 4.3.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Závěry této práce jsou v souladu s recentní světovou literaturou (110, 156), tedy že polymorfizmus *MBL2* genu není v přímé asociaci s respiračním fenotypem CF. Závažnější postižení respiračního traktu u MBL insuficientních CF pacientů kolonizovaných *S. aureus*

pozoroval také Carlsson a spol. (156). Závěry této práce se neshodují se staršími pracemi s menším počtem CF pacientů popisujících asociaci genotypu *MBL* s fenotypem CF (78, 157).



Obr. č. 4.2 Korelace genotypu a sérové koncentrace MBL (ng/ml)

Tab. č. 4.2 Srovnání sérové hladiny MBL, funkce plic a bakteriální infekce

Kolonizace	Bez	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cepacia</i>
Počet (%) N = 168	27 (16)	20 (12)	78 (46)	43 (26)
Věk Průměr (S.D.)	13 (7)	12 (4)	14 (6)	20 (5)
FEV <sub>1</sub> (%) Průměr (S.D.)	96 (18)	92 (15)	76 (21)	57 (22)
MEF <sub>50</sub> (%) Průměr (S.D.)	88 (26)	83 (19)	61 (26)	37 (24)
MBL (ng/ml) Průměr (S.D.)	2544 (1664)	2346 (1762)	2890 (1942)	2790 (1940)

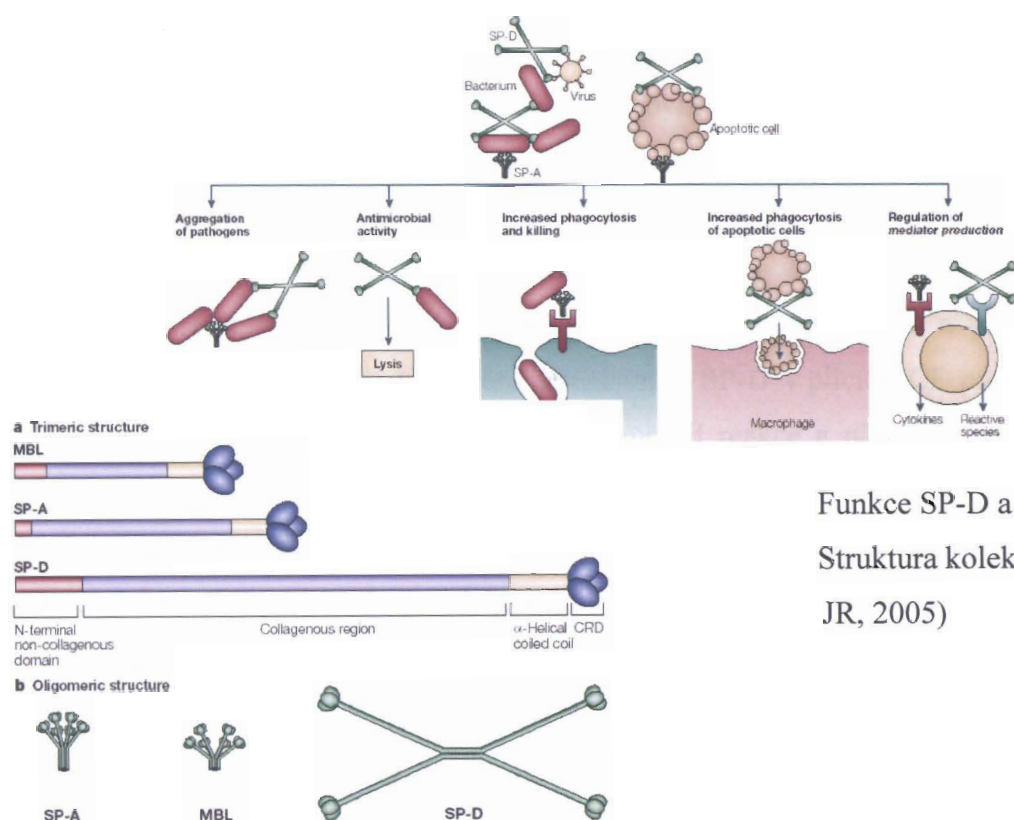
#### 4.4 Surfactant protein D (SP-D)

Surfactant protein D patří do rodiny hydrofilních plicních kolektinů, které hrají významnou roli v primárních obranných mechanismech v plicích, zvyšují opsonizaci mikrobu, usnadňují clearance apoptotických buněk, přímo zabíjí bakterie a omezují tak zánětlivou odpověď v plicích (161-163). SP-D je produkován hlavně v plicích, pneumocyty II. typu, dále Clara

buňkami a podslizničními buňkami. SP-D stejně jako SP-A byly dále nalezeny v průdušnici, v mozku, v testes, v slinných žlázách, v slzných žlázách, v ledvinách, srdci, pankreatu a ženském pohlavním ústrojí (164). Gen pro *SP-D* je stejně jako gen pro *SP-A* a *MBL* lokalizován na dlouhém raménku 10. chromozomu (165).

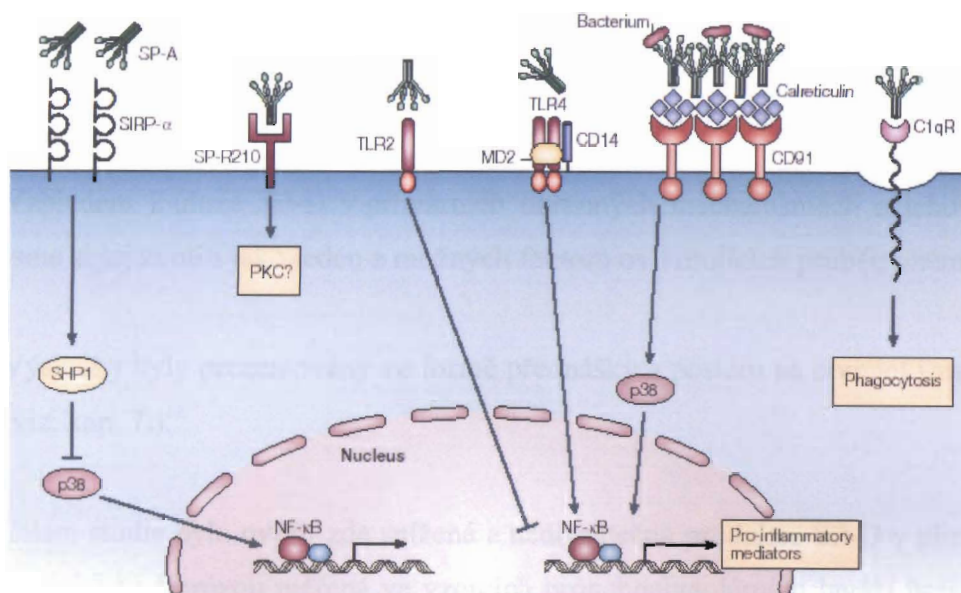
SP-D stejně jako SP-A a MBL patří do skupiny PRR (tzv. „pattern recognition receptors“), tedy receptorů rozpoznávajících specifické, nejčastěji cukerné (manózoové a glukózoové), motivy na povrchu patogenů. SP-D i SP-A se váží na lipopolysacharid  $G^-$  bakterií, dále na povrchové struktury  $G^+$  bakterií, virů, hub i na alergeny (166, 167) (viz. obr. 4.3). Velmi recentně byly prokázány interakce mezi některými TLR (TLR2 a TLR4) a SP-D a SP-A (168, 169) (viz. obr. 4.4).

Další plicní surfaktanty B a C hrají úlohu hlavně v redukci povrchového napětí v plicích, i když bylo prokázáno, že SP-C váže bakteriální lipopolysacharid (170-172). Při deficitu SP-B a SP-C dochází k nárůstu povrchového napětí a ke kolapsu plicních alveolů. Nedostatek SP-B a SP-C se projevuje nejčastěji u nezralých novorozenců a může vyústit až do syndromu respirační tísně (RDS - respiratory distress syndrome). Rekombinantně připravované SP-B a SP-C se podávají v prevenci RDS. Terapeutická aplikace rekombinantního SP-D a SP-A se zatím rutinně nepoužívá, ale byla by jistě terapeutickou možností u pacientů s chronickými záněty a infekcemi (např. u CF pacientů).



Obr. č. 4.3

Funkce SP-D a SP-A a  
 Struktura kolektinů (Wright  
 JR, 2005)



Obr. č. 4.4 Receptory kolektilinů (Wright JR, 2005)

#### 4.4.1 SP-D a CF

Vzhledem k chronické kolonizaci  $G^-$  patogeny u CF a neschopnosti imunitního systému tuto infekci účinně eliminovat je studium mechanismů (včetně plicních surfaktantů D i A) uplatňujících se v primární linii obrany v respiračním traktu nasnadě.

Postle (173) popsal sníženou koncentraci SP-D a SP-A v supernatantech BAL u CF pacientů. Toto snížení bylo významnější v přítomnosti chronické infekce a zánětu (neutrofilie) v plicích CF pacientů (174, 175). V plicích CF pacientů byla také popsána zvýšená proteolytická degradace SP-D i SP-A (176). V kontrole zánětu je velice důležitá fagocytóza patogenů a clearance apoptotických buněk, která je u CF narušena (177-179). Na této patologii se u CF pacientů zřejmě podílí i deficit SP-D. Vzhledem k opakovaně popsané vazbě SP-D na *P. aeruginosa* (180, 181) a vazbě *A. fumigatus* spouštěcí fagocytózu a přímé odstranění Aspergilových spór (182), je při snížené koncentraci SP-D v plicích CF pacientů narušena i vazba na tyto patogeny a iniciace primární imunitní reakce a následné odstranění těchto patogenů z organismu vedoucí k perzistenci infekce. Suplementace SP-D pomocí rekombinantně vyráběného přípravku by mohla zlepšit clearance patogenů z plic CF pacientů. Krane a Griese (183) změřili sérové koncentrace SP-D u 11 CF pacientů s ABPA, 11 CF pacientů bez této diagnózy a 19 neCF kontrol. U CF pacientů s ABPA byla sérová koncentrace SP-D významně zvýšená. Koncentrace SP-D se během akutní exacerbace ABPA neměnila bez ohledu na změny hladin celkového IgE. Sérová koncentrace SP-D tedy není



vhodným ukazatelem pro stanovení diagnózy ABPA, ani průběhu onemocnění. Koncentrace SP-D inverzně korelovala s tíží plicního postižení u CF (dle FEV<sub>1</sub> a FVC).

#### 4.4.2 Vlastní pozorování

Vzhledem k úloze SP-D v primárních obranných mechanismech a jeho působení v plicích jsme si jej zvolili jako jeden z možných faktorů ovlivňujících průběh onemocnění.

Výsledky byly prezentovány ve formě přednášky a posteru na domácí i zahraniční konferenci (viz. kap. 7.).

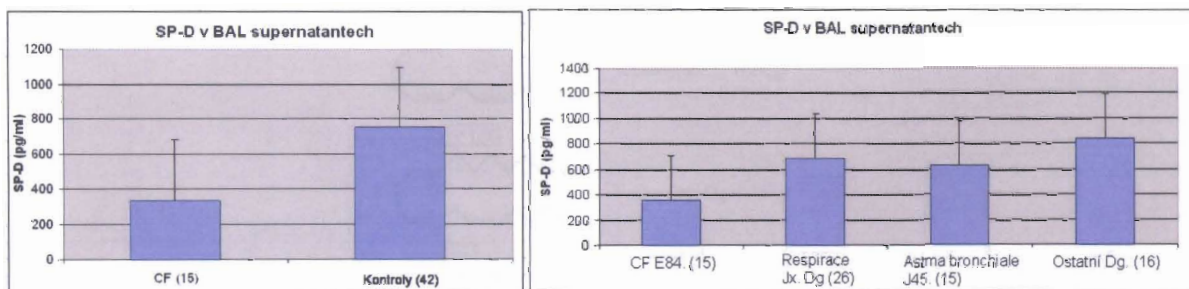
Cílem studie bylo ověřit zda snížená a nedostatečná produkce SP-D v plicích našich pacientů s cystickou fibrózou měřená ve vzorcích bronchoalveolárních laváží hraje roli v porušených obranných mechanismech plic.

V této pilotní studii s 15 CF pacienty a 42 neCF kontrolami byla produkce SP-D signifikantně nižší ( $p < 0.0015$ ) u CF pacientů (průměrná hladina SP-D 335, S.D. 317) než u kontrolní skupiny (průměr 750, S.D. 374) (viz. obr. č. 4.5). Hladina SP-D u pacientů s CF inverzně korelovala s tíží plicního poškození daného množstvím neutrofilních leukocytů. Pohlaví ani věk neměly na hladinu SP-D žádný vliv (viz. tabulka č. 4.3).

Nedostatečná produkce SP-D v plicích pacientů s CF vede k narušení obranných mechanismů. Z tohoto důvodu by možné terapeutické podávání SP-D vedlo k prevenci či snížení následků infekčních a zánětlivých poškození plicní tkáně.

##### 4.4.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Závěry této práce jsou v souladu s dosud publikovanými daty (174). Opakovaně byla popsána snížená koncentrace SP-D v supernatantech BAL CF pacientů.



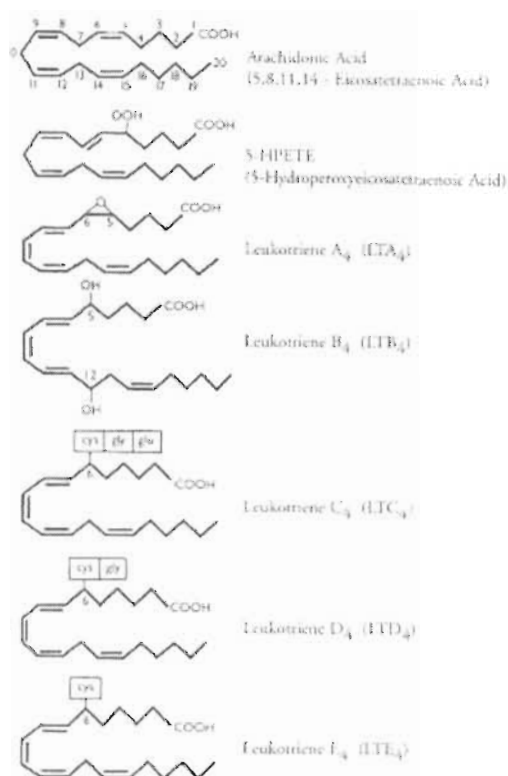
Obr. č. 4.5 Koncentrace SP-D (pg/ml) v BAL supernatantech u CF a kontrol

Tab. č. 4.3 Srovnání koncentrace SP-D v supernatantu BAL u pacientů s CF a neCF diagnózami v závislosti na věku a pohlaví

SP-D (průměr, S.D.)	E84. CF	Jx respirace	J45. astma	Ostatní	Kontroly (všechny Dg.)
Chlapci (průměr, S.D.)	164.0 (247.0)	722.8 (477.1)	678.3 (493.8)	872.8 (354.0)	770 (636)
Věk (průměr, S.D.)	11.2 (2.4)	10.8 (7.4)	12.0 (4.8)	14.0 (5.2)	11.8 (6.8)
Dívky (průměr, S.D.)	420.0 (324.3)	658.0 (309.1)	601.3 (222.0)	890.7 (358.0)	738.6 (339.0)
Věk (průměr, S.D.)	7.1 (3.8)	8.8 (5.2)	10.8 (3.4)	6.6 (6.3)	8.0 (5.6)

## 4.5 Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)

LTB<sub>4</sub> je jedním z působků vznikajících v metabolismu kyseliny arachidonové přímou hydrolyzou LTA<sub>4</sub>. Významně se podílí na potenciaci neutrofilního zánětu, působí jako mocný chemoatraktant neutrofilů do místa zánětu a indukuje produkci kyslíkových radikálů (184, 185).



Obr. č. 4.6 LTB<sub>4</sub> struktura (Henderson WR, 1994)

#### 4.5.1 LTB4 a CF

Prognóza nemocných s CF je ovlivněna především stavem plicních funkcí a stavem výživy. Na bronchopulmonální onemocnění má zásadní vliv chronická infekce dýchacích cest s doprovodnou zánětlivou odpovědí (131), která má sama potenciál poškozovat stěnu dýchacích cest proteázami a oxidačním stresem (57). Hlavními zánětlivými buňkami jsou neutrofilní leukocyty (186, 187), jejichž důležitým chemotaktickým mediátorem je leukotrien B4 (188). Dostupné publikace prokazují korelace koncentrací LTB4 a počtu neutrofilů v materiálech z dolních dýchacích cest (indukované sputum, bronchoalveolární laváž) a rovněž korelaci těchto parametrů s tíží bronchopulmonálního onemocnění (189-191). Rovněž koncentrace LTB4 v kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) koreluje s poklesem plicních funkcí u nemocných s CF (192).

Některé práce prokazují možnost ovlivnění koncentrací LTB4 v krevním séru za pomoci suplementace n-3 polynenasycených mastných kyselin (n-3 PUFA) vzhledem k tomu, že jde o prekurzory biologicky méně aktivního LTB5 (193, 194). Prekurzorem LTB4 je především kyselina arachidonová, jejíž koncentrace v krevním séru jsou u nemocných s CF relativně vyšší než koncentrace hlavních n-3 PUFA (195), tedy kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosaheptaenové (DHA). Existují práce, které prokazují příznivý efekt suplementace EPA a DHA jak u myšího modelu CF, tak u nemocných s CF (196-198).

#### 4.5.2 Vlastní studie

Výsledky studia LTB4 v kondenzátu vydechovaného vzduchu byly součástí interního grantu FN Motol a výsledky byly prezentovány formou posteru (viz. kap. 7.) a také připravovány do anglické publikace do *European Respiratory Journal*.

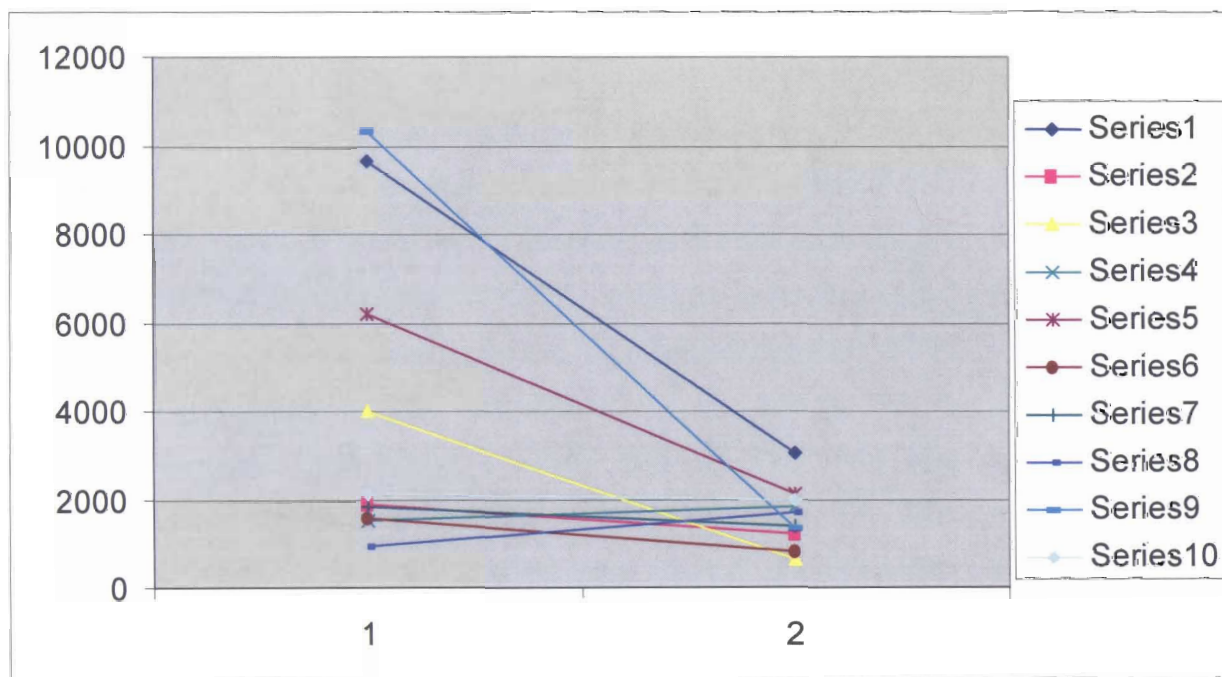
Cílem projektu bylo ověření hypotézy, podle které má suplementace n-3 PUFA u nemocných s CF potenciál zmírnit neutrofilní zánět v dýchacích cestách, a to díky snížení produkce LTB4.

Po podávání přípravku došlo k poklesu koncentrace LTB4 v KVV ( $p < 0.05$ ) a k snížení kyselosti KVV ( $p < 0.025$ ). Tolerance podávaného přípravku byla vysoká. Během studie nedošlo k statisticky signifikantní změně žádného z dalších testovaných parametrů (BMI, FEV<sub>1</sub>, počet neutrofilních leukocytů v periferní krvi, koncentrace CRP, cholesterolu a TAG v séru).

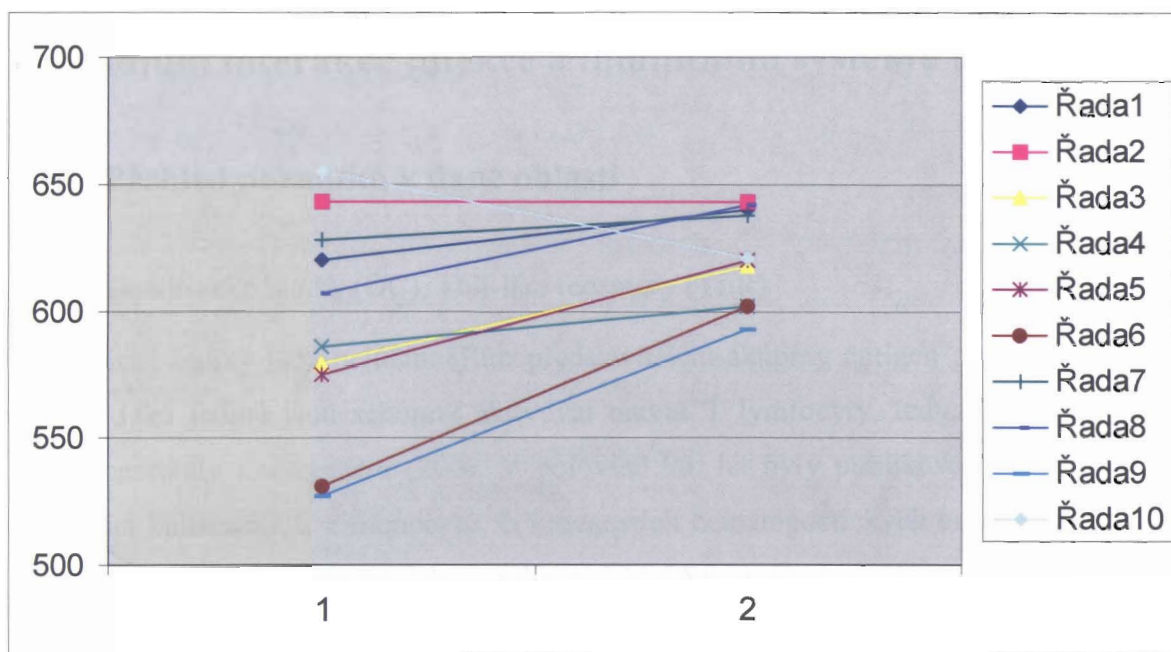
Průkaz ovlivnění koncentrací LTB<sub>4</sub> a pH v KVV prostřednictvím podávání n-3 PUFA svědčí pro možnost ovlivnění neutrofilního zánětu dýchacích cest u CF pacientů a tedy omezení progresu bronchopulmonálního onemocnění se zlepšením prognózy onemocnění.

#### 4.5.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Výsledky studie jsou zcela v souladu s literárními údaji. Opakovaně byly publikovány zvýšené hladiny LTB<sub>4</sub> u pacientů s CF nejenom v KVV, ale i v supernatantech BAL a v indukovaném sputu (189, 192, 199). Podávání n-3 PUFA jako potravního doplňku u CF pacientů bylo popsáno jako vhodná léčba k modulaci hladin nežádoucích metabolitů kyseliny arachidonové (198). Nebyla však dosud publikována studie využívající pro monitoraci účinků n-3 PUFA na metabolismus kyseliny arachidonové neinvazivního měření LTB<sub>4</sub> v kondenzátu vydechaného vzduchu.



Obr. č. 4.7 Koncentrace LTB<sub>4</sub> (pg/ml) v kondenzátu vydechaného vzduchu u CF pacientů před podáváním (1) a po n-3 PUFA (2)



Obr. č. 4.8 pH v kondenzátu vydechaného vzduchu u CF pacientů před podáním (1) a po n-3 PUFA (2)

## 5 Studium interakce infekce a imunitního systému u CF

### 5.1 Přehled poznatků v dané oblasti

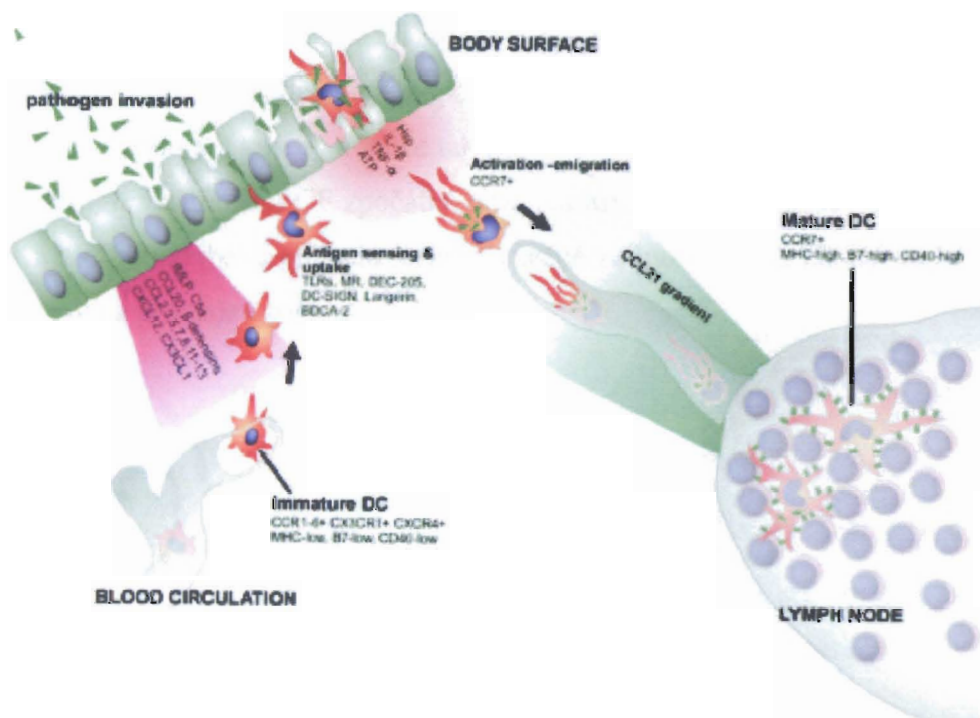
#### 5.1.1 Dendritické buňky (DC), Toll-like receptory (TLR)

Dendritické buňky jsou nejučinnějším představitelem skupiny antigen prezentujících buněk (APC). Jako jediné jsou schopny aktivovat naivní T lymfocyty, tedy lymfocyty, které se dosud neseťkaly s antigenem (200). V polovině 90. let byly publikovány první protokoly, popisující kultivaci DC z monocytů, či kmenových hematopoetických buněk zdravých dárců za přítomnosti rekombinantních cytokinů GM-CSF a IL-4 (201), což umožnilo jejich intenzivní studium.

V periferních tkáních se DC vyskytují v tzv. nezralém stavu. Nedokáží účinně stimulovat T lymfocyty, ale mají velkou schopnost fagocytózy a poskytují organismu informace o skladbě vnitřního prostředí. Fungují jako senzory, které mají včas upozornit na narušení integrity. Detekce specifických signálů znamenajících pro organismus ohrožení nastartuje proces vedoucí k výrazné změně fenotypu a funkčních vlastností DC, označovaný jako maturace. Pro indukci imunitní reakce namířené proti infekčním agens je nejdůležitější vazba molekul asociovaných s patogeny (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns), jejichž spektrum se vyseletovalo během evoluce, na příslušné receptory (PRR – pattern-recognition receptors) exprimované na DC. Mikrobiální struktury jsou na DC rozpoznávány zejména Toll-like receptory, které jsou významnou skupinou PRR (viz. Kap. 2.). Skupina TLR v současné době zahrnuje celkem jedenáct zástupců (72, 73, 202). Jednotliví členové rozpoznávají poměrně specificky určité typy struktur pocházejících z patogenů. TLR2 homodimery a TLR2-TLR1 heterodimery zprostředkovávají odpověď na mikrobiální triacetylované lipoproteiny, TLR3 na dvouvláknovou RNA (203, 204), TLR4 na LPS (205-207), TLR5 na flagelin bakterií, TLR2-TLR6 na diacetylované lipopeptidy (208, 209), TLR7 a TLR8 na imidazoquinoliny a TLR9 na CpG DNA sekvence bakterií (210). Například detekce konzervované části lipidu A v lipopolysacharidu umožňuje detekci téměř jakékoli Gram negativní bakterie pomocí jediného PRR, kterým je Toll-like receptor 4 (TLR-4).

Dendritická buňka procházející maturací přestává velmi rychle pohlcovat okolní antigeny a soustředí se na zpracování těch fragmentů, které ji aktivovaly. Zvýšená transkripce genů pro MHC I. a II. třídy má za následek vyšší syntézu těchto molekul a jejich zvýšený transport na membránu. Zralé DC exprimují celou řadu dosud známých kostimulačních molekul. Během

maturace dochází k přesmyku v expresi chemokinových receptorů. Nezralé DC exprimují především CCR5 a jsou atrahovány do periferních tkání chemokinem MIP-3b. Po aktivaci dojde ke snížení jeho exprese a na povrchu DC se objevuje především receptor CCR7, specifický pro chemokiny secernované v sekundárních lymfatických orgánech ELC (CCL19) a SLC (CCL21). Zralá DC je dokonale vybavena pro následnou interakci s antigen specifickými T lymfocyty, aktivuje je a polarizuje imunitní reakci směrem, který je nejúčinnější proti patogenu, který poškozuje integritu organismu.



Obr. č. 5.1 Jak fungují DC (Vermaelen K, 2005)

### 5.1.2 Bakterie a respirační infekce

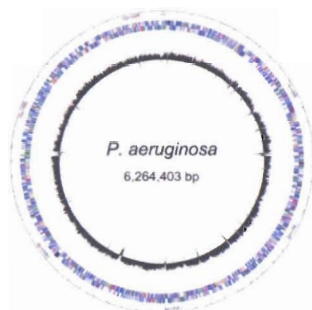
Gram negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* jsou pro imunokompetentního jedince nepatogenními bakteriemi, vyskytujícími se běžně v okolním prostředí, například v půdě či kanalizaci. Při normálním průběhu respirační infekce jsou bakterie pohlceny a usmrceny granulocyty a monocyty, které do poškozené tkáně vycestují. Fragменты usmrcených bakterií jsou pohlceny nezralými dendritickými buňkami, které jsou přítomny ve všech periferních tkáních. Rozpoznání specifických molekulárních struktur na těchto fragmentech vede k zahájení procesu aktivace DC. Zrající DC se přesouvá do sekundárních lymfatických orgánů. Tam, již plně vybavena pro stimulaci lymfocytů, se setká s Ag-specifickými T lymfocyty a tím je zahájena imunitní odpověď, která vede

k eliminaci infekce. U pacientů s CF je jisté, že průběh respirační infekce je odlišný, ale přesný mechanismus průběhu respirační infekce u nich není dosud znám (131, 211).

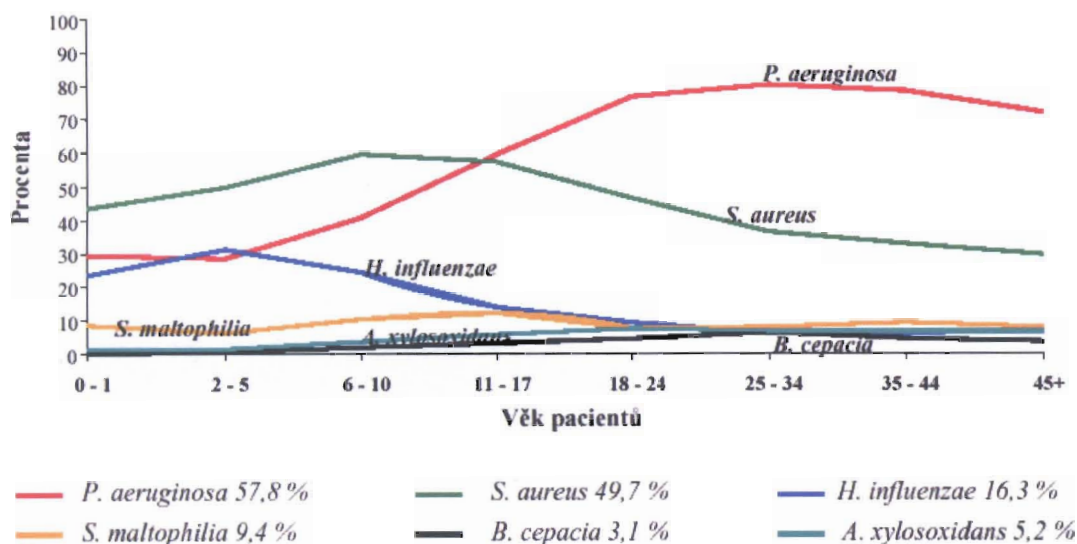
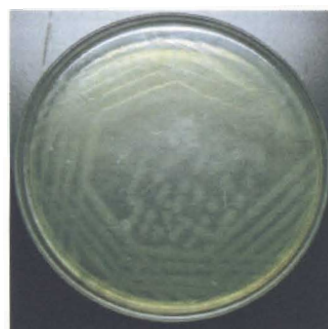
### 5.1.2.1 Pseudomonas aeruginosa

*P. aeruginosa* je typický představitel oportunních patogenů. Patří mezi pohyblivé aerobní gramnegativní tyče a je ubikviterní. V přírodě se vyskytuje především ve vodě, v menší míře pak v půdě kontaminované výkaly zvířat či lidí (vzácně se totiž může nacházet ve stolici zdravých lidí). Zdravé jedince nijak neohrožuje, ale závažným infekčním agens se stává právě u nemocných s CF a u primárně či sekundárně imunokompromitovaných pacientů. Je obávaným patogenem na odděleních popálenin či na jednotkách ARO, kde kontaminuje ventilátory, nebulizátory a katetry a může tak být zdrojem nozokomiální infekce.

Infekce *P. aeruginosa* může u CF zpočátku probíhat asymptomaticky, často však přechází do chronicity a z dlouhodobého pohledu je jednoznačně zodpovědná za zhoršování funkce plic, klinického stavu a prognózy pacientů.



Obr. č. 5.2  
*Pseudomonas aeruginosa*  
Genom a 24h kultura  
makroskopicky  
(www.pseudomonas.com)



Obr. č. 5.3 Výskyt nejčastějších patogenů v jednotlivých věkových kategoriích pacientů s CF (převzato z Hlášení registru pacientů Americké CF nadace za rok 2002)

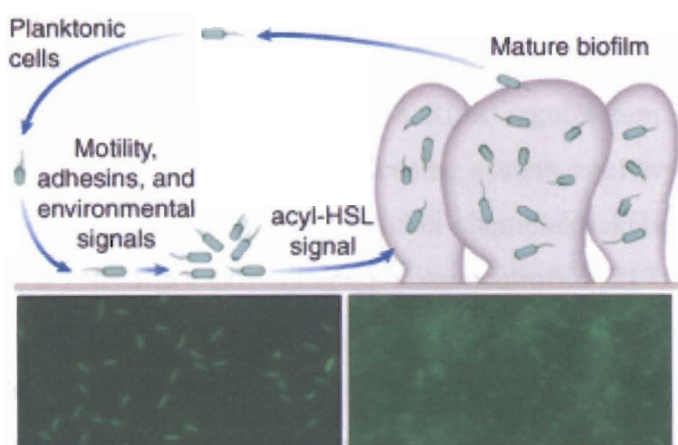


Prevalence infekce *P. aeruginosa* stoupá u CF pacientů s věkem a v dospělosti je chronicky infikováno až 80 % nemocných (212).

Mezi prokázané rizikové faktory získání infekce *P. aeruginosa* patří RS virová infekce, ženské pohlaví, homozygotita v F508 mutaci a předchozí infekce *S. aureus*.

Otázka, proč *P. aeruginosa* je tak význačným patogenem právě u CF, není stále jednoznačně zodpovězena. Předpokládá se, že je za tento fenomén zodpovědná kombinace několika faktorů, jakými jsou například porušená mukociliární clearance nebo vysokým obsahem soli snížená baktericidní aktivita defensinu neutrofilních granulocytů. Na specifické náchylnosti k infekci *P. aeruginosa* se pravděpodobně podílí samotná aberace CFTR proteinu, jehož extracelulární doména slouží jako *P. aeruginosa*-specifický receptor. Za normálních okolností je vazba bakterií na strukturálně nezměněný CFTR následována internalizací bakterií do buňky a jejich eliminací z dýchacích cest při epiteliální deskvamaci (213). Je-li však CFTR defektní, nefunguje jako receptor pro *P. aeruginosa*, a tudíž ani neprobíhá popsáný proces vypuzování bakterií z respiračního traktu. Na druhou stranu poškozený CFTR protein vytváří vhodné podmínky pro formování nových membránových receptorů pro bakterie. Děje se tak snížením hodnot extracelulárního pH, které vede k alteraci glykosylace epiteliálních komponent. Neúplně glykosylované, asialylované formy membránového glykolipidu GMI pak slouží přímo jako receptor *P. aeruginosa*. V tomto případě však nenásleduje užitečná fáze inkorporace a likvidace bakterie.

Bakterie je také schopna konvertovat ve specifickou mukoidní formu, jež je charakterizována tvorbou mukoidního exopolysacharidu alginátu (obr. č. 5.4).



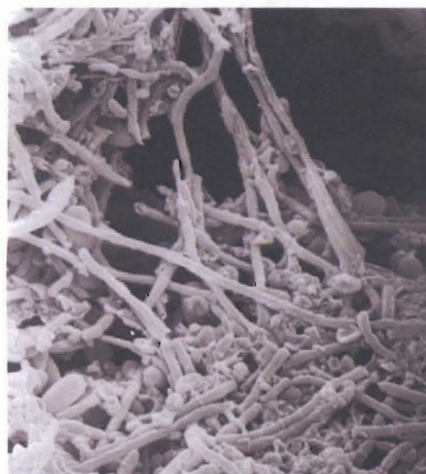
Obr. č. 5.4 Vznik biofilmu bakterií (Kolter R, 1998)

Alginát vytváří na povrchu bakterie ochranný obal, jenž má tendenci splynout s alginátovým obalem sousedních bakteriálních buněk, a tak vytvořit jakýsi vyšší stupeň bakteriálního společenství, které je označované jako biofilm (214). Alginát jakožto stěžejní stavební hmota

biofilmu umožňuje bakteriím účinnější vazbu k buňkám respiračního epitelu, představuje efektivní bariéru proti opsonizaci a fagocytóze a poskytuje bakteriím vhodnější podmínky pro růst v mikroprostředí s omezeně dostupným železem. Nízké hodnoty železa totiž spolu s nízkým pH, kyslíkovými radikály a limitovaným množstvím živin v bezprostředním okolí bakterie přispívají k aktivaci tvorby alginátu. Bakterie zalité v alginátu vykazují vyšší rezistenci k antibiotické léčbě, což souvisí s jejich pomalejším růstem v biofilmu a se zhoršenou penetrací antibiotik přes silnou (200  $\mu\text{m}$ ) a hustou biofilmovou vrstvu. Biosyntetická dráha pro alginát se prolíná s enzymatickou cestou syntézy lipopolysacharidu a vzájemně se tedy ovlivňují. To může vysvětlovat doprovodný fenomén při produkci alginátu, totiž zkrácení či úplnou ztrátu O- řetězců LPS, jejichž neúplnost činí bakterii vnímavou k účinkům komplementu a protilátek (215).

Bakterie se nezačínají okamžitě a automaticky formovat do biofilmu, neboť produkce alginátu patří mezi faktory řízené přes quorum sensing systém (216). Tento systém dovoluje bakteriím pomocí jejich signálních molekul sledovat denzitu vlastní populace. Zaznamenají-li ve svém

okolí dostatečné množství bakterií svého druhu, začnou hromadně tvořit exopolysacharid. Quorum sensing systém se vždy skládá ze syntázy, která katalyzuje syntézu signální molekuly (u většiny gramnegativních bakterií jde o acylhomoserinové laktony – AHL), a z transkripčního regulátoru, jenž ovlivňuje expresi dalších genů. U *P. aeruginosa* jsou prozatím popsány dva quorum sensing systémy: las systém, skládající se z LasR transkripčního regulátoru, a LasI syntázy (produkující 3-oxo-C12-HSL), a rhl systém s RhlR regulátorem a RhlI syntázou (produkující C4-HSL).



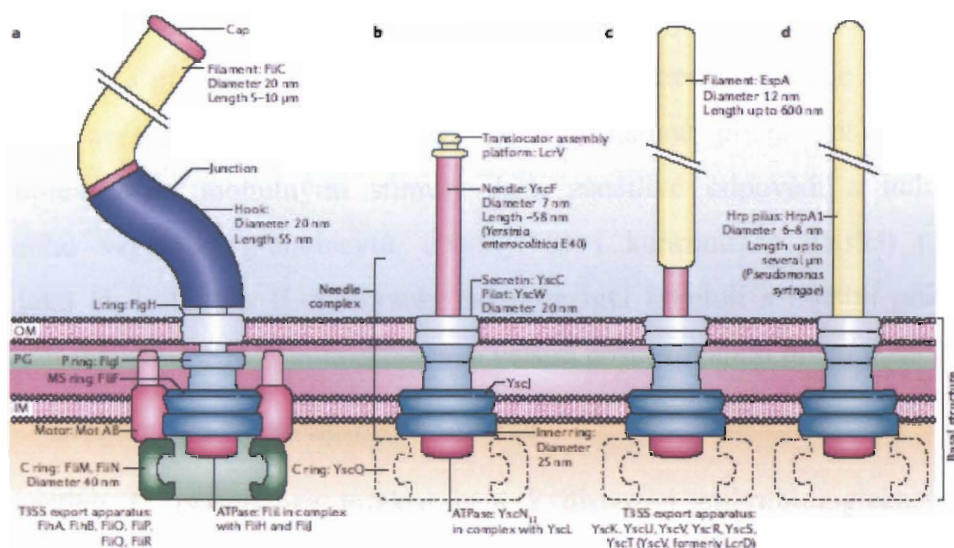
Zajímavostí je, že quorum sensing systém není svými účinky omezen pouze na prokaryota. AHL molekuly stimulují produkci chemotaktického IL-8, inhibují tvorbu prozánětlivého IL-12 a TNF-alfa a aktivují apoptotózu neutrofilů (217).

Poznatky o quorum sensing systému nepřinášejí jen fascinující informace o komunikačních dovednostech bakterií, ale nabízejí též nový směr, kudy by se mohla budoucí protiinfekční terapie ubírat (218).

Z výše uvedeného lze předpokládat, že i mnohé další faktory virulence jsou do menší či větší míry pod vlivem regulačních systémů. *P. aeruginosa* disponuje celou řadou extracelulárních enzymů, které se uplatňují v její patogenitě. Lze je podle mechanismu sekrece a účinku

rozčlenit do jednotlivých sekrečních systémů, častěji se však jednotlivé exoprodukty uvádějí bez vztahu k danému sekrečnímu systému.

Výjimkou je sekreční systém typu III, jenž obsahuje na 20 různých proteinů (219-222). Systém perforuje membrány hostitelských buněk a vytváří kanály pro vpravení svých efektorových enzymů do buňky (viz. obr. č. 5.5). Pravidelně je součástí rozsáhlejších genových oblastí (velikosti 10–200 kb), tzv. ostrovů patogenity (pathogenicity islands), které v sobě sdružují více faktorů virulence a jsou schopné vnitrodruhového i mezidruhového horizontálního přenosu (223).



Obr. č. 5.5 Struktura bičíku a injektizomu (Cornelis GR, 2006)

Mezi další, již klasické exoprodukty *P. aeruginosa*, patří proteázy (např. elastáza), exotoxin A, fosfolipáza C, pigment pyocyanin či hemaglutinin. V kompletním výčtu faktorů patogenity samozřejmě nechybí LPS a strukturální komponenty zprostředkovávající primární adhezi bakterií k epitelu dýchacích cest. Jde o fimbrie a bičíky, které však bakterie při své změně v mukoidní formu ztrácejí (stejně jako lipopolysacharidové O- řetězce). Mukoidní forma *P. aeruginosa* je makroskopicky patrná při kultivačním vyšetření. Jde o velmi specifický nále, který je takřka výhradně spojen s diagnózou CF, i když může být zachycen i u nemocných s chronickou bronchitidou či chronickou infekcí močových cest.

#### 5.1.2.2 Průběh *P. aeruginosa* infekce

Infekce *P. aeruginosa* má u CF poměrně charakteristický průběh (131, 211). První, časná, intermitentní fáze infekce je způsobena nemukoidní formou bakterie, která je obecně citlivější na antibiotickou léčbu. Tuto infekci lze agresivní antibiotickou léčbou eradikovat. Infekce se většinou objevuje v zimních měsících a navazuje často na virovou infekci.

Pokud není časná infekce včas léčena, bakterie vždy konvertuje v mukoidní formu a infekce se stává chronickou. Bakterie se stává často velmi rezistentní k antibiotické terapii a její eradikace je prakticky nemožná. Protilátková odpověď na přítomnost infekce se stupňuje. Chronická infekce nepříznivě ovlivňuje průběh základního onemocnění. Poškození plic při chronické infekci probíhá ve dvou stupních. Bakterie produkují faktory virulence, které působí lokální poškození tkání a zvýšenou produkci hlenu v dýchacích cestách. Poškození plicní tkáně má za následek zánětlivou odpověď, která hraje hlavní roli v další destrukci plicní struktury u CF. Fagocyty, neschopné zlikvidovat mukoidní formu *P. aeruginosa*, uvolňují řadu toxických působků, zahrnujících elastázu, toxické kyslíkové metabolity a bioaktivní lipidy. V důsledku působení pseudomonádové proteázy, která degraduje inhibitory proteáz, neinhibovaná neutrofilní elastáza působí další významné plicní poškození. Vznikající imunokomplexy jsou mohutnými stimuly další zánětlivé odpovědi s indukcí TNF $\alpha$  a oxidativního vzplanutí granulocytů. Zvyšují se i koncentrace dalších prozánětlivých cytokinů jako IL-1, IL-6 a IL-8. Vysoké hodnoty IgG korelují s horším průběhem plicní infekce, s chronickým neutrofilním zánětem a větším poškozováním plicní tkáně.

### 5.1.2.3 Diagnostika *P. aeruginosa* infekce

Pro diagnostiku *P. aeruginosa* infekce jsou k dispozici mikrobiologická, molekulárně-genetická a serologická diagnostika (viz. tab. č. 5.1) (224). Celosvětově rutinní je pouze mikrobiologické vyšetření.

Tab. č. 5.1 Dostupné diagnostické metody pro detekci *P. aeruginosa* u CF

Metodika	Příklad
Kultivace	
Zpracování	
Běžná kultivační média	Krevní agar
Kultivační média pro Gram- bakterie	McConkey agar
Selektivní kultivační média	<i>P. aeruginosa</i> specifický agar, ceftrimide agar
Oblast	
Nasopharynx	Nasopharyngeální aspirát - sekret HCD
Oropharynx	Výtěr krku, stěr z tonzil
Bronchy	Sputum spontánně produkované, indukované (hypertonickou solí)
	Bronchoalveolární laváž – sekret DCD
Bronchy / alveoly	
Vyšetření protilátek	
ELISA	Nepurifikované antigeny (celobuněčné proteiny)
	Purifikované antigeny (exoproteiny)
Western blott	Celobuněčné proteiny
Zkřížená imunoelktroforéza (CIE)	Precipitiny
Molekulárně-genetické metody	
	PCR
	FISH

### 5.1.2.3.1 Mikrobiologická diagnostika – mikroskopie, kultivace

Vzhledem k lokalizaci infekce a jejímu co nejčasnějšímu záchytu je vhodné pravidelné mikrobiologické (mikroskopické a kultivační) vyšetření, nejlépe 1× měsíčně, výtěrů či sekretu dýchacích cest a samozřejmě vyšetření při každém zhoršení respiračních příznaků.

Největší výpovědní hodnotu o infekci dolních cest dýchacích má vyšetření sputa a sekretu dolních cest dýchacích získaných při bronchoskopickém vyšetření. (Odlišení sputa od sekretu horních cest dýchacích se děje mikroskopickým vyšetřením. Vzorek lze považovat za sputum v případě nálezu alespoň 25 leukocytů a maximálně 10 epiteliálních buněk v jednom zorném poli.)

### 5.1.2.3.2 Molekulárně genetické metody

Molekulárně genetické metody, zvláště PCR nabývají v mikrobiologické diagnostice stále na větším významu. Výhody a některá rizika použití PCR shrnuje tabulka (viz. tab. č. 5.2).

Tab. č. 5.2 Výhody a nevýhody PCR diagnostiky u CF

Výhody a nevýhody PCR diagnostiky s přihlédnutím k CF problematice
PCR detekce zaměřená na jedinečnou genetickou sekvenci dané bakterie zcela eliminuje možnost mylné identifikace bakterie, k níž při běžném mikrobiologickém provozu může dojít.
PCR metody mají vyšší citlivost, díky níž dokáží zachytit patogen v klinickém materiálu dříve než běžná kultivace. V případě detekce <i>B. cepacia</i> se jedná až o jednoroční interval mezi pozitivitou PCR a kultivací.
Výsledky molekulárně genetické analýzy jsou dostupné během několika hodin. PCR diagnostika je velmi přínosná právě u CF, kde se setkáváme s poměrně vzácnými patogeny. Bakterie typu <i>B. cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> spp., <i>Ralstonia</i> spp. či <i>Pandorea</i> spp. mohou zůstat v rámci rutinního vyšetření nerozpoznány z důvodů nepoužívání selektivních půd, lokální nedostupnosti některých biochemických identifikačních systémů a též z důvodu malé zkušenosti mikrobiologické laboratoře s těmito neobvyklými patogeny.
Vyšší citlivost metody dovoľuje záchyt patogenu v době, kdy se v klinickém materiálu vyskytuje v malém, ještě nekultivovatelném množství. Své uplatnění tak PCR nachází též v časně detekci <i>P. aeruginosa</i> nebo <i>B. cepacia</i> . Okamžitá klinická odpověď ve smyslu zařzení časně pozitivního pacienta do jedné ze skupin, jež se vytvářejí podle mikrobiologických nálezů, významně přispívá k budování maximální efektivního izolačního systému, který brání dalšímu šíření infekce. Musíme si však být vědomi toho, že vysoká citlivost metody má i svou stinnou stránku, reprezentovanou rizikem falešné positivity (tj. laboratorní kontaminace).
Molekulární metody jsou neocenitelným pomocníkem v mapování epidemiologické situace, tj. v identifikaci přenosných kmenů, které jsou zodpovědné za šíření infekce mezi pacienty.

V současnosti je nejlépe propracována PCR detekce mikroorganismů patřících do komplexu *B. cepacia* až k podrobnější stratifikaci komplexu *B. cepacia* na úroveň genomovarů (225-228), viz. tab. č. 5.3).

Tabulka č. 5.3 Přehled názvů všech genomovarů komplexu *Burkholderia cepacia*

Species (druh)	Genomovar
<i>Burkholderia cepacia</i>	genomovar I
<i>Burkholderia multivorans</i>	genomovar II
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	genomovar III
<i>Burkholderia stabilis</i>	genomovar IV
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	genomovar V
<i>Burkholderia dolosa</i>	genomovar VI
<i>Burkholderia ambifaria</i>	genomovar VII
<i>Burkholderia anthina</i>	genomovar VIII
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	genomovar IX
<i>Burkholderia ubonensis</i>	genomovar X

PCR diagnostika *P. aeruginosa* je celosvětově testována, ale vzhledem k falešné pozitivitě není zatím rutinně používána v klinické praxi (224, 229-232).

Další z molekulárně genetických metod je metoda FISH. Tato metoda ale vzhledem k nepřilíživé vysoké senzitivitě nepřešla do klinické praxe (233).

### 5.1.2.3.3 Serologie

Serologické vyšetření má význam především u neexpectorujících pacientů, tedy hlavně malých dětí. V séru pacientů jsou stanovovány specifické protilátky proti *P. aeruginosa*, jejichž přítomnost a plazmatické hladiny korelují jak s konverzí infekce v chronickou fázi a tíží plicních zánětlivých změn, tak s časnou infekcí, pokud jsou již přítomny specifické protilátky (234-236). Při prvním záchytu *P. aeruginosa* jsou hodnoty protilátek často nezvýšeny. Podle některých autorů naopak protilátky stoupají ještě před kultivačním záchytem patogenu (237).

Podle hladiny titru antipseudomonádových protilátek je také možno sledovat dynamiku infekce. Úspěšná i.v. antibiotická terapie je spojována se stabilním či klesajícím titrem protilátek. Výhodou této nepřímé diagnostiky je detekce ze séra, tedy možnost provedení diagnostiky u každého pacienta bez potřeby sputa, nevýhodou je relativní finanční nákladnost. Principem je kvantitativní vyšetření hladiny antipseudomonádových protilátek přítomných v periferní krvi pacientů s CF pomocí metody ELISA. Tato metoda je velice citlivá a detekuje protilátky ve třídě IgG nejčastěji proti 3 specifickým antigenům *P. aeruginosa* (alkalická

proteáza, elastáza a exotoxin A). Ke stanovení pozitivního výsledku stačí pozitivita jedné z protilátek.



Obr. č. 5.6 Serologická diagnostika *P. aeruginosa* infekce dle titru specifických protilátek

### 5.1.3 Komplex *Burkholderia cepacia*

Komplex *B. cepacia* je gramnegativní aerobní pohyblivá tyčka, která se běžně vyskytuje v přírodě. Nachází se ve stojatých vodách, ale i v řekách, jezerech a v mořské vodě. Zachycena byla ve sklenících, na zelenině, v inhalátorech, v kosmetických přípravcích, v nepasterizovaném kravském mléku i v dezinfekčních roztocích (238). V půdě osidluje kořeny rostlin, s nimiž často žije v symbióze. Produkuje rostlinné hormony a množství antibiotik, včetně látek s antifungálním účinkem (cepacin, cepaciamid či chinolon pseudan), metabolizuje organické odpadní látky typu ftalátů nebo chlorovaných uhlovodíků, dokonce některé kmeny jsou schopny využívat penicilin G jako zdroj uhlíku. Pro tyto výjimečné schopnosti byla v 90. letech minulého století zařazena mezi slibná biodegradační a biokontrolní agens (registrované jako biopesticid Deny, Blue Circle nebo Intercept). Možné využití *B. cepacia* pro zemědělské účely se však dostalo do ostrého rozporu s jejím prokázaným patogenním potenciálem. Bakterie způsobuje plicní infekce především u pacientů s CF. Infekce jsou většinou chronického charakteru, i když jsou popsány i případy tranzientní kolonizace (239). Kromě CF bakterie dále ohrožuje pacienty s primárním nebo sekundárním poškozením imunity (zvláště pacienty, kteří mají chronickou granulomatózu, a nemocné na anesteziologicko-resuscitačních odděleních).

Walter Burkholder ji v roce 1950 identifikoval jako příčinu hniloby cibule (latinsky *Allium cepa*, odtud odvozen druhový název *cepacia*) a zařadil ji do rodu *Pseudomonas*. V roce 1992 byl pro *Pseudomonas cepacia* a dalších šest bakteriálních druhů vytvořen nový rod *Burkholderia* (240).

*B. cepacia* je tedy známa jako lidský oportunní patogen, fytopatogen, prospěšný rostlinný komenzál i biodegradační agens (241).

Pro komplex *B. cepacia* byla zavedena taxonomická jednotka *genomovar*, což je v podstatě druh definovaný pomocí molekulárně genetických metod (242, 243). Genomovar nelze odlišit

od příbuzných druhů (genomovarů) běžnými mikrobiologickými metodami. Kmeny původně označované jako *Burkholderia cepacia* se tak rozdělily nejprve do pěti (1997), později do devíti genomovarů (2002), jež se dohromady označují jako komplex *B. cepacia* (viz. tab. č. 5.3) (244). *B. cenocepacia* (genomovar III) a *B. multivorans* (genomovar II) odpovídají celosvětově za naprostou většinu Cepaciových infekcí u pacientů s CF.

V roce 1990 byl poprvé popsán přenos infekce mezi pacienty. Řada CF center následně identifikovala přenosné, tedy epidemické kmeny Cepacie. Nejznámějším příkladem je kmen z genomovaru III, označovaný jako ET12, který se rozšířil mezi CF nemocnými v Kanadě a následně ve Velké Británii (viz. obr. č. 5.7). Tato zjištění vedla k zavedení přísných protiepidemických opatření. Celosvětově je dodržován přísný segregáčnický systém dle infekce (viz. tab. č. 5.4).

Bakterie *B. cepacia* komplexu disponují stejně jako *P. aeruginosa* celou řadou klasických extracelulárních produktů zahrnujících lipázy, proteázy, hemolyziny (schopné indukovat apoptózu a degranulaci fagocytů), katalázy a siderofory vázající železo. Kapacita LPS endotoxinu indukovat prozánětlivý TNFalfa byla v porovnání s endotoxinem *P. aeruginosa* více než devítinásobná. Adheze bakterií k epitelu dýchacích cest je zprostředkována různými typy vláken (např. mesh vlákny či filamentózními pili). Za zvláštní pozornost stojí obří vlákna označovaná jako cable pili, která byla pozorována výhradně u epidemického kmene ET12 (viz. obr. č. 5.7).



Obr. Č. 5.7 Elektronoptická fotografie bakteriální buňky *B. cenocepacia*, která patří k epidemické linii ET12, jež na svém povrchu exprimuje obří vlákna (Sajjan US, 1995).

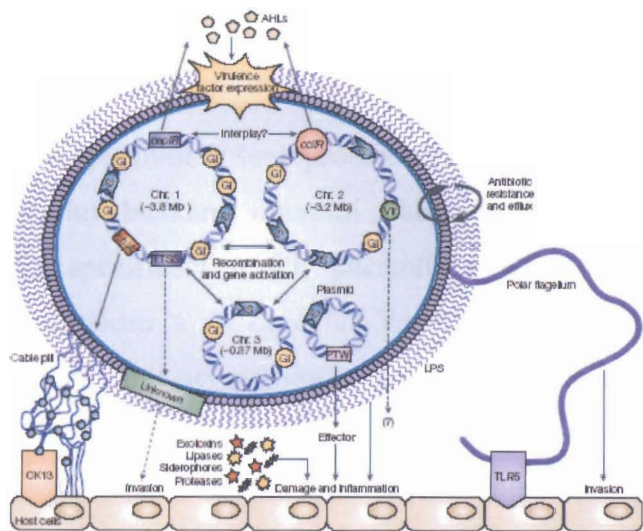
Diagnostika *B. cepacia* je standardně kultivační. V současné době přibývá pracovišť využívajících dále molekulárně genetické metody, hlavně PCR a i když je možno detekovat protilátky proti *B. cepacia*, rutinně se v klinické praxi serologie nevyužívá.

Největším klinickým problémem těchto bakterií je jejich vysoká rezistence na antibiotika vyžadující často podání troj až čtyřkombinace a využití jejich synergistického účinku.



Tab. č. 5.4 Izolační systém CF pacientů dle mikrobiologického nálezu

- nekolonizováni
- in fíkování meticilin-rezistentním *Staphylococcus aureus*
- in fíkování *P. aeruginosa* – sporadickými (tj. nepřenosnými) kmeny
- in fíkování *P. aeruginosa* – epidemickým (tj. přenosným) kmenem
- in fíkování *B. cepacia* komplex – prokázané pouze pomocí PCR
- in fíkování *B. multivorans*
- in fíkování *B. cenocepacia* – sporadickými kmeny
- in fíkování *B. cenocepacia* – epidemickým kmenem
- in fíkování *B. stabilis*



Obr. č. 5.8 Genomická struktura a hlavní faktory virulence *B. cenocepacia* ET-12 (Mahenthiralingam E., 2005)

#### 5.1.4 Dendritické buňky u pacientů s cystickou fibrózou

Pochopit složitý mechanismus inicializace a průběh *P. aeruginosa* infekce ve specifickém CF prostředí se zatím vědcům celého světa nepodařilo. Drobné střípky odkrývající a napomáhající pochopit tento složitý proces se neustále objevují.

Dendritické buňky se vzhledem k zásadní roli v regulaci imunitní odpovědi staly cílem studia mnoha výzkumných týmů i v rámci studia interakce právě těchto imunitních buněk v prostředí chronické plicní infekce u CF pacientů.

Většina prací je však z oblasti experimentálních modelů, pokusů na *CFTR* knock out myších, na buněčných liniích a *in vitro* pokusy na DC připravených z monocytů periferní krve. Zvláště přínosná jsou data o plicních DC, nejenom u CF, jejich interakci se specifickými patogenními strukturami bakterií, cesty aktivace spec. PRR (většinou z rodiny TLR) a cesty signalizace (245-253).

Zásadní roli v obraně proti infekci hraje epitel dýchacích cest (254). Interakce respiračních epitelálních buněk s respiračními DC je intenzivně studována také v CF prostředí zvláště v přítomnosti *P. aeruginosa* (255-260).

Neutrofilní zánět v plicích CF pacientů je doprovázen produkcí patologických množství cytotoxických molekul, hlavně neutrofilní elastázy, která blokuje účinek antiproteáz a narušuje nespecifické imunitní obranné mechanismy včetně aktivace DC (261, 262). Dle práce Roghanin a spol. je schopná elastáza neutrofilů přítomná ve sputu CF pacientů blokovat maturaci DC a zabránit tak aktivaci obranných mechanismů proti chronické infekci *P. aeruginosa* u CF pacientů (263, 264).

Všechna tato data jsou velmi cenná pro pochopení, jak funguje modifikované plicní CF prostředí v interakci se specifickými patogeny.

#### 5.1.5 Vlastní pozorování

Při komplexním řešení problematiky CF jsme se začali u těchto pacientů zabývat také stěžejními buňkami imunitní reakce, dendritickými buňkami. Zvláště jsme se zaměřili na jejich specifikaci u CF pacientů a na jejich interakci s infekčními agens, zejména *P. aeruginosa* a *B. cepacia*. Ve stejné oblasti jsme studovali i TLR receptory, důležité struktury v iniciaci imunitní odpovědi a v reakci na infekci.

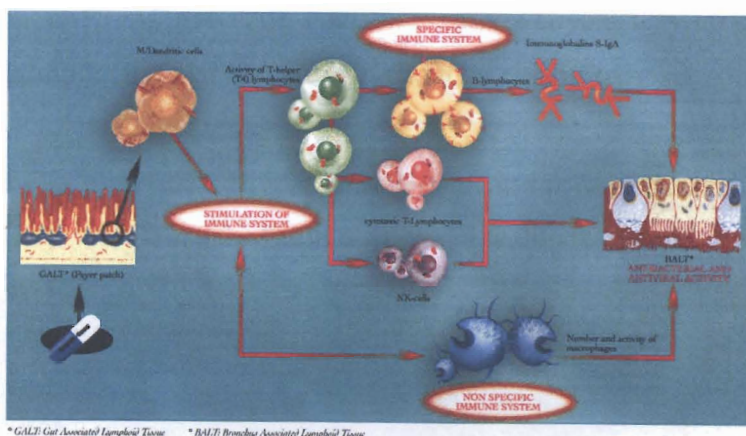
Výsledky studia interakce infekce a imunitního systému u pacientů s CF byly opakovaně prezentovány na přednáškách a formou posterů na domácích i zahraničních konferencích (viz. kap. 7.). Tématika studia dendritických buněk u pacientů s CF byla předmětem interního grantu FN Motol, který byl oceněn cenou ředitele jako nejlepší interní grant za rok 2003.

##### 5.1.5.1 Metodika přípravy z monocytů derivovaných DC

V rámci optimalizace metodiky přípravy DC z monocytů periferní krve před testováním DC od CF pacientů nás zajímala otázka, jakým způsobem na DC a jejich maturaci účinkují bakteriální imunomodulátory, běžně klinicky používané preparáty na podporu imunity.

Bakteriální imunomodulátory jsou heterogenní skupina léků (obsahující bakteriální lyzáty nebo extrakty definovaných kmenů bakterií) běžně používaných v klinické praxi pro nespecifickou stimulaci imunitního systému (viz. obr. č. 5.9). Bakteriální imunomodulátory byly spolu s enzymopreparáty testovány i u pacientů s CF (265).

Tato problematika byla publikována v zahraničním (*Vaccine*) i domácím (*Alergie*) odborném časopise (viz. III příloha, kap. 7., A4, B4). Publikace byla citována dalšími autory v impaktovaných časopisech. V domácím odborném tisku byla tato práce ohodnocena cenou za nejlepší původní článek v časopisu *Alergie* pro rok 2004.



Obr. č. 5.9 Předpokládaný mechanismus účinku bakteriálních imunomodulátorů (WHO Drug Information, 1993)

Zjistili jsme značné rozdíly v působení jednotlivých testovaných preparátů. Některé preparáty výrazně indukují maturaci DC (Luivac<sup>R</sup> a Ribomunyl<sup>R</sup>, v menší míře Imunor<sup>R</sup> a Biostim<sup>R</sup>). Význam této práce byl nejenom ve zdokonalování technologie přípravy DC, ale i pro pochopení mechanismu účinku těchto široce předepisovaných léků.

Závěry této práce jsou ve shodě s některými dřívějšími pracemi. Dosud však nebyla publikována práce, která by testovala všechny na trhu dostupné imunomodulátory. V jednotlivých pracích se však liší kvalita fungování jednotlivých testovaných imunomodulancí jako maturační činidla v procesu maturace DC (266, 267). Práce sloužila jako metodický podklad pro následné studium interakce DC a infekce u pacientů s CF.

### 5.1.5.2 Vlastní studium DC u CF pacientů

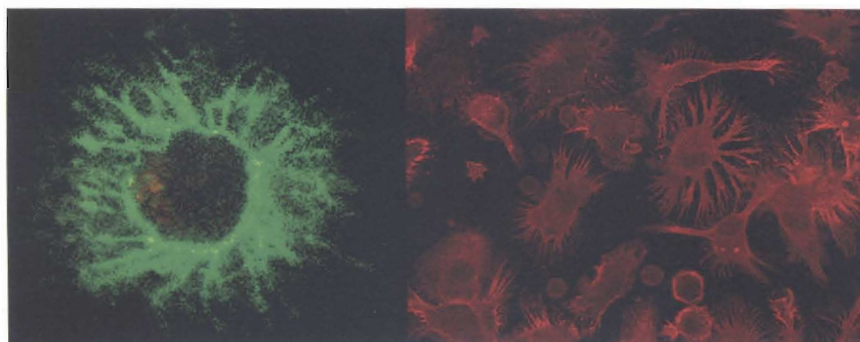
Výsledky studia DC u CF pacientů byly opakovaně prezentovány na domácích a zahraničních konferencích (viz. LT příloha, kap. 7.).

V pilotním projektu nás zajímalo, zda jsou DC u CF pacientů plně funkční a zda mají srovnatelné fenotypické vlastnosti s DC u zdravých dárců. Dále jsme se zaměřili na vliv kmenů *P. aeruginosa* a *B. cepacia* na aktivační stav DC. Zajímala nás hlavně otázka, zda je možné rozdílně ovlivnit maturaci DC odlišnými bakteriálními kulturami (živé versus tepelně inaktivované bakterie).

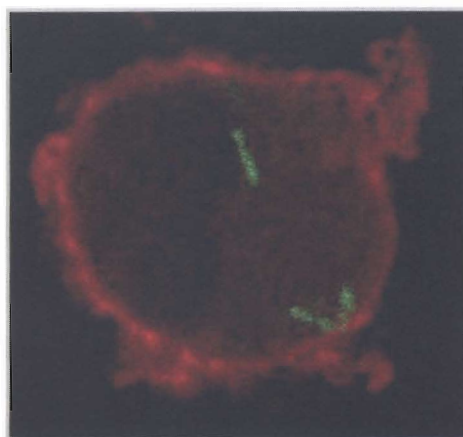
Provedli jsme mnoho pokusů, které opakovaně potvrdily, že DC u CF pacientů se fenotypicky ani funkčně neliší od DC zdravých dárců. Zásadním zjištěním je fakt, že tepelně inaktivované bakterie aktivují nezralé DC ve všech testovaných parametrech. Ve shodě s fenotypem zralých DC u nich byla výrazně redukována schopnost fagocytózy a zvýšena exprese kostimulačních a s maturací asociovaných molekul. Zralé DC produkují cytokiny polarizující

odpověď ve směru Th1, což potvrdila i analýza aktivovaných T lymfocytů. Živé bakterie nejsou schopny plnohodnotné aktivace nezralých DC a nejsou tedy schopny vyvolat zahájení imunitní reakce.

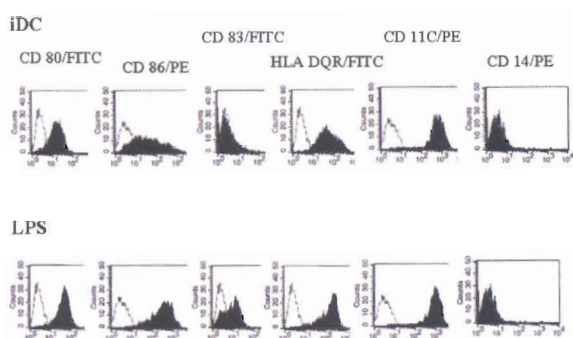
Rozdílná aktivace DC mrtvými a živými bakteriemi otvírá nový směr výzkumných aktivit v oblasti studia patofyziologie respiračního postižení u těchto pacientů.



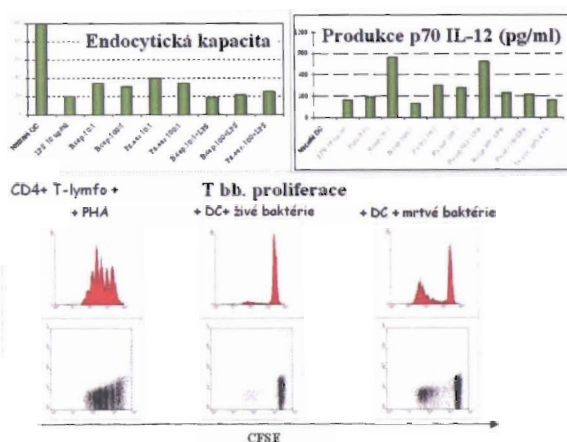
Obr. č. 5.10 Morfologie (konfokální mikroskop) DC u CF pacientů



Obr. č. 5.11 Nezralé DC aktivně pohlcují *P. aeruginosa*



Obr. č. 5.12 Fenotyp DC u CF pacientů



Obr. č. 5.13 Funkční vlastnosti DC u CF

#### 5.1.5.2.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Stejně jako naše pokusy, je i většina světové odborné literatury s DC připravenými z monocytů periferní krve, tedy pokusy *in vitro*.

Naše výsledky v oblasti polarizace imunitní odpovědi ve směru Th1 Gram negativními bakteriemi je ve shodě se světovou LT (249, 268, 269).

Také odlišná schopnost maturace živými a usmrcenými bakteriemi byla již publikována, ale u jiných bakteriálních kmenů a bez spojitosti s CF (270-274).

Všechna tato data jsou velmi cenná pro pochopení, jak funguje modifikované plicní CF prostředí v interakci se specifickými patogeny.

#### 5.1.6 Úloha TLR4 v patogenezi respiračního onemocnění u CF

V souvislosti s esenciální úlohou Toll-like receptorů v primární obraně organismu proti patogenům jsme se rozhodli jimi zabývat také u CF pacientů.

Navázání TLR s PAMP vede k aktivaci signalizační kaskády, iniciaci imunitní odpovědi a mobilizaci obranných mechanismů. Často však může systémová odpověď na zánět (zánětlivé faktory v periferním oběhu, horečka), která je velmi rychlá a účinná, ve svém extrémním projevu až organismus ohrozit na životě (septické stavy, (275)). Proto je zřejmé, že se v průběhu evoluce vyvinuly mechanismy, kterými je zánětlivá odpověď bržděna. Některé z nich působí již na úrovni signalizace TLR a mnoho studií se v dnešní době zaměřuje na negativní regulaci této aktivace. Alternativní sestřih při transkripci mRNA je jedním z mechanismů, které se mohou uplatňovat v regulaci vnitrobuněčných signalizačních drah. Vedle řady nových molekul byly objeveny inhibiční účinky „splicing variant“ některých molekul ze signální dráhy TLR. Tento způsob inhibice byl zaznamenán také přímo u myšičího TLR4. Alternativním sestřihem myšičí TLR4 mRNA vzniká krátký protein (smTLR4) obsahující pouze signální část bez transmembranové a intracelulární domény. Vysoká homologie s lidským TLR4 napovídá, že mechanismus regulace by mohl být podobný i u lidí.

TLR4 specificky rozpoznává LPS  $G^-$  bakterií a tedy i LPS *P. aeruginosa* chronicky přítomný u CF pacientů (276). Vzhledem k neschopnosti imunitního systému CF pacientů účinně eliminovat tuto  $G^-$  infekci je možno předpokládat i určitou dysregulaci TLR4 signalizace u těchto pacientů (277).

#### 5.1.7 Přehled poznatků o TLR u CF

Většina dosud publikovaných prací byla provedena na buněčných liniích či u myšičích modelů.

Greene a spol. srovnávala expresi TLR2/1, TLR2/6, TLR4, TLR9 po stimulaci specifickými TLR agonisty v tracheálních deltaF508 epiteliálních liniích v porovnání s kontrolní linií (255). Exprese jednotlivých TLR byla srovnatelná v obou testovaných liniích.

Muir a spol. srovnávala expresi jednotlivých TLR v respiračních epiteliálních liniích u CF, kontrol a analogicky u *CFTR* knock out myši a wild type myši (278). U CF epiteliálních linií i myši byla nalezena zvýšená exprese pouze TLR2 na apikální membráně epiteliálních buněk v reakci na bakteriální stimulaci.

### 5.1.8 Vlastní pozorování

Výsledky této práce byly opakovaně prezentovány na domácích i zahraničních konferencích. Článek s touto problematikou byl publikován v *Microbes and Infection* (viz. kap. 7., A3).

Cílem práce bylo zmapování kinetiky exprese jednotlivých transkripčních (sestříhových) variant lidského TLR4 u monocytů a DC. Zajímalo nás zda je TLR4 signalizace modifikována nebo negativně regulována při chronické  $G^{-}$  infekci u CF pacientů.

Výsledky ukázaly u obou typů buněk po stimulaci lipopolysacharidem specifický profil exprese každé z variant. Zatímco dvě varianty byly po aktivaci stabilně deregulovány, varianty NM138554 (s exony1,3,4) a NM003266 (1,2,3,4) ukázaly prudký vzestup exprese mezi 2 a 3 hodinou stimulace s následným poklesem na minimum. Monocyty od CF pacientů po LPS stimulaci ukázaly oproti kontrolám signifikantně ( $p < 0.05$ ) sníženou schopnost zvýšit expresi nejdlejší varianty (NM003266). Tato deregulace byla provázena signifikantně ( $p < 0.05$ ) zvýšenou produkcí TNF u CF pacientů.

Dva testované typy APC, monocyty a dendritické buňky *in vitro* vypěstované z monocytů vykazaly v průběhu aktivace LPS odlišný charakter exprese sestříhových variant TLR4. Zatímco u monocytů dochází k nárůstu exprese přímo z bazální hladiny před stimulací, u dendritických buněk dojde ihned po aktivaci ligandem k velmi rychlému snížení exprese a poté k postupnému zvyšování nad úroveň bazální hladiny. Tento rozdíl může souviset s rozdílnou funkcí monocytů a DC v imunitních reakcích. DC jsou o mnoho potentnější APC než monocyty a je možné, že hladina TLR je po stimulaci snížena, aby nemohlo dojít ke vzniku přehnané poškozující reakce.

Monocyty CF pacientů ve srovnání s kontrolami odpovídají na stimulaci LPS méně intenzivním vzrůstem exprese výše zmíněných sestříhových variant. Tento defekt spolu s pozorovanou vyšší produkcí TNF po stimulaci LPS naznačuje dysregulaci TLR4 signalizace u CF pacientů.

Pro plné pochopení úlohy TLR4 a jeho příp. dysregulace v patogenezi sino-pulmonálního postižení u CF pacientů jsou však nutné další studie.

#### 5.1.8.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Expresse jednotlivých sestřihových variant TLR4 u CF nebyla v hunánní medicíně dosud publikována.

Pomalejší odpověď monocytů CF pacientů na stimulaci LPS ve srovnání s kontrolami provázená méně intenzivním vzrůstem exprese výše zmíněných TLR4 sestřihových variant je ve shodě se světovou literaturou dokumentující zpožděnou LPS indukovanou odpověď v respiračních epitelálních buňkách CF pacientů (279). Pozorovaná vyšší produkce TNF po stimulaci LPS u CF pacientů je také ve shodě se světovou literaturou (280) na rozdíl od produkce IL-8, která v naší studii po stimulaci LPS u CF pacientů zvýšena nebyla (279, 281). Snížená schopnost dostatečné exprese inhibiční TLR4 splicing varianty (NM003266) v myeloidních buňkách CF pacientů, která by tak vedla ke zvýšené odpovědi na stimulaci TLR4, je ve shodě se světovou LT, dokumentující zvýšenou aktivaci NF-kappaB v LPS stimulovaných respiračních epitelálních buňkách u CF pacientů (279, 282).

## 6 Diagnostická aplikace v klinice - protilátky proti *P. aeruginosa*

Zkoumání imunitního systému CF pacientů vedla ke klinické aplikaci v podobě serologické diagnostiky infekce *P. aeruginosa* - vyšetřování titru protilátek proti *P. aeruginosa*.

### 6.1 Přehled poznatků v dané oblasti

Obecné informace týkající se Gram negativní tyčinky *P. aeruginosa*, vlastnosti, diagnostika a její specifity u CF shrnuje jiná kapitola (viz. kap. č. 5.1.2).

### 6.2 Přehled poznatků v serologii infekce *P. aeruginosa* u CF

Problematicke serologické diagnostiky *P. aeruginosa* infekce u CF se věnují výzkumné týmy již od poloviny sedmdesátých let minulého století (283). Od té doby vyšlo mnoho publikací věnujících se tomuto tématu (např. (81, 237, 284-288)).

Existují pracoviště, která již při serologické pozitivitě *P. aeruginosa* infekce zahajují razantní protipseudomonádovou léčbu (Dánsko a Německo), jiné země berou serologickou diagnostiku jako doplňující informaci ke kultivaci (USA a další).

Nejdelší sérologická studie korelující titry protilátek proti *P. aeruginosa* s intenzitou léčby a přežitím pacientů byla provedena během 30 let v Dánsku u 157 CF pacientů. Vzestup titru specifických protilátek zcela koreloval s kultivačním nálezem bakterie. Pacienti, kteří byli razantně léčeni, měli nižší titry specifických protilátek a přežívali déle od záchytu patogena (285).

Největší serologická studie byla provedena u 375 Evropských CF pacientů. V 1791 vzorcích sér byly změřeny titry specifických protilátek proti exotoxinu A, elastáze a alkalické proteáze. Protilátky s pozitivními titry proti alkalické fosfatáze dosahovaly nejvyšší senzitivity. Nejvyšší senzitivita byla dosažena kombinací vyšetření všech tří titrů specifických protilátek. U CF pacientů, u kterých došlo k úspěšné eradikaci patogena, došlo k signifikantnímu poklesu titrů specifických antipseudomonádových protilátek. Titry protilátek při prvozáchytu *P. aeruginosa* infekce byly poměrně nízké. Autoři doporučují využívat serologické diagnostiky k monitoraci léčby, avšak neléčit pacienty pouze dle výsledků serologie (237).

Dvě práce zabývající se touto problematikou vyšly v roce 2006 v časopisu Thorax (286, 288). Vzhledem k rozdílným výsledkům přes použití zcela shodné diagnostické metody (ale rozdílných cut-off hladin, viz. tab. č. 6.1), nechybělo ani zamyšlení odborníků, proč tomu tak je (284). Hlavním nedostatkem serologické diagnostiky je malé množství standardizovaných



komerčně dostupných kitů (celosvětově jsou teprve od roku 2006 dostupné 2 druhy kitů, mnoho pracovišť si však zvláště z finančních důvodů protilátky vyrábí nadále samo). Celosvětově neexistují jasně dané cut-off hladiny určující přítomnost infekce. Serologie dále nedokáže rozlišit lokalizaci infekci v dýchacích cestách, zda se jedná o infekci horních a nebo dolních cest dýchacích (289).

Pro budoucnost se jeví jako zásadní optimalizace a zvýšení specifity serologických diagnostických metod při detekci *P. aeruginosa* infekce. Jako kandidátní cílové struktury se jeví již dříve testované bičikové antigeny, panreaktivní protilátky proti “rough” LPS (290) a nově také cytotoxiny III. sekrečního systému ((291-293), viz obr. č. 5.5).

Tab. č. 6.1 Srovnání dvou studií zabývajících se serologickou diagnostikou *P. aeruginosa*

Publikováno v Thorax, 2006	I.	II.
Autoři	Kapler et al.	Tramper-Stranders et al.
Město, Země	Mnichov, Německo	Utrecht, Holandsko
Trvání studie	2000-2	2002-5
Design	<sup>#</sup> Prospektivní: měření titru protilátek á 3 měsíce po dobu 2 let Korelace s mikrobiologickou kultivací	<sup>†</sup> Cross-sectional (A) a prospektivní (B) Srovnání serologie a kultivace v roce 2004, prospektivně 1x ročně u CF děti
Počet CF pacientů	183	(A) 220 (B) 57
Věk (v letech)	2-41	0.7-65 4-14
Median	15.7	11.8 7.9
Průměr	16.7	14.5 8.1
<i>P. aeruginosa</i> infekce*		
Free	37%	42% 54%
Intermitentní	15%	27% 23%
Chronická	48%	31% 23%
Mukoidní	54%	? ?
Metodika - Komerčně dostupný ELISA kit (Mediagnost, Německo) detekující titry protilátek proti alkalické proteáze, elastáze a exotoxinu A	pozitivita při titru kterékoli protilátky nad 1:500	ROC determinované cut off hladiny

\* Korelace titru protilátek nejdříve s kultivací ze 2 předcházejících let, následně ze 2 následujících let.

<sup>†</sup> Stanovení titru protilátek na konci sledovaného období (2004) v cross-sectional studii (A) a pravidelně 1x ročně po dobu 3 let zároveň s kultivací v prospektivní studii (B).

<sup>#</sup> Chronická infekce *P. aeruginosa* definována Kapler a spol. jako pozitivních >7 z 8 kultivací, Tramper-Stranders a spol. jako pozitivních >50 % ze všech kultivací.

### 6.3 Vlastní studie

Serologická diagnostika protilátek proti *P. aeruginosa* se stala rutinním každoročním vyšetřením u všech CF pacientů od roku 2004.

U neexpektorujících pacientů hraje serologie významnou roli ve sledování přítomnosti infekce *P. aeruginosa*.

Projektem, který byl prezentován v souborném článku (viz. kap. 7., B3) a opakovaně i formou posterů (viz. kap. 7.) se stalo porovnání jednotlivých diagnostických metod při odhalení přítomnosti *P. aeruginosa* infekce.

### 6.3.1 Závěry

#### Serologie

Při zjištění positivity titrů protilátek je nutné vždy uvažovat o infekci *P. aeruginosa*. Protilátky však přinášejí i informaci anamnestickou a izolovaný nález pozitivních titrů může svědčit o infekci prodělané v minulosti.

Hraniční titry protilátek se objevují u části pacientů několik měsíců před kultivačním záchytem bakterie.

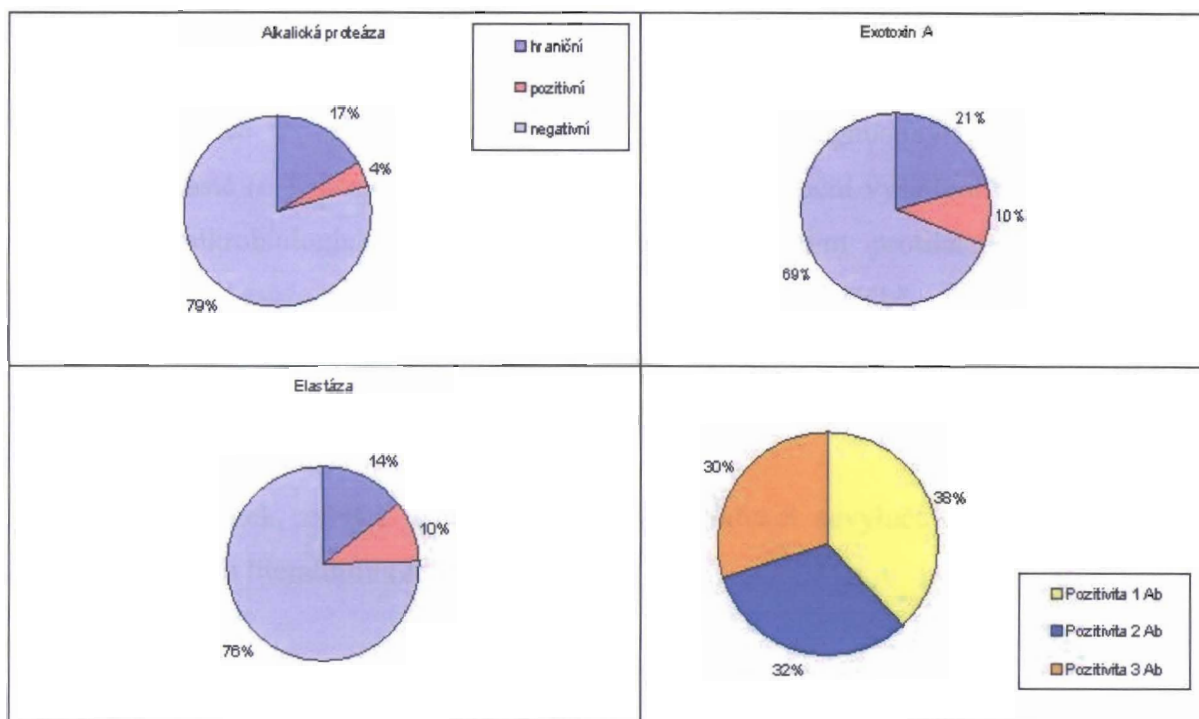
Protilátky proti exotoxinu A se v našem souboru jevily jako nejvíce senzitivní, u části CF pacientů se objevovaly dříve než protilátky proti dalším dvěma specifickým exoantigenům *P. aeruginosa* (viz. obr. č. 6.1). Nejvyšší naměřené titry protilátek proti jednotlivým exoantigenům ukazuje tabulka č. 6.2.

Negativita protilátek, zvláště u mladších dětí, však infekci nevylučuje (288).

Funkce plic a stav výživy u pacientů s kultivačně opakovaně potvrzenou chronickou *P. aeruginosa* infekcí a opakovanou negativitou titrů protilátek proti této bakterii byl výrazně horší v porovnání s jedinci s chronickou infekcí, jejichž imunitní systém reagoval na infekci produkcí specifických protilátek.

Tab. č. 6.2 Nejvyšší naměřené titry protilátek proti jednotlivým exoantigenům *P. aeruginosa*

Exoantigen	Nejvyšší změřený titer protilátek
Elastáza	1:28 000
Exotoxin A	1:18 000
Alk. proteáza	1:14 000



Obr. č. 6.1 Titry protilátek (%) proti jednotlivým exoantigenům *P. aeruginosa*; pozitivita (%) proti jednomu, kombinaci a všem třem exoantigenům *P. aeruginosa*

**Závěry vyplývající ze studia porovnávající jednotlivé diagnostiky *P. aeruginosa* infekce** (viz. kap. 7, B3):

Nejvýrazněji negativně ovlivňuje funkci plic infekce *B. cepacia*, jejíž klinický efekt překrývá klinický dopad infekce *P. aeruginosa*.

Také infekce *P. aeruginosa* významně ovlivňuje funkci plic a obě bakterie vedou k výraznému zhoršování funkce plic s věkem.

Důležité je zamezit chronické infekci *P. aeruginosa*, nebo ji alespoň oddálit a zabránit tak vzniku nevratných plicních změn.

Je zcela nezbytné další zdokonalení a zpřesnění laboratorních diagnostických metod vedoucích k včasné diagnóze a tím k možnosti časně léčby infekce *P. aeruginosa*.

Ve srovnání kultivačních metod a vyšetření pomocí PCR se ukazuje, že v případě *P. aeruginosa* ani jedna metoda není sama o sobě plně spolehlivá.

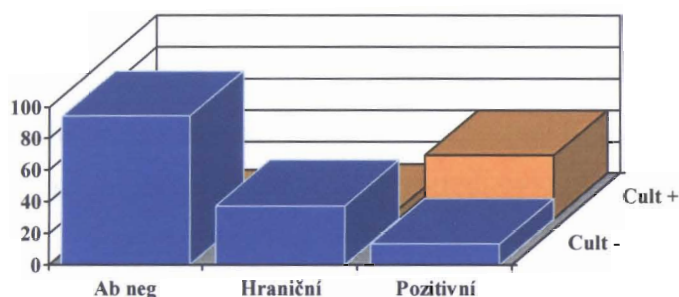
Ve srovnání s PCR vyšetřením infekce bakteriemi *B. cepacia* komplex nedává PCR diagnostika infekce *P. aeruginosa* tak spolehlivé výsledky a je zde velké podezření na možnost falešné positivity. Zjištěny byly ale i ojedinělé nálezy PCR negativní a kultivačně pozitivní. Rutinní používání PCR metody pro záchyt a řízení léčby infekce *P. aeruginosa* tedy

při současných metodách nelze zatím doporučit jako přesnou a spolehlivou metodu včasného záchytu infekce.

V případě infekce *P. aeruginosa* je zatím základem diagnostiky a mikrobiologické surveillance časté (á 1 měsíc) a pravidelně prováděné kulturační vyšetření v plně erudované a vybavené mikrobiologické laboratoři, doplněné vyšetřením protilátek. Výsledek této kombinace metod může být dobrým vodítkem při rozhodování o léčbě.

Při zjištění positivity titrů protilátek je nutné vždy uvažovat o infekci *P. aeruginosa*. Protilátky však přinášejí i informaci anamnestickou a izolovaný nález pozitivních titrů může svědčit o infekci prodělané v minulosti.

Negativita protilátek, zvláště u mladších dětí, však infekci nevyklučuje. Tato data jsou ve shodě se světovou literaturou (288).



Obr. č. 6.2 *P. aeruginosa* – korelace serologické diagnostiky s mikrobiologickou kultivací

### 6.3.1.1 Srovnání vlastních závěrů se světovou literaturou

Naše výsledky v oblasti serologické diagnostiky *P. aeruginosa* jsou v souladu se světovou literaturou. Porovnání jednotlivých metodik detekce *P. aeruginosa* infekce v organismu – mikrobiologické, molekulárně-genetické a serologické, nebylo dosud ve světě publikováno, i když existují práce porovnávající PCR diagnostiku s kultivací (224) či serologii s kultivací (237, 286, 288).

## 7 Závěr

Cystická fibróza je monogenně dědičné onemocnění, jasně definované, ale variabilita a šíře klinických projevů této komplexní choroby skrývá mnoho nejasného a dosud nevysvětleného. I když je imunitní systém u pacientů s CF podle všech známek při narození plně funkční, bez prokazatelné patologie, následně se s průběhem onemocnění rozvine řada sekundárních změn. Přesto, že jedním z klíčových klinických příznaků CF je chronická infekce a účast imunitního systému je tedy zásadní, ukazuje se, že jeho poruchy jsou až sekundární a ovlivnění imunitních funkcí při tomto onemocnění má jenom pomocnou úlohu. Nicméně teoretické poznatky o interakci imunitního systému s infekčními patogeny v modifikovaném CF prostředí jsou velmi zajímavé a nové poznatky jak o CF, tak o funkci imunitního systému, přinesou jistě v budoucnu nové pohledy na patogenezu a léčbu tohoto závažného onemocnění.

Studium imunitního systému pacientů s CF z klinicko-imunologicko-molekulárně-genetického pohledu se zaměřením na rozšíření poznatků o interakci imunitního systému s infekčními patogeny v modifikovaném CF prostředí bylo hlavním předmětem této disertační práce.

Při komplexní analýze imunitního profilu CF pacientů nás nález ANCA protilátek a snížení IgG2 jako jediného TH1 kontrolovaného izotypu u nejmladších CF pacientů vedl ke studiu cytokinového profilu těchto pacientů s předpokládanou nerovnováhou TH1 x TH2 cytokinového profilu ve prospěch TH2. V našem souboru se TH1 x TH2 nerovnováhu nepodařilo prokázat, ale významným objevem byla skupina CF pacientů neschopná adekvátně reagovat na stimulaci sekrecí jak IL-4 (TH2), tak IFN-gamma (TH1). Tento fakt byl doprovázen významným zhoršením funkce plic v čase v porovnání se skupinou CF pacientů adekvátně reagujících na stimulaci.

Z výsledků vyplývá, jak důležité je optimální cytokinové prostředí v obraně proti infekci a nerovnováha, příp. nedostatečná produkce důležitých cytokinů ovlivňuje závažnost postižení funkce plic a tedy morbiditu i mortalitu těchto pacientů.

V souladu s aktivním výzkumem ve světě, jsme se rozhodli také u našich pacientů hledat další genetické vlivy modifikující průběh základního onemocnění mimo *CFTR*. Z palety faktorů, které mohou ovlivňovat průběh CF, jsme se zaměřili hlavně na ty, které se účastní imunitních reakcí.

*TGF-beta1* byl vybrán jako klíčový cytokinový gen v tomto kontextu a pro jeho známý efekt v procesu fibrotizace. Byla nalezena rozdílná frekvence polymorfizmů *TGF-beta1* ve zdravé a CF populaci. Závěry této práce však nepotvrdily asociaci určitých polymorfizmů *TGF-beta1* s plicním postižením u CF pacientů. Byla však nalezena asociace jaterního a endokrinního postižení pankreatu s konkrétními polymorfizmy *TGF-beta1*. Důležité je také pozorování velmi nízkých koncentrací *TGF-beta1* u CF pacientů chronicky kolonizovaných komplexem *B. cepacia* činící tyto pacienty zranitelnějšími při akutní exacerbaci chronické G<sup>-</sup> infekce.

Dále jsme naši pozornost zaměřili na MBL, který je součástí nespecifické větve imunitní reakce, zvláště v systému aktivace komplementu a v prvních krocích imunitní odpovědi vůči infekci. Sérové hladiny MBL plně korelovaly s testovanými polymorfizmy *MBL2* genu. Polymorfismus *MBL2* genu nebyl v přímé asociaci s respiračním fenotypem CF. I pacienti s geneticky determinovanou nízkou produkcí MBL byli schopni zvýšené produkce tohoto lektinu v reakci na akutní exacerbaci infekce.

V průběhu našeho studia faktorů modifikujících průběh onemocnění jsme narazili i na další molekuly.

Prokázali jsme významné snížení koncentrace SP-D v supernatantech BAL u CF pacientů, tedy v místě patogenetické reakce. Vzhledem k roli proteinů surfaktantu, zvláště SP-D, který má imunologické funkce a místo působení v plicích, by mohla jeho nedostatečná produkce hrát roli v klinice CF.

Ukázali jsme možnost snížení koncentrace LTB<sub>4</sub> v kondenzátu vydechovaného vzduchu, doprovázené snížením kyselosti CF prostředí po aplikaci nenasycených mastných kyselin. Vzhledem k roli LTB<sub>4</sub>, jednoho z metabolitů kyseliny arachidonové, na potenciaci neutrofilního zánětu, kdy LTB<sub>4</sub> působí jako mocný chemoatraktant neutrofilů do místa zánětu a indikuje produkci kyslíkových radikálů a neúspěchu terapeutických pokusů s jeho podáváním by suplementace n-3 PUFA mohla být alternativní možností, jak upravit prostředí v plicích CF pacientů.

Ze všech těchto výsledků vyplývá, jak důležité je optimální prostředí v obraně proti infekci a nerovnováha, v podobě nedostatečné či přemrštěné reakce ovlivňuje závažnost postižení funkce plic. Z výše uvedených výsledků je také zřejmé, že na morbiditě i mortalitě CF pacientů se podílí celý komplex faktorů od poruchy *CFTR*, přes roli dalších modifikujících genů po nezanedbatelné vlivy prostředí.

Při komplexním řešení problematiky CF jsme se začali intenzivně zabývat také stěžejními buňkami imunitní reakce, dendritickými buňkami, u CF pacientů. Zvláště jsme se zaměřili na

jejich specifikaci u CF pacientů a na jejich interakci se specifickými infekčními agens. Opakovaně jsme potvrdili, že DC u CF pacientů se fenotypicky ani funkčně neliší od DC zdravých dárců. Významným zjištěním je fakt, že tepelně inaktivované bakterie aktivují nezralé DC ve všech testovaných parametrech (morfologicky, fenotypicky i funkčně) na rozdíl od živých bakterií, které nejsou schopny plnohodnotné aktivace nezralých DC a nejsou tedy schopny vyvolat zahájení imunitní reakce. Rozdílná aktivace DC mrtvými a živými bakteriemi otvírá nový směr výzkumných aktivit v oblasti studia patofyziologie respiračního postižení u těchto pacientů.

Ve stejné oblasti byly studovány i TLR receptory, důležité struktury v iniciaci imunitní dopovědi a v reakci na infekci. Byl popsán nový metodologický přístup založený na technologii RT-PCR v reálném čase umožňující přesnou kvantifikaci exprese čtyř sestřihových variant genu *TLR4*. Kvantifikace sestřihových variant pomůže odhalit funkce jednotlivých transkripčních variant po stimulaci a jejich možné narušené regulační působení po stimulaci DC v modifikovaném CF prostředí v přítomnosti chronické infekce.

Zkoumání imunitního systému CF pacientů vedla ke klinické aplikaci v podobě serologické diagnostiky infekce *P. aeruginosa* - vyšetřování titru protilátek proti *P. aeruginosa*. Bylo ukázáno, že serologie je významnou diagnostickou metodou a v kombinaci s mikrobiologickou kultivací může významně přispět k včasné a razantní terapii s cílem eradikovat tohoto patogena. Toto vyšetření je zvláště přínosné u neexpektorujících CF pacientů, neprodukujících sputum, nejčastěji malých dětí s CF, kde serologie může významně přispět k včasné diagnóze *P. aeruginosa* infekce.

## 8 LITERATURA

1. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am.* 2000 May;84(3):597-607.
2. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR BA, Sly WS and Valle D., editor. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York.: McGraw-Hill Inc; 2001. p. Chapter 201.
3. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000;67(2):117-33.
4. Busch R. On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol [Med] (Praha).* 1990;36:13-5.
5. Welsh MJ, Ramsey BWA. Research on cystic fibrosis. *J Respir Crit Care Med.* 1998;157::S148-S54.
6. Quinton P. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature Genetics.* 1983;301::421-2.
7. Quinton P. Physiological basis of cystic fibrosis. A historical perspective. *PhysiolRev.* 1999;79::3-22.
8. Andersen D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. a clinical and pathological study. *Amer J Dis Child.* 1938;56:344-99.
9. Andersen DH HR. Celiac Syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child.* 1946;72::62-80.
10. Lathrop GM, Farrall M, O'Connell P, Wainwright B, Leppert M, Nakamura Y, et al. Refined linkage map of chromosome 7 in the region of the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet.* 1988 Jan;42(1):38-44.
11. Estivill X, Farrall M, Scambler Pea. A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation free islands. *Nature Genetics.* 1987;326: 840-5.
12. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245(4922):1066-73.
13. Kerem B RJ, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene. genetic analysis. *Science.* 1989;245:1073-80.
14. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):169-75.
15. Bobadilla J, Macek MJ, Fine J, Farrell P. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation.* 2002;19::575-606.
16. Estivill X, Bancells C, Ramos C, Consortium atBCMA. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat.* 1997; 10:135-54.
17. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151: S47-S53.
18. Macek M, Jr., Macek M, Křebsová A, Vávřová V. Keltský původ populace v Česku. *Vesmír.* 2000;79:285.
19. Filip J. Keltská civilizace a její dědictví. Praha: Academia; 1995.
20. Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, Corey M, Levison H, Durie P, et al. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly->Asp at codon 551 and the DF508 mutation are clinically indistinguishable from DF508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *American Journal of Human Genetics.* 1992;51( 2): 245-50.
21. Dork T, Macek M, Jr., Mekus F, Tummeler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet.* 2000 Mar;106(3):259-68.
22. Loirat F. HS, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol.* 1997;69::419-25.
23. Cuthbert AW, Halstead J, Ratcliff R, Colledge WH, Evans MJ. The genetic advantage hypothesis in cystic fibrosis heterozygotes: a murine study. *J Physiol.* 1995 Jan 15;482 ( Pt 2):449-54.
24. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 28;94(22):12088-93.
25. Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, et al. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature.* 1998 May 7;393(6680):79-82.
26. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003 Sep;67(Pt 5):471-85.
27. Bush A. AE, Davies JC, Griesenbach U., Jaffe A. *Cystic Fibrosis in the 21st Century:* S Karger Pub; 2005.
28. Hodson M. GD, Bush A. *Cystic Fibrosis.* Third ed: Oxford University Press; 2007.
29. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998 Apr;132(4):589-95.



30. Vávrová V. Cystická fibróza. 1. vydání ed: Grada; 2006.
31. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006 Jul;61(7):627-35.
32. Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, et al. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 1;174(7):787-94.
33. Kerem E. Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7 Suppl 1:S166-9.
34. Rosenecker J, Huth S, Rudolph C. Gene therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives. *Curr Opin Mol Ther*. 2006 Oct;8(5):439-45.
35. Rubenstein RC. Targeted therapy for cystic fibrosis: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutation-specific pharmacologic strategies. *Mol Diagn Ther*. 2006;10(5):293-301.
36. White AF, Ponnazhagan S. Airway epithelium directed gene therapy for cystic fibrosis. *Med Chem*. 2006 Sep;2(5):499-503.
37. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):683-92.
38. Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, et al. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Mar;161(3 Pt 1):860-5.
39. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*. 2003 Oct 9;349(15):1433-41.
40. Alton E, Kitson C. Gene therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000 Jul;9(7):1523-35.
41. Alton EW. Use of nonviral vectors for cystic fibrosis gene therapy. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(4):296-301.
42. Anson DS, Smith GJ, Parsons DW. Gene therapy for cystic fibrosis airway disease- is clinical success imminent? *Curr Gene Ther*. 2006 Apr;6(2):161-79.
43. Conese M, Boyd AC, Di Gioia S, Auriche C, Ascenzioni F. Genomic context vectors and artificial chromosomes for cystic fibrosis gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2007 Jun;7(3):175-87.
44. Davies JC. Gene and cell therapy for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7 Suppl 1:S163-5.
45. Figueredo J, Limberis MP, Wilson JM. Prediction of cellular immune responses against CFTR in patients with cystic fibrosis after gene therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 May;36(5):529-33.
46. Griesenbach U, Boyd AC. Pre-clinical and clinical endpoint assays for cystic fibrosis gene therapy. *J Cyst Fibros*. 2005 May;4(2):89-100.
47. Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther*. 2006 Jul;13(14):1061-7.
48. Jaffe A, Prasad SA, Larcher V, Hart S. Gene therapy for children with cystic fibrosis--who has the right to choose? *J Med Ethics*. 2006 Jun;32(6):361-4.
49. Lee TW, Matthews DA, Blair GE. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*. 2005 Apr 1;387(Pt 1):1-15.
50. McCray PB, Jr. Cystic fibrosis. Difficulties of gene therapy. *Lancet*. 2001 Dec;358 Suppl:S19.
51. Norek A, Bal J. [On the way to gene therapy in cystic fibrosis]. *Med Wieku Rozwoj*. 2006 Jan-Mar;10(1 Pt 2):247-74.
52. Parsons DW. Airway gene therapy and cystic fibrosis. *J Paediatr Child Health*. 2005 Mar;41(3):94-6.
53. Setoguchi Y, Yokoyama T. [Cystic fibrosis and gene therapy]. *Nippon Rinsho*. 2005 Dec;63 Suppl 12:607-16.
54. Sueblinvong V, Suratt BT, Weiss DJ. Novel therapies for the treatment of cystic fibrosis: new developments in gene and stem cell therapy. *Clin Chest Med*. 2007 Jun;28(2):361-79.
55. Tate S, Elborn S. Progress towards gene therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005 Mar;2(2):269-80.
56. Ziady AG, Davis PB. Current prospects for gene therapy of cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Oct;6(5):515-21.
57. Berger M, Konstan M. Immunopathogenesis of Cystic Fibrosis Lung Disease. In: Yankaskas JR KM, editor. *Cystic Fibrosis in Adults*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p. 115-43.
58. Döring G, Bellon G, Knight R. Immunology in cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes, DM, editor. *Cystic Fibrosis*. 2nd ed. London: Arnolds; 2000. p. 109-40.
59. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(3):303-7.
60. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. 2004 Feb;23(2):327-33.

61. Gudmundsson GH, Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J Immunol Methods*. 1999 Dec 17;232(1-2):45-54.
62. Aarbiou J, Rabe KF, Hiemstra PS. Role of defensins in inflammatory lung disease. *Ann Med*. 2002;34(2):96-101.
63. Carlsson M, Eriksson L, Pressler T, Kornfalt R, Mared L, Meyer P, et al. Autoantibody response to BPI predict disease severity and outcome in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2007 May;6(3):228-33.
64. Cole AM, Ganz T. Antimicrobial peptides and proteins in the CF airway. *Methods Mol Med*. 2002;70:447-64.
65. Hiemstra PS. Antimicrobial peptides in the real world: implications for cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2007 Apr;29(4):617-8.
66. Saiman L, Tabibi S, Starner TD, San Gabriel P, Winokur PL, Jia HP, et al. Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Oct;45(10):2838-44.
67. Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock RE, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2921-7.
68. Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerecker AA, Golan DE, et al. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6907-12.
69. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med*. 2002 Jan;30(1 Supp):S64-S73.
70. Elsbach P. Mechanisms of disposal of bacterial lipopolysaccharides by animal hosts. *Microbes Infect*. 2000 Aug;2(10):1171-80.
71. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans*. 2003 Aug;31(Pt 4):785-90.
72. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. 2003 Jan 22;85(2):85-95.
73. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):675-80.
74. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003 Jun;15(4):396-401.
75. Kilpatrick D. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine*. 2002;12:335-51.
76. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19;1572(2-3):401-13.
77. Garred P, Pressler T, Langg Sea. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL deficient patient with severe cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 2002;33:201-7.
78. Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):431-7.
79. Tummeler B, Bosshammer J, Breitenstein S, Brockhausen I, Gudowius P, Herrmann C, et al. Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Behring Inst Mitt*. 1997 Feb(98):249-55.
80. Sediva A, Vavrova V, Bartosova J, Pohunek P, Bartunkova J, Macek M. Immune Aspects of Cystic Fibrosis. *ACI International*. 2001;13(2):67-70.
81. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *Jama*. 2002 Jun 12;287(22):2958-67.
82. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun*. 2003 Jul;71(7):3875-84.
83. Lang AB, Rudeberg A, Schoni MH, Que JU, Furer E, Schaad UB. Vaccination of cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa* reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jun;23(6):504-10.
84. Mallfoot A, Adam G, Ciofu O, Doring G, Knoop C, Lang AB, et al. Immunisation in the current management of cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2005 May;4(2):77-87.
85. Pier G. Application of vaccine technology to prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Vaccines*. 2005 Oct;4(5):645-56.
86. Kollberg H, Carlander D, Olesen H, Wejaker PE, Johannesson M, Larsson A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr Pulmonol*. 2003 Jun;35(6):433-40.

87. Dorlochter L, Carlsson M, Olafsdottir EJ, Roksund OD, Rosendahl K, Fluge G. Anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies and lung disease in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004 Aug;3(3):179-83.
88. Sediva A, Bartunkova J, Bartosova J, Jennette C, Falk RJ, Jethwa HS. Antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against bactericidal/permeability-increasing protein detected in children with cystic fibrosis inhibit neutrophil-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect*. 2003 Jan;5(1):27-30.
89. Rotschild M, Elias N, Berkowitz D, Pollak S, Shinawi M, Beck R, et al. Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein (BPI-ANCA) in cystic fibrosis patients treated with azithromycin. *Clin Exp Med*. 2005 Jul;5(2):80-5.
90. Cooper T, Savige J, Nassis L, Paspaliaris B, Neeson P, Neil J, et al. Clinical associations and characterisation of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against bactericidal/permeability-increasing protein and azurocidin. *Rheumatol Int*. 2000;19(4):129-36.
91. Schultz H, Schinke S, Weiss J, Cerundolo V, Gross WL, Gadola S. BPI-ANCA in transporter associated with antigen presentation (TAP) deficiency: possible role in susceptibility to Gram-negative bacterial infections. *Clin Exp Immunol*. 2003 Aug;133(2):252-9.
92. Doring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4842-50.
93. Hausler M, Schweizer K, Biesterfel S, Opladen T, Heimann G. Peripheral decrease and pulmonary homing of CD4+CD45RO+ helper memory T cells in cystic fibrosis. *Respir Med*. 2002 Feb;96(2):87-94.
94. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004 Dec;3(4):223-31.
95. Richman-Eisenstat J. Cytokine soup: making sense of inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1996 Jan;21(1):3-5.
96. Corvol H, Fitting C, Chadelat K, Jacquot J, Tabary O, Boule M, et al. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Jun;284(6):L997-1003.
97. Saadane A, Soltys J, Berger M. Acute *Pseudomonas* challenge in cystic fibrosis mice causes prolonged nuclear factor-kappa B activation, cytokine secretion, and persistent lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May;117(5):1163-9.
98. Salva PS, Doyle NA, Graham L, Eigen H, Doerschuk CM. TNF-alpha, IL-8, soluble ICAM-1, and neutrophils in sputum of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 1996 Jan;21(1):11-9.
99. Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Verghese MW, et al. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Mar 1;169(5):645-53.
100. Moss RB, Hsu YP, Olds L. Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 2000 Jun;120(3):518-25.
101. Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol*. 2004 May;37(5):393-9.
102. Osika E, Cavaillon JM, Chadelat K, Boule M, Fitting C, Tournier G, et al. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J*. 1999 Aug;14(2):339-46.
103. Stecenko AA, King G, Torii K, Breyer RM, Dworski R, Blackwell TS, et al. Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Inflammation*. 2001 Jun;25(3):145-55.
104. Schmitt-Grohe S, Naujoks C, Bargon J, Wagner TO, Schubert R, Hippe V, et al. Interleukin-8 in whole blood and clinical status in cystic fibrosis. *Cytokine*. 2005 Jan 7;29(1):18-23.
105. Teramoto S, Matsuse T, Ouchi Y. Increased production of TNF-alpha may play a role in osteoporosis in cystic fibrosis patients. *Chest*. 1997 Aug;112(2):574.
106. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Jul;104(1):72-8.
107. Bonfield TL, Panusk JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim Aea, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:2111-8.
108. Brazova J, Sediva A, Pospisilova D, Vavrova V, Pohunek P, Macek M, Jr., et al. Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. *Clin Immunol*. 2005 May;115(2):210-5.
109. Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, et al. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2000 Jun;55(6):459-62.
110. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005 Oct 6;353(14):1443-53.
111. Hubeau C, Le Naour R, Abely M, Hinrasky J, Guenounou M, Gaillard D, et al. Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar;135(3):528-34.
112. Zhao MH, Jayne DR, Ardiles LG, Culley F, Hodson ME, Lockwood CM. Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in patients with cystic fibrosis. *Qjm*. 1996 Apr;89(4):259-65.

113. Haubitz M. ANCA-associated vasculitis: diagnosis, clinical characteristics and treatment. *Vasa*. 2007 May;36(2):81-9.
114. Carlsson M, Eriksson L, Erwander I, Wieslander J, Segelmark M. Pseudomonas-induced lung damage in cystic fibrosis correlates to bactericidal-permeability increasing protein (BPI)-autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2003 Nov-Dec;21(6 Suppl 32):S95-100.
115. Schultz H, Hume J, Zhang de S, Gioannini TL, Weiss JP. A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2477-84.
116. Schultz H, Schinke S, Mosler K, Herlyn K, Schuster A, Gross WL. BPI-ANCA of pediatric cystic fibrosis patients can impair BPI-mediated killing of *E. coli* DH5alpha in vitro. *Pediatr Pulmonol*. 2004 Feb;37(2):158-64.
117. Sediva A, Bartunkova J, Kolarova I, Hrusak O, Vavrova V, Macek M, Jr., et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in children with cystic fibrosis. *J Autoimmun*. 1998 Apr;11(2):185-90.
118. Schultz H. From infection to autoimmunity: a new model for induction of ANCA against the bactericidal/permeability increasing protein (BPI). *Autoimmun Rev*. 2007 Mar;6(4):223-7.
119. Hull J, Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax*. 1998; 53:1018-21.
120. Kiewewetter SS, Davis C et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature Genetics*. 1993;5(3):274-8.
121. Accurso FJ, Sontag MK. Seeking modifier genes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 1;167(3):289-90.
122. McAuley DF, Elborn JS. Cystic fibrosis: basic science. *Paediatr Resp Rev*. 2000;1:93- 100.
123. Haston CK, Newbigging S, Corey M, Rozmahel R, Tsui LC. . . ; Nov;13: Ref Type: Abstract. Detection of modifier loci influencing the lung phenotype of cystic fibrosis knockout mice. *Manum Genome*. 2002:605-13.
124. Mahadeva R, Lomas DA. Secondary genetic factors in cystic fibrosis lung disease. *Thorax*. 2000 Jun;55(6):446.
125. Yarden J, Radojkovic D, R V, A V, C dB, C N, et al. Modulating genes in CF and COPD disease. *Pediatr Pulmonol*. 2003;S 25,:P92.
126. Bronsveld I, Mekus F, Bijman Jea. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of deltaF508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest*. 2001;108::1705-15.
127. Mekus F, Laabs U, Veeze H, Tummler B. Genes in the vicinity of CFTR modulate the cystic fibrosis phenotype in highly concordant or discordant F508del homozygous sib pairs. *Hum Genet*. 2003 Jan;112(1):1-11.
128. Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):128-9.
129. Rohlf's EM, Silverman LM. Is the hemochromatosis gene a modifier locus for cystic fibrosis? *Genet Test*. 1998;2:85-8.
130. de Gracia J, Mata F, Alvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005 Jul;60(7):558-63.
131. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15;168(8):918-51.
132. Acton JD, Wilmott RW. Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes. *Paediatr Respir Rev*. 2001 Dec;2(4):332-9.
133. Davies JC, Griesenbach U, Alton E. Modifier genes in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2005 May;39(5):383-91.
134. Salvatore F, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet*. 2002;111:88-95.
135. Sliker MG, Sanders EA, Rijkers GT, Ruven HJ, van der Ent CK. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005 Aug;4 Suppl 2:7-13.
136. Aron Y, Polla B, Bienvenu Tea. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Crit Care Med*. 1999;159::1464-8.
137. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1350-8.
138. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney Int Suppl*. 1995 Jun;49:S19-23.
139. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw*. 1996 Sep;7(3):363-74.
140. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*. 1998 Oct 27;66(8):1014-20.

141. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999 Jan;8(1):93-7.
142. Kelly M, Kolb M, Bonniaud P, Gauldie J. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(1):39-49.
143. El-Gamel A, Awad M, Sim E, Hasleton P, Yonan N, Egan J, et al. Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1998 Apr;13(4):424-30.
144. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, et al. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med.* 1995 Jan;1(1):74-9.
145. Grainger DJ, Metcalfe JC. Transforming growth factor-beta: the key to understanding lipoprotein(a)? *Curr Opin Lipidol.* 1995 Apr;6(2):81-5.
146. De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Bacher K, Vral A, De Neve W, et al. TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jul 15;65(4):1240-8.
147. Ivanovic V, Melman A, Davis-Joseph B, Valcic M, Geliebter J. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. *Nat Med.* 1995 Apr;1(4):282-4.
148. Pierce DF, Jr., Gorska AE, Chytil A, Meise KS, Page DL, Coffey RJ, Jr., et al. Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4254-8.
149. Hume GE, Fowler EV, Lincoln D, Eri R, Templeton D, Florin TH, et al. Angiotensinogen and transforming growth factor beta1: novel genes in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Med Genet.* 2006 Oct;43(10):e51.
150. Matthey DL, Nixon N, Dawes PT, Kerr J. Association of polymorphism in the transforming growth factor {beta}1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Aug;64(8):1190-4.
151. Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek M, Jr, Zemkova D, Vavrova V, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. *J Med Genet.* 2004;41(8):629-33.
152. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros.* 2005 Mar;4(1):7-26.
153. Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, Super M, Webb AK, Schwarz M, et al. End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 1;167(3):384-9.
154. Kilpatrick D. Introduction to mannan-binding lectin. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(4):745-7.
155. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003 Nov;40(7):423-9.
156. Carlsson M, Sjolholm AG, Eriksson L, Thiel S, Jensenius JC, Segelmark M, et al. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. *Clin Exp Immunol.* 2005 Feb;139(2):306-13.
157. Gabolde M G-BM, Feingold J, Besmond C. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study. *BMJ.* 1999;319:1166-7.
158. Buranawuti K, Cheng S, Merlo C, Zeitlin P, Rosenstein BJ, Mogayzel P, et al. Variants of the mannose binding lectin gene modify survival of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2003;S 25:P91.
159. Davies J, Neth O, Alton Eea. Differential binding of mannose-binding lectin to respiratory pathogens in cystic fibrosis. *Lancet.* 2000;355:1885-6.
160. Summerfield J. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. *Biochem Soc Trans.* 2003;31::770-3.
161. Hartl D, Griese M. Surfactant protein D in human lung diseases. *Eur J Clin Invest.* 2006 Jun;36(6):423-35.
162. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jan;5(1):58-68.
163. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:547-78.
164. Madsen J, Kliem A, Tornoe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):5866-70.
165. Crouch E, Rust K, Veile R, Donis-Keller H, Grosso L. Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2976-83.
166. Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:521-54.
167. Shepherd VL. Pulmonary surfactant protein D: a novel link between innate and adaptive immunity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Mar;282(3):L516-7.

168. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):5989-92.
169. Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, 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 Jul 1;171(1):417-25.
170. Augusto LA, Synguelakis M, Espinassous Q, Lepoivre M, Johansson J, Chaby R. Cellular antiendotoxin activities of lung surfactant protein C in lipid vesicles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Aug 1;168(3):335-41.
171. Augusto LA, Synguelakis M, Johansson J, Pedron T, Girard R, Chaby R. Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):61-7.
172. Chaby R, Garcia-Verdugo I, Espinassous Q, Augusto LA. Interactions between LPS and lung surfactant proteins. *J Endotoxin Res.* 2005;11(3):181-5.
173. Postle AD, Mander A, Reid KB, Wang JY, Wright SM, Moustaki M, et al. Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jan;20(1):90-8.
174. Griese M, Essl R, Schmidt R, Rietschel E, Ratjen F, Ballmann M, et al. Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Nov 1;170(9):1000-5.
175. Noah TL, Murphy PC, Alink JJ, Leigh MW, Hull WM, Stahlman MT, et al. Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Sep 15;168(6):685-91.
176. von Bredow C, Wiesener A, Griese M. Proteolysis of surfactant protein D by cystic fibrosis relevant proteases. *Lung.* 2003;181(2):79-88.
177. Alexis NE, Muhlebach MS, Peden DB, Noah TL. Attenuation of host defense function of lung phagocytes in young cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2006 Jan;5(1):17-25.
178. Vandivier RW, Fadok VA, Ogden CA, Hoffmann PR, Brain JD, Accurso FJ, et al. Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways. *Chest.* 2002 Mar;121(3 Suppl):89S.
179. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3978-86.
180. Tino MJ, Wright JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1996 Apr;270(4 Pt 1):L677-88.
181. Bufler P, Schikor D, Schmidt B, Griese M. Cytokine stimulation by *Pseudomonas aeruginosa*--strain variation and modulation by pulmonary surfactant. *Exp Lung Res.* 2004 Apr-May;30(3):163-79.
182. Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggarwal SS, Sarma PU, et al. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun.* 1997 Aug;65(8):3171-9.
183. Krane M, Griese M. Surfactant protein D in serum from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur Respir J.* 2003 Oct;22(4):592-5.
184. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys.* 2001 Jan 15;385(2):231-41.
185. Henderson WR, Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* 1994 Nov 1;121(9):684-97.
186. Ordonez CL, Henig NR, Mayer-Hamblett N, Accurso FJ, Burns JL, Chmiel JF, et al. Inflammatory and microbiologic markers in induced sputum after intravenous antibiotics in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Dec 15;168(12):1471-5.
187. Reinhardt N, Chen CI, Loppow D, Schink T, Kleinau I, Jorres RA, et al. Cellular profiles of induced sputum in children with stable cystic fibrosis: comparison with BAL. *Eur Respir J.* 2003 Sep;22(3):497-502.
188. Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Feb;30(2):173-8.
189. Sagel SD, Accurso FJ. Monitoring inflammation in CF. *Cytokines.* *Clin Rev Allergy Immunol.* 2002 Aug;23(1):41-57.
190. Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, Kapsner RK, Osberg I, Accurso FJ. Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2002 Dec;141(6):811-7.
191. Ding YL, Yao WZ, Liu Z, Wang YZ. [Changes of leukotriene B4 in induced sputum and plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease and the effects of theophylline]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2005 Jul;28(7):441-4.
192. Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Apr 15;167(8):1109-12.

193. Calder PC. omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet.* 2001;88:109-16.
194. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids.* 2001 Sep;36(9):1007-24.
195. Freedman SD BP, Zaman MM et al. . Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med.* 2004;350: 560-9.
196. Freedman SD SJ, Blanco PG, Alvarez JG. Fatty acids in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2000;6: .530-2.
197. De Vizia B, Raia V, Spano C, Pavlidis C, Coruzzo A, Alessio M. Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. *JPEN J Parenter Enter Nutr.* 2003 Jan-Feb;27(1):52-7.
198. Panchaud A, Sauty A, Kernen Y, Decosterd LA, Buclin T, Boulat O, et al. Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial. *Clin Nutr.* 2006 Jun;25(3):418-27.
199. Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, Corradi M, Folesani G, Baraldi E, et al. Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections. *Pediatr Pulmonol.* 2005 Dec;40(6):494-9.
200. Saas P, Tiberghien P. Dendritic cells: to where do they lead? *Transplantation.* 2002 Jan 15;73(1 Suppl):S12-5.
201. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996 Sep 27;196(2):137-51.
202. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;311:1-16.
203. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans.* 2000 Oct;28(5):563-6.
204. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK, Mantovani A. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2000 Apr;67(4):450-6.
205. Ellingsen E, Morath S, Flo T, Schromm A, Hartung T, Thiemermann C, et al. Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med Sci Monit.* 2002 May;8(5):BR149-56.
206. Backhed F, Meijer L, Normark S, Richter-Dahlfors A. TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cell Microbiol.* 2002 Aug;4(8):493-501.
207. Beutler B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;270:109-20.
208. Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem.* 2001 Aug;268(16):4580-9.
209. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001 Jul;13(7):933-40.
210. Heit A, Maurer T, Hochrein H, Bauer S, Huster KM, Busch DH, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):2802-5.
211. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr.* 2007 Feb;19(1):83-8.
212. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007;67(3):351-68.
213. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, et al. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science.* 1996;271(5245):64-7.
214. Schindler J. Mikrobiální biofilm. *Vesmir.* 2001;80(4):203-6.
215. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 1996;60(3):539-74.
216. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect.* 2003;46(4):207-14.
217. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* 2003;71(10):5785-93.
218. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1460-5.
219. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1322-8.
220. Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int J Med Microbiol.* 2000 Oct;290(4-5):381-7.

221. Jia J, Wang Y, Zhou L, Jin S. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6557-70.
222. Yahr TL, Goranson J, Frank DW. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol*. 1996 Dec;22(5):991-1003.
223. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Nov;4(11):811-25.
224. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005 Aug;4 Suppl 2:37-43.
225. Drevinek P, Hrbackova H, Cinek O, Bartosova J, Nyc O, Nemecek A, et al. Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3485-8.
226. Hallin M, Maes N, Byl B, Jacobs F, De Gheldre Y, Struelens MJ. Clinical impact of a PCR assay for identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3942-4.
227. Karpati F, Jonasson J. Polymerase chain reaction for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. *Mol Cell Probes*. 1996;10(6):397-403.
228. O'Callaghan EM, Tanner MS, Boulnois GJ. Development of a PCR probe test for identifying *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia*. *J Clin Pathol*. 1994;47(3):222-6.
229. Vosahlikova S, Drevinek P, Cinek O, Pohunek P, Maixnerova M, Urbaskova P, et al. High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic. *Res Microbiol*. 2007 May;158(4):324-9.
230. Pohunek P, ZD, Brázová J., Vošáhlíková Š., Vávrová V. . Infekce bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* u nemocných cystickou fibrózou. Možnosti diagnostiky a klinické výstupy tříleté studie. *Čes-slov Pediatr*. 2007;62(9):527-33.
231. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):2074-9.
232. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4312-7.
233. Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Homef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):818-25.
234. Hoiby N, Hertz JB. Quantitative studies on immunologically specific and non-specific absorption of *Pseudomonas aeruginosa* antibodies in serum from cystic fibrosis patients. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]*. 1981 Jun;89(3):185-92.
235. Chiappini E, Taccetti G, Campana S, Turchini S, Marianelli L. [Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibodies, circulating immune complexes, and anticytoplasm antibodies of neutrophils in patients with cystic fibrosis with and without *Pseudomonas aeruginosa* colonization]. *Pediatr Med Chir*. 2001 Jan-Feb;23(1):27-30.
236. Pardo E, Iapichino L, Collura M, Furnari ML, Termini L, Cascio A, et al. [Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibodies and lung disease in cystic fibrosis]. *Infez Med*. 2000;8(2):87-91.
237. Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Döring G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2007 Mar;42(3):249-55.
238. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol*. 2003;5(9):719-29.
239. Jones AM, Webb AK. Recent advances in cross-infection in cystic fibrosis: *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA and *Pandora* spp. *J R Soc Med*. 2003;96 Suppl 43:66-72.
240. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol*. 1992;36(12):1251-75.
241. Jones AM, Dodd ME, Webb AK. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *Eur Respir J*. 2001;17(2):295-301.
242. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 2002;51(7):533-8.
243. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Feb;3(2):144-56.
244. Vandamme P. Polyphasic Taxonomy in Practice: the *Burkholderia cepacia* Challenge. *WFCC Newsletter*. 2002;34:17-24.



245. Epelman S, Stack D, Bell C, Wong E, Neely GG, Krutzik S, et al. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):2031-40.
246. Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):650-4.
247. Hooi DS, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Pritchard DI. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6463-70.
248. Kikuchi T, Crystal RG. Antigen-pulsed dendritic cells expressing macrophage-derived chemokine elicit Th2 responses and promote specific humoral immunity. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(6):917-27.
249. Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2002 Aug;14(4):420-31.
250. Rimoldi M, Chieppa M, Larghi P, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2818-26.
251. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Ernst RK, Miller SI, Wilson CB. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jul;287(1):L143-52.
252. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 1;172(5):530-51.
253. von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA, Strickland DH, et al. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1609-18.
254. Stick SM, Holt PG. The airway epithelium as immune modulator: the LARC ascending. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jun;28(6):641-4.
255. Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, et al. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol*. 2005 Feb 1;174(3):1638-46.
256. Marcet B, Horckmans M, Libert F, Hassid S, Boeynaems JM, Communi D. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J Cell Physiol*. 2007 Jun;211(3):716-27.
257. Rajan S, Cacalano G, Bryan R, Ratner AJ, Sontich CU, van Heerckeren A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Sep;23(3):304-12.
258. Reiniger N, Ichikawa JK, Pier GB. Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection of human bronchial epithelial cells. *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):6822-30.
259. Thorley AJ, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ )-induced dendritic cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Apr;32(4):262-7.
260. Wu Q, Lu Z, Verghese MW, Randell SH. Airway epithelial cell tolerance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Res*. 2005;6:26.
261. Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A, Sommer CW, Liechti-Gallati S, Kraemer R, et al. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Jul;150(1):207-13.
262. Knight RA, Kollnberger S, Madden B, Yacoub M, Hodson ME. Defective antigen presentation by lavage cells from terminal patients with cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 1997 Mar;107(3):542-7.
263. Roghaniau A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 1;174(11):1189-98.
264. Roghaniau A, Williams SE, Sheldrake TA, Brown TI, Oberheim K, Xing Z, et al. The antimicrobial/elastase inhibitor elafin regulates lung dendritic cells and adaptive immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 May;34(5):634-42.
265. Vogelmeier C, Gillissen A, Buhl R. Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil elastase activity. *Chest*. 1996 Dec;110(6 Suppl):261S-6S.
266. Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Thurnher M. A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD83+ immunostimulatory dendritic cells. *Immunol Lett*. 2001 Feb 1;76(1):63-7.
267. Boccaccio C, Jacod S, Kaiser A, Boyer A, Abastado JP, Nardin A. Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells. *J Immunother (1997)*. 2002 Jan-Feb;25(1):88-96.

268. de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, et al. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol*. 2002 Feb 15;168(4):1704-9.
269. Smits HH, van Beelen AJ, Hessele C, Westland R, de Jong E, Soeteman E, et al. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol*. 2004 May;34(5):1371-80.
270. Kikuchi T, Kobayashi T, Gomi K, Suzuki T, Tokue Y, Watanabe A, et al. Dendritic cells pulsed with live and dead *Legionella pneumophila* elicit distinct immune responses. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1727-34.
271. Muraille E, Giannino R, Guirnalda P, Leiner I, Jung S, Pamer EG, et al. Distinct in vivo dendritic cell activation by live versus killed *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1463-71.
272. Rey-Ladino J, Koochesfahani KM, Zaharik ML, Shen C, Brunham RC. A live and inactivated *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain induces the maturation of dendritic cells that are phenotypically and immunologically distinct. *Infect Immun*. 2005 Mar;73(3):1568-77.
273. Skinner JA, Reissinger A, Shen H, Yuk MH. Bordetella type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1934-40.
274. Zhan Y, Cheers C. Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J Immunol*. 1998 Aug 1;161(3):1447-53.
275. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest*. 2003 Sep;124(3):1103-15.
276. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.
277. Schwartz DA. TLR4 and LPS hyporesponsiveness in humans. *Int J Hyg Environ Health*. 2002 Apr;205(3):221-7.
278. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, et al. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jun;30(6):777-83.
279. Joseph T, Look D, Ferkol T. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Mar;288(3):L471-9.
280. Pfeffer KD, Huecksteadt TP, Hoidal JR. Expression and regulation of tumor necrosis factor in macrophages from cystic fibrosis patients. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993 Nov;9(5):511-9.
281. Zaman MM, Gelrud A, Junaidi O, Regan MM, Warny M, Shea JC, et al. Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Sep;11(5):819-24.
282. DiMango F, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. 1998 Jun 1;101(11):2598-605.
283. Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral immune response. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol*. 1974 Aug;82(4):551-8.
284. Farrell PM, Govan JR. *Pseudomonas* serology: confusion, controversy, and challenges. *Thorax*. 2006 Aug;61(8):645-7.
285. Johansen HK, Norregaard L, Gotzsche PC, Pressler T, Koch C, Hoiby N. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: a marker of therapeutic success?--A 30-year cohort study of survival in Danish CF patients after onset of chronic *P. aeruginosa* lung infection. *Pediatr Pulmonol*. 2004 May;37(5):427-32.
286. Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*. 2006 Aug;61(8):684-8.
287. Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Hoiby N. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of *pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. *J Cyst Fibros*. 2006 Jan;5(1):9-15.
288. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SW, Teding van Berkhout F, Kimpfen JL, et al. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax*. 2006 Aug;61(8):689-93.
289. Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2003 Nov;9(6):492-7.
290. Nelson JD, Norden C, Mader JT, Calandra GB. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of acute suppurative arthritis in children. *Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration*. *Clin Infect Dis*. 1992 Nov;15 Suppl 1:S172-6.

291. Journet L, Hughes KT, Cornelis GR. Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review). *Mol Membr Biol*. 2005 Jan-Apr;22(1-2):41-50.
292. Abe A, Matsuzawa T, Kuwae A. Type-III effectors: sophisticated bacterial virulence factors. *C R Biol*. 2005 May;328(5):413-28.
293. Ader F, Le Berre R, Faure K, Gosset P, Epaulard O, Toussaint B, et al. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):4263-71.

## 9 Publikace autorky

### A. Publikace v zahraničí (IF > 1)

1. **Brazova J.**, Sismova K., Vavrova V., Bartosova J., Macek M. Jr., Lauschmann H., Sediva A.: Polymorphisms of TGF-beta 1 in Cystic Fibrosis Patients. *Clin Immunol.* 2006 Dec;121(3):350-7. IF 3.60
2. **Brazova J.**, Sediva A., Pospisilova D., Vavrova V., Pohunek P., Macek M. Jr., Bartunkova J., Lauschman H.: Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. *Clin Immunol.* 2005 May;115(2):210-5. IF 3.22
3. Jaresova I., Rozkova D., Spisek R., Janda A., **Brazova J.**, Sediva A.: Kinetics of Toll-like receptor 4 splice variants expression in LPS-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis. *Microbes and Infection*, 2007 Sep;9(11):1359-67. IF 3.12
4. Spisek R., **Brazova J.**, Rozkova D., Zapletalova K. Sediva A., Bartunkova J.: Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine.* 2004;22(21-22):2761-8. IF 2.82

### B. Publikace v České Republice

1. **Brázová J.**, Šedivá A.: Imunitní systém u pacientů s cystickou fibrózou. Je vše v normě? *Čs.pediatric*, 2006;61(4):213-20.
2. **Brázová J.**: Genetické modifikátory v patogenezi CF. Zánět. Očkování, vakcinace, imunizace u pacientů s CF. Léčení zánětu. Monografie: Věra Vávrová a kol. Cystická fibróza. Grada 2005. 49-63, 147-155, 247, 269-273; ISBN 80-247-0531-1.
3. Pohunek P., Zemková D., **Brázová J.**, Vošáhlíková Š., Vávrová V.: Infekce bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* u nemocných cystickou fibrózou. Možnosti diagnostiky a klinické výstupy tříleté studie. *Čs.pediatric*, 2007; 62(9):527-33.
4. Špišek R., **Brázová J.**, Rožková D., Zapletalová K., Šedivá A., Bartůňková J.: Vliv klinicky užívaných imunomodulancí na maturaci dendritických buněk. *Alergie*,2004;6(1):11-16.

**Problematika dosud nepublikovaných výsledků postgraduálního studia uvedených v této dizertační práci se stala též předmětem následujících odborných sdělení a textů:**

#### **Manózu vážící lektin:**

- Sediva A., **Brazova J.**, Sismova K., Freiburger T., Cinek O., Bartosova J.: Polymorphisms of MBL gene in cystic fibrosis patients. 19. Annual North American Cystic Fibrosis Conference. Baltimore, Maryland, USA, říjen 20-23, 2005. Abstrakta v *Pediatr Pulmonol Suppl. 2005;28:S253, p187.*
- **Brázová J.:** Polymorfizmus MBL u pacientů s cystickou fibrózou. *Prezentace* na 22. PIK, Rožnov Pod Radhoštěm, 12.6.2005

#### **Surfaktant protein D:**

- **Brazova, J.**, Pohunek, P., Sediva, A.: Surfactant protein D in BAL of children with CF. 29th European Cystic Fibrosis Conference, 15.-18. červen 2006, Kodaň, Dánsko. *Journal of Cystic Fibrosis, Supp. 1,2006;5:82,S38-167.*
- **Brázová J.**, Pohunek P., Šedivá A.: Surfaktant protein D v BAL pacientů s cystickou fibrózou. XXIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Hradec Králové 25.-28.10. 2006. *Vybraná prezentace.* Abstrakta v *Alergie*, 2006:6(1).

#### **Leukotrien B4:**

- Fila L., **Brazova J.**, Musil J.: Supplementation with n-3 PUFA in CF patients: analysis of exhaled breath condensate. 30th European Cystic Fibrosis Conference, 15.-18. červen 2007, Belek, Turecko. *Journal of Cystic Fibrosis, Supp. 1,2007.*

#### **Úloha protilátek proti *P. aeruginosa* u CF:**

- **Brazova J.**, Zemkova D., Vosahlikova S., Nyc O., Pohunek P., Vavrova V.: *Pseudomonas aeruginosa* infection: utility of microbiological, PCR-based and serological techniques. 30th European Cystic Fibrosis Conference, 15.-18. červen 2007, Belek, Turecko. *Journal of Cystic Fibrosis, Supp. 1,2007.*
- Bartošová J., Zemková D., **Brázová J.**, Bohmová K., Vosahliková S., Skalická V. et al.: Diagnosis of *P. aeruginosa* infection using microbial, molecular biology and serology techniques. 29th European Cystic Fibrosis Conference, 15.-18. červen 2006, Kodaň, Dánsko. *Journal of Cystic Fibrosis, Supp. 1,2006;5:82,S16.*
- Vávrová V., Bartošová J., Fila L., Zemková D., Skalická V., **Brázová J.** et al.: Clinical features of *P. aeruginosa* (*Pa*) negative patients with the history of *Pa* infection. 29th European Cystic Fibrosis Conference, 15.-18. červen 2006, Kodaň, Dánsko. *Journal of Cystic Fibrosis, Supp. 1,2006;5:82,S34.*

- **Brazova J.**, Skalicka A., Sediva A.: Antibodies against *P. aeruginosa* in CF children - diagnostic value. 28th European Cystic Fibrosis Conference, červen 2005, Kréta, Řecko. *Journal of Cystic Fibrosis, Suppl. 1, 2005;3:52,S20-25.*

#### Studium interakce dendritických buněk s infekcí u CF:

- Šedivá A., **Brázová J.**, Matějková J., Fila L.: The influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the maturation state of dendritic cells in cystic fibrosis (CF) patients. 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazílie, srpen 21-25, 2007
- **Brázová J.**, Matějková J., Šedivá A.: The role of dendritic cells in pathogenesis of respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. 7th EFIS Tatra Immunology conference, červen 24.-28., 2006, Štrbské Pleso, Slovensko.
- **Brazova J.**, Matejkova J., Sediva A.: The role of mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa* on maturation state of dendritic cells in cystic fibrosis patients. 19. Annual North American Cystic Fibrosis Conference. Baltimore, Maryland, USA, říjen 20-23, 2005. Abstrakta v *Pediatr Pulmonol Suppl. 2005;28:S240, p150.*
- **Brazova J.**, Spisek R., Sediva A.: The role of dendritic cells in pathogenesis of respiratory infection in cystic fibrosis patients. 18. Annual North American Cystic Fibrosis Conference. St. Louis, Missouri, USA, říjen 14-17, 2004. Abstrakta v *Pediatr Pulmonol Suppl. 2004;27:92-388.*
- **Brazova J.**, Spisek R.: The role of dendritic cells in pathogenesis of respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Prezentace* na 2nd joint Workshop "Translational experiences in tumour immunotherapy" 28.4.2004
- **Brázová J.**, Špíšek R.: Role dendritických buněk v patogenezi respiračních onemocnění u pacientů s cystickou fibrozou. *Prezentace* na Studentská vědecká konference, Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, 30.4.2004.
- **Brázová J.:** Dendritické buňky na rozhraní přirozené a specifické imunity. *Přednáška* na 3. LF UK. Centrum biomedicínských oborů, Vinohrady. 8.12.2004.

# Přílohy

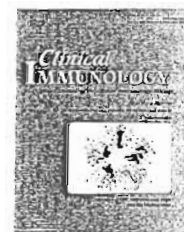
Publikace autorky s IF > 1 v následujícím pořadí:

**Brazova J.**, Sismova K., Vavrova V., Bartosova J., Macek M. Jr., Lauschmann H., Sediva A.: Polymorphisms of TGF-beta 1 in Cystic Fibrosis Patients. *Clin Immunol.* 2006 Dec;121(3):350-7. (IF 3.60)

**Brazova J.**, Sediva A., Pospisilova D., Vavrova V., Pohunek P., Macek M. Jr., Bartunkova J., Lauschman H.: Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. *Clin Immunol.* 2005 May;115(2):210-5. (IF 3.22)

Jaresova I., Rozkova D., Spisek R., Janda A., **Brazova J.**, Sediva A.: Kinetics of Toll-like receptor 4 splice variants expression in LPS-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis. *Microbes and Infection*, 2007 Sep;9(11):1359-67. (IF 3.12)

Spisek R., **Brazova J.**, Rozkova D., Zapletalova K. Sediva A., Bartunkova J.: Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine.* 2004;22(21-22):2761-8. (IF 2.82)



## Polymorphisms of TGF-beta1 in cystic fibrosis patients

Jitka Brazova<sup>a,\*</sup>, Kristyna Sismova<sup>a</sup>, Vera Vavrova<sup>b</sup>, Jana Bartosova<sup>b</sup>,  
Milan Macek Jr.<sup>c</sup>, Hynek Lauschman<sup>d</sup>, Anna Sediva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology, University Hospital Motol, Charles University, Prague, V Uvalu 84, 150 06, Prague 5, Czech Republic

<sup>b</sup> Paediatric Department, University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic

Received 1 May 2006; accepted with revision 29 August 2006

Available online 18 October 2006

### KEYWORDS

Cystic fibrosis (CF);  
Cytokines;  
Transforming growth  
factor beta1 (TGF-beta1);  
Polymorphism

**Abstract** There is a significant phenotypic variance among cystic fibrosis (CF) patients. Due to the role of TGF-beta1 in fibrotic processes we investigated its role in CF pathogenesis. *TGF-beta1* codons 10 and 25 were genotyped in 118 Czech CF patients and 268 controls by PCR-ARMS. Difference between CF and controls was found at codon 10, lower frequency of T/T homozygotes, and codon 25, higher frequency of G/C heterozygotes. We did not prove the association of *TGF-beta1* polymorphisms and lung function in CF, however, the TT (codon 10)/GG (codon 25) genotype was preferentially associated with CF-related liver disease and diabetes. Independent of the *TGF-beta1* genotype, production of cytokine was higher in patients than in controls with the notable exception of very low levels in *Burkholderia cepacia* complex colonized patients. In CF, both extremes, highest or lowest TGF-beta 1 production, were associated with impaired lung function. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive inherited disease and also one of the most thoroughly studied monogenic disorders since the identification of the causal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene in mid-1989 [1,2].

The forms of CF differ with respect to the severity of lung and pancreatic involvement, including other clinical signs of CF such as male infertility and others [3]. CF lung disease associated with chronic pulmonary infection is the major life-quality affecting and eventually life-shortening factor [2].

Even with the growing knowledge about both the *CFTR* genotypes and the pathogenesis of the disease phenotype, it becomes increasingly apparent that there are no unambiguous genotype-phenotype correlations [4]. There is only about 60% [5,6] phenotypic correlation with the *CFTR* mutation severity with regards to the sino-pulmonary disease. Besides the possible influence of the environment, the effect of secondary genetic factors (CF modifiers) is strongly suggested and these have been subjected to extensive research [4,7–14].

Among candidate gene modifiers [15,16] we decided to investigate the *TGF-beta1*, a cytokine with possible pathogenic role in CF due to its overall "positive effect" on the general process of tissue fibrosis [17,18].

TGF-beta1 is a multifunctional cytokine that regulates proliferation and differentiation of a wide spectrum of cells

\* Corresponding author. Fax: +420 224 435 962.

E-mail address: [jitka.brazova@centrum.cz](mailto:jitka.brazova@centrum.cz) (J. Brazova).



both *in vivo* and *in vitro* [19]. TGF- $\beta$ 1 influences cell growth, differentiation, apoptosis, cell migration, immune cell function and extracellular matrix production [20,21]. TGF- $\beta$ 1 production varies from person to person and is partly dependent on *TGF- $\beta$ 1* gene polymorphisms at different positions [22,23]. Pathological dysregulation of TGF- $\beta$ 1 pathway was described to modulate the development of several disease groups, including cancer [24-27], atherosclerosis [28,29], autoimmune [30] and also fibrotic disease [18,23,31,32]. TGF- $\beta$ 1 plays a central role in fibrosis, contributing to the influx and activation of inflammatory cells, the epithelial to mesenchymal transdifferentiation of cells and the influx of fibroblasts and their subsequent elaboration of extracellular matrix. Thus far, there have been only a few reports about the role of TGF- $\beta$ 1 in CF lung disease with contradictory results [33-35].

Drumm et al. recently reported correlation between *TGF- $\beta$ 1* gene polymorphisms, particularly the -509 (T/T genotype) and +869, codon 10 (C/C genotype) with more severe CF lung disease [35]. On the other hand, the same alleles were reported as protective against obstructive pulmonary disease (COPD) induced by smoking [36,37].

Arkwright et al. [33] previously reported the correlation between *TGF- $\beta$ 1* gene polymorphism in the signal sequence at codon 10 and +915 (codon 25) and production of this cytokine in CF patients. In CF patients with *TGF- $\beta$ 1*, codon 10 high producer genotype (T/T genotype in contrast to Drumm et al.) lung functions deteriorated more rapidly. The biallelic polymorphism, either T or C in the DNA sequence at position +869, changes the amino acid at codon 10 from proline to leucine. Similarly, at position +915 either G or C results in the amino acid at codon 25 being either arginine or proline. Both polymorphisms encoding proline ("T/G") were associated with lower TGF- $\beta$ 1 synthesis both *in vivo* and *in vitro* [22].

TGF- $\beta$ 1 thus represents a crucial factor for the development of fibrotic changes in CF.

Based on the knowledge of basic properties of TGF- $\beta$ 1, we aimed to investigate the influence of the cytokine gene polymorphisms and the capability of TGF- $\beta$ 1 production in a well-characterized cohort of CF patients. The potential association of *TGF- $\beta$ 1* genotype and/or phenotype with the status of CF lung and gastrointestinal disease were the primary targets of the study. Particular attention was paid to the TGF- $\beta$ 1 influence on the occurrence and severity of infectious complications in CF.

## Patients, materials and methods

### Patients

One hundred and eighteen Czech CF patients (aged 1 to 35 years; mean 12.7 years, SD 6.3) and 268 control subjects (aged 1 to 30 years; mean 12.2 years, SD 10.3) were studied. All included CF patients have been regularly and longitudinally followed at the National Cystic Fibrosis Center-University Hospital Motol in Prague. The diagnosis of CF was established by typical clinical and laboratory features, increased sweat chloride concentrations over 60 mmol/l and detection of CF-causing mutations in the *CFTR* gene. *CFTR* gene genotype was determined in all patients using a combination of standard molecular genetic techniques. The

most common, F508del, mutation was detected by PCR and subsequent non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Other relatively common CF mutations were detected using allele-specific oligonucleotide hybridization, amplification refractory mutation detection system, PCR-mediated site-directed mutagenesis and standard restriction digestion techniques, including the CF-16 Research Prototype Assay (Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA).

F508del homozygotes (48%), F508del compound heterozygotes (41%) and patients with so called severe *CFTR* mutations (classes I-III) were included in this study [10].

Patients were included in the study at a consecutive manner based on their diagnosis of CF and otherwise generally stable health status at the time of examination. Only clinically stable cases with no apparent exacerbation at the time of examination were included in this study. No patient received systemic corticosteroids and/or any form of immunosuppressive therapy at the time of the study.

The control group consisted of apparently healthy people, mostly laboratory staff and healthy subjects who underwent small surgery interventions and/or visited Paediatric wards of the University Hospital Motol with minor acute injuries. This cohort is representative for the entire Czech population.

All CF children parents, CF adults and healthy controls participating in the study were informed in details about the study and informed consents were signed prior to the involvement in the protocol by cases and/or their fiduciaries.

### Patients' clinical status (lung function, bacterial colonization, smoking history, nutritional status, pancreatic sufficiency, CFRD, CF-related hepatopathy, cirrhosis etc.)

Pulmonary function tests were performed using the Pneumoscop (Ganshorn, Germany) apparatus in patients older than 5 years of age employing flow-volume loop analysis. The lung function was studied by measuring forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>), expiratory flows at 25%, 50% and 75% of vital capacity (MEF<sub>25</sub>, MEF<sub>50</sub>, and MEF<sub>75</sub>) and peak expiratory flow (PEF). All measured values were expressed as a percentage of predicted values. For the purpose of this study only FEV<sub>1</sub> and MEF<sub>50</sub> parameters were evaluated.

Chronic infection with *P. aeruginosa* was considered positive in patients who had three consecutive microbiological samples with positive results (spontaneously expectorated sputum, saline solution induced sputum, throat cultures or bronchoscopy samples) within 1 year. If sputum was available, the chronic *P. aeruginosa* colonization was confirmed by species-specific PCR. Furthermore the *P. aeruginosa* infection was followed according to the titer of anti-*Pseudomonas* antibodies using serological methods (EIA, Mediagnost, Germany).

*Burkholderia cepacia* complex colonization was considered positive in patients who had positive microbiological samples and positive PCR. *B. cepacia* genomovars were identified using a set of genomovar-specific PCR reactions [38].

None of CF patients were active smokers at the time of this study (self-reported, using questionnaire). Twenty of them notified us about the history of smoking. Control subjects indicated that they had never smoked (for more detailed patient data see Table 1).

Table 1 CF patients and healthy controls characteristics

	This study	Arkwright et. al.	Drumm et. al.	
<i>CF patients (number)</i>	118	171	498 <sup>a</sup>	252
Mean age	12.7 (1-35)	23 (6-54)	20.8±8.1	22.3±7.8
Sex (F/M%)	45/55	55/45	52/48	43/57
<i>CFTR</i> mutations	All severe (classes I-III) 48% F508del homozygotes	All F508del homozygotes	Various <i>CFTR</i> 70.5% F508del homozygotes	
Mean FEV <sub>1</sub> (%predicted)			<68%	≥68%
All: FEV <sub>1</sub> (mean (SD))	82 (22)			
<i>Under 18 years:</i>				
FEV <sub>1</sub> (mean (SD))	86 (18)	50% (less than 50%)		
Over 18 years (mean (SD))	67 (28)			
Chronic colonization				
<i>P. aeruginosa</i>	44	-	Included	
<i>B. cepacia</i> complex	12	-	0	
No colonization	44	12	Included	
PI (%)	92	-	Included	
CFRD (%)	4	15	Included	
Insulinopenia (%)	11	-		
CFRLD (%)	35	-		
Cirrhosis (%)	5	15		
Osteoporosis (%)	2	-		
Smoking history (Number)	0	-		
<i>Healthy controls (number)</i>	268	107		
Mean age	12.2 (1-30)			

Comparison between our study, Arkwright's et. al. and Drumm's et. al. work.

<sup>a</sup> Two studies included. First: in 808 F508del homozygotes patients with severe (263 patients) or mild disease (545) 16 polymorphisms in 10 genes previously reported as CF modifiers were tested for any association. Second study which followed: 498 CF patients with various *CFTR* genotypes were tested for an association of *TGF-beta1* codon 10 CC genotype with low FEV<sub>1</sub>. The FEV<sub>1</sub> criteria were settled as 68% of FEV<sub>1</sub> predicted which divide the patients into two groups.

## TGF-beta1 analysis

All blood samples for gene polymorphism studies and cytokine production were collected in CF patients in stable state of the disease without acute exacerbations and with normal inflammatory markers (C-reactive protein, leukocytes count).

## TGF-beta1 gene polymorphism studies

Frozen DNA samples from whole blood of all CF patients and controls were obtained through phenol extraction and ethanol precipitation following proteinase K digestion. *TGF-beta1* genotypes at codons 10 (position +869) and 25 (position +915) were determined in 118 CF patients and 268 controls by amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (PCR-ARMS), as described elsewhere [39,40].

## TGF-beta1 production

In 100 CF patients and 30 controls total levels of investigated cytokine (ng/ml) were measured by specific ELISA (Bender Medsystem, Germany) according to the manufacturer's instructions in supernatants of whole blood diluted (1 in

10) in ex vivo 10 medium cell culture simultaneously stimulated by 50 µl of lipopolysaccharide (LPS) in a concentration of 25 µg/ml (*E. coli*, Sigma, Prague, Czech Republic) and 50 µl 5 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) (Wellcome Diagnostics™, UK)<sup>1</sup>. Supernatants were collected after 48 h and frozen until examination in cytokine assay. The results were calculated by reference to a standard curve and expressed as nanogram per milliliter.

## Statistical analysis

The results were summarized in a database and analyzed by multifactor non-linear correlation analysis. Comparison of *TGF-beta1* gene polymorphisms distribution between CF patients and healthy controls was made by the standard Chi-square test. Student's one-sided *t*-test was used for genotype-phenotype correlation studies. Two tailed *p* values <0.05 were considered as significant for all statistical tests.

<sup>1</sup> Production of TGF-beta1 in unstimulated (without LPS and PMA) blood supernatants was under the ELISA detection limits.

## Results

### TGF- $\beta$ 1 polymorphism frequencies in the Czech Republic

CF patients showed similar pattern of polymorphisms as healthy controls, with the exception of lower frequency of T/T homozygotes at position +869, codon 10 (CF 29%, controls 42%,  $p < 0.02$ , 95% CI 0.35-0.89, OR 0.56) and higher frequency of G/C heterozygotes at position +915, codon 25 (CF 16%, controls 8%,  $p < 0.03$ , 95% CI 1.11-4.14, OR 2.15) (see Tables 2 and 3).

### TGF- $\beta$ 1 production

Range of TGF- $\beta$ 1 production (ng/ml) was rather wide in controls (mean=15, SD=6) and appeared even broader in CF patients (mean=26, SD=20). Independently of the TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism, production of TGF- $\beta$ 1 was higher in CF patients than in healthy controls (being statistically significant with  $p < 0.025$ ).

Naturally, higher production of TGF- $\beta$ 1 was more often found in patients chronically colonized with *P. aeruginosa*, impaired lung function and a worse nutrition status. On the other hand, the lowest TGF- $\beta$ 1 production was found in patients colonized with bacteria from *B. cepacia* complex ( $p < 0.0015$ ), in particular *B. cenocepacia* (formerly genomovar III of the *B. cepacia* complex). This phenomenon was also valid for the subset of F508del homozygous CF patients (see Graph 1). Due to the lack of immunosuppressive therapy lower production of TGF- $\beta$ 1 could not be related to non-genetic factors.

### TGF- $\beta$ 1 genotype—Phenotype correlation

We did not find correlation between TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism and production of this cytokine within our cohort. None of the tested polymorphisms was associated with impaired TGF- $\beta$ 1 production (see Fig. 1). There was no correlation between particular TGF- $\beta$ 1 genotype and survival in age stratified CF patients. Neither gender nor age affects TGF- $\beta$ 1 production in CF patients (data not shown). No correlations were identified between TGF- $\beta$ 1 production and any other environmental parameters.

TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism was not associated with any type of bacterial colonization typical for CF patients.

Half of CF patients with TT/GG genotype (TT polymorphism, codon 10 and GG, codon 25) of TGF- $\beta$ 1 presented

Table 2 Frequencies of TGF- $\beta$ 1 polymorphism at codon 10 (position +869)

Codon	CF %	Controls %	OR	CI	95%	P value
<i>Genotypic frequencies</i>						
C/C	24	20	41	15	1.41	0.81 2.47 0.28
C/T	60	51	114	43	1.40	0.90 2.16 0.16
T/T	34	29	113	42	0.56	0.35 0.89 0.02
Total	118		268			

Table 3 Frequencies of TGF- $\beta$ 1 polymorphism at codon 25 (position +915)

Codon	CF %	Controls %	OR	CI	95%	P value
<i>Genotypic frequencies</i>						
C/C	0	0	4	1	0.45	0.05 3.85 0.76
C/G	19	16	22	8	2.15	1.11 4.14 0.03
G/G	99	84	242	90	0.56	0.30 1.06 0.10
Total	118		268			

with CF-related liver disease (CFLD) [41] compared to other genotypes where less than third of CF patients had CFLD. Likewise CF-related diabetes (CFRD) [42] was observed more in patients with TT/GG genotype (see Table 4).

Number of patients under the age of ten was comparable within the TT/GG subgroup of patients and with the remainder of the CF population with non-TT/GG TGF- $\beta$ 1 genotype. The risk of CFRD development was similar in both groups (in both instances data not shown).

CF patients chronically colonized with *P. aeruginosa* or bacteria from *B. cepacia* complex presented with worse lung dysfunction (FEV<sub>1</sub>: mean=60%, SD=25) than CF patients without any chronic colonization (mean=83%, SD=25) independently of the TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism.

## Discussion

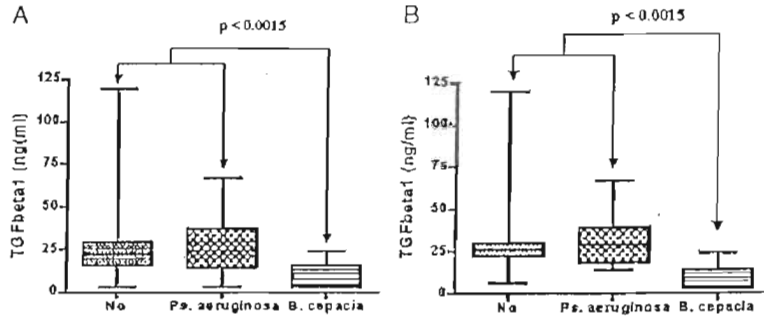
CF is a chronic, progressive, multisystemic disease with a known genetic etiology, but not entirely elucidated complex pathogenesis. In essence gradual progress of CF eventually leads to the development of tissue fibrosis in affected organs. The dominant role of fibrosis in CF is reflected also in its name derived from typical obstructive fibrotic findings in the CF pancreas [43]. TGF- $\beta$ 1 is a multifunctional regulatory cytokine with crucial role in fibrotic processes. Therefore, it is noteworthy that only few studies about the potential role of TGF- $\beta$ 1 in CF have been published so far [13,33,34]. In our study, we focused on the possible role of TGF- $\beta$ 1 as a modifier gene in a well-defined cohort of CF patients and on the potential association of TGF- $\beta$ 1 production capacity on the clinical outcome of Czech CF patients.

Intriguingly, we found different distribution of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms at codon 10 and 25 in CF patients and healthy Czech controls. This observation is novel and difficult to causally explain at this stage. It could be due to lower number of studied cases and/or controls and to a population-specific bias.

However, this result tempted us to suggest prenatal selection of alternating TGF- $\beta$ 1 alleles at the respective variant site due to their likely involvement in the documented prenatal onset of inflammation in CF [44]. Thus, further studies are needed to address this phenomenon.

### Lung disease

We were unable to find an association of particular TGF- $\beta$ 1 polymorphisms with the status of CF lung disease. We also did not confirm clear association between TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism at codon 10 and lung function



Graph 1 TGF-beta1 production and bacterial colonization in all CF patients (part A) and in F508del homozygotes subset (part B). The lowest TGF-beta1 production was found in patients colonized with bacteria from *B. cepacia* complex ( $p < 0.0015$ ), impaired lung function and worse nutrition status regardless *CFTR* mutation.

deterioration previously described by Arkwright et al. [33] and/or recently by Drumm et al. [35]. Surprisingly, they both found association at codon 10, albeit in opposite genotypes. Arkwright et al. found that CF carriers of *TGF-beta1* codon 10 T/T genotype were at higher risk of CF lung disease, while Drumm et al. observed that the C/C genotype conveyed the highest risk for lung function deterioration. Such variance might be caused by the differences in respective study designs between these groups and/or sample sizes (Table 1). The surprising lack of association between TGF-beta1 and lung disease is true also for TGF-beta1 protein production. The finding of Wojnarowski et al. that the highest TGF-beta1 production in CF patients is associated with the mildest lung disease does not apply to our patients [34]. Besides different study designs also the fact that we investigate TGF-beta1 production in the peripheral blood cells and not directly in CF

lung epithelia might cause the lack of significant association due to obvious tissue specificity [45]. Despite the fact that we cannot detect strong dependence between *TGF-beta1* genotype and phenotype with CF lung disease, we observed an interesting association between TGF-beta1 secretion potential and lung function. Patients on both sides of TGF-beta1 production distribution curve, i.e., extreme "low" and "high" producers, presented with most deteriorated lung functions (Fig. 1). This demonstrates a potentially important regulatory role of TGF-beta1 and its notable position in the complex net of pro- and anti-inflammatory mediators.

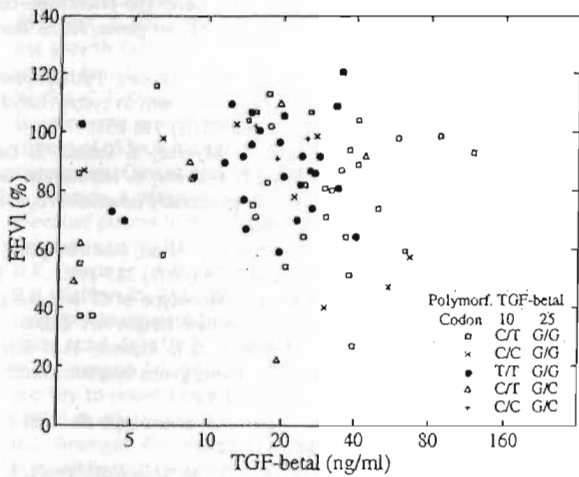


Figure 1 *TGF-beta1* gene polymorphisms, production and lung function (FEV<sub>1</sub>) in CF patients. There was no association between *TGF-beta1* gene polymorphism, production of this cytokine and severity of CF lung disease. CF patients chronically colonized with *P. aeruginosa* or bacteria from *B. cepacia* complex presented with worse lung disease (FEV<sub>1</sub>: mean=60%, SD=25; mean age=13 years, SD=5.3) than CF patients without any chronic colonization (mean=83%, SD=25; mean age=11 years, SD=4.9) independently of the *TGF-beta1* gene polymorphism.

Table 4 Frequencies of liver and pancreatic disease associated with CF in patients with *TGF-beta1* polymorphism TT/GG at codon 10/ and 25 compared with other polymorphisms

	TT/GG	Others
	34 (29%)	84 (71%)
	Number (%)	Number (%)
Liver cirrhosis	3 (9)	3 (3.5)
CF-related liver disease <sup>a</sup>	17 (50)	24 (28.6)
CF-related diabetes <sup>b</sup>	3 (9)	2 (2.4)
Insulinopenia	5 (15)	8 (9.5)

There was an association between *TGF-beta1* gene polymorphism and liver and pancreatic CF disease. Half of CF patients with TT/GG genotype of *TGF-beta1* presented with CF-related liver disease compared to other genotypes where less than third of CF patients had CF-related liver disease. Also CF-related diabetes was seen more in patients with TT/GG genotype.

<sup>a</sup> Cystic fibrosis-related liver disease, defined by at least one of the following criteria: (1) documented persisting increase in serum concentrations of any of the liver enzymes, ALT at least twice normal, AST at least 1.5 times normal, alkaline phosphatase at least 1.5 times normal, GGT at least 1.5 times normal; (2) persistent hepatomegaly of more than 6-month duration defined by percussed liver span greater than 1 SEM for age; (3) splenomegaly, defined as a palpable spleen greater than 2.0 cm below the left costal margin; (4) abnormalities of ultrasound scan (increased size, dishomogeneous echogenicity, nodular liver, irregular margins, splenomegaly) within 6 months.

<sup>b</sup> World Health Organisation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO Consultation. Part 1: Geneva, WHO, 1999.

## Liver and pancreatic disease

Although the presented data do not strictly confirm the association between *TGF-beta1* gene polymorphisms, production of this cytokine and the overall severity of the CF lung disease, we found the association between *TGF-beta1* gene polymorphism and liver and pancreatic CF disease. This finding is in accordance with previous studies where high levels of TGF-beta1 were associated with increased liver fibrosis in autoimmune hepatitis [46] and in animal models of liver and pancreatic fibrosis [47,48]. Arkwright et al. also found association between CFLD and high expressing *TGF-beta1* haplotypes and angiotensin-converting enzyme (an enzyme involved in TGF-beta1 activation) [13].

## Chronic infection

TGF-beta1 and other modifying factors play an important, but not decisive role in CF clinical disease. The crucial factor that influences CF phenotype is represented in our study by the chronic infection status. CF patients chronically colonized with *P. aeruginosa* or bacteria from *B. cepacia* complex presented with statistically significantly lower lung functions (measured by FEV<sub>1</sub> and MEF<sub>50</sub> parameters) than CF patients without any chronic colonization, independently of the *TGF-beta1* gene polymorphism. This fact confirms the unfavorable effect of chronic colonization on the course of CF (Fig. 1).

Although we did not find an association between *TGF-beta1* gene polymorphism and any forms of chronic bacterial infection, we found correlation between such infection and production of TGF-beta1. Serious clinical problems associated with either very low TGF-beta1 production in patients colonized with bacteria from *B. cepacia* complex or high TGF-beta1 production in patients chronically colonized with *P. aeruginosa* proved the importance of balanced production of this regulatory cytokine in accordance with the devastating role of chronic infection.

Interestingly, TGF-beta also plays an important role in the phenomenon of so called "endotoxin tolerance" [49]. Endotoxin tolerance is represented by the state of cell resistivity to subsequent LPS exposure that helps to protect the host from cellular damage caused by LPS-mediated hyperactivation of macrophages and other cells of immune system. Endotoxin tolerance also represents mean of immune cell adaptation to a persistent bacterial infection, which is a situation typical for CF. Endotoxin tolerance is a complex process, but it is noteworthy that LPS at least partly induces tolerance by stimulating the production of TGF-beta [50]. Such situation might be reflected in our findings of high TGF-beta1 production in chronic *P. aeruginosa* colonized patients. On the other hand, our finding of lowest TGF-beta1 production in *B. cepacia* colonized patients with the worst lung function might be considered as a risk factor with the potential cessation of endotoxin tolerance status that might lead to "cepacia syndrome", irreversible and rapid clinical decline associated with collapse of immune functions.

## Conclusions

TGF-beta1 is an important modifying factor in the pathogenesis of CF. Based on our results, the particular *TGF-beta1*

polymorphisms (TT/GG) predispose a CF patient with severe classes I-III *CFTR* mutations to the development of CFRD and CFLD. TGF-beta1 production capacity influences the potentially devastating bacterial infections in CF. Despite these findings, TGF-beta1 is just part of the mosaic influencing the overall phenotype of the disease. Further studies are necessary to elucidate complex pathogenesis in CF. We suggest that not only cytokine gene variants, but the whole system of interfering factors influences the overall clinical picture in this disease.

## Acknowledgments

Supported by Czech Ministry of Health (NI/7486-3; NR8458-5; NR/7974-3, 006420301; 00064203) and Ministry of Education (GACR 310/03/H147; IGA 0021620812). We would like to acknowledge all collaborating patients and controls.

## References

- [1] J.R. Riordan, J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science* 245 (1989) 1066-1073.
- [2] M.J. Welsh, B.W. Ramsey, F. Accurso, G.R.e.a. Cutting, in: B.A. Scriver, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill Inc., New York, 2001, Chap. 201.
- [3] M.J. Welsh, L.C. Tsui, T.F. Boat, A.L. Beaudet, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, McGraw Hill, 1995, pp. 3799-3875.
- [4] S.O. Salvatore, G. Castaldo, Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes, *Am. J. Med. Genet.* 111: (2002) 88-95.
- [5] R.L. Gibson, J.L. Burns, B.W. Ramsey, Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168 (2003) 918-951.
- [6] J. de Gracia, F. Mata, A. Alvarez, T. Casals, S. Gatner, M. Vendrell, D. de la Rosa, L. Guarner, E. Hermosilla, Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis, *Thorax* 60 (2005) 558-563.
- [7] J.C. Davies, U. Griesenbach, E. Alton, Modifier genes in cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 39 (2005) 383-391.
- [8] J.D. Acton, R.W. Wilmott, Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes, *Paediatr. Respir. Rev.* 2 (2001) 332-339.
- [9] M.G. Sliker, E.A. Sanders, G.T. Rijkers, H.J. Ruven, C.K. van der Ent, Disease modifying genes in cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 4 (Suppl. 2) (2005) 7-13.
- [10] J. Zielenski, Genotype and phenotype in cystic fibrosis, *Respiration* 67 (2000) 117-133.
- [11] J. Zielenski, M. Corey, R. Rozmahel, D. Markiewicz, I. Aznarez, T. Casals, S. Larriba, B. Mercier, G.R. Cutting, A. Krebsova, M. Macek Jr., E. Langfelder-Schwind, B.C. Marshall, J. DeCelle-Germana, M. Claustres, A. Palacio, J. Bal, A. Nowakowska, C. Ferec, X. Estivill, P. Durie, L.C. Tsui, Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13, *Nat. Genet.* 22 (1999) 128-129.
- [12] Y. Aron, B. Polla, T.e.a. Bienvenu, HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am. J. Crit. Care Med.* 159 (1999) 1464-1468.
- [13] P.D. Arkwright, V. Pravica, P.J. Geraghty, M. Super, A.K. Webb, M. Schwarz, I.V. Hutchinson, End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and

- cytokine gene polymorphisms, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (2003) 384-389.
- [14] M.G. Stieker, J.M. Deckers-Kocken, C.S. Uiterwaal, C.K. van der Ent, R.H. Houwen, Risk factors for the development of cystic fibrosis related liver disease, *Hepatology* 38 (2003) 775-776 (author reply 776-777).
- [15] J. Hull, A.H. Thomson, Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis, *Thorax* 53 (1998) 1018-1021.
- [16] G.B.M. Gabolde, J. Feingold, C. Besmond, Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study, *BMJ* 319 (1999) 1166-1167.
- [17] P.J. Sime, K.M. O'Reilly, Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment, *Clin. Immunol.* 99 (2001) 308-319.
- [18] M. Kelly, M. Kolb, P. Bonniaud, J. Gaudie, Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 39-49.
- [19] G.C. Blobe, W.P. Schiemann, H.F. Lodish, Role of transforming growth factor beta in human disease, *N. Engl. J. Med.* 342, (2000) 1350-1358.
- [20] D.A. Lawrence, Transforming growth factor-beta: an overview, *Kidney Int., Suppl.* 49 (1995) S19-S23.
- [21] D.A. Lawrence, Transforming growth factor-beta: a general review, *Eur. Cytokine Network* 7 (1996) 363-374.
- [22] D.J. Grainger, K. Heathcote, M. Chiano, H. Snieder, P.R. Kemp, J.C. Metcalfe, N.D. Carter, T.D. Spector, Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 93-97.
- [23] M.R. Awad, A. El-Gamel, P. Hasleton, D.M. Turner, P.J. Sinnott, I.V. Hutchinson, Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation, *Transplantation* 66 (1998) 1014-1020.
- [24] Y. Shirai, S. Kawata, N. Ito, S. Tamura, K. Takaishi, S. Kiso, H. Tsushima, Y. Matsuzawa, Elevated levels of plasma transforming growth factor-beta in patients with hepatocellular carcinoma, *Jpn. J. Cancer Res.* 83 (1992) 676-679.
- [25] W. Cui, C.J. Kemp, E. Duffie, A. Balmain, R.J. Akhurst, Lack of transforming growth factor-beta 1 expression in benign skin tumors of p53null mice is prognostic for a high risk of malignant conversion, *Cancer Res.* 54 (1994) 5831-5836.
- [26] V. Ivanovic, A. Melman, B. Davis-Joseph, M. Valcic, J. Geliebter, Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer, *Nat. Med.* 1 (1995) 282-284.
- [27] D.F. Pierce Jr., A.E. Gorska, A. Chytil, K.S. Meise, D.L. Page, R.J. Coffey Jr., H.L. Moses, Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 4254-4258.
- [28] D.J. Grainger, J.C. Metcalfe, Transforming growth factor-beta: the key to understanding lipoprotein(a)? *Curr. Opin. Lipidol.* 6 (1995) 81-85.
- [29] D.J. Grainger, P.R. Kemp, J.C. Metcalfe, A.C. Liu, R.M. Lawn, N.R. Williams, A.A. Grace, P.M. Schofield, A. Chauhan, The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis, *Nat. Med.* 1 (1995) 74-79.
- [30] A.B. Kulkarni, J.M. Ward, L. Yaswen, C.L. Mackall, S.R. Bauer, C.G. Huh, R.E. Gress, S. Karlsson, Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders, *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 264-275.
- [31] M.S. Anscher, W.P. Peters, H. Reisenbichler, W.P. Petros, R.L. Jirtle, Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 1592-1598.
- [32] A. El-Gamel, M. Awad, E. Šim, P. Hasleton, N. Yonan, J. Egan, A. Deiraniya, I.V. Hutchinson, Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis, *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* 13 (1998) 424-430.
- [33] P.D. Arkwright, S. Laurie, M. Super, V. Pravica, M.J. Schwarz, A. K. Webb, I.V. Hutchinson, TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis, *Thorax* 55 (2000) 459-462.
- [34] C. Wojnarowski, T. Frischer, E. Hofbauer, C. Grabner, W. Mosgoeller, I. Eichler, R. Ziesche, Cytokine expression in bronchial biopsies of cystic fibrosis patients with and without acute exacerbation, *Eur. Respir. J.* 14 (1999) 1136-1144.
- [35] M.L. Drumm, M.W. Konstan, M.D. Schluchter, A. Handler, R. Pace, F. Zou, M. Zariwala, D. Fargo, A. Xu, J.M. Dunn, R.J. Darrach, R. Dorfman, A.J. Sandford, M. Corey, J. Zielenski, P. Durie, K. Goddard, J.R. Yankaskas, F.A. Wright, M.R. Knowles, Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1443-1453.
- [36] J.C. Celedon, C. Lange, B.A. Raby, A.A. Litonjua, L.J. Palmer, D.L. DeMeo, J.J. Reilly, D.J. Kwiatkowski, H.A. Chapman, N. Laird, J.S. Sylvia, M. Hernandez, F.E. Speizer, S.T. Weiss, E.K. Silverman, The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 1649-1656.
- [37] L. Wu, J. Chau, R.P. Young, V. Pokorny, G.D. Mills, R. Hopkins, L. McLean, P.N. Black, Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax* 59 (2004) 126-129.
- [38] P. Drevinek, H. Hrbackova, O. Cinek, J. Bartosova, O. Nyc, A. Nemeč, P. Pohunek, Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA, *J. Clin. Microbiol.* 40 (2002) 3485-3488.
- [39] C. Perrey, S.J. Turner, V. Pravica, W.M. Howell, I.V. Hutchinson, ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms, *Transplant Immunol.* 7 (1999) 127-128.
- [40] C. Perrey, V. Pravica, P.J. Sinnott, I.V. Hutchinson, Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report, *Transplant Immunol.* 6 (1998) 193-197.
- [41] C. Colombo, P.M. Battezzati, Liver involvement in cystic fibrosis: primary organ damage or innocent bystander? *J. Hepatol.* 41 (2004) 1041-1044.
- [42] M. Costa, S. Potvin, Y. Berthiaume, L. Gauthier, A. Jeanneret, A. Lavoie, R. Levesque, J. Chiasson, R. Rabasa-Lhoret, Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis, *Diabetes Metab.* 31 (2005) 221-232.
- [43] M.J. Lewis, E.H. Lewis III, J.A. Amos, G.J. Tsongalis, Cystic fibrosis, *Am. J. Clin. Pathol.* 120 (2003) S3-S13 (Suppl.).
- [44] J.C. Cohen, J.E. Larson, Pathophysiologic consequences following inhibition of a CFTR-dependent developmental cascade in the lung, *BMC Dev. Biol.* 5 (2005) 2.
- [45] K.B. Schwarz, J. Rosensweig, S. Sharma, L. Jones, M. Durant, C. Potter, M.R. Narkewicz, Plasma markers of platelet activation in cystic fibrosis liver and lung disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 37 (2003) 187-191.
- [46] E.M. Bayer, W. Herr, S. Kanzler, C. Waldmann, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, H.P. Dienes, A.W. Lohse, Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity, *J. Hepatol.* 28 (1998) 803-811.
- [47] Z. Qi, N. Atsuchi, A. Ooshima, A. Takeshita, H. Ueno, Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 2345-2349.

- [48] H. Yoshikawa, Y. Kihara, M. Taguchi, T. Yamaguchi, H. Nakamura, M. Otsuki, Role of TGF-beta1 in the development of pancreatic fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver. Physiol.* 282 (2002) G549-G558.
- [49] M.A. West, W. Heagy, Endotoxin tolerance: a review, *Crit. Care Med.* 30 (2002) S64-S73.
- [50] L.M. Sly, M.J. Rauh, J. Kalesnikoff, C.H. Song, G. Krystal, LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance, *Immunity* 21 (2004) 227-239.

## Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis

Jitka Brazova<sup>a,\*</sup>, Anna Sediva<sup>a</sup>, Dagmara Pospisilova<sup>a</sup>, Vera Vavrova<sup>b</sup>, Petr Pohunek<sup>b</sup>,  
Milan Macek Jr.<sup>c</sup>, Jirina Bartunkova<sup>a</sup>, Hynek Lauschmann<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Institute of Immunology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup>Pediatric Clinic, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup>Institute of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup>Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic

Received 6 October 2004; accepted with revision 31 January 2005

Available online 10 March 2005

### Abstract

The previously observed occurrence of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients who have cystic fibrosis (CF), together with the reported decrease in IgG2, a Th1-controlled isotype, suggests a potential for Th1/Th2 imbalance in CF patients with a possible Th2 predominance. 48 CF patients and 16 controls had levels of IFN $\gamma$ , IL-4, and IL-10 measured in supernatants of whole blood cell cultures stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and phytohemagglutinine (PHA). The patients were divided into 2 groups: “low responders”, having negligible secretion of cytokines (IFN $\gamma$ : 10.0–200.0 pg/ml, IL-4: 0.0–0.3 pg/ml) and “high responders”, producing high levels of both IFN $\gamma$  (500.0–2000.0 pg/ml) and IL-4 (1.0–200.0 pg/ml). There was a statistically significant ( $P < 0.01$ ) deterioration of lung function measured by an FEV<sub>1</sub> decline by 11.2% over 3 years in the “low responder” group. 10 of 16 “low responders” had chronic lung infections with *P. aeruginosa* while such infection was less prevalent in the “high responder” group where only 13 of 32 CF patients had positive cultures. A shift towards Th2 response was observed in the “high responder” group as children chronically infected with *P. aeruginosa* had greater IL-4 production than non-infected CF patients within the same cohort. ANCA autoantibodies were found only in the “high responder” group. Th2 immune response predominance in a subset of CF patients is associated with chronic *P. aeruginosa* infection.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Cytokines; IFN $\gamma$ ; IL-4; Th1; Th2; Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA); Child; Cystic fibrosis (CF)

### Introduction

Cystic fibrosis (CF) is one of the most thoroughly studied disorders since the identification of the causal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene [1,2]. In children and subsequently in adults, severity of the CF lung disease, associated with chronic pulmonary infections, is the major factor influencing CF patient survival [1]. The hallmark of CF lung disease is chronic infection by *P. aeruginosa* that gradually increases from childhood through early adolescence [1,3]. Although the pathogenesis of CF

lung disease has been studied in detail [3], the exact pathogenesis and precipitating factors of the initial *Pseudomonas* infection have not yet been elucidated. CF lung disease is a result of a long-term sequence of pathogenetic steps, including interaction of the specific pulmonary milieu with ubiquitous opportunistic infection, which are strongly modified by the immune response. The immune system in CF patients has been extensively studied, with few minor alterations, such as transient hypogammaglobulinemia in infancy, found [1]. Despite an apparently normal immune response, the devastating lung infections by *Pseudomonas* species are progressive, being almost impossible to eradicate. In this study, we focused on immune parameters in CF patients. Previously, we found lower levels of IgG during the first year of life in CF patients when compared to normal

\* Corresponding author.

E-mail address: [jitka.brazova@centrum.cz](mailto:jitka.brazova@centrum.cz) (J. Brazova).



healthy control subjects. Transient IgG2 deficiency was also observed in patients under the age of 6 years prior to the development of general hypergammaglobulinemia that is otherwise common in CF patients [4–6]. Furthermore, we have frequently detected ANCA autoantibodies in a subset of CF patients [7,8]. The occurrence of ANCA even in the youngest age groups together with a decrease in IgG2, the only Th1 controlled IgG isotype, led us to the examination of the Th1/Th2 balance in immune responses of our patients. We hypothesized that a shift towards Th2 response can negatively influence the immune defense against *Pseudomonas* infection. This presumption was also supported by previous reports of severe *Pseudomonas* infection in Th2-respondent mice when compared to mild lung disease in Th1-respondent murine strains [9].

### Patients and methods

Forty-eight children/young adults having CF, aged 1 to 20 years (median 11 years; 24 males, 24 females) and 16 sex and age-matched controls, aged 1 to 21 years (median 10 years; 7 males, 9 females) were studied. CF patients have been regularly and longitudinally followed on an outpatient basis at the National CF Center—University Hospital Motol in Prague. The diagnosis of CF was established by typical clinical features, increased sweat chloride concentrations over 60 mmol/l [10] and detection of CF-inducing mutations in the *CFTR* gene [11]. Patients were included in the study on a consecutive manner based on their diagnosis of CF. On the long-time basis, patients were treated accordingly to their clinical status, including anti-inflammatory drugs and antibiotics. No patient in the investigated group was on systemic corticosteroid treatment. In the time of enrollment, all patients were in stable health status. The control group consisted of normal healthy children that had common upper respiratory infections and who were symptom-free at the follow-up visit.

All children and young adults were examined twice a year for typical parameters of humoral immunity. Serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM, IgG subclasses 1–4, CRP, circulating immune complexes, antinuclear antibodies (ANA), and antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) were measured by routine immunological methods that are utilized at our Institute. The methods included nephelometry with appropriate antisera (DADE Behring, Marburg, Germany) for immunoglobulins and CRP, and indirect immunofluorescence for ANA and ANCA (Binding Site, Birmingham, UK). All sera were further tested for ANCA specificity against bactericidal/permeability increasing protein BPI (BPI protein IgG antibodies ELISA kit, Genesis Diagnostics, Ely, UK) and against proteinase 3 (PR3) (EIAgen c-ANCA kit, Biochem Pharma Group, Freiburg, Germany). The levels of cytokines IFN $\gamma$ , IL-4, and IL-10 were measured by ELISA (BioSource International, Camarillo, California, USA) in supernatants of diluted whole

blood (1 in 10) in RPMI 1640 cell culture stimulated by 50  $\mu$ l of lipopolysaccharide (LPS) in a concentration of 25  $\mu$ g/ml (*E. coli*, Sigma, Prague, Czech Republic) and 50  $\mu$ l 5  $\mu$ g/ml phytohemagglutinin (PHA) (Wellcome Diagnostics, UK) [12]. Supernatants were collected after 48 h and frozen until examination in cytokine assays. The patients' results were compared to age-matched controls, investigated in the same manner.

*CFTR* gene genotype was determined in all patients using a combination of molecular genetic techniques. The most common F508del mutation was detected by PCR and subsequent non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis [13]. Other relatively common CF mutations were detected using allele-specific oligonucleotide hybridization, amplification refractory mutation detection system, PCR-mediated site-directed mutagenesis, and standard restriction digestion techniques, including the CF-16 Research Prototype Assay (Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA) [14,15].

Pulmonary function tests were performed using the Spiroscope (Ganshorn) apparatus in patients older than 5 years of age employing flow-volume loop analysis. The lung function was studied by measuring forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>), expiratory flows at 25%, 50%, and 75% of vital capacity (MEF 25, MEF 50, MEF 75, and MEF 25–75%) and peak expiratory flow (PEF). All measured values were expressed as a percentage of predicted values [16]. For the purpose of this study, only FEV<sub>1</sub> parameters were evaluated. We focused on differences in lung function status, comparing FEV<sub>1</sub> in years 2000–2003. We used only the data of 31 out of 48 CF patients, as 8 children were too young to perform the lung function investigation, in addition to the death of 4 patients from 2000–2003 and also non-compliance of 5 patients at the study conclusion. Chronic infection with *P. aeruginosa* was considered positive in patients who had three consecutive microbiological samples with positive results (spontaneously expectorated sputum, saline solution induced sputum, throat cultures or bronchoscopy samples) within 1 year. If sputum was available, the chronic colonization was confirmed by PCR. Furthermore, the *P. aeruginosa* infection was followed according to the titer of anti-*Pseudomonas* antibodies using serological methods (EIA, Mediagnost, Germany).

Microbiologic assessments confirming infection by *P. aeruginosa* and clinical assessments including FEV<sub>1</sub> as a characteristic of lung function were included in the statistical analysis.

The results were summarized in a database and analyzed by multifactor non-linear correlation analysis. The IFN $\gamma$  levels were assessed after stimulation, since the basic IFN $\gamma$  levels were very low (between 0 and 5 pg/ml, while levels after stimulation ranged within tens and hundreds of pg/ml). The IL-4 values were formatted for mathematical input as an increase of IL-4 (the difference between the level after stimulation minus the baseline level of IL-4).

Comparison of FEV<sub>1</sub> changes was made by Student's one-sided *t* test.

**Results**

No primary immune deficiencies were noted in the basic humoral and cellular immune profile of the investigated CF patients. Further, no cytopenias or other significant abnormalities in total and differential blood count were noted. Immunoglobulin levels typically increased with age in the CF group when compared to normal controls (Fig. 2). ANCA autoantibodies measured by indirect immunofluorescence were found in 13 of 48 CF patients, 8 of who were positive for BPI and 4 of who were positive for PR3. PHA-induced lymphocyte proliferation tests in CF patients were comparable to healthy controls (data not shown).

There was a division of the investigated group of CF patients into two distinct categories related to the level of production of IFN $\gamma$  and IL-4 (Table 1, Fig. 1), "low responders" and "high responders".

Sixteen patients in the low responder group produced very low IFN $\gamma$  and IL-4 in response to LPS and PHA stimulation, and only rarely developed ANCA autoantibodies, including 3 patients with low positive C-ANCA values. The course of the lung disease associated with *P. aeruginosa* colonization in this low responder group was unfavorable. These patients had lower levels of IgA when compared to other CF children (mean: IgA 0.97 g/l, SD 0.6 versus 2.23 g/l, SD 1.3). CRP was below 6 mg/l in all low responder patients.

There was no difference in the distribution of particular *CFTR* genotypes between the low responder and high responder groups. However, the presence of "severe" *CFTR* gene mutations [17] on both CF chromosomes was detected only in the group of "low responders". Thirty-two patients in the "high responder" group produced significant amounts of both IFN $\gamma$  and IL-4. The immune response in these patients was similar to that of the controls (Table 1). This subgroup was characterized by the presence of ANCA autoantibodies

Table 1  
Humoral immunity of CF patients: comparison between "low" and "high responders" with respect to IFN $\gamma$ , IL-4, and IL-10 production

	Age, years; mean (range)	IFN $\gamma$ (pg/ml), mean SD	Incr. IL-4 (pg/ml), mean SD	IL-10 (pg/ml), mean SD
Group 1	10.5	65.8	0.04	103.2
N = 16	(1–18)	62.7	0.07	8.9
Group 2	10.5	1403.1	28.3	104.2
N = 32	(2–20)	400.9	44.6	14.4
Controls	11.3	950.7	21.6	105.3
N = 16	(1–21)	418.0	40.9	16.8

The patients in group 1, "low responders", produced only minimal amounts of IFN $\gamma$  and IL-4 after stimulation with LPS and PHA. The cytokine production of the patients in the group 2 "high responders" was adequate and comparable to that of control subjects.

The IL-4 values were formatted as an increase of IL-4 (the difference between the level after stimulation minus the baseline level of IL-4).

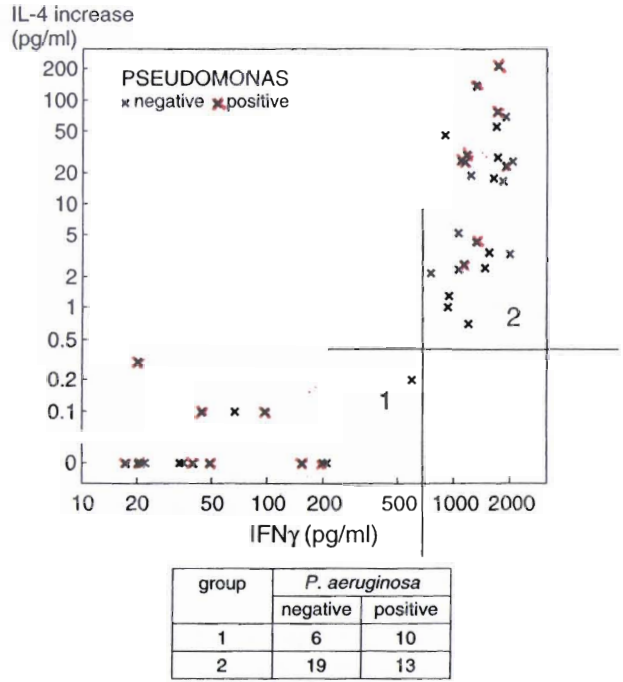


Fig. 1. Infection with *P. aeruginosa* in the groups of "low" (1) and "high responders" (2). Infection with *P. aeruginosa*: x negative: negative or intermittent *P. aeruginosa* infection; x positive: chronic *P. aeruginosa* infection. Chronic infection with *P. aeruginosa* is more frequent among CF patients in the "low responder" group. Within the group of "high responders", patients with chronic *P. aeruginosa* infection responded with higher IL-4 production. The difference in IL-4 production between *P. aeruginosa* positive and *P. aeruginosa* negative patients in the "high responder" group is statistically significant, *P* < 0.02.

directed mainly against BPI. 10 of 32 patients were positive by IIF, 7 having a high titer of specific BPI-ANCA, and 3 having antibodies directed against PR3. Two patients from this group also had elevated levels of CRP ranging from 18 to 70 mg/l, and were infected by *Burkholderia cepacia*.

The distribution of typical *P. aeruginosa* infection among "low responders" and "high responders" is shown in Fig. 1. There was a higher prevalence of patients with chronic *P. aeruginosa* infection within the "low responder" group. Chronic infection by *P. aeruginosa* was less frequent in the group of "high responders". The patients who had long-term colonization with *P. aeruginosa* responded with greater IL-4 production than those without chronic *P. aeruginosa* infection. The difference in IL-4 production between chronically infected and non-infected CF patients within the group of "high responders" was statistically significant (*P* < 0.02).

Data on IL-10 production are shown in Table 1. Immune response was similar in CF patients and in the control group.

Differences in the lung function status, as assessed by FEV<sub>1</sub>, were assessed in the groups of CF patients who were differentiated by levels of IFN $\gamma$  and IL-4 production (Table 2). In both the "high responders" and the "low responders", 2 patients died during the 3-year period. Both were chronically infected with *P. aeruginosa*. Within these two groups, we found statistically significant difference in lung

Table 2  
Lung function—FEV<sub>1</sub>: comparison between low and high responders over time

	FEV % of predicted values mean (SD)	
	2000	2003
Group 1: IFN $\gamma$ < 200 (pg/ml) (N = 10)	72 (28)	61 (32)
Group 2: IFN $\gamma$ > 500 (pg/ml) (N = 10)	74 (23)	73 (30)
Normal range	80–100	

During the 3 years of investigation, lung function (FEV<sub>1</sub>) declined by 11.2% in the “low responder” group, which is statistically significant ( $P < 0.01$ ) when compared to almost no changes in FEV<sub>1</sub> (1.4%) over time in the “high responder” group.

function (FEV<sub>1</sub>) deterioration over time. Lung function (FEV<sub>1</sub>) declined by 11.2% in the “low responder” group, being statistically significant ( $P < 0.01$ ) when compared to the absence of changes in FEV<sub>1</sub> (1.4%) over time in the “high responder” group.

The decline of lung function was more prominent in *P. aeruginosa* colonized patients in both groups, compared to patients without colonization. This phenomenon was most prominent in *P. aeruginosa* positive patients in the “low responder” group where FEV<sub>1</sub> declined by 11.3% in time, being statistically significant ( $P < 0.05$ ).

With the exception of increasing levels of immunoglobulins with age (Fig. 2), there was no correlation of the overall immune profile, ANCA positivity or *P. aeruginosa* infection with age and/or gender in the studied CF cases.

## Discussion

The immune response against pathogens including the immune reaction of CF patients to *P. aeruginosa* is initiated by innate immunity followed by specific acquired immune responses provided by activated B and T lymphocytes [18–23]. The nature of the specific immune response is influenced by the Th1/Th2 balance [24]. A predominant Th2 type of immune response in adult CF patients has already been described [25,26]. Reduced IFN $\gamma$  production by peripheral mononuclear cells in CF patients was detected in another

study [27]. However, based on our current study, we cannot completely confirm these hypothetical assumptions. Within the studied groups of children and adolescents with CF, two distinct subgroups were noted having very different cytokine production profiles, divided according to the changes observed in IFN $\gamma$  and IL-4 production after LPS and PHA stimulation. There was no overlap between these groups. The third investigated cytokine, IL-10, did not follow any of the observed trends and was uniform in both CF and control patients. Similar findings concerning IL-10 secretion in CF and control subjects have been previously reported [28].

The first group of patients was termed a “low responder” group. They produced only negligible amounts of both IFN $\gamma$  and IL-4 in response to stimulation. Chronic infection by *P. aeruginosa* was more prevalent in this group and lung function deterioration over time was statistically significant when compared with the “high responder” group. The decrease in FEV<sub>1</sub> in the “low responder” group might be caused by *P. aeruginosa* infections, but also may be related to insufficient immunocompetency. It appears that this “low responder” group has immune responses, which fail to produce sufficient amounts of cytokines to defend against chronic infection. The interplay between the immune status and infection in CF patients is therefore obvious; however, it has to be stressed that presented data are retrospective and therefore it is impossible to distinguish whether the in vitro findings are a consequence of chronic *P. aeruginosa* infection or a cause of it.

In this “low responder” group, immune response seemed to be too low to initiate autoantibody production, as the appearance of ANCA was rarely seen. The “high responder” group, appeared to be more immunocompetent, having more substantial cytokine production. These patients had adequate cytokine production, comparable to that found in the normal controls. Chronic infection by *P. aeruginosa* was much less prevalent in the “high responder” group and lung function deterioration was less severe than in “low responder” group in time. There were no other differences in parameters that can influence the development of chronic *P. aeruginosa* infection, such as greater age of patients, in this group.

Within this “high responder” group, children with chronic *P. aeruginosa* infection had a trend towards greater IL-4

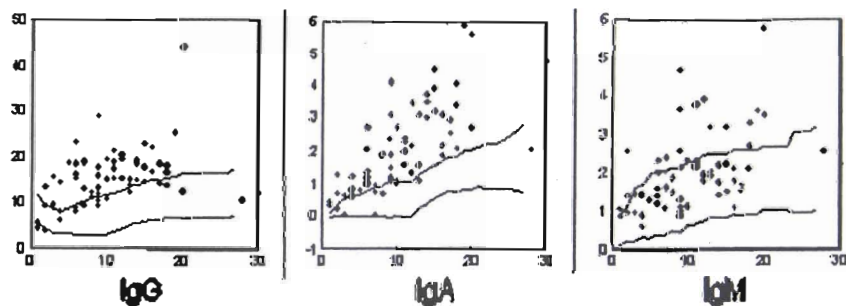


Fig. 2. The level of immunoglobulins compared with normal control values (mean  $\pm$  3 SD) and age. The level of immunoglobulins (g/l) gradually increased with age. With the exception of IgG in the age group 0–1 year, all immunoglobulins in CF children are significantly higher than in normal control subjects. The level of significance reaches certainty ( $P < 10^{-16}$ ). Normal age-related values are marked by lines, representing mean  $\pm$  3 SD.

production (Fig. 1) which corresponds to findings in adults having chronic infections [26]. Thus, within the group of “high responders”, there was a trend towards increased Th2 response in patients with chronic *P. aeruginosa* infection. However, there are other immunologic factors, which likely influence the final clinical outcome of CF patients. One such factor may be the formation of ANCA autoantibodies, which occur in a subset of CF patients. ANCA autoantibodies were found almost exclusively in the group of “high responders”. There was no correlation between deteriorating CF clinical status and ANCA-positivity in these CF patients. In the “high responders” group, ANCA autoantibody presence was associated with lung colonization by *P. aeruginosa* but this connection was not exclusive. Interestingly, chronic *P. aeruginosa* infection was more prevalent in the “low responder” group in which ANCA presence was rare. There were no rheumatologic or other clinical findings indicative of a possible autoimmune disease in the ANCA positive patients. The etiology, pathogenesis, and clinical significance of ANCA in CF still await clarification.

When analyzing the possible association of the nature of the respective immune response and the *CFTR* genotype, we observed that patients bearing “severe” *Class I* mutations on both CF chromosomes [17] belonged to the “low responder” group, including 3 investigated patients, indicating that there might be an association between the *CFTR* genotype and the “strength” of immune response in CF, a finding which requires further study to confirm.

## Conclusion

The present study partially confirms our initial hypothesis that Th2 predominance might contribute to the *Pseudomonas*-related CF lung disease. In the investigation, CF patients could be divided into distinct groups according to their immunologic response: “low responders” and “high responders”. The low immune response in the first group of patients may predispose them to early chronic *P. aeruginosa* infection [28] and quicker deterioration of lung function. Children in the high response group tend to have greater IL-4 production and in this respect resemble the Th2 polarized immune response reported in adults having CF [25,26]. Even if the immune response pattern in CF patients exerts only a partial influence on the course of the CF lung disease, this immune response pattern represents an important factor in the defense against *P. aeruginosa* infection [29]. This investigation presents a further line of evidence that immune factors may modify the final severity of CF lung disease.

## Acknowledgments

Supported by Czech Ministry of Health (IGA 7486-3, 6497-3, 6464-3, 6462-3), Ministry of Education (0021620812, 111300003, LN00A079), and GACR

922113. We would like to acknowledge all collaborating patients and controls.

## References

- [1] M.J. Welsh, L.C. Tsui, T.F. Boat, A.L. Beaudet, Cystic fibrosis, in: C.R. Schriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, Mc Graw Hill, 1995.
- [2] J.R. Riordan, J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, et al., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science* 245 (1989) 1066–1073.
- [3] J.J. Wine, The genesis of cystic fibrosis lung disease, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 309–312.
- [4] A. Sediva, J. Bartunkova, I. Kolarova, V. Vavrova, Immunity and autoimmunity in children with CF, XXII. Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Montreal, Canada, 1998.
- [5] A. Sediva, J. Bartunkova, V. Vavrova, Humoralni imunita u deti s cystickou fibrozou (Humoral immunity in children with cystic fibrosis), *Cs. Pediatrie* 54 (10) (1999) 535–539.
- [6] A. Sediva, V. Vavrova, J. Bartosova, P. Pohunek, J. Bartunkova, M. Macek, Immune aspects of cystic fibrosis, *Allergy Clin. Immunol. Int.* 13 (2) (2001) 67–70.
- [7] A. Sediva, I. Kolarova, J. Bartunkova, Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children, *Eur. J. Pediatr.* 157 (1998) 987–991.
- [8] A. Sediva, J. Bartunkova, I. Kolarova, O. Hrusak, V. Vavrova, M. Macek Jr., C.M. Lockwood, A.C. Dunn, Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in children with cystic fibrosis, *J. Autoimmun.* 11 (1998) 185–190.
- [9] C. Moser, H.P. Hougen, Z. Song, J. Rygaard, A. Kharazmi, N. Hoiby, Early immune response in susceptible and resistant mice strains with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection determines the type of T-helper cell response, *Apmis* 107 (1999) 1093–1100.
- [10] L.E. Gibson, C.R.E., A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis, *Pediatrics* 23 (1959) 545–549.
- [11] B.J. Rosenstein, G.R. Cutting, The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel, *J. Pediatr.* 132 (1998) 589–595.
- [12] D. De Groote, P.F. Zangerle, Y. Gevaert, M.F. Fassotte, Y. Beguin, F. Noizat-Pirenne, J. Pirenne, R. Gathy, M. Lopez, I. Dehart, et al., Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation, *Cytokine* 4 (1992) 239–248.
- [13] M. Macek Jr., L. Ladanyi, J. Burger, A. Reis, Missense variations in the cystic fibrosis gene: heteroduplex formation in the F508C mutation, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 1173–1174.
- [14] M. Macek Jr., A. Mackova, A. Hamosh, B.C. Hilman, R.F. Selden, G. Lucotte, K.J. Friedman, M.R. Knowles, B.J. Rosenstein, G.R. Cutting, Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%, *Am. J. Hum. Genet.* 60 (1997) 1122–1127.
- [15] T. Dork, M. Macek Jr., F. Mekus, B. Tummler, J. Tzountzouris, T. Casals, A. Krebsova, M. Koudova, I. Sakmaryova, M. Macek Sr., V. Vavrova, J. Zemkova, E. Ginter, N.V. Petrova, T. Ivaschenko, V. Baranov, M. Witt, A. Pogorzelski, J. Bal, C. Zekanowsky, K. Wagner, M. Stuhmann, I. Bauer, H.H. Seydewitz, T. Neumann, S. Jakubiczka, Characterization of a novel 21-kb deletion, *CFTR-dele2,3(21 kb)*, in the *CFTR* gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe, *Hum. Genet.* 106 (2000) 259–268.
- [16] A. Zapletal, E.K. Motoyama, L.E. Gibson, A. Bouhuys, Pulmonary mechanics in asthma and cystic fibrosis, *Pediatrics* 48 (1971) 64–72.
- [17] J. Zielenski, Genotype and phenotype in cystic fibrosis, *Respiration* 67 (2000) 117–133.

- [18] X. Estivill, Complexity in a monogenic disease, *Nat. Genet.* 12 (1996) 348–350.
- [19] R. Bals, D.J. Weiner, J.M. Wilson, The innate immune system in cystic fibrosis lung disease, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 303–307.
- [20] J.A. Hoffmann, F.C. Kafatos, C.A. Janeway, R.A. Ezekowitz, Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* 284 (1999) 1313–1318.
- [21] J.A. Borghans, A.J. Noest, R.J. De Boer, How specific should immunological memory be? *J. Immunol.* 163 (1999) 569–575.
- [22] D.T. Fearon, R.M. Locksley, The instructive role of innate immunity in the acquired immune response, *Science* 272 (1996) 50–53.
- [23] R.B. Parad, C.J. Gerard, D. Zurakowski, D.P. Nichols, G.B. Pier, Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4744–4750.
- [24] T. Mosmann, Cytokines and immune regulation, in: R.R. Rich (Ed.), *Clinical Immunology, Principles and Practise*, Mosby, St. Louis, 1996.
- [25] M. Skov, L.K. Poulsen, C. Koch, Increased antigen-specific Th-2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in patients with cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 27 (1999) 74–79.
- [26] C. Moser, S. Kjaergaard, T. Pressler, A. Kharazmi, C. Koch, N. Hoiby, The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type, *APMIS* 108 (2000) 329–335.
- [27] R.B. Moss, Y.P. Hsu, L. Olds, Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.* 120 (2000) 518–525.
- [28] M. Rosenfeld, R.L. Gibson, S. McNamara, J. Emerson, J.L. Burns, R. Castile, P. Hiatt, K. McCoy, C.B. Wilson, A. Inglis, A. Smith, T.R. Martin, B.W. Ramsey, Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 32 (2001) 356–366.
- [29] S.D. Sagel, F.J. Accurso, Monitoring inflammation in CF. *Cytokines, Clin. Rev. Allergy Immunol.* 23 (2002) 41–57.

Original article

# Kinetics of Toll-like receptor-4 splice variants expression in lipopolysaccharide-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis

Irena Jarešová<sup>a,1</sup>, Daniela Rožková<sup>a,1</sup>, Radek Špišek<sup>b</sup>, Aleš Janda<sup>a</sup>,  
Jitka Brázová<sup>a</sup>, Anna Šedivá<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology, University Hospital Motol and 2nd Medical School, Charles University, V Úvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Laboratory of Tumor Immunology, The Rockefeller University, York Avenue 1230, New York, NY 10021, USA

Received 23 October 2006; accepted 22 June 2007

Available online 1 July 2007

## Abstract

Toll-like receptors (TLR) are key components of innate immune system. As TLR activation could induce potentially harmful inflammatory response, activation of TLR signaling pathways has to be under tight control. Besides other control mechanisms, an inhibitory function of murine TLR4 splice variants was recently demonstrated. In this study we investigated expression of four TLR4 splice variants in human antigen presenting cells (APC). Furthermore, we studied modification in TLR4 splice variants expression in APC in cystic fibrosis (CF) patients chronically infected by Gram-negative bacteria. We developed a novel reliable real-time PCR detection system that allowed monitoring of individual TLR4 splice variants expression. In APC from healthy donors we detected a characteristic transient increase of two out of four splice variants after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Similarly to murine TLR4, one of these variants, NM 003266, might translate to a potentially inhibitory protein. In contrast to controls, CF monocytes had significantly changed LPS-induced expression of TLR4 gene and its variants including reduced ability to up-regulate the expression of the potentially inhibitory variant upon stimulation. In accordance with this observation, monocytes from CF patients produced significantly more tumor necrosis factor after LPS stimulation than healthy controls. Our results thus describe the kinetics of TLR4 splicing variants expression after LPS stimulation and indicate a possible alteration of its regulation in CF patients.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Toll-like receptor 4; Alternative splicing; Cystic fibrosis

## 1. Introduction

Signaling via Toll-like receptors (TLRs), an evolutionary conserved group of molecules identified in lower organisms and mammals, plays a crucial role in a defense against pathogens. Cells of innate immune system expressing these receptors recognize conserved pathogen structures, termed

pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and initiate activation of an adaptive immune response. So far 11 mammalian TLRs with their specific ligands have been identified [1]. They all contain cytoplasmic domain with high homology to interleukin (IL)-1 receptor (TIR domain) and an extracellular region containing leucine-rich repeat motifs responsible for recognition of pathogens. Lipopolysaccharide (LPS), a component of an outer membrane of Gram-negative bacteria, has been identified as a ligand of Toll-like receptor 4 (TLR4). Signaling events triggered by TLR4 result in the initiation of transcription of many genes involved in the inflammatory immune response against pathogens [2,3].

LPS might trigger an acute and excessive release of proinflammatory cytokines dominated by tumor necrosis factor

*Abbreviations:* TLR4, Toll-like receptor 4; LPS, lipopolysaccharide; TNF, tumor necrosis factor; CF, cystic fibrosis; APC, antigen presenting cells; PAMP, pathogen-associated molecular patterns; RQ-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; DC, dendritic cell.

\* Corresponding author. Tel.: +420 2 24 43 59 59; fax: +420 2 24 43 59 62.

E-mail address: anna.sediva@lfmotol.cuni.cz (A. Šedivá).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

(TNF). In the case of severe infection by Gram-negative bacteria, this activation may lead to potentially fatal endotoxin shock. Chronic infection by Gram-negative bacteria also activates TLR4 associated signaling cascades; however, the subsequent immune response is modified by repeated and chronic exposure to bacterial LPS. Re-exposure of TLR4 expressing cells to LPS leads to the state of so called “LPS tolerance” with far less dramatic consequences in the altitude of inflammatory response [4,5]. In any circumstances, LPS triggered inflammatory response is under complex control that particularly targets initial steps of TLR4 signaling cascade [6].

Recently several negative regulators of TLRs activation have been identified [7]. In addition to cytoplasmic proteins such as IRAK-M [8] and membrane-bound molecules ST2, SIGIRR [9,10], negative regulation by the induction of alternative splicing of proteins participating in TLR signal transduction was described [11]. In mice, two inhibitory alternatively spliced isoforms of *Irak2* gene were described [12]. Negative regulation was also observed directly at the level of TLR molecules: the soluble form of TLR2 inhibited IL-8 and TNF production by monocytes stimulated with TLR2 ligand, bacterial lipopeptide [13]. A similar mechanism of TLR signaling inhibition was also described for mouse TLR4 [14]. One of the three alternatively spliced mRNAs contains an additional exon with a stop codon resulting in a protein lacking the transmembrane and intracellular domains. This soluble mouse TLR4 (smTLR4) attenuates LPS-induced TLR signaling [14]. High homology of mouse TLR4 with human and its similar four-exon structure suggests that alternative splicing of this gene could also play an important regulatory role in humans.

In this study, we describe the development of a novel real-time PCR-based system for reliable quantitative detection of all four human TLR4 splice variants. We used this approach to monitor the kinetics of expression of individual variants during in vitro LPS-induced TLR4 stimulation of antigen presenting cells. In order to determine whether long-term exposure to LPS during chronic Gram-negative infection leads to qualitatively different response to LPS stimulation, we also analyzed expression of TLR4 splice variants in monocytes isolated from cystic fibrosis (CF) patients colonized with Gram-negative bacteria. Cystic fibrosis is a severe autosomal recessive inherited disease, caused by mutations in the CFTR gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Clinical presentation of CF phenotype is the result of mutations of the gene and subsequent impaired function of the chloride channel. CF patients tend to suffer from chronic, mostly bacterial, respiratory infections. Most severe and typical pathogens are Gram-negative bacteria—*Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex. Interestingly, specific structures of LPS with higher stimulatory potential were found in *P. aeruginosa* isolates from CF patients [15]. Apparently, chronic contact with Gram-negative infection modifies the immune response. It remains unclear whether TLR4 signaling modulation or its regulation is involved in this process. To reveal any possible modification in CF patients we therefore applied our novel detection system and

quantified TLR4 splice variants expression in CF monocytes after LPS exposure.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Media and cell cultures

Complete culture medium (CM) was used for the culture of monocytes and dendritic cells and consisted of RPMI 1640 (Cambrex, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cambrex), 2 mM L-glutamine (Cambrex), and 1% penicillin/streptomycin (Cambrex). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 2.2. Monocyte isolation and dendritic cell generation

Peripheral mononuclear cells were isolated from peripheral blood of CF patients or healthy human donors by density gradient centrifugation (Ficoll paque, Amersham Biosciences). Monocytes were then negatively separated by Monocyte isolation kit II (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) with more than 95% purity. Immature monocyte-derived DCs were generated as previously described [16]. Briefly, PBMC were obtained from isolated monocytes by culture for 5 days in CM in the presence of GM-CSF at 500 IU/ml (Leukine, Berlex, Richmond, CA) and 20 ng/ml of IL-4 (Peprotech, London, UK). Monocytes or dendritic cells at the concentration of  $1 \times 10^5$  or  $5 \times 10^5$  cells per well, respectively, were stimulated with 100 ng/ml LPS (*Escherichia coli*, Sigma, St. Louis, MO) in CM.

### 2.3. Patients and controls

In this study, 9 CF patients (5 males and 4 females; mean age  $21.8 \pm 6.9$  years) and 9 healthy controls (5 males and 4 females, mean age  $26 \pm 5.6$  years) were tested. All patients with genetically confirmed diagnosis were from Cystic Fibrosis Centre at the University Hospital Motol in Prague. All CF patients except one were F508del homozygotes (for more detailed patient data see Table 1). Healthy controls did not have any family history of CF or features associated with CF or chronic Gram-negative infection.

All CF children's parents, CF adults and healthy controls participating in the study were informed in detail about the study and informed consents were signed prior to the involvement in the protocol.

### 2.4. Cytokine detection

Culture supernatants from LPS stimulated monocytes or DC were collected in succeeding time points up to 24 h and TNF and IL-8 production were analyzed by ELISA kits (Biosource, Camarillo, CA).

### 2.5. RT-PCR

Total cellular RNA was prepared from stimulated monocytes or DC using Rneasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Table 1  
CF patients' characteristics

Patients	Sex	Age (years)	Inpatient or outpatient <sup>a</sup>	Genotype	Current colonization of <i>P. aeruginosa</i> and/or <i>B. cepacia</i>
Non-colonized	M	25	In	del21kb/F508del	–
	F	17	Out	F508del/F508del	–
	M	31	Out	F508del/F508del	–
Colonized	M	32	In	F508del/F508del	Pa
	M	20	In	F508del/F508del	Pa, Bc IIIA
	F	25	Out	F508del/F508del	Pa
	M	20	Out	F508del/F508del	Pa
	F	12	Out	F508del/F508del	Pa
	F	24	Out	F508del/F508del	Pa

Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Bc IIIA, *Burkholderia cepacia* genomovar IIIA.

<sup>a</sup> Outpatients were seen for routine CF clinic visit, inpatients were hospitalized for therapy due to CF exacerbation.

One microgram of RNA was treated by 1 U of DNase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) 30 min at 37 °C. The enzyme was inactivated by heating at 65 °C for 10 min in the presence of 2 mM EDTA (Fermentas). RNA was then transcribed into cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Presence of DNA contamination and verification of successful isolation of RNA was tested by PCR amplification of ABL gene with intron spanning primers: forward primer 5'-TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T-3', reverse primer 5'-TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA GCT TTT-3'. This reaction results in 764 bp product when DNA is a template and 201 bp product in RNA. cDNA was synthesized by Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

To detect all TLR4 splicing variants, PCR with primers designed to exons I and IV were performed (forward primer: 5'-ATA GCG AGC CAC GCA TTC A-3' and reverse primer: 5'-ACC CGC AAG TCT GTG CAA TAA-3'). The amplified products were separated on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Expression of splice variants was quantified by real-time quantitative RT-PCR using iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) with primers designed in the exons junction (Fig. 1B). The following primers were used: **TLR4-NM 138554**: 5'-TCA CAG AAG CAG TGA GGA TGA T-3', 5'-AAG TAA TAT TAG GAA CCA CCT CCA-3'; **TLR4-NM 003266**: 5'-TTAG GAACCACCTCCGTGATAA-3', 5'-TTG GCC CTA AAC CAC ACA GAA-3'; **TLR4-NM 138557**: 5'-ATT TCA CAC CTC CAC GCA GG-3', 5'-ATT TCA CAC CTC CAC GCA GG-3'; **TLR4-NM 138556**: 5'-TGT CTG GAT TTC ACA CCT CCG-3', 5'-TTG GCC CTA AAC CAC ACA GAA-3'; **total TLR4**: 5'-TAT TCC CGG TGT GGC CAT T-3', 5'-GTG CTG GGA CAC CAC AAC AA-3', Taqman probe 5'-TTC GGC TTT TAT GGA AAC CTT CAT GGA TG TT-3'; **β-actin**: 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3', 5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA-3', Taqman probe 5'-CAA GAT CAT TGC TCC TCC TGA GCG CA-3'. Real-time RT-PCR reactions

were performed in triplicates using the first-strand cDNA and Platinum Taq polymerase (Invitrogen), 200 nM dNTP (Promega, Southampton, UK), 1.5–4 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 0.5 μM primers (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany), SYBR Green (Promega) and 10 nM fluorescein (Bio-Rad). Levels of TLR expression were normalized using β-actin reaction as exogenous control to obtain the relative expression value.

## 2.6. PCR products cloning

PCR products were inserted into vectors using TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Plasmids from *E. coli* culture were purified using JETPREP Plasmid Miniprep Kit (GENOMED GmbH, Löhne, Germany) and DNA concentration was assessed with Quant-iT kit (Invitrogen). Plasmid copies number was calculated and used for absolute standard curve generation.

To verify the sequence inserted in plasmid DNA, sequencing was performed using BigDye™ Primer v3.0 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and sequences were analyzed on DNA sequencer ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

## 3. Results

### 3.1. Quantitative detection of TLR4 splice variants

As previously reported, mouse TLR4 gene express several splice variants [14]. National Center for Biotechnology Information (NCBI) database contains reference sequences of four mRNA splice variants for human TLR4. All four splice variants contain exon I and exon IV while exons II and III are alternatives (Fig. 1A). We first sought to determine whether myeloid DCs express all four splice variants after LPS stimulation. To detect the presence of all four splice variants of TLR4, RT-PCR with specific primers flanking the region between exons I and IV was performed (Fig. 1A). All four splice variants were expressed by DCs at various time points after LPS stimulation. Length of PCR products corresponded with the expected length of RT-PCR products amplified from individual variants differing by the presence of exons II and III. However, attributes of an end-point RT-PCR and possible preferential amplification of short products in the sample did not allow us to perform precise quantification of individual splice variants. Thus in order to quantify the expression of TLR4 splice variants, we developed a real-time RT-PCR (RQ-PCR) detection system. As each splice variant contains unique sequence at the border of two exons, we designed primers into exon junctions to specifically detect the desired splice variant as shown in Fig. 1B. To provide an additional control that primers would not anneal to other splice variants, control plasmids containing sequences of other variants were constructed and tested (Fig. 1B). RQ-PCR conditions, annealing temperature, MgCl<sub>2</sub>, primers and polymerase concentration were optimized until the product in control samples was detected or until the difference of Ct values between sample and control plasmid was clearly distinct (Fig. 1C).



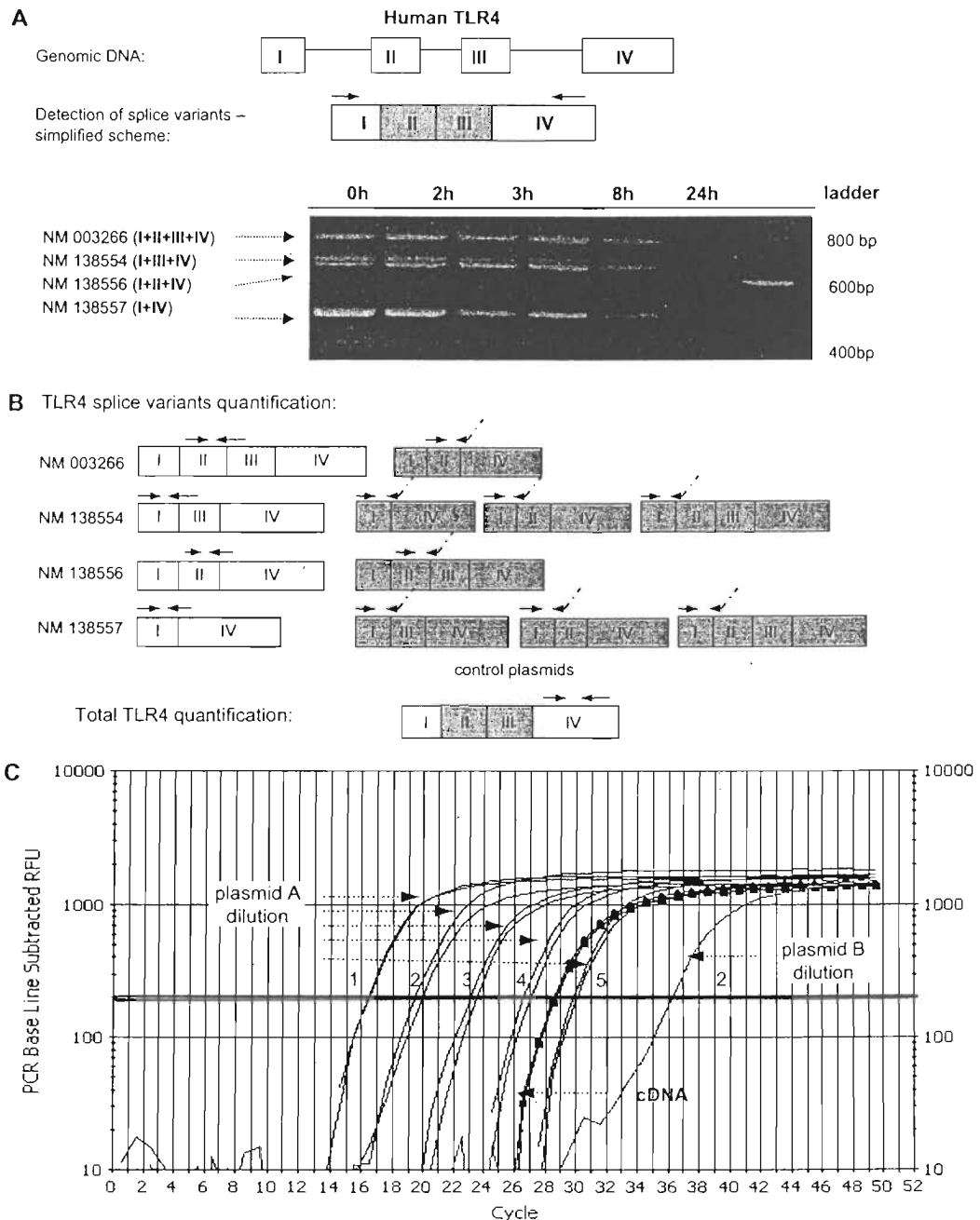


Fig. 1. (A) The exon structure of human TLR4 gene and detection of TLR4 splice variants in human monocyte-derived dendritic cells (DC) treated with 100 ng/ml LPS for indicated times. Human TLR4 contains four exons (depicted as boxes). Exons II and III are alternative (marked by shading). PCR reactions were performed with primers designed to exons I and IV. The amplified products were visualized by gel electrophoresis. (B) Schematic representation of TLR4 splice variants quantitative detection. Primers were designed to allow specific detection of individual variants. Exons I–IV are shown as boxes and arrows indicate primers, designed in exon junctions. Primer annealing in constructed control plasmids (gray color) is outlined. (C) Specificity optimization of splice variant detection by RQ-PCR. Amplification of plasmid A (serial dilutions numbered with 1–5) containing sequence of the detected splice variant (shown in black) was compared to amplification curve of a control plasmid B (shown in gray). The difference of more than 17 cycles between Ct values of reactions with plasmid A and B (using the same starting amount—dilutions 2) was reached. Annealing temperature 68 °C; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 3.2. Analysis of splice variants of TLR4 after LPS stimulation

To analyze the effect of LPS stimulation on the transcription of alternative TLR4 splice variants, kinetics of individual

TLR4 splice variants expression was examined during 24 h after monocyte-derived DC and monocytes stimulation by LPS (Fig. 2A,B). TNF production was used as a surrogate marker of LPS-mediated activation (Fig. 2B). Splice variant NM 138554 was the most expressed variant followed by NM

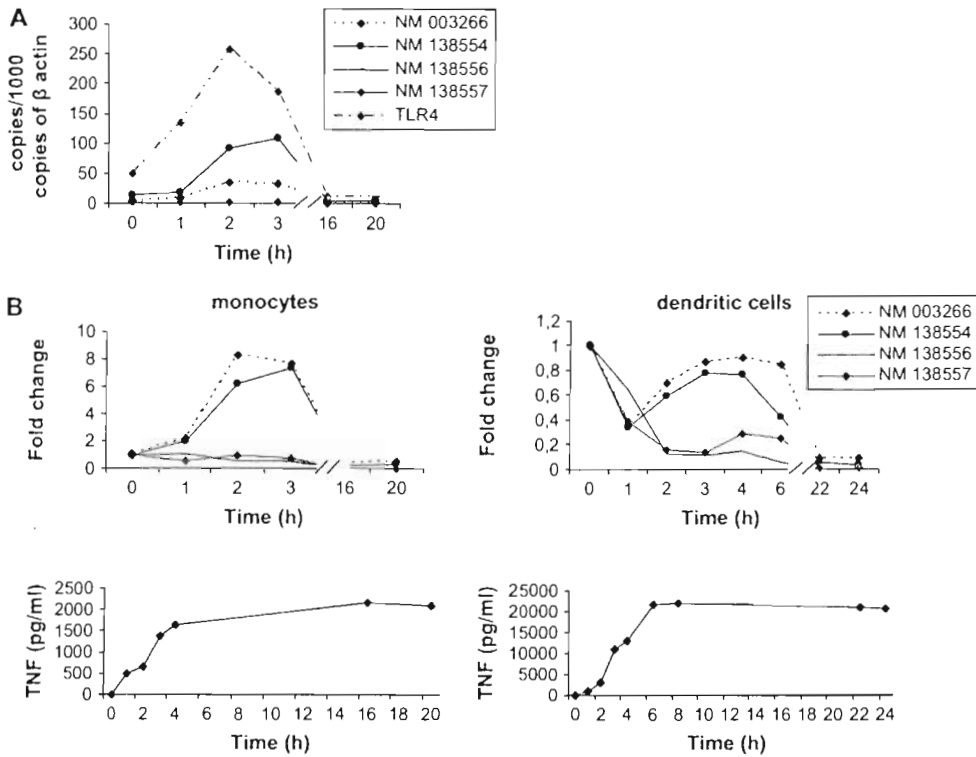


Fig. 2. Kinetics of TLR4 splice variants expression and TNF production in LPS-stimulated cells from healthy donors (LPS at concentration 100 ng/ml). (A) Absolute levels of TLR4 splice variants and total TLR4 mRNA expression in monocytes. Number of copies was normalized to number of copies of  $\beta$ -actin. (B) Relative change of TLR4 splice variants mRNA expression and LPS-induced TNF production by monocytes (left column) and monocyte-derived DCs (right column). Expression levels of all splice variants in unstimulated cells were set to 1. TNF concentration was measured in collected supernatants by ELISA. Representative data from one of three experiments are shown.

003266 splice variant. Expression of NM 138556 and 138557 was significantly lower. As expected, the highest absolute amount of copies was detected for total TLR4, using primers located in exon IV and therefore including all possible TLR4 splicing products (Figs. 1B, 2A).

RQ-PCR analysis revealed that both splice variants containing exon III (NM 003266 with exons I, II, III, IV and NM 138554 with exons I, III, IV) showed a distinct pattern of expression kinetics than the remaining exon III missing variants. After the stimulation of monocytes, expression of NM 003266 and NM 138554 quickly increased during the first three hours and then it gradually declined (Fig. 2B). A similar pattern was observed for the analysis of total TLR4 (data not shown). Expression of the two remaining splice variants NM 138556 consisting of exons I, II, IV and NM 138557 with exons I, IV gradually decreased. Interestingly, when we performed this assay in monocyte-derived DCs, mRNA expression of the two splice variants containing exon III (NM 003266 and NM 138554) changed markedly as well, but in contrast to monocytes it was transiently down-regulated within 1 h after LPS stimulation. Then, after it reached its initial levels, it further decreased (Fig. 2B). Twenty-four hours after LPS stimulation, expression levels of all splice variants in both monocytes and DCs were lower than prior to the stimulation.

### 3.3. Splice variants expression in CF and non-CF monocytes

To determine whether the expression of splice variants differs in non-CF and CF cells, monocytes separated from blood of healthy controls and CF patients were treated with LPS and kinetics of TLR4 splice variants expression was studied. For statistical analysis CF patients were grouped according to the current bacterial colonization by Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* or *B. cepacia*) (Table 1). We performed expression analysis of total TLR4 and analysis of splice variants NM 138554 and NM 003266, as we previously showed that only these splice variants were significantly increased after LPS stimulation. In all CF samples tested, we confirmed the similar pattern of expression dynamics for both TLR4 splice variants as in healthy controls (Fig. 3). We did not find any significant differences between colonized or non-colonized CF patients at any measured time point (data from the three time points showed in Fig. 4A). However, we observed significantly reduced total TLR4 and NM 138554 variant expression level after 3 h of stimulation in CF patients in comparison to the control group ( $P < 0.05$ ).

In the next step we analyzed the ability of monocytes to up-regulate expression of total TLR4 and of each splice variant after stimulation (fold change—maximum detected expression

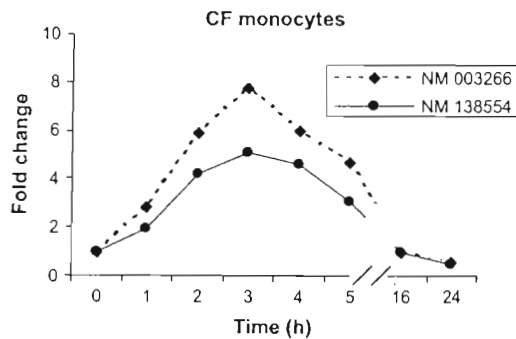


Fig. 3. Kinetics of the two dominant TLR4 splice variants in CF monocytes. Monocytes isolated from CF subjects were incubated with 100 ng/ml LPS for 24 h and expression of splice variants NM 003266 and NM 138554 was measured by RQ-PCR at indicated time points.

level was related to its respective basal level before stimulation) (Fig. 4B). Whereas we did not find a statistically significant difference in this parameter for splice variant NM 138554, an increase in the expression of full-length splice variant NM 003266 and the resulting increase in the total TLR4 expression were significantly higher in healthy controls than in CF patients ( $P < 0.05$ ). The peak of expression was reached between 2 and 6 h. It is noteworthy that monocytes of CF patients reached maximum of total TLR4 expression levels significantly later than control monocytes ( $4.4 \pm 0.96$  vs.  $3.3 \pm 0.82$  h,  $P < 0.05$ ). The same tendency was observed for NM 138554 variant (Fig. 4B).

#### 3.4. Production of IL-8 and TNF by CF and non-CF monocytes

In order to determine whether the observed changes in TLR4 expression in CF patients correlated with their activation status caused by chronic LPS stimulation in vivo, we compared the kinetics of cytokine production by CF and control monocytes stimulated by LPS. While there was no difference in the production of IL-8, the production of TNF was higher in monocytes from CF patients with a statistically significant difference in supernatants collected 4 h after LPS stimulation ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5).

#### 4. Discussion

Although many studies investigated the role of TLR4 in the immune response against pathogens, reports about the regulation of TLR4 function are relatively scarce. Few and in some cases contradictory data were published about the dynamics of TLR4 activation upon LPS binding. In all these studies, TLR expression was assessed based on the detection of exon IV, which is common to all four splice variants described in TLR4 gene (total TLR4 expression). Recent studies show that up to 42% of all human primary transcripts undergo alternative splicing, with highest incidence in genes participating in the immune and nervous system function [17]. The biologically different roles of alternatively spliced proteins are likely

to play an important role in the regulation of the immune response. Moreover, many cases of alternative splicing were found in mammalian TLR genes and their homologues in plants and *Drosophila* [11,13,18]. In this study we therefore directly monitored the expression of all TLR4 splice variants. We designed a novel method allowing for precise quantitative detection of TLR4 splice variants after LPS stimulation. In contrast to previously published results on TLR2 [11], we did not observe any variation in the splice variants in different cells (monocytes or myeloid DCs) or individuals. All four variants were constitutively transcribed. We showed an increase in the transcription of total TLR4 during the first 3 h after LPS stimulation and subsequent decline to the levels below the steady-state expression. A similar up-regulation pattern was detected by semi-quantitative PCR [19,20], Northern blot assay [21] and on the protein level by FACS [22]. However, down-regulation assessed by semi-quantitative PCR was also reported [23]. As the RQ-PCR based system allows to discriminate between expression levels of specific variants, we further show, for the first time, that the increase in total TLR4 mRNA is caused by specific up-regulation of two splice variants, both containing exon III (NM 003266 and NM 138554). This observation is particularly interesting as the sequence of one of these variants, NM 003266, contains all four exons including exon II. As suggested by Iwami et al., in analogy to studies in mice, a stop codon in exon II of human TLR4 might give rise to a small protein without transmembrane and intracellular domain [14]. Similar to the already described mouse smTLR4, such a small soluble protein might exert an inhibitory function in TLR4 signaling [14]. In contrast to monocytes, in monocyte-derived DC we observed short-term down-regulation of NM 138554 and NM 003266 expression after LPS stimulation followed by a rapid increase similar to that observed in monocytes (Fig. 2B). This transient loss of TLR4 expression by immature DC during maturation has been described previously [21] and might be associated with the mechanisms that control the level of DC stimulation. Dendritic cells represent a unique population with the crucial role in the initiation of the immune response. They secrete large amounts of pro-inflammatory cytokines and in their mature stages activate and modulate T-cell responses. In contrast to monocytes, DCs are much more potent in inducing the immune response and it is conceivable that DCs are more tightly regulated. The interesting possibility that the dynamics of TLR expression might be one of the control steps in their activation would require further investigation.

TLR4 signaling is particularly important in Gram-negative infection. In our study we used cystic fibrosis as a model of chronic infection with Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* and *B. cepacia*. The issue of TLR signaling in CF has recently gained substantial interest [24–26]. We were especially interested in the dynamic and the character of TLR4 and its splice variants expression observed in monocytes from CF patients in the initial steps of the immune response.

The kinetics of TLR4 transcript expression seems to be a particularly constant phenomenon as we repeatedly observed it in all tested subjects including the cells from CF patients.

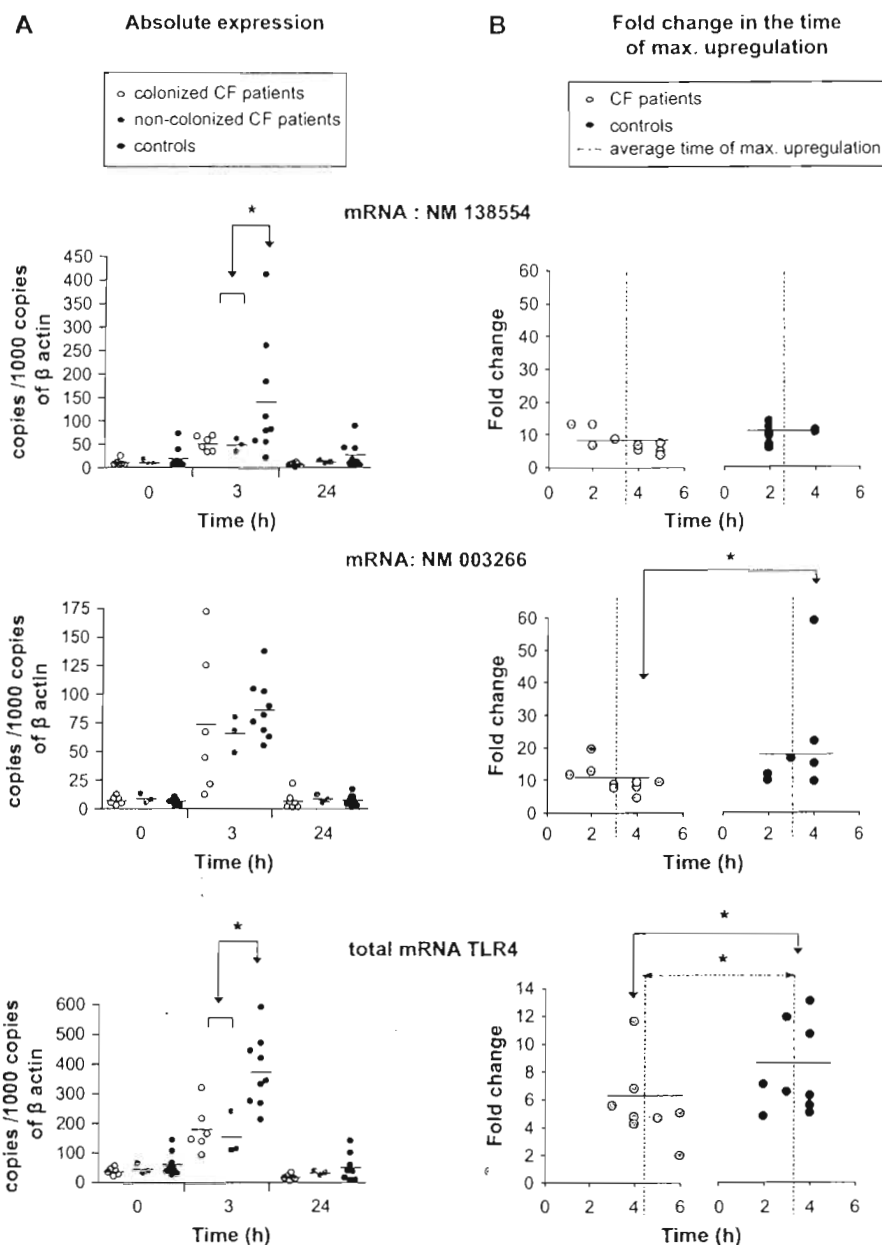


Fig. 4. Expression of TLR4 splice variants in CF patients ( $n = 9$ ) and healthy controls ( $n = 9$ ). Monocytes isolated from healthy controls and CF subjects were incubated with 100 ng/ml LPS and expression of TLR4 gene and its splice variants NM 003266 and NM 138554 was measured by RQ-PCR in different time points of stimulation. For statistical analysis non-parametric Mann–Whitney test was used. Statistical significance ( $P < 0.05$ ) is marked with an asterisk. The mean value from each group is represented by a line. (A) Comparison of absolute expression levels of TLR4 splice variants and total TLR4 in colonized or non-colonized CF patients to healthy controls in three time points after stimulation. (B) Comparison of fold change (maximum detected expression level was related to its respective basal level before stimulation) of splice variants expression in groups of patients and healthy controls. Fold change (parameter  $y$ ) is depicted in relation to the time point of maximal expression (parameter  $x$ ) in each sample. Average time of maximal expression for each group is displayed by a dashed line.

Despite chronic exposure of these cells to Gram-negative bacteria derived LPS we did not observe any differences in the dynamics of the response between chronically colonized patients and patients with intermittent infection. However, differences were evident when we compared the level of TLR4 expression induced by LPS stimulation between CF patients and controls. While splice variant NM 138554 expression level was significantly decreased in CF patients after 3 h of stimulation in comparison with healthy controls, its up-regulation (maximum

level related to basal levels before stimulation) was identical in both groups. This might be explained by the fact that the kinetics of NM 138554 up-regulation were slower in CF patients than in healthy controls ( $3.4 \pm 1.42$  vs.  $2.4 \pm 0.83$  h, respectively). Similarly, total TLR4 reached its maximal levels significantly later in CF patients than in healthy controls ( $4.4 \pm 0.96$  vs.  $3.3 \pm 0.82$  h) (Fig. 4B). These findings are in agreement with study describing a delayed LPS-induced response in CF cells [27].

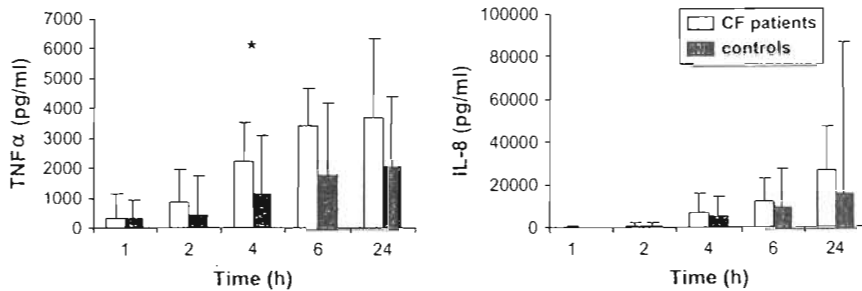


Fig. 5. Production of cytokines by LPS stimulated monocytes from CF patients ( $n = 9$ ) and controls ( $n = 9$ ). Concentration of TNF and IL-8 was analyzed in supernatants collected at indicated time points after LPS stimulation. \* $P < 0.05$  CF monocytes compared to controls. Bars represent median values with 95% confidence interval.

The most interesting characteristic for CF patients was the significantly reduced ability to up-regulate splice variant NM 003266 and the resultant lower up-regulation of total TLR4 in CF patients as compared to healthy donors (Fig. 4A,B). The difference observed in the magnitude of change of the splice variant NM 003266 is striking as it implies the possibility that such change might reflect differential regulation of TLR4 function in CF monocytes. The differences expressed in individual variants are reflected in a significant divergence in the expression of total TLR4 between CF patients and controls.

In addition to the expression of TLR4 splice variants, we also measured the production of cytokines by CF and non-CF cells. Several studies comparing cytokine production in CF patients and healthy controls reported increased production of IL-8 [27], TNF [28] or lower LPS effective concentration required for its induction, even in CF patients who had no recent history of infection. This effect was suggested to be a result of CFTR dysfunction [29]. In our settings, we did not confirm increased IL-8 production in CF patients, but we observed an increased early TNF response to LPS, with no correlation to the presence or character of bacterial colonization. Increased TNF production in CF patients suggests an enhanced susceptibility to inflammatory reaction after LPS stimulation. It is tempting to speculate that the lower up-regulation of potentially inhibitory TLR4 splice variant NM 003266 in myeloid cells from CF patients accounts for an increased response to TLR4 stimulation. This hypothesis is also in accordance with the observation of increased NF- $\kappa$ B activation in LPS-stimulated cells from CF patients [27,30]. Such results are, however, in contrast to the findings typical for endotoxin tolerance [31,32] characterized by reduced pathogen related TNF production and rather indicate excessive immune response by CF patients.

In conclusion, we describe a novel real-time PCR based approach allowing for quantitative detection of four splicing variants of human TLR4 in monocytes and dendritic cells. We describe the kinetics of TLR4 splicing variants expression after LPS stimulation of monocytes and DCs. All four TLR4 splicing variants are transcribed constitutively, with a characteristic pattern after LPS stimulation. Up-regulation of total TLR4 transcripts after LPS stimulation is due to the increase of splice variants NM 003266 and NM 138554. Splice variant

NM 003266 is particularly interesting as it might give rise to the small soluble protein with the potential inhibitory function. Typical LPS-induced up-regulation of this splice variant was significantly lower in stimulated monocytes from CF patients. Interestingly, LPS stimulation of monocytes from CF patients led to the significantly higher TNF production compared to healthy controls.

This system allowing quantitative analysis of alternative TLR4 transcripts represents a useful tool for dissecting the role of alternative splicing of TLR4 in LPS-mediated cell activation.

#### Acknowledgements

This work was supported by grant IGA NR 8458-5/2005 and by project MZ CR 00064203 from the Czech Ministry of Health, by grant 310/03/H147 from the Grant Agency of the Czech Republic and by project MSM0021620812 from the Ministry of Education.

#### References

- [1] T. Kawai, S. Akira, TLR signaling, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 816–825.
- [2] S. Akira, Mammalian Toll-like receptors, *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2003) 5–11.
- [3] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 987–995.
- [4] M.A. West, W. Heagy, Endotoxin tolerance: A review, *Crit. Care Med.* 30 (2002) S64–S73.
- [5] H. Fan, J.A. Cook, Molecular mechanisms of endotoxin tolerance, *J. Endotoxin Res.* 10 (2004) 71–84.
- [6] M. Fujihara, M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma, H. Ikeda, Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex, *Pharmacol. Ther.* 100 (2003) 171–194.
- [7] F.Y. Liew, D. Xu, E.K. Brint, L.A. O'Neill, Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 446–458.
- [8] K. Kobayashi, L.D. Hernandez, J.E. Galan, C.A. Janeway Jr., R. Medzhitov, R.A. Flavell, IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling, *Cell* 110 (2002) 191–202.
- [9] D. Wald, J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J.E. Sims, G.R. Stark, X. Li, SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 920–927.

- [10] E.K. Brint, D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A.N. McKenzie, L.A. O'Neill, F.Y. Liew, ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 373–379.
- [11] V. Haehnel, L. Schwarzfischer, M.J. Fenton, M. Rehli, Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages, *J. Immunol.* 168 (2002) 5629–5637.
- [12] M.P. Hardy, L.A. O'Neill, The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27699–27708.
- [13] E. LeBouder, J.E. Rey-Nores, N.K. Rushmere, M. Grigorov, S.D. Lawn, M. Affolter, G.E. Griffin, P. Ferrara, E.J. Schiffrin, B.P. Morgan, M.O. Labeta, Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk, *J. Immunol.* 171 (2003) 6680–6689.
- [14] K.I. Iwami, T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikachoen, Y. Yoshikai, Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling, *J. Immunol.* 165 (2000) 6682–6686.
- [15] R.K. Ernst, E.C. Yi, L. Guo, K.B. Lim, J.L. Burns, M. Hackett, S.I. Miller, Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*, *Science* 286 (1999) 1561–1565.
- [16] D. Rozkova, R. Horvath, J. Bartunkova, R. Spisek, Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors, *Clin. Immunol.* 120 (2006) 260–271.
- [17] B. Modrek, A. Resch, C. Grasso, C. Lee, Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2850–2859.
- [18] T. Jordan, S. Schornack, T. Lahaye, Alternative splicing of transcripts encoding Toll-like plant resistance proteins - what's the functional relevance to innate immunity? *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 392–398.
- [19] D. Bosisio, N. Polentarutti, M. Sironi, S. Bernasconi, K. Miyake, G.R. Webb, M.U. Martin, A. Mantovani, M. Muzio, Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide, *Blood* 99 (2002) 3427–3431.
- [20] L. Armstrong, A.R. Medford, K.J. Hunter, K.M. Uppington, A.B. Millar, Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis, *Clin. Exp. Immunol.* 136 (2004) 312–319.
- [21] A. Visintin, A. Mazzoni, J.H. Spitzer, D.H. Wyllie, S.K. Dower, D.M. Segal, Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells, *J. Immunol.* 166 (2001) 249–255.
- [22] J.S. Hadley, J.E. Wang, S.J. Foster, C. Thiemermann, C.J. Hinds, Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling, *Infect. Immun.* 73 (2005) 7613–7619.
- [23] A.E. Medvedev, A. Lentschat, L.M. Wahl, D.T. Golenbock, S.N. Vogel, Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells, *J. Immunol.* 169 (2002) 5209–5216.
- [24] C.M. Greene, T.P. Carroll, S.G.J. Smith, C.C. Taggart, J. Devaney, S. Griffin, S.J. O'Neill, N.G. McElvaney, TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 1638–1646.
- [25] A. Muir, G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M.I. Gomez, A. Van Heeckeren, A. Prince, Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30 (2004) 777–783.
- [26] K. Faure, T. Sawa, T. Ajayi, J. Fujimoto, K. Moriyama, N. Shime, J.P. Wiener-Kronish, TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins, *Respir. Res.* 5 (2004) 1.
- [27] T. Joseph, D. Look, T. Ferkol, NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 288 (2005) L471–L479.
- [28] K.D. Pfeffer, T.P. Huecksteadt, J.R. Hoidal, Expression and regulation of tumor necrosis factor in macrophages from cystic fibrosis patients, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9 (1993) 511–519.
- [29] M.M. Zaman, A. Gelrud, O. Junaidi, M.M. Regan, M. Warny, J.C. Shea, C. Kelly, B.P. O'Sullivan, S.D. Freedman, Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (2004) 819–824.
- [30] E. DiMango, A.J. Ratner, R. Bryan, S. Tabibi, A. Prince, Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2598–2605.
- [31] F. Nomura, S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, S. Akira, Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression, *J. Immunol.* 164 (2000) 3476–3479.
- [32] I. Diterich, C. Rauter, C.J. Kirschning, T. Hartung, *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3979–3987.

## Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators

Radek Spisek<sup>a,b,\*</sup>, Jitka Brazova<sup>a</sup>, Daniela Rozkova<sup>a</sup>, Katerina Zapletalova<sup>a</sup>,  
Anna Sediva<sup>a</sup>, Jirina Bartunkova<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology, 2nd Medical Faculty, Charles University, V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

<sup>b</sup> Center for the Cell Therapy and Tissue Implants, 2nd Medical Faculty and Faculty Hospital Motol,  
V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

Received 7 August 2003; received in revised form 11 December 2003; accepted 12 January 2004

Available online 1 February 2004

### Abstract

Dendritic cells (DC) become fully functional upon maturation by various stimuli. We tested whether an immunostimulatory effect of clinically used immunomodulators (Luivac<sup>®</sup>, Biostim<sup>®</sup>, Ribomunyl<sup>®</sup>, Imudon<sup>®</sup>, Bronchovaxom<sup>®</sup>) is caused by direct DC activation. We found that Luivac<sup>®</sup>, Biostim<sup>®</sup> and Ribomunyl<sup>®</sup> have a very high DC stimulatory potential *in vitro*. The level of DC activation was comparable or higher than DC maturation induced by standard maturation stimuli, Poly (I:C) or lipopolysaccharide. Treated DC had activated phenotype, reduced phagocytic activity and they induced the proliferation of allogeneic T lymphocytes. These results are important for understanding the physiology of action of these widely prescribed agents. Administration of bacterial immunomodulators should be considered with care to avoid the potential risk of inducing an autoimmune disease. They could also be used as well-defined maturing agents in the protocols used for the *ex vivo* production of DC-based vaccines for clinical trials.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Dendritic cell; Maturation; Immunotherapy; Bacterial immunomodulators

### 1. Introduction

Dendritic cells (DC) are considered to be the key antigen-presenting cells for the activation of naive T cells and for the initiation of the primary immune reaction. They exist in two functionally and phenotypically distinct states termed immature and mature. The process of maturation involves the continuous transition from an immature DC residing in peripheral tissue and sampling its environment to the mature DC in the secondary lymphatic organs. These mature DC are fully equipped for the efficient stimulation of Ag-specific T lymphocytes. Steady-state DC are immature, have high phagocytic activity, express low-levels of costimulatory molecules and have low antigen processing capacity [1]. Much of the current research effort focuses on their role in the induction and maintenance of the peripheral tolerance [2]. The process of maturation is typically initiated by the binding of conserved pathogen-derived molecules to pathogen recognition receptors (PRRs), including the family of Toll-like receptors (TLRs). This leads to the activation of the transcription of genes coding for MHC and costimulatory molecules, to the production of

inflammatory cytokines and to the switch of the surface expression of chemokine receptors [3]. The upregulation of MHC classes I and II and of costimulatory molecules synergically enhances the antigen presenting capacities of DC and their T-cell stimulatory potential. This complex process culminates in the arrival of activated DC in the T cell zone of lymph nodes where they interact with T cells. DC maturation thus has to be viewed as a process that coordinately regulates DC's antigen capturing, processing and presentation, expression of costimulatory molecules and cytokine secretion in both the time and space [4]. Description of protocols allowing for the generation of large numbers of DC from peripheral blood monocytes enabled the use of DC pulsed with various forms of tumor antigen as cellular vaccines for tumor immunotherapy [5]. Clinical trials performed on patients with advanced diseases have achieved encouraging results [6]. In the light of the recent insights into the DC maturation characteristics it appears crucial to implement the maturation step in the current protocols for DC-based vaccine generation [7,8].

Bacterial immunomodulators are widely prescribed drugs. They form a heterogeneous group of drugs usually composed of standardized lysates or extracts of different bacterial strains used for a non-specific activation of the immune system. There are administered in order to increase

\* Corresponding author.

E-mail address: [radek.spisek@lfmotol.cuni.cz](mailto:radek.spisek@lfmotol.cuni.cz) (R. Spisek).

mucosal immunity and to prevent recurrent infections of the respiratory tract. However, an exact mechanism of their action *in vivo* remains largely unexplained. In this study, we tested whether an immunostimulatory effect of a wide range of clinically used immunomodulators (Luivac<sup>®</sup>, Biostim<sup>®</sup>, Ribomunyl<sup>®</sup>, Imudon<sup>®</sup>, Bronchovaxom<sup>®</sup>) is caused by a direct effect on the activation status of DC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Media and cell cultures

Complete culture medium (CM) was used for the culture of lymphocytes and dendritic cells and consisted of RPMI (BioWhittaker, Berkshire, England) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, BioWhittaker), 2mM L-Glutamine, and 1% penicillin/streptomycin (BioWhittaker). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

For the phenotypic studies, we also used serum-free X-VIVO 15 medium (BioWhittaker), with similar results as for the RPMI + 10%FCS.

### 2.2. Generation of immature DC

Immature monocyte-derived DC were generated from buffy coats obtained from the Institute of hematology and blood transfusion in Prague. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by standard Ficoll-Paque (Amersham, Upsalla, Sweden) gradient centrifugation. 10 × 10<sup>6</sup> PBMC were suspended in 3 ml of CM and allowed to adhere to 6-well plates. After 2 h incubation at 37 °C,

the nonadherent lymphocytes were removed and adherent monocytes were cultured for 5 days in CM with 500 U/ml of GM-CSF (Leucomax<sup>®</sup>, Novartis, Sweden) and 15 ng/ml of IL-4 (Biosource, Nivelles, Belgium). Fresh cytokines were added on day 3. Day 5 immature DC were used for further tests.

### 2.3. Characteristics of DC maturation model

We tested the effect of clinically available modulators on the maturation of DC. Tested agents (Luivac<sup>®</sup>, Biostim<sup>®</sup>, Ribomunyl<sup>®</sup>, Imudon<sup>®</sup>, Bronchovaxom<sup>®</sup>) are composed of various bacterial components. Luivac<sup>®</sup>, Biostim<sup>®</sup>, Imudon<sup>®</sup> and Bronchovaxom<sup>®</sup> are standardized mixtures of bacterial strains lysates, Ribomunyl<sup>®</sup> contains ribosomal RNA from bacteria causing recurrent respiratory tract infections together with the glycoprotein from *Klebsiella pneumoniae*. Biostim<sup>®</sup> is composed of *K. pneumoniae* glycoprotein extract. Detailed composition and the range of concentrations tested for each drug are listed in Table 1.

Day 5 immature DC were seeded in 24-well plates (NUNC, Roskild, Denmark) at 1 × 10<sup>6</sup> DC/ml in CM with GM-CSF and IL-4. DC activation was achieved by the treatment with Poly (I:C) 50 µg/ml (Sigma, Prague, Czech Republic) [8], LPS 10 µg/ml (Sigma). To test the ability of immunomodulators to activate immature DC, graded doses of these agents were added to day 5 immature DC. Phenotypic and functional consequences of DC treatment with tested drugs were evaluated 48 h after stimulation together with the survival of activated DC. According to the manufacturers' information, tested drugs contained no trace amounts of LPS.

Table 1  
Composition and range of tested concentrations

Immunomodulator	Composition	Concentrations tested	Comments
Ribomunyl <sup>®</sup> (Pierre Fabre Medicament, France)	Ribosomal RNA from <i>Klebsiella pneumoniae</i> 35%, <i>Streptococcus pneumoniae</i> 30%, <i>Streptococcus pyogenes</i> 30%, <i>Hemophilus influenzae</i> 5%, membrane proteoglycans from <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50 µg to 10 mg/ml	
Bronchovaxom <sup>®</sup> (Laboratoires OM, Geneva)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes et viridans</i> , <i>Klebsiella pneumoniae et ozaenae</i> , <i>Neisseria catarrhalis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	15 µg to 350 µg/ml	Concentrations above 100 µg/ml severely reduced DC viability
Luivac <sup>®</sup> (Sankyo Pharma, Germany)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Branhamella catarrhalis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	5 µg to 1 mg/ml	Concentrations above 75 µg/ml severely reduced DC viability
Biostim <sup>®</sup> (Cassenne Laboratoire, France)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> glycoprotein	2,5 µg to 250 µg/ml	Concentrations above 50 µg/ml severely reduced DC viability
Imudon <sup>®</sup> (Solvay Pharma, France)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Candida albicans</i>	50 µg to 1 mg/ml	



#### 2.4. Flow cytometric analysis of cell surface phenotype and intracellular staining

For the phenotypic analysis, FITC or PE conjugated monoclonal antibodies (mAbs) against following molecules were used: CD40, CD80, HLA-DR, CD14, CD83, CD86, HLA-ABC (BD Pharmingen, Prague, Czech Republic). Cells were stained for 30 min at 4 °C and washed twice in PBS + 0.1% BSA. Stained DC were analyzed on FACSCalibur (Becton Dickinson) using Cell Quest Pro software. The DC population was gated according to its FSC and SSC properties and dead cells were excluded on the basis of propidium iodide (PI; Sigma) staining. Appropriate negative controls were included and at least 5000 viable DC were counted in each experiment.

#### 2.5. Cytokine detection

After 48 h of treatment with different agents, supernatants were collected and analyzed for the presence of p70 IL-12 and IL-10 by ELISA assay using a commercially available kit (R&D Systems, Abingdon, UK).

#### 2.6. FITC-dextran endocytosis

The  $2 \times 10^5$  DC were equilibrated at 37 or 0 °C for 10 min and then incubated with FITC-dextran (40 000 MW, Sigma) at a concentration of 1 mg/ml. After different times of incubation at 37 or 0 °C, cold staining buffer was added to stop the experiment. Cells were washed three times with ice cold PBS and analyzed by FACSCalibur. Nonspecific binding of dextran to DC determined by incubation at 0 °C was subtracted.

#### 2.7. Mixed lymphocyte reaction (MLR)

CD4+ T cells were positively selected using CD4 selection kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Purity of CD4 population used for further studies varied and always exceeded 93%. Graded numbers of DC activated for 24 h by tested agents were cultured in triplicates in U-bottom 96-well plates (NUNC) with  $1 \times 10^5$  CD4 T lymphocytes from allogeneic donor in a final volume of 200  $\mu$ l. Proliferation of allogeneic T-cells was determined after 4 days by uptake of  $^3\text{H}$  thymidine (0,04 MBq/100 ml) for the last 18 h.

### 3. Results

For each bacterial immunomodulator, we tested a wide range of concentrations in the preliminary experiments. Testing of higher concentrations for preparations with only weak or none DC-stimulatory effect was limited either by the inability to bring them in more concentrated aqueous solution or by the severe reduction in DC survival (see comments in Table 1). Concentrations presented throughout the study

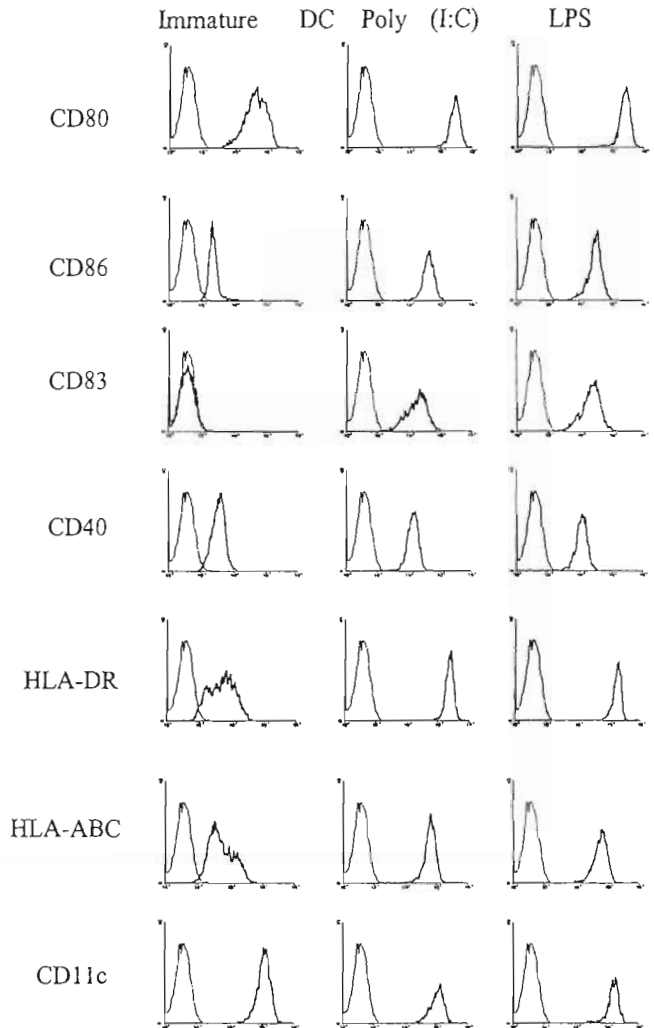


Fig. 1. Phenotype of immature DC and of DC activated for 48 h by the continuous treatment with Poly(I:C) or LPS. Day 5 immature DC were cultured for 48 h in the presence of Poly(I:C), LPS or left untreated. DC were gated according to their morphological properties and only viable cells (propidium iodide negative) were included in the final analysis. The thick lines represent the specific expression of investigated molecules, whereas the thin line represents the isotype control staining. The profiles are representative of five independent experiments with DC generated from different donors.

correspond to the optimal concentrations for agents with DC stimulatory effect. For immunomodulators without a significant effect on DC maturation, we report the maximal concentrations that did not cause severe reduction of DC viability.

Immature day 5 DC generated from peripheral blood monocytes displayed typical morphology and their phenotype correlated to their immature state with negative lineage markers for monocytes, lymphocytes and NK cells, moderate levels of CD80, CD86, HLA class I and II, and complete negativity of CD83 (Fig. 1 and data not shown). In control experiments, immature DC were stimulated for 48 h with two substances known to have a strong DC maturation-inducing capacity, LPS and Poly(I:C) (Fig. 1). Immature DC were treated with tested agents and their phe-

notypic and functional characteristics were assessed 48 h later.

3.1. Phenotypic changes 48 h after the treatment with immunomodulators

Extensive phenotypic analysis performed 48 h after initial stimulation with tested agents revealed that stimulation with Luivac®, Biostim®, Ribomunyl® led to a dramatic increase in the surface expression of costimula-

tory (CD80, CD86, CD40), maturation-associated (CD83) and antigen-presentation associated molecules (HLA-ABC, HLA-DR) molecules (Fig. 2). The degree of their up-regulation was comparable to the activation induced by LPS and Poly(I:C). We did not observe any significant maturation-associated increase in these molecules after the 48 h treatment with Imudon® and Bronchovaxom®. The viability of activated DC was assessed 48 h after the addition of activators by flow cytometry analysis (PI staining). The number of viable cells was estimated by flow cytometry

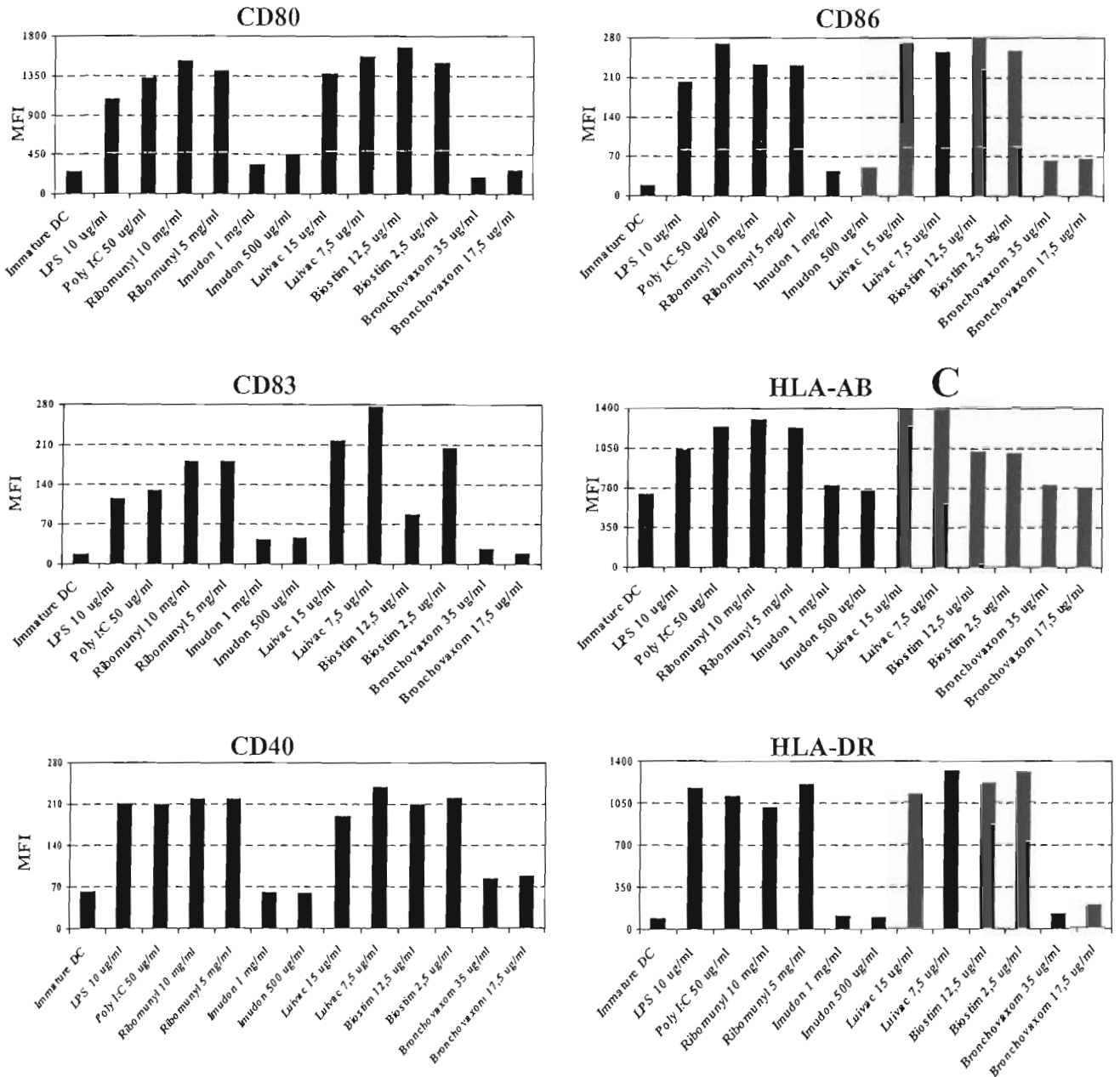


Fig. 2. Phenotypic profile of DC treated with different immunomodulators. Surface expression of various maturation-related molecules was analyzed 48 h after the initial stimulation of immature DC. Values represent mean fluorescent intensity (MFI) intensity. The level of non-specific fluorescence, obtained with an isotype-matched irrelevant mAb was set at 4 MFI. Representative results of one out of five independent experiments with different DC preparations are shown.

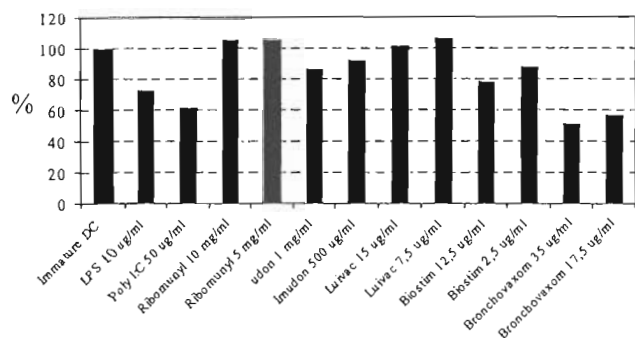


Fig. 3. Yield of viable DC 48 h after maturation compared to survival of iDC. The viability of DC was evaluated by flow cytometry. DC survival 48 h after the addition of maturing stimuli is expressed as a percentage of iDC survival. Representative results of five independent experiments are shown.

using PI negative portion of cells with DC optical characteristics. Fig. 3 shows the total number of viable mDC in culture when compared to survival of iDC without any additional stimuli. Treatment with LPS or Poly(I:C) negatively affected the yield of living cells 48 h after their addition by 20–30%, as previously reported. However, activation induced by Luivac®, Biostim®, Ribomunyl® did not lead to the significant cells loss, with 80–100% of live DC as compared to immature DC.

Similar results were obtained when using serum free medium X-VIVO 15 during the whole culture period. In this case, only Poly(I:C) was used as a positive control of DC stimulation as LPS requires the presence of the serum in the culture media (data not shown).

### 3.2. Phagocytic and T-cell proliferation inducing capacity of activated DC

Decreased phagocytic activity is a hallmark of the process of DC maturation. We thus analyzed whether stimulation of DC with tested agents changed their ability to capture Ag. This process was quantitated by means of fluorescein-conjugated dextran uptake. As shown in Fig. 4, dendritic cells treated with drugs inducing their phenotypic maturation i.e. Luivac®, Biostim® and Ribomunyl® had lower antigen uptake compared to DC treated with Imudon®, Bronchovaxom® or to immature DC.

To test whether Luivac®, Biostim® and Ribomunyl® induce maturation of DC to fully functional APC, DC from day 5 cultures that had been incubated for 24 h were tested for their capacity to stimulate allogeneic CD4 T cells. As Fig. 5 shows, DC treated by these agents stimulated proliferative responses more effectively than immature DC and as well as LPS or Poly(I:C)-treated cells did. Increase of allogeneic T-cell proliferation was apparent in all DC: T-cell ratios tested and was consistent for all donors tested. As for phenotypic profile and phagocytic capacity, Imudon® and Bronchovaxom® were inferior in their DC-activating potential and the proliferative response induced by these

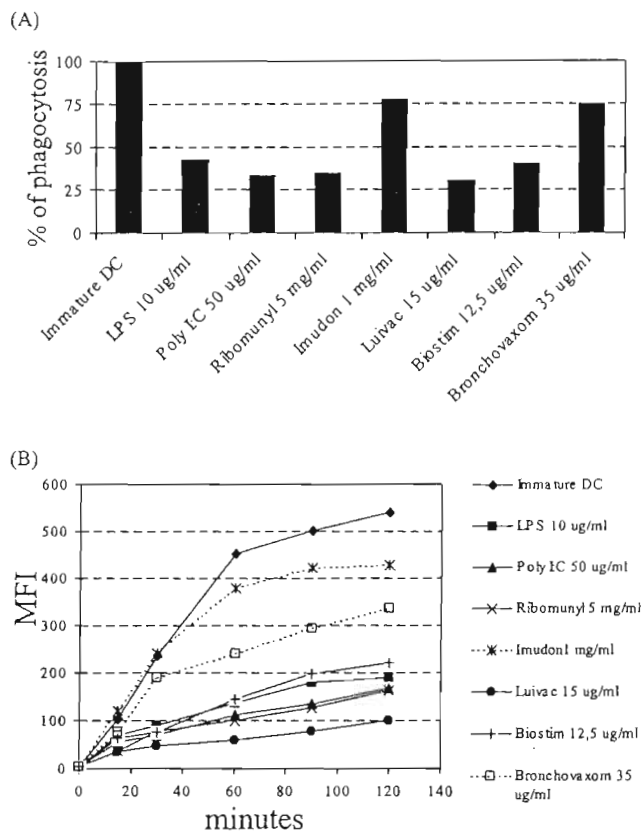


Fig. 4. FITC-dextran uptake by DC stimulated with tested immunomodulators. Immature DC were pulsed with FITC-dextran (1 mg/ml) and analyzed by FACS as described in Materials and Methods. (A) Kinetics of FITC-dextran uptake during first 2 h. Values represent mean fluorescent intensity. (B) Endocytic activity of DC stimulated for 48 h with indicated immunomodulators and incubated for 2 h with FITC-dextran. Data are expressed as a percentage of phagocytic capacity of immature DC. Representative result of three independent experiments with different DC preparations is shown.

drugs did not significantly differ from immature DC. Thus in these experiments, the T-cell stimulatory capacity of DC correlated with the state of their phenotypic maturation as reflected by the level of costimulatory and maturation associated molecules.

### 3.3. Production of IL-12 and IL-10

We finally analyzed whether tested agents induced the production of cytokines by DC.

We tested two cytokine known to be produced by activated DC that have a major impact on the nature of induced immune reaction: IL-12, known to be a potent inducer of Th1 lymphocytes, secreted as a biologically active heterodimer p70 that is composed of two subunits (p35 and p40). The second cytokine determined in this study, IL-10, appears to have an important role in the induction of regulatory T lymphocytes and thus in the maintenance of peripheral tolerance. As expected, Poly(I:C)-treated DC produced significant amounts of bioactive IL-12 with only a discrete

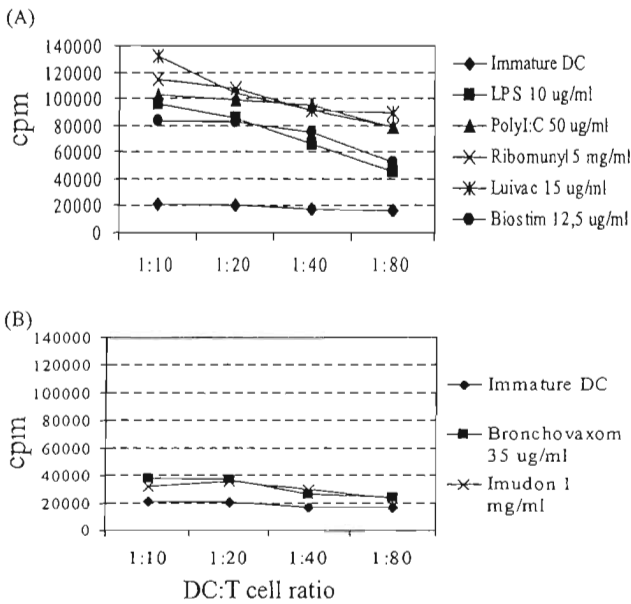


Fig. 5. T-cell allostimulatory capacity of DC treated with indicated immunomodulators. DC matured with different immunomodulators were used at graded numbers to stimulate allogeneic T lymphocytes. Proliferation was measured after 18 h of  $^3\text{H}$  thymidine incorporation on day 4. The values are a mean of triplicate. Similar results were obtained in three separate experiments. Error bars represent a SD of a triplicate.

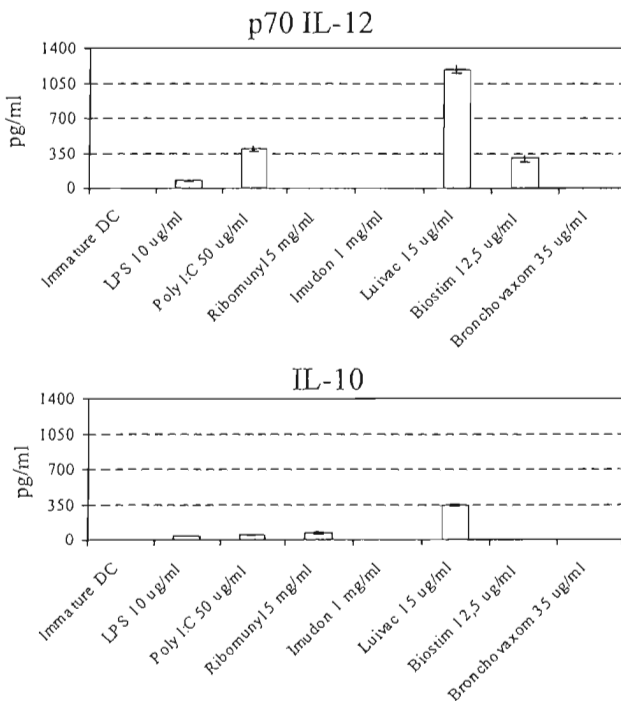


Fig. 6. Secretion of p70 IL-12 and IL-10 by mDC. Quantity of biologically active p70 IL-12 heterodimer (A) and IL-10 (B) was analyzed in supernatants from 48 h cultures of DC matured by various agents by ELISA. Experiments were done 3 times for each maturing agent. Results of one representative experiment for DC IL-4 are shown. Error bars represent a SD of a triplicate.

secretion of IL-10 (Fig. 6). LPS-treated DC produced low amounts of both IL-12 and IL-10. Luivac<sup>®</sup> treatment induced substantial p70 IL-12 production by maturing DC, this was accompanied by lower production of IL-10. Significant p70 IL-12 production, comparable to that detected for Poly(I:C) was also induced by Biostim<sup>®</sup>. None of the other agents induced significant production of either of tested cytokines.

#### 3.4. Reproducibility of the data between various donors and different batches

DC were generated from peripheral blood monocytes obtained from healthy blood donors. At least five independent experiments with DC from different donors were performed for each test. It is important to note that although the absolute values of mean fluorescence intensity, quantity of secreted cytokines or counts per minutes in MLRs varied slightly between donors, the overall tendency remained unchanged. Two different batches of each drug were used for all reported experiments with comparable results.

## 4. Discussion

Immature DC reside in peripheral tissues and recent reports suggest their role in the maintenance of peripheral tolerance against self-antigens [9]. TLRs represent probably the major mechanism by which the innate system recognizes biochemical patterns displayed by infectious invaders [10]. Their stimulation triggers the signaling pathways leading to the release of cytokines and the induction of costimulatory molecules, the hallmarks of DC maturation.

Additional DC stimulation is achieved and modulated by proinflammatory cytokines such as TNF, IL-1 $\beta$  and prostaglandine E<sub>2</sub> or by a variety of noninflammatory and pathogen unrelated factors like histamine, heparane sulfate and ATP. These auxiliary stimuli influence the nature of a maturational process and provide DC with different capacities for T cell effector subset priming [4,11,12].

Until recently, DC maturation was thought of as a binary process in which immature DC, were transformed into mature DC with optimal T-cell stimulatory capacity. However, it has become clear that different types of mature DC exist which have different functional capacities with respect to the T-cell responses that they are capable of inducing. For example, depending on the timing and type of maturation stimulus, mature monocyte-derived DC are able to drive Th1 or Th2 differentiation of naive T-cells. Both mature plasmacytoid and monocyte-derived DC have been reported to induce antigen-specific regulatory T-cell (Treg) function in CD8<sup>+</sup> T-cells, leading to the loss of cytotoxic activity in antigen-specific cells [13,14]. Antigen-specific suppression of CTL function was also observed in two healthy subjects in vivo after subcutaneous injection of immature peptide-loaded DC [15]. With respect to cancer immunotherapy, these results imply that incomplete, or

“incorrect” DC maturation could have consequences for the clinical response. Since the goal of this type of therapy is to activate and augment the number of tumour-specific CTL, DC preparations that are incapable of promoting the differentiation of naive CD8<sup>+</sup> T-cells into effector CTL are not likely to constitute an effective approach.

In this study, we investigated the effect of several immunomodulatory drugs on the maturation of immature monocyte-derived DC. We report three of these tested agents: Ribomunyl<sup>®</sup>, Luivac<sup>®</sup>, Biostim<sup>®</sup> that exert a very high DC-stimulatory potential in all investigated aspects, i.e. maturation-associated phenotypic changes, decreased Ag-capturing capacities and augmented T-cell stimulatory capacity. The level of DC activation was comparable or higher than the activation induced by Poly(I:C) or LPS. The group of clinically used immunomodulators consists of a heterogeneous group of drugs usually composed of the standardized mixture of bacterial strains accounting for respiratory tract infections. They are usually prescribed in order to increase mucosal immunity and to prevent recurrent infections of the respiratory tract. According to the current knowledge about the activation of DC by microbial products, it is not surprising that bacterial lysates or extracts induce DC maturation in vitro. More surprising is the fact that different immunomodulators induce uneven level of activation. We hypothesise that this could in part be explained by differences in their composition and due to the different technology of their production. Since all of tested agents are composed of membrane and bacterial wall lysates from both G<sup>-</sup> and G<sup>+</sup> bacteria they are likely to activate DC through the triggering of Toll-like receptors. Besides LPS and bacterial lipoproteins, *K. pneumoniae* outer protein A (OmpA) is another candidate for DC activation [16]. Ribomunyl, in addition, contains an important quantity of ribosomal RNA and can thus activate DC by means of TLR3 crosslinking [17]. A recent report has described DC-stimulatory activity of Bronchovaxom<sup>®</sup>, a drug that in our hands had only marginal effect on DC activation [18]. A possible explanation for this discrepancy is that, in our study, the concentrations of Bronchovaxom above 50 µg/ml significantly impaired DC survival with only 10% of viable cells 48 h after stimulation while the concentration of 100 µg/ml was tested in Zelle-Rieser's report, without assessing the viability. Among agents tested in our study, only Luivac activated DC to produce significant quantities of p70 IL-12. However, the concurrent administration of Ribomunyl<sup>®</sup> and IFN $\gamma$  was shown to increase IL-12 production by Ribomunyl-activated DC [19].

It is conceivable that the results obtained in this study are relevant for the in vivo action of immunomodulatory drugs, which are up to date largely unexplained. As all these drugs are administered orally they get to the intestinal lumen, where they can be delivered to the DC localized in the mucosa [20]. Their entry into DC can occur either via M cells or by a direct mechanism which involves dendrites sent by DC through the tight junctions between epithelial cells

into the intestinal lumen. Bacterial uptake then results in DC activation, migration to the secondary lymphoid organs and the initiation of an immune response. This model not only gives a rationale for the immunostimulatory effect of these drugs but it also emphasizes that the prescription of these agents should be done with caution. Although it is difficult to estimate the concentrations of bacterial immunomodulators that are achieved in the small intestine, we believe that they should be prescribed carefully in well-founded indications in order not to increase the risk of the development of an autoimmune disease in predisposed patients.

DC-based vaccines represent a very attractive vector for anti-cancer immunotherapy and a number of studies were reported in various cancers with some encouraging results. The protocols used for in vitro production of DC vaccines used different strategies to achieve some degree of DC maturation. A recent analysis of pooled data from the clinical trials that included metastatic melanoma patients treated with DC has shown that the addition of TNF during the generation of DC vaccines was strongly correlated with favorable outcome of the treatment [21]. DC maturation state is therefore an important parameter for the clinical effectiveness of DC-based immunotherapy and DC maturation step should be optimized in future trials in order to improve clinical responses. High capacity of several bacterial immunomodulators to initiate DC maturation and the fact that they are readily available in Good Manufacturing Practice conditions makes of them the relevant candidates to be tested in the protocols for DC vaccine production. A potential obstacle for the use of bacterial immunomodulators as clinical-grade maturation agents in immunotherapy of tumor diseases could lie in the high quantity of bacterial antigens loaded on activated DC. High density of bacteria-derived antigens could thus mask only weakly immunogenic tumor antigens. Whether this could impede the process of the induction of the immune response against tumor cells requires further investigation.

## Acknowledgements

This study has been supported by a Czech Ministry of Health grant IGA MZ 7537-3, the projects LN 00 A065, VZ 111300001 from the Ministry of Education and VZ 00000064203 from the Ministry of Health.

## References

- [1] Banchereau J, Briere F, Caux C. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
- [2] Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001;22(7):394–400.
- [3] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1(2):135–45.
- [4] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106(3):263–6.

- [5] Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196(2):137–51.
- [6] Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000;18:245–73.
- [7] Spisek R, Chevallier P, Morineau N, Milpied N, Avet-Loiseau H, Harrousseau JL, et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res* 2002;62(10):2861–8.
- [8] Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Mefflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50(8):417–27.
- [9] Dhodapkar MV, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 2002;100(1):174–7.
- [10] Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216.
- [11] Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20(12):561–7.
- [12] Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunology* 2000;1(4):311–6.
- [13] Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195(6):695–704.
- [14] Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2001;2(11):1010–7.
- [15] Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bharwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193(2):233–8.
- [16] Jeannin P, Renno T, Goetsch L, Miconnet I, Aubry JP, Delneste Y, et al. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* 2000;1(6):502–9.
- [17] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732–8.
- [18] Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Thurnher M. A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD83+ immunostimulatory dendritic cells. *Immunol Lett* 2001;76(1):63–7.
- [19] Boccaccio C, Jacod S, Kaiser A, Boyer A, Abastado JP, Nardin A. Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cells. *J Immunother* 2002;25(1):88–96.
- [20] Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2(4):361–7.
- [21] McIlroy D, Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52(10):583–91.