

Projekt Forskerspirer 2016, SUND

MBL-MANGEL, SVAMPEINFEKTION OG KNOGLEMARVS- TRANSPLANTATION



Cecilie Holm Christiansen

Gammel Hellerup Gymnasium

Indholdsfortegnelse

INTRODUKTION	3
PROBLEMSTILLING	3
MBL-MANGELS GENETIK	4
KONSEKVENSER VED MBL-MANGEL (KNOGLEMARVSTRANSPLANTATIONER)	4
METODE	5
INVASIV MYKOSE	5
ELISA-METODEN.....	5
DET EKSPERIMENTELLE	6
BUDGET	7
KONKLUSION	7
TAK TIL	7
LITTERATURLISTE	9
ARTIKLER	9
INTERNET	9

Introduktion

MBL er en forkortelse for ”mannose bindende lektin”, hvilket er et protein i blodet, der kan binde sig til kulhydraterne mannose og N-acetyl glucosamine ved deres specifikke placering på overfladen af forskellige bakterier, virus og svampe som *Aspargillus fumigatus*. MBL’ets binding til netop disse igangsætter komplementsystemet, som er en reaktionskæde af proteiner i blodet, der bekæmper mikroorganismene. Personligt er jeg ramt af immundefekten, hvilket har vækket min interesse for dette emne. Min MBL-værdi er målt til 18, hvilket betyder, at jeg har 18 µg/L blod, mens normalen er på 500. Dette skyldes en genetisk, homozygot fejl på kromosom nr. 10 – ved en heterozygot fejl ville værdien være over 50¹. Ifølge de læger, jeg siden diagnosen har besøgt, er opdagelsen af MBL-mangel så ny, at en del læger faktisk ikke kender til selve immundefekten, og derfor lever en del mennesker i uvished om årsagen til, at de hele tiden må lægge sig syge. Defekten findes hos ca. 10% af den danske befolkning og forårsager infektioner, specielt hvis det også er en anden genfejl i immunsystemet tilstedet samtidig. For MBL defekte patienter med symptomer er det vigtigt at holde så mange bakterier væk fra kroppen, som muligt, samt ikke at omgås folk, der viser tegn på fx at have en virus i kroppen. Derudover er ekstra forsigtighed mht. bl.a. hygiejne hos patienter som er generelt immundefekte fx hos patienter som skal have foretaget en knoglemarvstransplantation.

I sig selv er MBL-mangel ikke en sygdom, og forårsager blot ufarlige infektioner. Disse er ofte virus- og luftvejsinfektioner, hvilket resulterer i, at MBL-patienter ofte må lægge sig syge. MBL-patienter er altså mere udsatte for bl.a. influenzer, vira og mellemøreinfektioner, men med mindre sygdommen kombineres med en anden faktor, er den hverken alvorlig eller dødelig. MBL-mangel kan i nogle tilfælde være en fordel, bl.a. ved hjerneblødninger², og tilførsel af MBL i blodet er dermed ikke nødvendigvis en ideel kur mod immundefekten. Den lave MBL-værdi resulterer i en lavere aktivering af komplementsystemet, hvilket giver mindre inflammation.

Problemstilling

Jeg vil i mit forsøg undersøge sammenhængen mellem værdien af MBL-koncentrationen i blodet og tilstanden hos patienter, der har fået en invasiv svampeinfektion som følge af en knoglemarvstransplantation.

Da MBL og dermed komplementsystemet er det første som igangsættes ved en mikroorganismes angreb på kroppen, og infektion fra svampen *Aspargillus fumigatus* er noget man ofte ser som en komplikation hos patienter der har fået en knoglemarvstransplantation pga. leukæmi, er det min

¹ <http://mbl-mangel.dk/om-mbl-mangel/genetik/>

² Fluri, Felix m.fl.: *Mannose-Binding Lectin Deficiency Is Associated With Smaller Infarction Size and Favorable Outcome in Ischemic Stroke Patients.*

hypotese at patienter der i forvejen har et lavt MBL niveau er mere følsomme for *Aspergillus fumigatu*-infektionen end patienterne med et højt MBL-niveau.

MBL-mangels genetik

MBL-mangel skyldes en genfejl lokaliseret på kromosom nr. 10. MBL2-genet, som findes hos mennesker, består af exon 1-4. Den genetiske fejl skyldes en genetisk variation enten på codon nr. 52, 54 eller 57 i exon 1. Genfejlen på codon 54 (GGC til GAC) er den hyppigste i den danske befolkning og medfører at aminosyren glysin udskiftes med asparaginsyre. Det normale GGC-allel kaldes allel A, mens GAC-allelet kaldes allel B. På codon nr. 57 forekommer i nogle tilfælde en substitution af glysin med glutaminsyre, hvor strukturen ændres fra GGA til GAA. Dette allel navngives allel C, og har, uafhængigt af allel B, også effekt på koncentrationen af MBL i blodet. C-allelet er hyppigt forekommende hos mennesker med afrikansk baggrund. Den tredje variation sidder i codon 52 og kaldes D hvor en variation fra CGT til TGT fører til at en udskiftning af arginin med cystein. Allelerne B, C og D angiver hvilken variant af MBL-mangel der er tale om. Disse slås ved statistiske analyser ofte sammen under betegnelsen O, hvilket jeg også vil gøre i mit forsøg³.

Konsekvenser ved MBL-mangel (knoglemarvstransplantationer)

Selvom MBL-mangel i sig selv ikke har fatale konsekvenser, kan MBL-mangel i forbindelse med andre sygdomme give komplikationer. Dette ses fx ved lungesygdommen cystisk fibrose, hvis påvirkning af MBL-mangel blev testet af bl.a. Peter Garred i et forsøg, hvis resultater blev udgivet i *The Journal of Clinical Investigation* i 1999⁴. Her fremgik det, at lungefunktionen hos patienter, der led af både cystisk fibrose og MBL-mangel, var betydeligt værre, samt at disse patienters forventede levetid blev reduceret med otte år.

Mangel på MBL forventes at have indflydelse på risiciene ved knoglemarvstransplantationer, idet et nedsat immunforsvar er meget sensitivt over for svampeinfektioner. Det, grundet manglen på MBL, i forvejen defekte immunforsvar svækkes yderligere af knoglemarvstransplantationen, hvilket øger risikoen for svampeinfektioner, ofte forårsaget af svampen *aspergillus fumigatus*, som er en art af skimmelsvamp. MBL er den primære igangsætter af komplementsystemet ved påvirkning af *aspergillus fumigatus*⁵, og MBL-patienter forventes dermed at være i større risiko for svampeinfektioner med alvorlige følger. Svampen kan befinde sig i bl.a. jord, planter, kompost,

³ Garred, Peter m.fl.: *Mannose-binding lectin and its genetic variants*.

⁴ Garred, Peter m.fl.: *Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis*.

⁵ Garred, Peter m.fl.: *Mannose-binding lectin (MBL) is the main complement activator on Aspergillus fumigatus conidia under immunocompromised*.

husstøv og endda i madvarer, og patienten er dermed næsten konstant eksponeret for svampen, som sjældent har konsekvenser for det velfungerende immunforsvar. Svampen påvirker typisk luftvejene, og kan hos immundefekte, hvor svampen er patogen, sprede sig til de indre organer og medføre komplikationer som kroniske infektioner, samt kræft og leverskader, som følge af *aspergillus*' produktion af aflatoksin. I et sådant tilfælde er svampeinfektionen invasiv, og infektionen kaldes *invasiv mykose*. Ved invasiv mykose befinder infektionen sig i blodbanerne, og kan dermed spredes til kroppens organer.

Metode

Patienter der, som følge af en knoglemarvstransplantation, har fået en svampeinfektion (invasiv mykose), skal undersøges, og sammenlignes med knoglemarvstransplanterede patienter som ikke har fået svampeinfektion. Det skal undersøges, om deres tilstand har en sammenhæng med patienternes MBL-værdier, og om MBL-manglen dermed har en indflydelse på risikoen for en invasiv svampeinfektion. Da immunforsvaret svækkes af en knoglemarvstransplantation er patienten i forvejen i høj risiko for en svampeinfektion, og det er derfor muligt, at mangel på MBL ikke har spillet nogen rolle. MBL-mangel forventes dog at øge risikoen, idet MBL er den primære igangsætter af komplementsystemet ved påvirkning af svampen *aspergillus fumigatus*.

Forsøget skal laves på 200 patienter, 100 i hver gruppe, for at få et repræsentativt datasæt, som kan laves en statistisk analyse på. Patienterne skal være i forskellige aldersgrupper med lige dele patienter i hver, så alderen ikke bliver en faktor, der skal medtages i overvejselsen af resultaterne. Derudover skal der være lige dele patienter af hvert køn, så dette også bliver en kontrolleret variabel. Selvom *aspergillus fumigatus* kan smitte gennem berøring, bliver de sanitære forhold for patienterne ikke klassificeret som en afhængig variabel, idet svampen næsten befinder sig over alt.

Invasiv mykose

Invasiv mykose diagnosticeres ofte på mistanke, især hos immundefekte patienter. Hvis diagnosen stilles på mistanke kan behandlingen dog ikke starte med det samme, idet svampen skal identificeres før valget af medikament kan tages. Diagnosen kan derudover stilles ved dyrkning af blodprøver fra patienten, hvor serologiske prøver ofte er effektive. Biopsier (vævsprøver) fra lungerne kan også bruges til diagnosticering af invasiv mykose.

Patienterne med invasiv mykose er i forvejen diagnosticerede, og Rigshospitalet stiller disse data til rådighed.

ELISA-metoden

Til måling af koncentrationen af MBL i patienternes blod, anvendes ELISA-metoden. ELISA står for *enzymme linked immunosorbent assay*, og er en metode til bl.a. påvisning af antistof og antigen,

og kan fx bruges til diagnosticering af en virus- eller bakteriesygdom. ELISA-metoden skal i forbindelse med dette forsøg anvendes til påvisning af et antistof, MBL. Her anvendes metoden *sandwich ELISA*, hvor anti-MBL-antistoffer kommer i brøndene i en mikrotiterplade, hvortil MBL-molekylerne kan binde sig. Blodprøven fra patienten tilsættes brøndene, og hvis der er MBL til stede, bindes det til anti-MBL-antistofferne. Derefter skylles ubundne proteiner væk, og et nyt antistof tilsættes. Dette antistof har et enzym koblet på sig, og binder sig til den bundne MBL. Ubundet antistof vaskes af, og et nyt stof tilsættes. Dette stof omdannes af det koblede enzym til farvestof, og opløsningens farve bliver hermed indikator for mængden af MBL. Om MBL-koncentrationen er høj eller lav, kan ses med det blotte øje, og en mere specifik værdi kan måles med et spektrofometer, idet opløsningen er farvet, og absorptionen dermed kan måles som udtryk for MBL-værdien.

ELISA-metoden måler en MBL-koncentration, og angiver ikke om der er tale om en punktmutation på codon 52, 54 eller 57 – altså om der er tale om MBL-variant B, C eller D. I dette forsøg skelnes dermed ikke mellem varianterne, der fokuseres i stedet på MBL-koncentrationens påvirkning på sandsynligheden for invasiv mykose.

Det eksperimentelle

Forsøget udføres ved blodprøvetagning til måling af MBL-koncentrationen hos de forskellige grupper af patienter. Det skal derefter undersøges, om disse koncentrationer har en sammenhæng med invasiv mykose.

Fase 1:

Patienterne udvælges. Her skal udvælges patienter, som har fået foretaget en knoglemarvstransplantation, både med og uden invasiv mykose. Patienterne skal være lige dele mænd og kvinder inden for hver gruppe, samt lige dele fra forskellige aldersgrupper. Da MBL-koncentrationen er medfødt, vil jeg undersøge patienter, som allerede er har fået en knoglemarvstransplantation, idet MBL produceres i leveren, og transplantationen dermed ikke vil påvirke det medfødte niveau.

Fase 2:

Patienternes journaler gennemgås, og deres data noteres og sættes i et regneark.

Fase 3:

Blodprøver. Nedfrosne blodprøver undersøges for MBL niveau med ELISA test. Denne test laves i laboratoriet på Rigshospitalet, som vil stille deres faciliteter til rådighed.

Fase 4:

Bearbejdning af resultater. Koncentrationen af MBL i patienternes blod sammenlignes med tilstanden hos patienterne både med og uden invasive svampeinfektioner. Sammenhængen mellem MBL-værdi og svampeinfektionen kan vise sig ikke at findes, hvilket kan påvises via

kontrolgruppen. Denne gruppe patienter, som ikke er ramt af svampeinfektioner, kan vise sig at have lave MBL-værdier, hvilket vil afkræfte hypotesen om MBL-mangels forhøjelse af risikoen for en svampeinfektion efter en knoglemarvstransplantation. Ved at kigge på resultaterne fra begge grupper patienter, kan sandsynligheden, som patienter med MBL-mangel har for at få en svampeinfektion som følge af en knoglemarvstransplantation, udregnes.

Fase 6:

Efterarbejde. Hvad kan resultaterne bruges til i praksis?

Budget

Anti-MBL-antistoffer til måling af 200 prøver, købt fra Bioporto	5000 kr.
ELISA-plader, købt fra Nunc	1000 kr.
Prøveglasser, 200 stk.	2000 kr.
Produktion af rekombinant MBL	2000 kr.
Søjler til oprensning	3000 kr.
Buffere	2000 kr.
MBL komplement funktionskit fra Euro Diagnostica	5000 kr.
Sum	20000 kr.

Hjælp til laboratoriearbejde og bearbejdning af resultaterne stilles gratis til rådighed.

Konklusion

Hvis en patient med MBL-mangel, der har fået en knoglemarvstransplantation, påvirkes i hyppigere og højere grad af invasiv mykose end en patient, med et velfungerende immunforsvar, bør enhver patient testes for MBL-mangel inden transplantationen. Hermed kender lægerne til den forhøjede risiko for den invasive svampeinfektion med alvorlige følger, og opmærksomheden på symptomerne øges hos både læge og patient. Da svampeinfektionen også er smitsom gennem berøring, skal hygiejnen hos personalet omkring patienten også optimeres.

Tidlig behandling af invasiv mykose kan være afgørende for patientens liv, og en sen start på behandlingen giver en dårlig prognose. Diagnosen er dermed vigtig at få stillet hurtigt, og hvis MBL-mangel viser sig at øge risikoen for invasiv mykose betydeligt, kunne en undersøgelse for MBL mangel hos alle, der skal have fortaget en knoglemarvstransplantation, foretages før operationen.

Tak til

Først og fremmest vil jeg takke min forskerkontakt, Peter Garred, som er klinisk professor og overlæge på Rigshospitalets Klinisk Immunologiske Afdeling. Han har været en enormt stor hjælp gennem hele forløbet, specielt med design af forsøget og budgetlægning. Jeg blev anbefalet at skrive til Peter af flere forskere, da jeg i begyndelsen af forløbet skrev rundt for at finde en forskerkontakt. Her fik jeg at vide, at Peter var ”verdensmester i MBL” – og det er jeg ikke i tvivl om!

Derudover vil jeg takke min koordinator, Dorthe Mondrup, for hendes store indsats for at holde alle forskerspirer fra Gl. Hellerup Gymnasium motiverede, samt hendes engagement og interesse i hvert af vores projekter. I forlængelse af dette vil jeg takke mine ”med-spirer” fra gymnasiets forskerspirergruppe, som jeg har delt projektets op- og nedture, frustrationer og succeser med.

Litteraturliste

Artikler

Degn, Søren E. m.fl.: *The lectin pathway and its implications in coagulation infections and auto-immunity*. I: Current Opinion in Organ Transplantation, 02.2011, s. 1-7. Internetadresse: http://journals.lww.com/co-transplantation/Abstract/2011/02000/The_lectin_pathway_and_its_implications_in.5.aspx Besøgt d. 17.10.2016 (Artikel)

Fluri, Felix m.fl.: *Mannose-Binding Lectin Deficiency Is Associated With Smaller Infarction Size and Favorable Outcome in Ischemic Stroke Patients*. I: plos.org, 21.06.2011, s. 1-6. Internetadresse: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021338> Besøgt d. 22.10.2016 (Artikel)

Garred, Peter m.fl.: *Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis*. I: The Journal of Clinical Investigation, 15.08.1999, s. 1-7. Internetadresse: <http://www.jci.org/articles/view/6861> Besøgt d. 17.10.2016 (Artikel)

Garred, Peter m.fl.: *Mannose-binding lectin (MBL) is the main complement activator on Aspergillus fumigatus conidia under immunocompromised conditions*. I: The Journal of Immunology, 01.05.2016, s. 1-1. Internetadresse: http://www.jimmunol.org/content/196/1_Supplement/63.6.short Besøgt d. 17.10.2016 (Artikel)

Garred, Peter m.fl.: *Mannose-binding lectin and its genetic variants*. I: nature.com, 05.01.2006, s. 1-10. Internetadresse: <http://www.nature.com/gene/journal/v7/n2/abs/6364283a.html> Besøgt d. 17.10.2016 (Artikel)

Nuytinck, Lieve og Fred Shapiro: *Mannose-binding lectin: laying the stepping stones from clinical research to personalized medicine*. I: Future Medicine, 12.2004, s. 35-52. Internetadresse: <http://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.1517/17410541.1.1.35> Besøgt d. 17.10.2016 (Artikel)

Ricklin, Daniel m.fl.: *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. I: nature.com, 19.08.2010, s. 1-12. Internetadresse: <http://www.nature.com/nj/journal/v11/n9/full/nj.1923.html> Besøgt d. 17.10.2016 (Artikel)

Internet

Biotech Academy: ELISA. Udgivet af Biotech Academy.
Internetadresse: <http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasiale-projekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/elisa> - Besøgt d. 18.10.2016 (Internet)

MBL-mangel.dk: MBL-mangel.dk. Udgivet af Foreningen MBL-mangel.
Internetadresse: <http://mbl-mangel.dk> - Besøgt d. 17.10.2016 (Internet)

US national library of medicine: mannose-binding lectin deficiency. Udgivet af USA.gov.
Internetadresse: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/mannose-binding-lectin-deficiency#diagnosis> -

Besøgt d. 17.10.2016 (Internet)