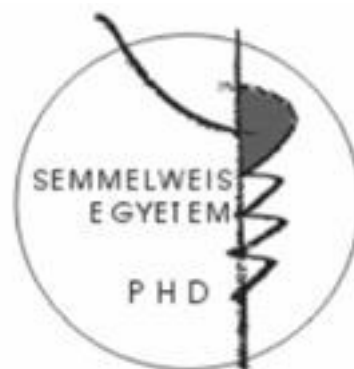


Jelátviteli folyamatok vizsgálata neutrofil granulocitákban és az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában

Doktori tézisek

Dr. Németh Tamás

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Helyes Zsuzsanna egyetemi docens, az MTA doktora
Dr. Cervenak László tudományos főmunkatárs, Ph.D.

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prohászka Zoltán tudományos főmunkatárs, az MTA doktora
Dr. Nagy György egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2012

ÖSSZEFOGLALÁS

A neutrofil granulociták működése nélkülözhetetlen a szervezet egészséges működéséhez: mind funkciócsökkenésük (fertőzések révén), mind túlműködésük (például egyes autoimmun folyamatokban) komoly zavarokat eredményezhet. PhD-munkám során neutrofil granulociták jelátvitelével és a vizsgált molekulák autoimmun ízületi gyulladásban betöltött szerepével foglalkoztam.

Első kísérleteimben egy először általunk jellemzett p190RhoGAP-hiányos egértörzs segítségével kimutattam, hogy a p190RhoGAP nem nélkülözhetetlen résztvevője a neutrofilek β_2 -integrin-függő és -független folyamatainak, valamint a neutrofil- és β_2 -integrin-függő autoimmun ízületi gyulladásnak.

További vizsgálataim során azt találtam, hogy az Fc-receptor (FcR) γ -lánc esszenciális a neutrofilek Fc γ -receptor-mediált in vitro sejtválaszaihoz. Struktúra-funkció analízis révén bizonyítottam, hogy az FcR γ -lánc ITAM-tirozinjai nélkülözhetetlenek ezekben a folyamatokban, valamint az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában.

A neutrofilek Fc γ -receptor jelpályájának további vizsgálata során kimutattam, hogy a jelátvitel a Syk tirozin-kináztól disztálisan kettéválk egy CARD9-független, korai sejtválaszokhoz és egy CARD9-függő, NF- κ B-mediált késői sejtválaszokhoz vezető útvonalra. A CARD9 az autoantitest-indukált ízületi gyulladásban is fontos komponensnek bizonyult, melynek hátterében feltehetően a neutrofilek és makrofágok csökkent citokin-termelése áll.

Végül kimutattam, hogy a tirozin-kináz gátló dasatinib nem befolyásolja lényegesen a β_2 -integrinek inside-out szignalizációját és a baktériumok neutrofilek általi fagocitózisát.

A neutrofil granulociták működésében szerepet játszó molekulák feltérképezése hozzásegít minket a gyulladás patogenezisének pontosabb megértéséhez és hozzájárulhat a gyulladásos kórképek (például autoimmun folyamatok) egy újabb, jövőbeni farmakológiai terápiájának a kidolgozásához.

BEVEZETÉS

A neutrofil granulociták nélkülözhetetlen résztvevői a szervezet immunvédekezésének. A nyugalmi körülmények között a vérben keringő neutrofilek a behatoló kórokozók hatására elhagyják az érpályát és a szövetekbe vándorolnak, ahol sejtfelszíni receptoraik közvetítésével aktiválódni képesek. Az aktiválódott neutrofilek hatékony effektor sejtek: szuperoxid-termelésük, granulum-tartalmuk leadása és fagocitotikus képességük révén a mikroorganizmusok közvetlen eliminálását, citokin- és kemokin-termelésük által pedig további immunsejtek helyszínre toborzását, illetve azok működésének módosítását végzik. A neutrofilek működése térben és időben szigorúan szabályozott folyamat, melynek zavara autoimmun szövetkárosítást eredményezhet.

Az autoimmun betegségek krónikus, progresszív kórképek, melyek a nyugati társadalmak lakosságának közel 3%-át érintik és komoly halálóki tényezők. Az autoimmun kórképek egyik legnagyobb csoportját az autoimmun ízületi gyulladások alkotják, melyek közül a legismertebb a reumatoid arthritis. Bár az autoimmun ízületi gyulladások elterjedtségük, krónikus lefolyásuk és az érintettek fokozódó mozgáskorlátozottsága révén komoly terhet jelentenek a betegeknek és a társadalomnak, a betegségek terápiája mindezidáig nem teljesen megoldott. Mindez felveti az igényt további terápiás szerek kifejlesztésére új célmolekulák azonosításán keresztül, melyhez azonban jobban meg kell ismerni a gyulladás patomechanizmusát. Mivel számos irodalmi adat utal arra, hogy a neutrofil granulociták fontos szereplői egyes autoimmun kórképeknek (ami felveti, hogy a neutrofilek működésének befolyásolása esetleg terápiás cél is lehet a jövőben), kísérleteinkben elsősorban ezen sejttípussal foglalkoztunk.

Az immunműködésekben számos receptor vesz részt, melyek jelpályájuk révén összekapcsolják a kiindulási jeleket a végrehajtó sejtműködésekkel. A klasszikus immunreceptorok közé a limfociták antigén-receptorai és az Fc-receptorok tartoznak. Általánosságban elmondható, hogy az immunreceptorok

jelátvitelében a receptor-komplexben található tirozin-tartalmú ITAM motívumtól kiindulva számos tirozin-kináz szerepel és a jelpálya aktiválódása végül különböző transzkripciós faktorokon (például az NF- κ B alegységeken) végződve hozza létre a megfelelő sejtválaszokat. A neutrofil granulociták felszínén nagy számban találhatóak az immunglobulin G megkötésére képes Fc γ -receptorok, melyek jelátvitele a klasszikus immunreceptorokéval mutat hasonlóságot. Ugyanakkor nem ismert, hogy az aktiváló Fc γ -receptorok ligandkötő láncához sóhíddal kapcsolódó ITAM-tartalmú segédlánc, az FcR γ -lánc szükséges-e és amennyiben igen, akkor pontosan miként neutrofilek Fc γ -receptor jelátviteléhez. Nem tisztázott továbbá, hogy az NF- κ B szerepel-e a jelátvitelben, valamint, hogy a dendritikus sejtek ITAM-szerű jelátvitelében szereplő, az NF- κ B nukleáris transzlokációjához vezető intracelluláris adapter fehérje, a CARD9 részt vesz-e a folyamatban.

A heterodimer integrinek olyan sejt-sejt/sejt-extracelluláris mátrix kapcsolóelemek, adhéziós molekulák, melyek a sejt belsejéből érkező szignálok hatására konformációs és membrán-lokalizációs változáson mennek keresztül. Ez az „inside-out” szignalizációnak nevezett folyamat lehetővé teszi a ligandkötést és a további jelátvitelt („outside-in” szignalizáció). Fagocitasejtek β_2 -integrin jelpályája egy összetett, a mai napig nem minden elemében tisztázott folyamatsor, melyben az Src-típusú tirozin-kinázok szerepe tagadhatatlan. Az Src-kinázok hatásaikat részben kis G-fehérjéken keresztül fejtik ki. A kis G-fehérjék (például a Rho) jellegzetes aktivációs ciklussal rendelkeznek és szabályozásukban jelentősek a GTP-áz aktiváló fehérjék (a GAP-ok). Mivel a p190RhoGAP fibroblasztokban és idegsejtekben fontos Src-szubsztrátnak, továbbá ezen sejtek integrin-függő folyamatai során jelentős szereplőnek bizonyult, felmerült bennünk, hogy a p190RhoGAP esetleg szerepel a neutrofil granulociták β_2 -integrinek által szabályozott működéseiben.

A tirozin-kinázok számos sejtműködést szabályoznak a szervezetben a sejtek proliferációjától az immunműködésekig. Míg ezen enzimek megfelelő aktivitása kritikus a szervezet normál működéséhez, a molekulák mutációi

daganatok kialakulásához, az immunsejtek túlműködésével együtt járó aktivitás-fokozódása pedig autoimmun szövetkárosításhoz vezethet. A hematológiai daganatok kialakulásában kiemelt jelentősége van a Bcr-Abl fúziós fehérjének, mely az Abl tirozin-kináz szabályozatlan aktiválódásához vezet. Ezen betegségek terápiájában elterjedten alkalmazzák az Abl-t specifikusan gátló imatinib-et, illetve az Abl és az Src-kinázok közös gátlószerét, a dasatinibet. A dasatinib Src-kinázokat gátló hatása alapján felmerült, hogy a vegyület a daganatos sejtek mellett esetleg az érett egészséges neutrofilekre is hatással lehet. A kérdéskör a jelenlegi hematológiai alkalmazás mellékhatásai, másrészt pedig mint egyes autoimmun folyamatok lehetséges új terápiás megközelítése miatt lehet fontos.

Az autoimmun ízületi gyulladások egyes állatmodelljeiben (például a K/BxN szérum transzfer artritiszben) mind a neutrofil granulociták, mind a korábban említett Fc γ -receptorok és β_2 -integrinek fontos szereplőnek bizonyultak. Mindez aláhúzza a neutrofil jelátviteli folyamatok pontosabb megismerésének fontosságát, melynek esetleg terápiás vonzatai is lehetnek a neutrofil túlműködésekkel jellemezhető autoimmun kórképekben.

Munkám során a fentiekben említett jelátviteli folyamatok genetikai és farmakológiai megközelítésekkel való módosításának hatását vizsgáltam a neutrofil granulociták in vitro aktiválódására és az autoantitest-indukált ízületi gyulladás in vivo lefolyására.

CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során az alábbi négy témakörrel foglalkoztam és a következő kérdésekre kerestem a választ:

- Milyen módon befolyásolja egy GTP-áz aktiváló fehérje, a p190RhoGAP hiánya a neutrofil granulociták β_2 -integrin-függő, valamint -független sejtválaszait és a neutrofil-, illetve integrin-mediált K/BxN szérum transzfer artritisz kialakulását?
- Szükséges-e az Fc-receptor γ -lánc és két ITAM-tirozinja neutrofil granulociták Fc γ -receptorainak működéséhez, vagy a segédlánc csupán a receptorok sejtfelszíni kifejeződését biztosítja? Miként módosítja ezen tirozinok fenil-alaninra történő cserélése az autoantitest kiváltotta ízületi gyulladást?
- Részt vesz-e és amennyiben igen, milyen módon a CARD9 adapter fehérje neutrofil granulociták Fc γ -receptorainak szignalizációjában és kísérletes autoimmun ízületi gyulladásban?
- Milyen hatással van a második generációs antileukémiás szer, a dasatinib egészséges humán neutrofilek β_2 -integrin inside-out szignalizációjára és a bakteriális fagocitózisra?

Vizsgálataim során az első három esetben genetikai, a negyedikben farmakológiai megközelítést alkalmaztam.

MÓDSZEREK

A kísérletekhez használt főbb egértörzsek, csontvelői kimérák

A p190RhoGAP hiányának vizsgálatához egy újonnan előállított p190RhoGAP mutáns allélt (*Grlf1*^{tm2JSet}) hordozó egértörzs felhasználásával készített csontvelői kimérákat használtam. Integrin-függő referenciapontként CD18^{-/-} egerek szolgáltak. Az Fc-receptor γ -lánc intracelluláris tirozinjainak vizsgálatához az FcR γ -lánc-hiányos genetikai háttéren vad típusú vagy ITAM-tirozinmutáns FcR γ -láncot expresszáló transzgenikus egereket alkalmaztunk. A CARD9 szerepének vizsgálata során CARD9- és Bcl10-hiányos egereket, valamint Syk-hiányos csontvelői kimérákat használtunk.

Csontvelő-transzplantációhoz az előzetesen letálisan besugárzott CD45.1-pozitív recipiens egereknek intravénásan CD45.2-t expresszáló csontvelői donorsejteket adtunk. A transzplantáció sikerességét négy héttel a műtét után áramlási citométerrel ellenőriztük.

Kontrollként genetikai módosítástól mentes vad típusú egereket vagy vad típusú donorok segítségével létrehozott kimérákat használtunk.

Méréseink során a különböző sejtek genotípusát utólag Western-blot segítségével is ellenőriztük.

A neutrofil granulociták izolálása, a kísérleti körülmények

A kísérleteink során használt egér neutrofil granulocitákat csontvelőből preparáltuk Percoll gradiensen. Humán neutrofil granulociták izolálásához az önkéntes donorok perifériás véréből származó sejteket a dextrános ülepítést követően Ficoll gradiensen centrifugáltuk.

A gátlószerrel történő kísérletek során a humán neutrofileket különböző koncentrációjú dasatinibbel kezeltük. Kontrollként DMSO-t tartalmazó minták szolgáltak.

A neutrofil granulocitákat izolálásuk és sejtválaszaik vizsgálata során HBSS oldatban tartottuk. A funkcionális mérések előtt az oldatokat kalcium-

kloriddal és (néhány kivételtől eltekintve) magnézium-kloriddal egészítettük ki. A funkcionális vizsgálatok 37 °C-on történtek.

A neutrofilek sejtválaszainak vizsgálati módszerei

A neutrofilek aktiválásának módozatai

Integrin-függő folyamatokhoz az integrinek inside-out szignalizációját biztosító kostimulust (például TNF α -t) alkalmaztunk immobilizált fibrinogénnel fedett felszínen. Az immunkomplex-függő aktiválódáshoz humán szérumban albumin és anti-albumin antitest vagy laktoferrin és anti-laktoferrin antitest segítségével létrehozott immobilizált immunkomplexeket használtunk.

A neutrofilek *in vitro* és *in vivo* sejtválaszainak mérése

A szuperoxid-termelés méréséhez citokróm c redukciós módszert használtunk. A zselatináz degranulációt zselatináz zimográfia, a sejtszétterülést fáziskontraszt mikroszkópia segítségével értékeltük. Az *in vitro* sejtválaszlás méréséhez Transwell-migrációs módszert alkalmaztunk. A CD11b-upreguláció és CD11b-aktiváció mérését áramlási citométeren végeztük. A citokin-leadás mérése során az aktivált sejtek felülúszóinak citokin-tartalmát ELISA-módszerrel határoztuk meg. A bakteriális fagocitózis vizsgálatához kevert humán szérummal opsonizált, GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus* törzset használtunk.

Az intracelluláris jelátviteli folyamatok vizsgálatához Western-blot technikát, az NF- κ B-aktiváció méréséhez elektroforetikus mobilitás shift assay-t (EMSA-t) használtunk.

A neutrofilek *in vivo* migrációjának vizsgálatára kompetitív vándorlási tesztet alkalmaztunk kevert csontvelői kimerák alkalmazásával.

A K/BxN szérumban transzfer arthritisz kiváltása és mérése

Az ízületi gyulladás kiváltásához spontán arthritiszben szenvedő K/BxN egerek szérumban intraperitoneálisan injektáltuk vad típusú, illetve génmódosított

egerekbe (3-400 μ l szérum egyedenként). Az ízületi gyulladás jeleit klinikai pontszám meghatározásával, a bokák vastagodását egy speciális mérőeszköz segítségével követtük 14 napon keresztül. A bokaízület funkcionális állapotáról rácson való lógás/lógotás segítségével nyertünk információt.

A kísérletekből származó adatok értékelése és prezentálása

Valamennyi kísérletünket legalább három alkalommal elvégeztük és mindannyiszor a bemutatottakhoz hasonló eredményt kaptunk. In vitro méréseink során egyetlen kísérleten belül általában három párhuzamos, azonos csoportba tartozó mintát használtunk. A kísérletekből származó adatokat a kísérleti felállásnak megfelelően egy- vagy kétmintás t-próbának, illetve ismétléses, kétfaktoros variancia-analízisnek (ANOVA módszernek) vetettük alá (+ Tukey-féle post-hoc teszt). A statisztikai kiértékeléshez a STATISTICA programot használtuk. A szignifikancia határának a $p=0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

A p190RhoGAP szerepe neutrofil granulocitákban és autoimmun ízületi gyulladásban

A p190RhoGAP null mutáció és a *p190RhoGAP*^{-/-} egyedek jellemzése

A p190RhoGAP hiányának vizsgálatához a p190RhoGAP null mutáns allélját (*Grlf1*^{tm2JSet}) hordozó egértörzset használtam, melyet egy amerikai munkacsoport hozott létre, de elsőként mi jellemeztük és publikáltuk a mutációt.

A p190RhoGAP hiánya perinatális letalitást okozott. Ennek áthidalására p190RhoGAP^{+/-} heterozigóták időzített terhességéből származó p190RhoGAP-hiányos és vad típusú allélt hordozó kontroll magzatok májának felhasználásával csontvelő-transzplantációt végeztünk. Kísérleteinkhez az így nyert csontvelői kimérákat használtuk.

A p190RhoGAP szerepe egér neutrofilek β_2 -integrin-függő folyamataiban

Fibrinogén felszínen TNF α jelenlétében a CD18-hiányos sejtekkel ellentétben a p190RhoGAP-hiányos granulociták szuperoxid-termelése csupán kismértékű csökkenést mutatott vad típusú társaikhoz képest. A p190RhoGAP-hiányos neutrofilek nem mutattak lényegi károsodást néhány további kostimulus esetében sem. TNF α jelenlétében, integrin-ligand felszínen a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek is szétterültek, bár a vad típussal ellentétben kissé csökkent mértékben. A p190RhoGAP továbbá nem mutatkozott nélkülözhetetlennek sem az in vitro, sem az in vivo vizsgált neutrofil migráció során.

Szerepel-e a p190RhoGAP az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában?

A K/BxN szérumsztransfer arthritisz kísérleteink során az arthritogén szérummal kezelt vad típusú egyedekben jól megfigyelhető gyulladás alakult ki, mely a CD18-hiányos egerekben nem jött létre. A p190RhoGAP^{-/-} kimérákban a vad típuséhoz hasonló mértékű ízületi gyulladás jött létre. A funkcionális tesztben hasonló eredményeket kaptunk.

Az Fc-receptor γ -lánc és ITAM-tirozinjainak szerepe egér neutrofil granulociták Fc γ -receptor-mediált jelátvitelében és az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában

Az FcR γ -lánc szerepe neutrofilekben

Immobilizált immunkomplex-felületen a vad típusú egér neutrofilekkel szemben az FcR γ -lánc-hiányos sejtek képtelenek voltak szuperoxid-termelésre, zselatináz-leadásra és szétterülésre. Mivel az FcR γ -lánc hiányában az aktiváló Fc γ -receptorok nem fejeződtek ki a neutrofilek felszínén, felmerült a kérdés, hogy vajon a segédlánc csupán stabilizálja a membránban a ligandkötő receptor-láncot, vagy azon túlmenően esetleg ITAM-tirozinjai révén a jelátvitelben is részt vesz.

Az Fc-receptor γ -lánc ITAM-tirozinok szerepének vizsgálati megközelítése

Struktúra-funkció analízisünk során a két ITAM-tirozin helyett funkcionálisan semleges fenilalanint tartalmazó Fc-receptor γ -lánc mutánst használtunk FcR γ háttéren (FcR $\gamma^{+/+}$ FcR γ (YF)Tg egyedek). Kontrollként FcR γ -hiányos háttéren módosítatlan exogén Fc-receptor γ -lánc gént transzgenként tartalmazó egereket használtunk (FcR $\gamma^{+/+}$ FcR γ (VT)Tg). Méréseink során genetikai módosításoktól mentes vad típusú és FcR $\gamma^{+/+}$ egyedeket is vizsgáltunk.

Az Fc-receptor γ -lánc tirozinmutáns neutrofilek jellemzése és az ITAM-tirozinok szerepe neutrofilek Fc γ -receptor kiváltotta sejtválaszaiban

A fenti genetikai módosítások nem befolyásolták a sejtek érését. Western-blot segítségével továbbá jól látható volt, hogy az FcR $\gamma^{+/+}$ háttérre visszajuttatott vad típusú, valamint ITAM-tirozinmutáns FcR γ allélt hordozó neutrofilekben újból megjelent az FcR γ -lánc és az ahhoz kapcsolódó sejt felszíni Fc γ -receptorok.

Míg a vad típusú FcR γ -lánc FcR γ -hiányos háttérre való visszajuttatása részlegesen helyreállította az Fc γ -receptor-mediált szuperoxid-termelést, az

ITAM-tirozinmutáns FcR γ esetében nem jelent meg a sejtválasz. Hasonlóképpen alakult a sejtek zselatináz leadása és szétterülése is.

Az ITAM-tirozinok szerepe az autoimmun artritisz effektor fázisában

Míg az FcR γ ^{-/-} FcR γ (VT)Tg egerekben kialakult egy köztes erősségű ízületi gyulladás, az FcR γ ^{-/-} FcR γ (YF)Tg állatok védettnek bizonyultak az ízületi gyulladással szemben. Míg az artritogén szérummal kezelt FcR γ ^{-/-} FcR γ (VT)Tg egyedekben megjelent az ízületi diszfunkció, az ITAM-tirozinok hiánya védeltséget eredményezett.

A CARD9 szerepének vizsgálata primer fagocitasejtekben és autoantitest-mediált ízületi gyulladásban

A CARD9-hiányos egér neutrofilek jellemzése

Kimutattuk, hogy a CARD9 jelen van neutrofil granulocitákban és a hiánya nem befolyásolja az Fc γ RIII és Fc γ RIV sejt felszíni expresszióját.

Neutrofil sejtválaszok CARD9 hiányában

A neutrofilek immunkomplex-kiváltotta, Fc-receptor-függő sejtválaszai közül először a rövidebb távú (30 percen belül megjelenő) válaszokat vizsgáltuk. Ezek közül a CARD9-hiányos neutrofilek a vad típussal megegyező mértékben voltak képesek szuperoxid termelésére, zselatináz leadására és szétterülésre, míg az I κ B α foszforilációja és degradációja, valamint az NF- κ B aktivációja jelentősen károsodott CARD9 hiányában.

Az Fc-receptor-függő hosszabb távú (több óra alatt létrejövő) sejtválaszok közül az NF- κ B-dependens kemokinek, így a CXCL2 és a CCL3 termelése jelentősen károsodott CARD9 hiányában. Hasonló jelenséget figyeltünk meg csontvelői eredetű makrofágok Fc γ -receptor jelátvitelének vizsgálatakor is.

A Syk tirozin-kináz és a Bcl10 szerepe neutrofilek Fc γ -receptor jelátvitelében

In vitro kísérleteink további részében a CARD9 pontosabb helyzetét szeretnénk volna meghatározni neutrofil granulociták Fc γ -receptor jelátvitelében.

Irodalmi adatok alapján a Syk tirozin-kináz és a Bcl10 adapter fehérje szerepét vizsgáltuk. Immobilizált immunkomplex-felszínen a Syk hiányában mind a rövidebb távú, mind a hosszabb távú sejtválaszok károsodtak. Ezzel szemben a Bcl10 csak a neutrofilek hosszabb távú válaszaihoz volt szükséges.

A CARD9 szerepe autoimmun ízületi gyulladás effektor fázisában

Az artritogén szérumbeadását követően a CARD9-hiányos egerekben is kialakult az ízületi gyulladás, azonban a vad típusú egyedekével összevetve határozottan gyengébb mértékben: mind a klinikai pontszám, mind a bokavastagság-változás tekintetében egy intermedier fenotípus alakult ki. Az artritogén szérumbelátásban részesült CARD9-hiányos egyedek továbbá a vad típusnál mérsékeltebb ízületi funkciózavart mutattak. Hasonlóan intermedier fenotípust figyelhettünk meg egy autoantitest-mediált autoimmun hólyagos bőrgyulladásban is CARD9 hiányában. A részleges károsodás hátterében az in vivo megfigyelt csökkent synoviális CXCL2-szint és a CARD9-hiányban megfigyelhető normál in vivo migráció miatt a neutrofilek és a makrofágok csökkent hosszabb távú sejtválaszait (kemokin-termelését) valószínűsítettük.

A dasatinib néhány neutrofil sejtválaszra gyakorolt hatásának vizsgálata

A dasatinib hatása humán neutrofilek β_2 -integrin inside-out szignalizációjára

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib nem befolyásolta lényegesen a TNF α , az IL-8 és az fMLP hatására bekövetkező CD11b-upregulációt és -aktivációt.

Érintetlen β_2 -integrin-függő fagocitózis dasatinib jelenlétében

A kevert humán szérumbelátással opszonizált GFP-jelölt baktériumokat adott ideig humán neutrofilekkel inkubáltuk. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib nem befolyásolta a *Staphylococcus aureus* neutrofil granulociták általi fagocitózisát.

KÖVETKEZTETÉSEK

A célkitűzéseknek megfelelően következtetéseimet is négy pontban foglalom össze.

1. Karakterizáltunk egy új, a p190RhoGAP teljes hiányát eredményező mutációt egerekben és vizsgáltuk a fehérje hiányának következményeit neutrofil granulocitákban. A p190RhoGAP^{-/-} neutrofil granulociták nem mutattak lényeges károsodást β_2 -integrin-függő és -független in vitro folyamatokban. Hasonlóképpen a p190RhoGAP nem bizonyult nélkülözhetetlennek a β_2 -integrin-függő autoantitest-mediált autoimmun ízületi gyulladásban sem.

2. Az Fc-receptor γ -lánc hiányában károsodtak a neutrofil granulociták Fc γ -receptor-mediált sejtválaszai. Transzgénikus struktúra-funkció analízissel kimutattuk, hogy ezen folyamatban esszenciálisak az FcR γ -lánc ITAM-tirozinjai. Ugyancsak nélkülözhetetlenek bizonyultak a kérdéses tirozinok autoantitest-mediált ízületi gyulladásban.

3. A CARD9 nem szükséges neutrofilek Fc γ -receptor aktivációját követően megjelenő rövidebb távú, ellenben esszenciális egyes hosszabb távú sejtválaszok (például a kemokin-termelés) kialakulásához. Ez utóbbi során a CARD9 a Syk-től disztálisan helyezkedik el és feltehetően a Bcl10 révén befolyásolja a transzkripciós faktor NF- κ B alegységeinek nukleáris transzlokációját. A CARD9-hiány részleges károsodást eredményezett autoantitest-mediált autoimmun betegségekben, melynek hátterében nagy valószínűséggel a kemokinek (neutrofilek és makrofágok általi) csökkent termelése állhat.

4. A kis molekulásúlyú dasatinib nem gátolta lényegesen a humán neutrofil granulociták β_2 -integrin inside-out szignalizációját, valamint a kevert humán szérummal opsonizált baktériumok fagocitózisát.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló közlemények (időrendben):

Jakus Z, **Németh T**, Verbeek JS, Mócsai A.
Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes.
J Immunol 2008;180:618-629.
Impakt faktor: 6,000

Németh T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Z, Walzog B, Settleman J, Mócsai A.
Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice.
J Immunol 2010;185:3064-3075.
Impakt faktor: 5,745

Németh T, Mócsai A.
The role of neutrophils in autoimmune diseases.
Immunol Lett 2012;143:9-19., Review
Impakt faktor: 2,511

Futosi K, **Németh T**, Pick R, Vántus T, Walzog B, Mócsai A
Dasatinib inhibits pro-inflammatory functions of mature human neutrophils.
Blood 2012; 119(21):4981-91.
Impakt faktor: 10,558

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

Csölle C, Andó RD, Kittel A, Gölöncser F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, **Németh T**, Mócsai A, Sperlágh B.
The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice.
Int J Neuropsychopharmacol 2012.
(Nyomdában, DOI: 10.1017/S1461145711001933)
Impakt faktor: 4,699