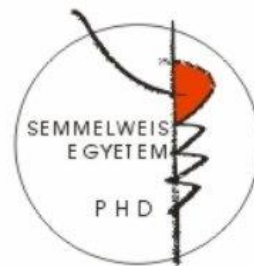


# A foszfolipidek, a GTP-áz aktiváló fehérjék, valamint az extracelluláris vezikulák szerepének vizsgálata a neutrofil granulocita szuperoxid-termelésében

Doktori értekezés

**Dr. Lőrincz Márton Ákos**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Cervenák László, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Prechl József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora,  
egyetemi tanár  
Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2015

# 1 Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>Tartalomjegyzék.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Bevezetés .....</b>	<b>9</b>
3.1	A neutrofil granulocita általános bemutatása.....	9
3.2	A reaktív oxigénszármazékok .....	11
3.3	A NADPH-oxidázok .....	14
3.4	A fagocita NADPH-oxidáz enzimkomplex.....	17
3.4.1	A fagocita NADPH-oxidáz alegységeinek összeépülése .....	19
3.4.2	A fagocita oxidáz működésének szabályozási pontjai.....	20
3.4.2.1	Lipid természetű anyagok hatása az oxidáz működésére .....	20
3.4.2.1.1	Az arachidonsav hatása az oxidáz működésére .....	21
3.4.2.1.2	A glükocerebrozidok hatása az oxidáz működésére .....	21
3.4.2.1.3	Az oxidált foszfolipidek hatása a NADPH-oxidázra .....	22
3.4.2.2	A Rac működését befolyásoló fehérjék.....	23
3.4.2.2.1	A GEF fehérjék.....	24
3.4.2.2.2	A GDI fehérjék .....	24
3.4.2.2.3	A GAP fehérjék .....	25
3.4.2.2.3.1	ARHGAP1.....	25
3.4.2.2.3.2	ARHGAP25.....	27
3.4.2.2.3.3	ARHGAP35.....	27
3.4.2.2.3.4	Bcr .....	28
3.5	Az extracelluláris vezikulák általános bemutatása.....	29
3.5.1	A neutrofil granulocita EV-i .....	31
3.6	Az EV-kutatás lehetőségei és korlátai .....	33
<b>4</b>	<b>Célkitűzések .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Módszerek.....</b>	<b>36</b>
5.1	Neutrofil granulociták preparálása .....	36
5.2	Neutrofil granulocita citoszol- és membránfrakció tisztítása .....	36
5.3	Fehérjemennyiség-meghatározás .....	36
5.4	A felhasznált rekombináns fehérjéket kifejező baktériumtörzsek.....	37

5.5	Rekombináns fehérjék előállítása .....	37
5.6	A szuperoxid-termelés vizsgálata sejtmentes rendszerben .....	37
5.7	Anti-ARHGAP1 és anti-ARHGAP25 antitestek tisztítása .....	39
5.8	Neutrofil granulocita membránfrakciójának immundepléciója.....	40
5.9	SDS gélelektroforézis és Western blot .....	40
5.10	GTP-áz aktivitás mérése sejtmentes rendszerben .....	41
5.11	Extracelluláris vezikulák preparálása .....	41
5.12	Az extracelluláris vezikulák áramlási citométeres vizsgálata .....	42
5.13	Baktériumok és elölt élesztő sejtek preparálása és opszonizálása .....	44
5.14	Extracelluláris vezikulák szuperoxid-termelésének vizsgálata .....	45
5.15	Baktériumnövekedési teszt .....	45
5.16	Dinamikus fényszórásmérés.....	46
5.17	Elektronmikroszkópos felvételek készítése.....	46
5.18	Tömegspektrometria vizsgálat .....	47
5.19	Statisztikai analízis.....	47
<b>6</b>	<b>Eredmények .....</b>	<b>48</b>
6.1	Fosfolipidek hatása a NADPH-oxidáz működésére sejtmentes rendszerben.....	48
6.1.1	Fosfolipidek hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülésére.....	48
6.1.2	Fosfolipidek hatása az összeépült NADPH-oxidáz enzimkomplex működésére	50
6.2	A szuperoxid-termelés függése a Rac aktiváltsági állapotától .....	50
6.2.1	Rekombináns GAP-ok hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülésére és szuperoxid-termelésére .....	51
6.2.2	Rekombináns GAP-ok hatása a már összeépült NADPH-oxidáz működésére.....	54
6.2.3	Membránkötött GAP-ok hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex működésére .	55
6.2.4	Membránkötött GAP-ok immundepléciója.....	55
6.2.5	Membránkötött GAP-ok immundepléciójának hatása a NADPH-oxidáz működésére.....	57
6.3	Neutrofil granulocita eredetű EV-k vizsgálata.....	59
6.3.1	A tárolási körülmények hatása a neutrofil granulocita eredetű EV-k tulajdonságaira és biológiai funkciójára.....	59
6.3.1.1	Neutrofil granulocita eredetű EV minták vezikulaszámának változása 1 hónapos tárolás során.....	59
6.3.1.2	Neutrofil granulocita eredetű EV-k áramlási citométeres tulajdonságainak változása 1 hónapos tárolás során .....	60

6.3.1.3	A tárolt EV-k méretmegoszlásának változása tárolás hatására .....	61
6.3.1.4	A tárolt EV-k elektronmikroszkópos megjelenése tárolás után .....	62
6.3.1.5	A tárolt aEV-k antibakteriális hatásának változása .....	63
6.3.2	A spontán sejthalál során keletkező EV jellemzése.....	64
6.3.3	Neutrofil granulocita eredetű EV szuperoxid-termelése .....	68
6.3.4	A NADPH-oxidáz alegységeinek tömegspektrométeres kimutatása a neutrofil granulocita eredetű EV-kban.....	69
6.3.5	A reaktív oxigénszármazékok szerepe az aEV-k antibakteriális hatásában.....	70
<b>7</b>	<b>Megbeszélés.....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Következtetések .....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Összefoglalás.....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Summary .....</b>	<b>83</b>
<b>11</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>84</b>
<b>12</b>	<b>A társszerzők közötti munkamegosztás .....</b>	<b>102</b>
<b>13</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>103</b>
<b>14</b>	<b>Függelék .....</b>	<b>104</b>

## 2 Rövidítések jegyzéke

AA	Arachidonsav (arachidonic acid)
Abl	Abelson-kináz
Abr	Aktív Bcr-hoz hasonló fehérje (active Bcr-related)
AD	A p67 <sup>phox</sup> aktivációs doménje
aEV	Opszonizált részecske hatására termelt EV
AIR	Autoinhibíciós régió
Alix	ALG-2-höz kapcsolódó fehérje X (ALG-2-interacting protein X)
ApoEV	Apoptotikus extracelluláris vezikula
ARHGAP	Rho/Rac/Cdc42 család GAP-ok
AS	A gp91 <sup>phox</sup> aktivációs része
ATCC	Amerikai sejtkultúra kollekción (American type culture collection)
Bcr	Breakpoint cluster region fehérje
BPI	Baktérium permeabilitást fokozó fehérje (bactericidal permeability increasing)
C2	Kalciumfüggő lipidkötő domén
C5a	Komplement 5 hasítási töredék
CCL	Kettős cisztein motívummal rendelkező kemokin ligandok
CD	Differenciációs marker (cluster of differentiation); az utána írt számok különböző fehérjéket jelölnek
CGD	Krónikus granulomatózis (chronic granulomatous disease)
cPLA <sub>2</sub>	Citoszolikus foszfolipáz A <sub>2</sub> (cytosolic phospholipases A <sub>2</sub> )
CR3	Komplement receptor 3
CRAL-TRIO	Hidrofób molekulákat kötő domén
CXCL	Cisztein-X-cisztein motívummal rendelkező kemokin ligandok
Den EV	Denaturált extracelluláris vezikula
Depl.	Depletált
DLS	Dinamikus fényszóródási teszt (dynamic light scattering)
DMEM	Dulbecco-féle módosított Eagle tápoldat (Dulbecco's modified Eagle medium)
DMSO	Dimetil-szulfoxid

DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
Dock	Dedicator of cytokinesis fehérje
DPI	Difenil-jodonium
DTT	Dithiothreitol
DUOX	Dual oxidase fehérje
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav (ethylene-diamine-tetraacetic acid)
EF kar	Kalciumkötő fehérje domén
EGTA	Etilén-glikol-tetraecetsav (ethylene-glycol-tetraacetic acid)
ELISA	Enzim-kötött immunszorbens eljárás (enzyme-linked immunosorbent assay)
emPAI	Exponenciálisan módosított fehérjegyakorisági index (exponentially modified protein abundance index)
ERK	Extracelluláris szignál regulált kináz
EV	Extracelluláris vezikulum
Exo	Exoszóma
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FasL	Fas ligand
Fc	Az antitestek azon része, amit a leukociták kötnek (fragment crystallizable region)
FcR	Fc-receptor
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
fMLF	Formil-metionin-leucin-fenilalanin
FSC	Az áramlási citométerben egy részecske előre irányuló fényszórása (forward scatter)
GAP	GTP-áz aktiváló fehérje (GTP-ase activating protein)
GC	Glükocerebrozid
G-CSF	Granulocitakolonía-stimuláló faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GDI	GDP disszociációt gátló fehérje (GDP dissociation inhibitor)
GDP	Guanozin-difoszfát
GEF	Guanin-nukleotid kicserélő faktor (guanine nucleotide exchange factor)

GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GM-CSF	Granulocita/monocitakolónia-stimuláló faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GST	Glutation-S-transzferáz
GTP	Guanozin-trifoszfát
GTP- $\gamma$ -S	Guanozin 5'-O-[gamma-thio]-trifoszfát
HBSS	Hank-féle normalizált sóoldat (Hank's balanced salt solution)
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etánszulfonsav
HLA	Humán leukocita antigén
ICAM	Intercelluláris sejtadhéziós molekula (intercellular cell adhesion molecule)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	interleukin; az utána írt számok különböző fehérjéket jelölnek
IPTG	Izopropil- $\beta$ -d-tiogalaktozid
ITAM	Immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	Immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
IZO	Izotípus kontroll
JNK	c-Jun N-terminális kináz (c-Jun N-terminal kinase)
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth baktérium táptalaj
LPS	Lipopoliszacharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrién B <sub>4</sub>
Mac-1	Makrofág-1 antigén (macrophage-1 antigen, CD11b/CD18)
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
miRNS	MikroRNS
MMP25	Mátrix metalloproteáz 25
MPO	Mieloperoxidáz
mRNS	MessengerRNS
MV	Mikrovezikula

n.s.	Nem szignifikáns
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált alakja
NET	Neutrofil extracelluláris csapda (neutrophil extracellular trap)
NGAL	Neutrofil zselatináz-asszociált lipokalin (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)
NOD	Nukleotidkötő oligomerizációs domén (nucleotide-binding oligomerization domain)
NOX	NADPH oxidáz
NOXA1	NADPH oxidáz aktivátor 1
NOXO1	NADPH oxidáz organizáló 1 fehérje
OD	Optikai denzitás
oxPAPC	1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glicero-3-foszforilkolin
oxPAPE	1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glicero-3-foszforiletanolamin
oxPAPG	1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glicero-3-foszforilglicerin
oxPAPS	1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glicero-3-foszforilszerin
oxPLPC	1-palmitoil-2-linoil-sn-glicero-3-foszforilkolin
PAF	Vérlemezke aktiváló faktor (platelet activating factor)
PAK	p21-aktivált protein kináz
PB1	Phox és Bem1 domén
PBS	Foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PH	Pleckstrin homológ domén
Phox	Fagocita oxidáz (phagocytic oxidase)
PI	Propidium-jodid
PI3K	Foszfoinozítid-3-kináz
PKC	Protein kináz C
PL	Fosfolipid
PLB-985	Akut, nem limfoid leukémia eredetű sejtvonal
PMA	Forbol-észter (phorbol-myristate-acetate)
PMN	Polimorfonukleáris fehérvérsejtek (polymorphonuclear leukocytes); 95%-uk neutrofil granulocita
PMSF	Fenil-metil-szulfonilfluorid (phenyl-methane-sulfonyl fluoride)
P-REX	Foszfatidilinozitol-(3,4,5)-trifoszfát-függő Rac GEF

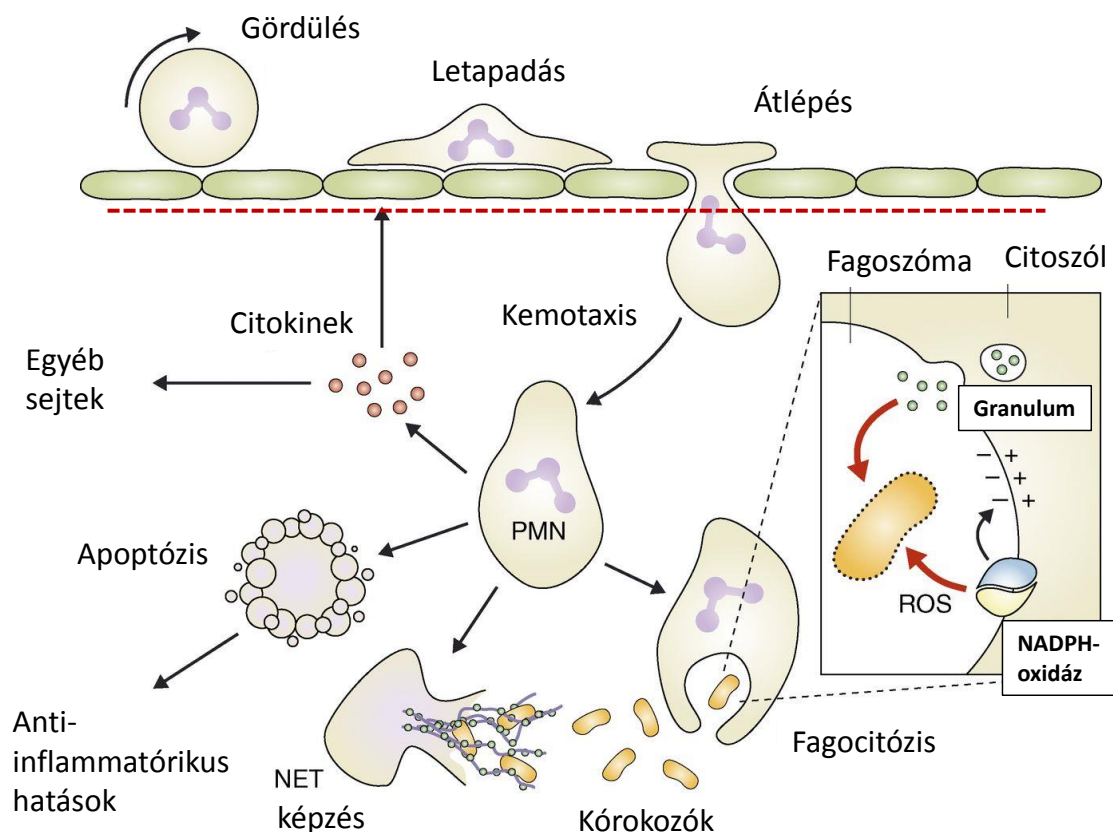


PS	Foszfatidilszerin
PSGL	P-szelektin glikoprotein ligand
PX	Phox domén
Rac	Ras-hoz hasonló C3 botulinum toxin szubsztrát
Ras	Patkány szarkóma fehérje (rat sarcoma protein)
Rho	Ras homológ fehérje
RIG	Retinsav-indukált gén terméke
RLU	Relatív lumineszcens egység (relative luminescent unit)
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reaktív oxigénszármazék
RPE	Vörös-fikoeritrin (red-phycoerythrin); fluoreszcens festék
Rpm	Percfordulat (round per minute)
rRNS	Riboszómális RNS
S.E.M.	Az átlag hibája (standard error of mean)
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (sodium-dodecyl-sulfate)
Sec14	Hidrofób moelkulákat kötő domén
sEV	Spontán termelődött extracelluláris vezikula
SH3	Src-homológia 3 domén (src homology 3 domain)
SOD	Szuperoxid-dizmutáz (superoxide dismutase)
SSC	Az áramlási citométerben egy részecske oldalirányú fényszórása (side scatter)
T <sub>3</sub>	Trijód-tironin
T <sub>4</sub>	Tiroxin
Tiam	T-sejt limfóma invázió és metasztázis fehérje
TNF	Tumor nekrozis faktor
TNFR	TNF-receptor
TPR	Tetratricopeptide domén
Tris	Trisz-(hidroximetil)-aminometán
tRNS	TranszferRNS
Tsg101	Tumor érzékenységi gén 101 terméke
Vav	Vav GEF fehérje
VCAM-1	Vaszkuláris sejtadhéziós faktor 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

### 3 Bevezetés

#### 3.1 A neutrofil granulocita általános bemutatása

A neutrofil granulociták fontos szerepet játszanak az immunrendszer működésében, különösen a baktériumok és a gombák elleni védekezésben [1, 2]. A neutrofilek a veleszületett immunitás elemeiként, az antimikrobiális folyamatok során korán aktiválódó sejtek közé tartoznak. A csontvelőben a granulocita-monocita progenitor sejtből nagy mennyiségben, naponta  $1-2 \times 10^{11}$  számban képződő neutrofilek alkotják az emberi perifériás vér fehérvérsejtjeinek 50-65%-át [3]. Az érett neutrofil granulociták 10-12 órát töltenek az érpályában keringve, majd több lépésből álló folyamat során ott lépnek át az érfalon, ahol fertőzésre utaló veszélyjellel találkoznak. Veszélyjel lehet mikroorganizmus behatolását jelző molekula, sejtkárosodás következtében felszabaduló anyag, vagy más immunsejtből származó citokin. Ezek hatására kezdetben gyenge, majd erős kapcsolat alakul ki neutrofilek és a veszélyjel hatására megváltozott felszínű endotélsejtek között [4]. A bonyolult kilépési folyamatot leegyszerűsített formában az 1. ábra felső felében szemléltetem. A veszélyjel helyszínén először a gördülésnek (rolling) nevezett gyenge kölcsönhatás alakul ki az endotélsejtek és neutrofilek között, amiben a szelektineknek van központi szerepe. Az erősebb kapcsolódáshoz, a letapadáshoz (adhézió) és az érből való kilépéshez (diapedezis) a neutrofilek felszínén található integrinekre van szükség. Az átlépés során a sejtek para- vagy transzcelluláris módon jutnak át az érfalon. Az átlépés ideje alatt a neutrofil és az endotél szoros kapcsolata fenntartja az érfal folytonosságát. Az átjutott sejtek a szövetközi vándorlással párhuzamosan ürítik szekréciós vezikuláikat, és az így leadott mátrix metalloproteázok nagyban megkönnyítik mozgásukat [5, 6]. A vándorló neutrofileket a szöveti immunsejtek (pl. makrofágok, hízósejtek) által elválasztott szabályozó anyagok (pl. gyulladási citokinek, leukotriének), valamint a behatoló kórokozók evolúció során megőrzött molekulái, mintázatai aktiválhatják. Az aktiváció hatására nagy számban jelennek meg jelátvivő receptorok és adhéziós fehérjék a neutrofil sejt felszínén. A vándorlásban és aktivációban szerepet játszó sejt felszíni receptorokat, ezek ligandumait és a receptorokhoz köthető jellemző sejt választ az 1. függelékben foglaltam össze.



**1. ábra: A neutrofil granulociták kilépése az érpályából és működésük a szövetek között (forrás: [7], a szerző által módosítva).**

Az aktivált neutrofil granulocita képes a behatoló ágens bekebelezésére (fagocitózisára), mely alapján a neutrofilt a professzionális fagocitasejtek közé soroljuk. A fagoszóma terébe ürített granulumfehérjék és reaktív oxigénszarmazékok úgy pusztítják el a kórokozókat, hogy nem, vagy csak kismértékben károsítják a szervezet környező sejtjeit [8-10]. A granulumok különféle hasító enzimeket, valamint a mikroorganizmusok túléléséhez, növekedéséhez szükséges faktorokat megkötő peptideket (pl. B<sub>12</sub>-vitamin-kötő fehérjét, laktoferrint) tartalmaznak, amelyek közvetett, vagy közvetlen módon fejtik ki mikrobaellenes hatásaikat. A granulumok összetételét a 2. függelékben gyűjtöttem össze [11-13]. A neutrofilek mikrobaellenes-eszköztárába tartozó reaktív oxigénszarmazékok (ROS) termelését a 3.4 fejezetben tárgyalom részletesen. A ROS-ok közvetlen toxikus hatása mellett a ROS-szintézisért felelős NADPH-oxidáz töltéskülönbséget is létrehoz a fagoszómamembrán két oldala között. A töltéskülönbségnek és a citoplazma elsavanyodását kompenzáló H<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> áramoknak is szerepe lehet a granulumfehérjék aktiválásában és a kórokozók elpusztításában [14-16].

A neutrofilek képesek a kórokozók sejten kívüli elpusztítására is. Ha az aktiválódott sejtek a sejthalál nemrégiben leírt formáját, a NETózist mutatják (NET, neutrophil extracellular trap), akkor a sejtekből DNS és antimikrobiális fehérjék szabadulnak fel, amelyek hálószerűen csapdába ejtik, majd elpusztítják a környező kórokozókat [17, 18].

További fontos feladata a gyulladás helyére érkező és ott aktiválódó granulocitáknak, hogy proinflammatorikus citokinekkal és kemokinekkal további neutrofileket és egyéb immunsejteket vonzanak a szövetbe, ezáltal erősítve a gyulladásos választ [19].

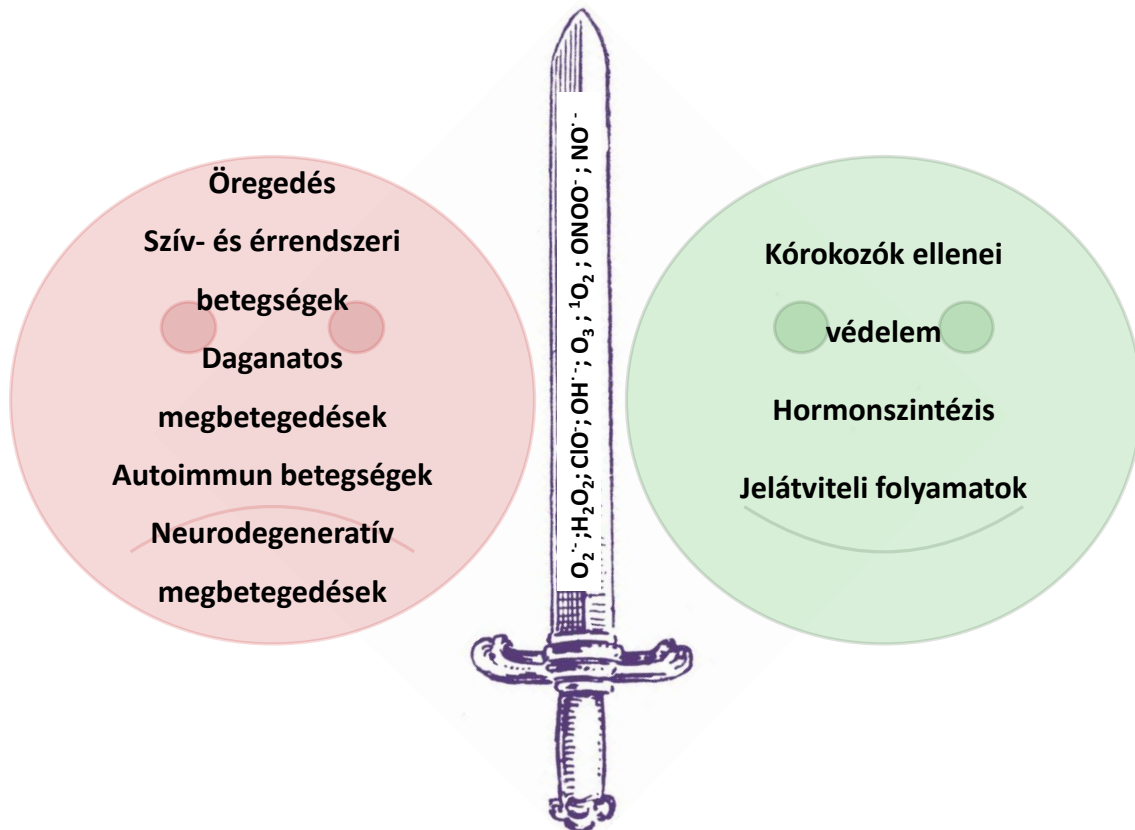
A nem aktiválódott, érett neutrofilek rövid életidejük lejártával a programozott sejthalál jeleit mutatják, majd az azután visszamaradó sejtrészeket a monocita-makrofág rendszer veszi fel és bontja le. Az apoptotikus neutrofilek eltávolítása a szövetekből véd a granulomokban tárolt veszélyes anyagok felszabadulásának káros következményeitől, illetve antiinflammatorikus mediátor felszabadulást vált ki az apoptotikus testeket felvevő makrofágokból [20-23]. A neutrofilek eddig bemutatott funkcióit az 1. ábrán foglalom össze.

A neutrofil granulociták működési zavara visszatérő gyulladásos betegségekben nyilvánul meg. Ha valamilyen csontvelői folyamat miatt csökken a neutrofilek képzése, és neutropeniás állapot alakul ki, akkor az egyébként könnyen leküzdhető betegségek is életveszélyes fertőzések állapotához vezetnek [24]. Az érfalon történő átlépésben kitüntetett szerepet játszó  $\beta_2$ -integrin károsodásánál például súlyos, visszatérő bakteriális fertőzések alakulnak ki (I-es típusú leukocita adhéziós deficiencia) [25]. Szintén visszatérő gennykeltők általi megbetegedésekkel kell számolni, ha a NADPH-oxidáz funkcióképtelen (krónikus granulomatózis) [26, 27], vagy a Chediak-Higashi-szindrómában, ahol a granulumműködés károsodott [28].

### 3.2 A reaktív oxigénszármazékok

A reaktív oxigénszármazékok (ROS) biológiai működését a kétélű kard sajátosságaihoz hasonlíthatjuk. Egyszerre hasznosak és veszélyesek is a szervezetre nézve. A megfelelő időben, térben és mennyiségben termelt ROS elengedhetetlen az immunválasz kialakulásához [10, 16]. Ismert elengedhetetlen szerepük a hormonszintézisben [29, 30] és részt vesznek jelátviteli folyamatokban is [31]. Másrészt a túlzott, nem megfelelő helyen történő, vagy nem kellően kordában tartott ROS-termelés a szervezet saját szöveteit is károsíthatja. Valószínűsíthető a ROS káros szerepét

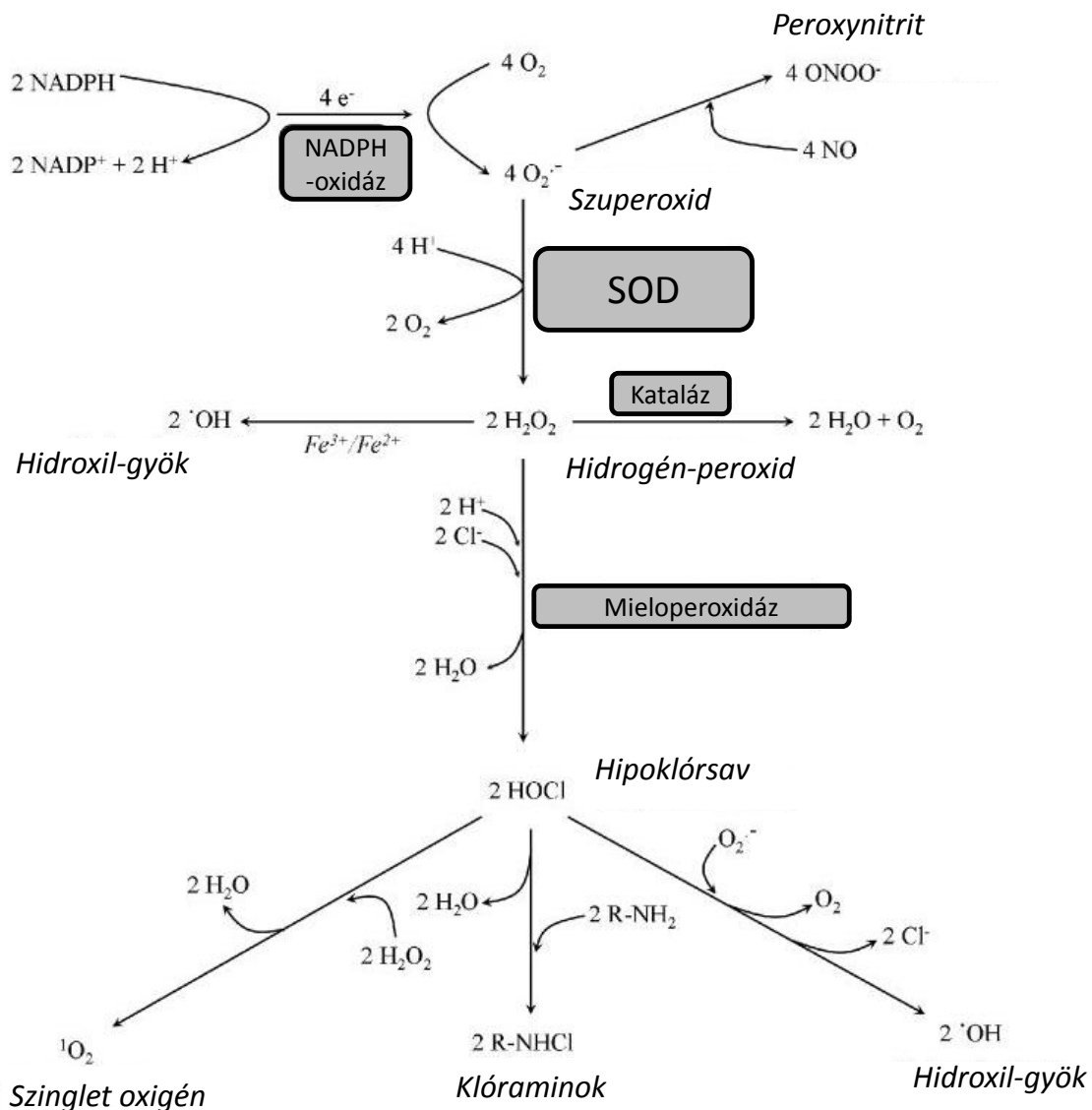
az öregedésben [32], a daganatos [33], és neurodegeneratív megbetegedésekben [34], valamint szív- és érrendszeri kórfolyamatokban is [35] (2. ábra).



2. ábra: A kard két éle: a reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok részvétele a homeosztázis fenntartásában és egyes kóros folyamatokban. (Bár az öregedés nem kóros folyamat, de a ROS kiváltotta öregedési jelenségek egyértelműen a káros oldalhoz tartoznak.)

Az emberi szervezetben a ROS több forrása is ismert. A mitokondriumban a légzési lánc melléktermékeként keletkezik, de jelentős mennyiségű ROS-ot termelnek a xantin-oxidáz, a citokróm p450 enzimrendszer és számos további enzim mellett a nitrogénmonoxid-szintázok is [36]. A szabályozott ROS-termelés a NADPH-oxidázok családjának feladata (3. ábra). A család legismertebb tagja a fagocita NADPH-oxidáz, amely a fagocita sejtek oxidatív robbanásáért felelős. Az oxidatív robbanás során elsőként keletkező ROS a szuperoxid-anion ( $O_2^{\cdot -}$ ), amely szuperoxid-dizmutáz hatására továbbalakulhat erős oxidáló tulajdonsággal rendelkező hidrogén-peroxiddá ( $H_2O_2$ ). A  $H_2O_2$  mieloperoxidáz hatására az egyik legtoxikusabb ROS-ká, a hipoklorit-anionná ( $ClO^{\cdot}$ ) alakul. További kémiai reakciók hatására számos más szabadgyök, mint a hidroxil gyök ( $^{\cdot}OH$ ), a peroxil gyök ( $RO_2^{\cdot}$ ) és az alkoxil gyök ( $RO^{\cdot}$ ) és nem gyök természetű molekula, mint a hipoklórossav ( $HOCl$ ), az ózon ( $O_3$ ), a szinglet oxigén

( $^1\text{O}_2$ ) is keletkezhet. Nitrogén-monoxiddal (NO) reakcióba lépve peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) vagy egyéb reaktív nitrogénszármazékok, mint a nitrogén-monoxid gyök ( $\text{NO}^\bullet$ ), nitrogén-dioxid gyök ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), dinitrogén-trioxid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) képeződik. A reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok nagy reakciókészségüknek köszönhetően gyorsan kölcsönhatásba lépnek más molekulákkal (fehérjékkel, nukleinsavakkal és zsírokkal), így károsítva a bekebelezett kórokozókat és kóros esetekben a szervezet saját elemeit is [37]. A reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok képzését a 3. ábrán foglalom össze.



3. ábra: A fagocita NADPH-oxidáz eredetű reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok kaszkádszerű keletkezése a fagoszómában (forrás: [37], módosítva).

A fagocita NADPH-oxidáz által termelt ROS immunválaszban betöltött jelentőségére az enzimkomplex működési zavara esetében megfigyelhető krónikus granulomatózis betegség

(CGD) hívja fel a figyelmet. A CGD egy örökletes betegség, amelyben a beteg fagocita sejtjei nem képesek elegendő szuperoxidot termelni, ezért visszatérő, kataláz pozitív bakteriális (*S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. cepacia*, *Nocardia*, *Listeria* és *Klebsiella* törzsek) és gombás (*Aspergillus* és *Candida* törzsek) tüdőgyulladásoktól, tályogoktól, oszteomyelitisztől, bakteriémiától és orbáncból szenvednek [26, 27, 38, 39].

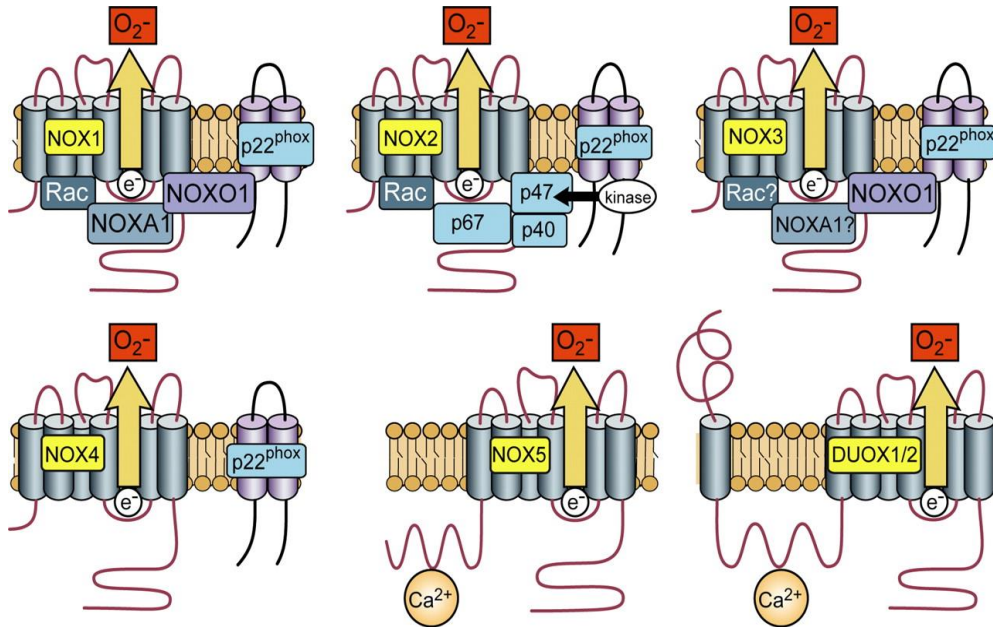
A nem megfelelő helyen, vagy módon aktivált fagociták által túlzott mértékben termelt ROS felelős a szervezet molekuláris sérüléseinek egy részéért. Az okozott DNS-mutáció, a lipidperoxidáció, vagy a fehérjék és szénhidrátok oxidációja számos kórfolyamatban játszik szerepet. Autoimmun betegségekben (reumatoid arthritisz, glomerulonefritisz, gyulladásgos bélbetegségek) immunkomplexek váltják ki a fagociták ROS-termelését [40]. Kimutatták továbbá, hogy szívizomiszkémia esetén a reperfüzió után kialakuló szívizomelhalás mértéke jelentősen csökkenthető a neutrofilek mennyiségének csökkentésével, illetve a kitapadásuk gátlásával [41]. Az agyi iszkémia-reperfüzió során, valamint a legtöbb akut és krónikus vesebetegségben (például diabéteszes nefropátiában) szintén lényeges tényező a neutrofilek okozta szövetkárosodás [42-47].

A teljesség igénye nélkül bemutatott ROS-kapcsolt betegségek súlyossága felhívja a figyelmet arra, hogy a fagocita NADPH-oxidáz működését élettani körülmények között egy precíz szabályozás tarthatja kordában.

### 3.3 A NADPH-oxidázok

A NADPH-oxidázok családjának hét tagja ismert: Nox1, Nox2 Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 és Duox2 [48]. Közös tulajdonságuk, hogy a NADPH oxidációja során felszabadult elektront valamilyen membránon keresztül molekuláris oxigénre szállítják, amely így  $O_2^{\cdot-}$ -dá alakul (a Duox esetében eddig csak  $H_2O_2$ -t sikerült termékként kimutatni,  $O_2^{\cdot-}$ -ot nem). A család tagjai nagymértékű strukturális hasonlóságot mutatnak. A fehérjék alapvázát 6 transzmembrán domén adja, melyek két hem prosztetikus csoportot kötnek. A C-terminális végen található a NADPH-kötő hely, és a FAD-kötő régió. A Nox5 ezek mellett egy N-terminálisan elhelyezkedő EF-kar motívummal is rendelkezik. Szintén található ilyen motívum a Duox fehérjékben, amelyek tartalmaznak egy további transzmembrán régiót és az N-terminális végen egy extracelluláris peroxidáz-homológ domént is (4. ábra). Az enzimek aktiválódásakor az elektron a

NADPH-ról a FAD-ra, majd a transzmembrán régiókban kötött két hem molekulán keresztül az extracelluláris térbe, vagy a fagoszómába kerül, ahol a végső elektronfelvevő a molekuláris oxigén. Az oxigén redukciójának eredményeképp szuperoxid-anion keletkezik ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ ) [49].



4. ábra: A NADPH-oxidázok családja és az enzimatis működésükhöz szükséges membránkötött és citoszolikus partnerfehérjék. A  $p47^{phox}$  és a NOXO1, illetve a  $p67^{phox}$  és a NOXA1 fehérjék nagyfokú homológiát mutatnak. A NOX3 esetében a NOXA1 és Rac szükségessége az aktivációhoz vitatott. A NOX4 konstitutív aktivitásához csak a  $p22^{phox}$  szükséges. A NOX5, a DUOX1 és DUOX2  $Ca^{2+}$ -kötés hatására aktiválódik (forrás:[50]).

Bár a NADPH-oxidázok alapvető felépítése és működése nagyfokú hasonlóságot mutat, szöveti előfordulásuk és biológiai szerepük nagyon sokféle az emberi szervezetben. Az elsőként jellemzett Nox2, vagy fagocita oxidáz az immunválaszban játszik szerepet a már ismertetett módon. Működéséhez további membránkötött ( $p22^{phox}$ , prenilált Rac) és citoszolikus ( $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  és  $p40^{phox}$ ) fehérjékre van szükség, amelyek összekapcsolódva alkotják a NADPH-oxidáz enzimkomplext [51]. A Nox1 főképp a vastagbélben, az erek simaizmaiban, a prosztatában, és a méhben található meg. Szerepe a vérnyomás-szabályozásban bizonyított, valamint feltételezik részvételét a szervezet immunvédelmében is. A Nox1 működéséhez szintén további membránkötött ( $p22^{phox}$ , prenilált Rac) és citoszolikus (Noxo1 és Noxa1) fehérjék szükségesek [52, 53]. Az emberi Nox3 a magzati szövetekben mutatható ki, de funkciója még nem ismert. Egerek belső fülében az otolit kristályok bioszintézisében játszik szerepet. Működéséhez a  $p22^{phox}$ -ra és Noxo1-re van szükség, de nem kizárható a



Rac és Nox1 szükségessége sem [54-56]. A Nox4 a vesében, az endotélben, az oszteoklasztokban, a nyirokcsomókban, a lépben és a herében található meg. Feltételezik részvételét a kardiovaszkuláris szabályozásban és az érlelmeszesedésben, de elképzelhető, hogy oxigénszenzor szerepe is van. Konstitutívnak gondolt ROS-termeléséhez a p22<sup>phox</sup> szükséges [57, 58]. A Nox5 megtalálható a petefészekben, a méhlepényben, a méhben, a hasnyálmirigyben, a csontvelőben, az érfal simaizomban, a magzati szövetekben, a herében, valamint a lép és nyirokcsomók T- és B-limfocitákban gazdag részeiben. Élettani szerepe jelenleg még nem ismert. Aktiválódásához az N- és C-terminális részek között intramolekuláris kapcsolatra van szükség. Ez az EF-kar motívumokat tartalmazó rész kalciumkötése után alakul ki [59, 60]. A Duox1 és Duox2 a pajzsmirigyben, a tüdőben, a nyálmirigyekben és a gyomor-bél rendszerben található meg. T<sub>3</sub> és T<sub>4</sub> pajzsmirigy-hormonok szintézisében játszott szerepük jól ismert [29, 30, 61], de valószínűleg részt vesznek a nyál antimikrobiális védelmében is [62]. A Nox család tagjainak jellemző tulajdonságait az I. táblázatban foglaltam össze.

**I. táblázat: Az Nox család tagjai és főbb jellemzőik.**

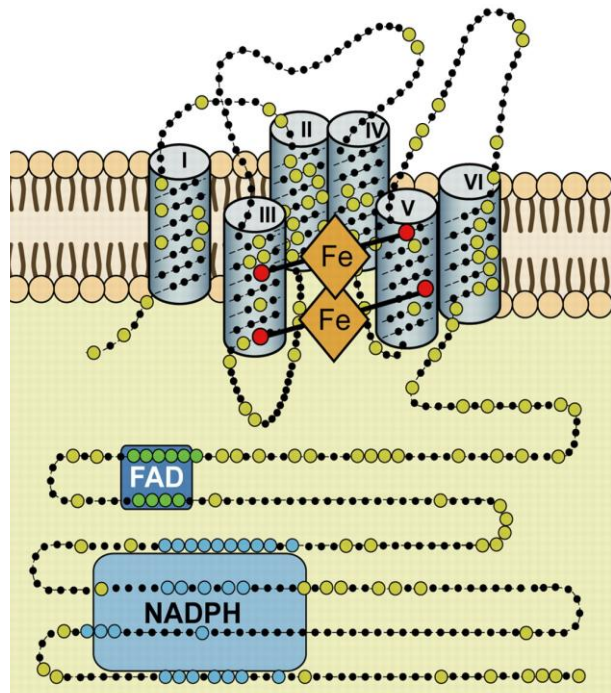
<b>Fehérje</b>	<b>Jellemző szöveti előfordulás</b>	<b>Működéshez szükséges faktorok</b>	<b>Biológiai funkció</b>
<b>Nox1</b>	Vastagbél, érfal	p22 <sup>phox</sup> , Noxo1, Noxa1, Rac	Immunvédekezés, vérnyomás-szabályozás
<b>Nox2</b>	Fehérvérsejtek	p22 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> , p47 <sup>phox</sup> , p40 <sup>phox</sup> , Rac	Immunvédekezés
<b>Nox3</b>	Magzati szövetek	p22 <sup>phox</sup> , Noxo1, Noxa1?, Rac?	Otolit kristály képződés?
<b>Nox4</b>	Vese, endotélsejtek	p22 <sup>phox</sup>	Kardiovaszkuláris szabályozás?
<b>Nox5</b>	Petefészek, here, magzati szövetek	Ca <sup>2+</sup>	?
<b>Duox1/2</b>	Pajzsmirigy, nyálmirigyek	Ca <sup>2+</sup>	Hormonszintézis, immunvédekezés

### 3.4 A fagocita NADPH-oxidáz enzimkomplex

A fagocitasejtekben működő NADPH-oxidáz legalább 5 alegységből felépülő enzimkomplex, amelynek katalitikus magja a gp91<sup>phox</sup>. A gp91<sup>phox</sup>, vagy Nox2 kifejeződése rendkívül széleskörű. Megtalálható a fagocitasejteken (neutrofilek, eozinofilek, monociták, makrofágok) kívül, neuronokban, szívizomsejtekben, harántcsíkolt izomban, májsejtekben, endotélsejtekben, fibroblasztokban és hemopoetikus őssejtekben is [48]. A gp91<sup>phox</sup> egy stabil heterodimer, a citokróm b<sub>558</sub>  $\beta$ -alegysége. A heterodimer  $\alpha$ -alegysége a p22<sup>phox</sup>. A citokróm b<sub>558</sub>-hoz tartozik egy FAD és két hem csoport is, amelyeket a gp91<sup>phox</sup> négy hisztidin aminosava stabilizál (His-101, His-115, His-209, His-222; 5. ábra) [63, 64]. A FAD és a hem csoportok az elektronszállító útvonal résztvevői, köztes elektronhordozók a NADPH és a molekuláris oxigén között. A köztes elektronhordozók elengedhetetlen szerepét az enzimműködésben jól jelzi, hogy a FAD antagonistája deaza-FAD, vagy a hem csoportot gátló difenil-jodonium (DPI) jelenléte mellett az oxidáz aktivitása elveszik [49].

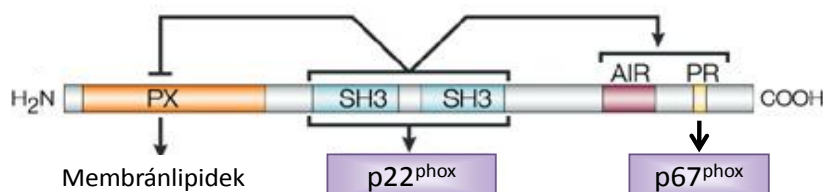
A citokróm b<sub>558</sub> kisebbik alegysége, a p22<sup>phox</sup> két transzmembrán régiót tartalmazó, glikozilált fehérje, amely citoplazma felőli részén található egy prolin gazdag régió, amelyhez SH3 doménekkel rendelkező fehérjék köthetnek. Nagyon valószínű, hogy ez a dokkoló helye a foszforilált p47<sup>phox</sup> SH3 doménjének. Ezt támasztja alá, hogy ismertek olyan CGD esetek, amelyek a p22<sup>phox</sup> ezen régiójának hibájával hozhatók összefüggésbe [65].

A citokróm b<sub>558</sub> citoszolikus partnerfehérjéi közül a p47<sup>phox</sup> 390 aminosavból épül fel. Négy kitüntetett domént tartalmaz: N-terminálisan egy phox homológia (PX) domént, két



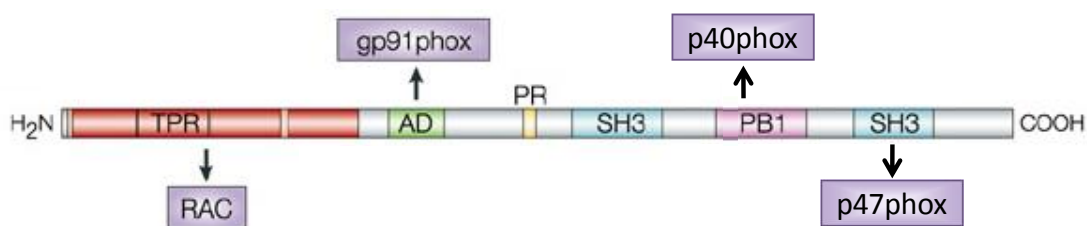
5. ábra: A fagocita NADPH-oxidáz felépítése és a transzmembrán régiók elhelyezkedése. A hem proszтетikus csoportokat kötő aminosavak piros, a FAD-ot kötő aminosavak zöld, a NADPH-t kötő aminosavak kék színnel kerültek feltüntetésre. A megnövelt méretű aminosavak konzerváltak a NADPH-oxidázok családjában (forrás:[49]).

belső SH3 domént, egy autoinhibitoros régiót és C-terminálisan egy prolingazdag régiót. A PX domén foszfatidil-inozitol-3,4-biszfoszfáttal és egyéb foszfinozitol-származékokkal is kapcsolatba léphet, ezáltal a fehérjét a plazmamembránhoz horgonyozhatja. Nyugvó neutrofilekben az SH3 domének az autoinhibitoros doménhez és a PX doménhez kötnek, és így rejtve maradnak a fehérje belsejében. A prolingazdag régió a p67<sup>phox</sup>-ot köti (6. ábra) [65].



6. ábra: A p47<sup>phox</sup> doménszerkezete. A PX domén membrán-foszfolipidekhez, az SH3 domének a p22<sup>phox</sup>-hoz, a prolingazdag régió (PR) a p67<sup>phox</sup>-hoz kötheti a fehérjét. Az autoinhibíciós régió (AIR) a fehérje nyugvó, zárt állapotában gátolja a PX domén lipidszétését (forrás: [66], módosítva).

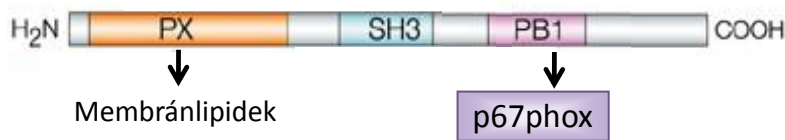
A citoszolikus partnerfehérjék közül a p67<sup>phox</sup> szükséges az elektron átjutásához a NADPH-ról a FAD-ra. Az 526 aminosavból álló fehérje 5 ismert domént tartalmaz [65]: N-terminálisan a tetratrikopeptid ismétlődő domént (TPR), mely a Rac kis G-fehérjével lép kapcsolatba [67], egy aktiváló domént, amely a gp91<sup>phox</sup>-hoz köt, egy belső prolingazdag domént, két SH3 domént, amelyek a p47<sup>phox</sup> prolingazdag régiójához kötnek és egy PB1 domént, amely az SH3 domének között helyezkedik el. A PB1 domén szolgál a p40<sup>phox</sup> megkötésére. A fehérje első 210 aminosava vesz részt az enzimkomplex NADPH-kötő részének kialakításában (7. ábra) [65].



7. ábra: A p67<sup>phox</sup> doménszerkezete. A TPR domén a Rac-hoz, az aktiváló domén (AD) a gp91<sup>phox</sup>-hoz, az SH3 domének a p47<sup>phox</sup>-hoz, a PB1 domén a p40<sup>phox</sup>-hoz kötheti a fehérjét (forrás: [66], módosítva).

A p40<sup>phox</sup> nem szükséges az oxidáz *in vitro* összeépüléséhez és működéséhez, de sejtes rendszerben egyértelműen kimutatható az enzimkomplexben, sőt nemrégiben leírtak egy p40<sup>phox</sup> defektushoz köthető CGD-s esetet is [68]. A 339 aminosavat tartalmazó fehérje nyugvó sejtben a p67<sup>phox</sup>-hoz kötve található meg a citoszolban.

Három ismert doménje van: N-terminálisan található egy PX domén, amely specifikusan köti a foszfatidil-inozitol-3-foszfátot. A fehérje közepén egy SH3 domén, a C-terminálisan egy PB1 motívum található. Ez utóbbi köti a fehérjét a p67<sup>phox</sup> PB1 doménjéhez. A p40<sup>phox</sup> a nyugvó sejtben kismértékben foszforilált, de a PKC további oldalláncokat (Ser-315, Thr-154) foszforilálhat, ami aktiválja a fehérjét (8.ábra) [65].



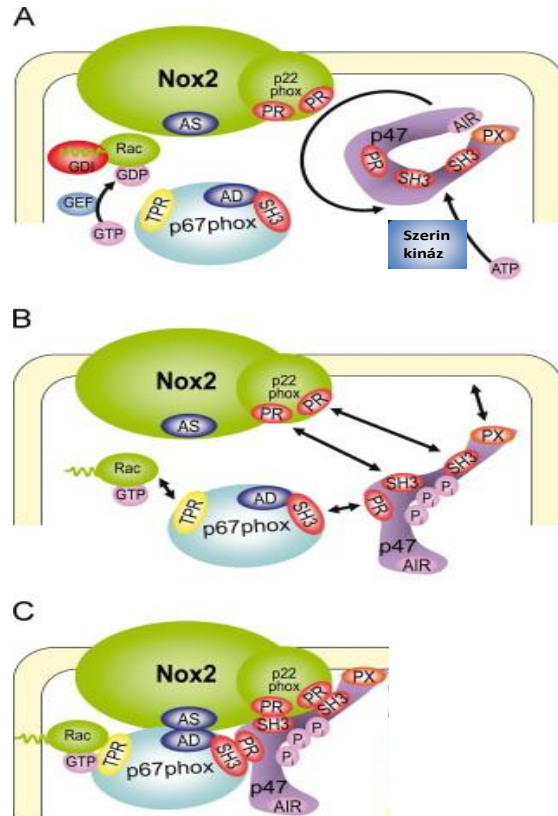
**8. ábra: A p40<sup>phox</sup> doménszerkezete. A PX domén membrán-fosfolipidekhez, a PB1 domén a p67<sup>phox</sup>-hoz kötheti a fehérjét (forrás:[69]).**

Az enzimkomplex összeépüléséhez szükséges a GTP-kötött Rac kis G-fehérje jelenléte is [70, 71]. Az emberi neutrofil granulocitákban a teljes Rac mennyiség kb. 96%-a Rac2, de a Rac1 is megtalálható bennük [72]. A Rac a kis G-fehérjék Rho/Rac/Cdc42 családjába tartozik, és mint minden kis G-fehérje, GTP-kötött formában aktív és GDP-kötött formában inaktív. A két állapot közti átmenetet a 3.4.2.2 fejezetben tárgyalom részletesen. Nyugvó sejtekben a Rac a citoszolban található meg RhoGDI-hez kötődve, inaktív állapotban. Aktiváció hatására leválik a GDI-ről, GTP-kötött formába kerül és kihelyeződik a membránhoz [73, 74]. A fehérje 170-199 aminosavak közötti régiója köt a p67<sup>phox</sup> TPR doménjéhez [75], „inzer” régiója (124-135 aminosavak) a citokróm b<sub>558</sub>-cal lép kapcsoltba, a C-terminális részen lévő posztranszlációs módosulás során megszerzett geranil-geranil csoport pedig a membránhoz rögzítheti a fehérjét [76, 77].

### 3.4.1 A fagocita NADPH-oxidáz alegységeinek összeépülése

A neutrofil granulocitában a citokróm b<sub>558</sub> elsősorban a specifikus és zselatináz granulomokban található, melyek aktivációkor fuzionálnak a fagoszómával (2. függelék) [11]. A fagocitózis során elsősorban Fc- és komplementreceptorok indította jelátviteli utak (1. függelék) váltják ki az enzimkomplex alegységeinek szerin/treonin kinázok (PKC, ERK1/2, PAK, MAPK) által végzett foszforilációját. A 303. és 379. aminosavak közötti régióban foszforilálódott p47<sup>phox</sup> autoinhibitoros, zárt formája felnyílik, a szabaddá váló PX domén a membránhoz horgonyzódik és a fehérje

foszforilált részei a p22<sup>phox</sup>-hoz kötődnek. A membránhoz kötődő p47<sup>phox</sup> szállítja az enzimműködéshez szükséges, szintén foszforilált p67<sup>phox</sup>-ot a gp91<sup>phox</sup> és a membránhoz kötődő Rac közelébe (9. ábra) [51]. A több ponton membránhoz rögzült citoszolikus alegységek stabil komplexet képeznek a citokróm b<sub>558</sub>-cal. A citoplazma közel állandó NADPH-tartalma miatt a komplex addig termeli a szuperoxidot, amíg az alegységek megfelelő konformációban maradnak a gp91<sup>phox</sup>-hoz képest. Az alegységek helyzetét a komplexbe épített „időzítő”, a Rac változtathatja meg a legkézenfekvőbb: ha hidrolitikus aktivitása lehasítja a GTP gamma helyzetű foszfátját, akkor az elektronszállítás megszűnik [78, 79].



9. ábra: A NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülésének lépései. A) p47<sup>phox</sup> zárt állapota szerin-kinázok hatására felnyílik. B) A p47<sup>phox</sup> szabaddá vált kötő doménjei kapcsolatot létesítenek a p67<sup>phox</sup>-szal, a p22<sup>phox</sup>-szal és a membránnal. A Rac GTP-kötött állapotba kerül. C) Az enzimkomplex összeépül és a p67<sup>phox</sup> aktiváló doménje (AD) kiegészíti a gp91<sup>phox</sup> NADPH-kötő részét (AS) (forrás:[76]).

### 3.4.2 A fagocita oxidáz működésének szabályozási pontjai

Az összeépülés foszforilációs lépésein túl további pontokon is szabályozódhat a NADPH-oxidáz működése. A lipidek az oxidáz összeépülését, a Rac-ot szabályozó fehérjék a már összeépült, működő enzimkomplex aktivitását és szétesését befolyásolják.

#### 3.4.2.1 Lipid természetű anyagok hatása az oxidáz működésére

A lipidek közvetve és közvetlenül is szabályozzák a fagocita NADPH-oxidáz működését. A közvetett szabályozáshoz elsősorban a citoszolikus alegységek kikötéséhez szükséges foszfolipidek sejtorganelum-megoszlása tartozik, de ismert

olyan lipidhatás is, amely a Rac-ot szabályozó fehérjék működését befolyásolja [80, 81]. A továbbiakban a lipidek NADPH-oxidázra gyakorolt közvetlen szabályozó hatásait mutatom be.

#### **3.4.2.1.1 Az arachidonsav hatása az oxidáz működésére**

A komplex megfelelő összeépüléséhez elengedhetetlen az arachidonsav (AA) jelenléte, amit citoszolikus foszfolipáz A<sub>2</sub> biztosít (cPLA<sub>2</sub>) [82]. Az AA nagy koncentrációban képes a p47<sup>phox</sup> autoinhibitoros konformációját is felnyitni, ezzel kiváltva az enzimkomplex összeépülését. Az AA hasonlóan hathat, mint a kritikus szerin aminosavak foszforilálódása, de jelenléte tovább erősíti a foszforiláció aktiváló hatását is [83, 84]. Arachidonsav hiányában, a cPLA<sub>2</sub>-hiányos PLB-985 sejtekben az enzimkomplex összeépülhet, de nem képes szuperoxid-termelésre a FAD redukciójának, és így az elektronszállításnak károsodása miatt. Az AA-nak tehát nemcsak a komplex összeépülése során lehet aktiváló hatása, hanem a már összeépült enzimkomplex működését is segíti [85, 86]. Az AA szerepének fontosságát hangsúlyozza, hogy azt előállító cPLA<sub>2</sub> C2 doménje képes közvetlenül a p47<sup>phox</sup> PX doménjéhez kötni, és az AA-at az összeépült NADPH-oxidáz közvetlen szomszédságában felszabadítani [87].

#### **3.4.2.1.2 A glükocerebrozidok hatása az oxidáz működésére**

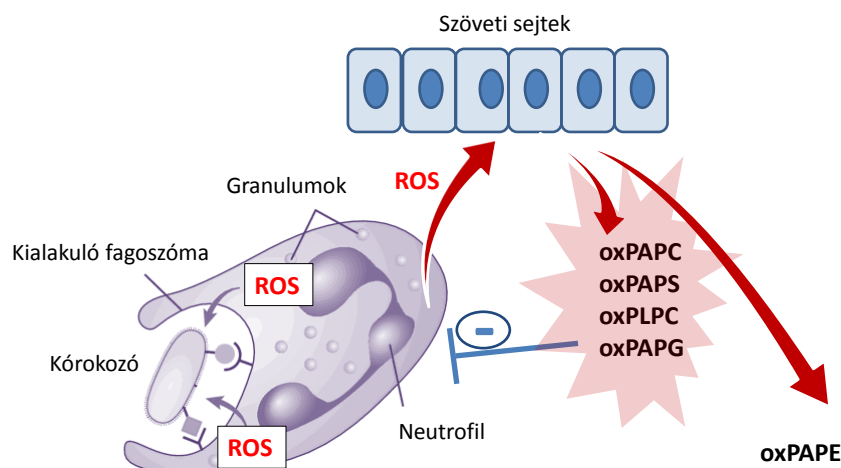
Az arachidonsavval ellentétben a glükocerebrozidok (GC) nem fordulnak elő olyan mennyiségben egészséges emberek vérében, hogy hatást gyakoroljanak a neutrofil granulociták NADPH-oxidázának működésére. Megfigyelték azonban, hogy Gaucher-kórban károsodik a veleszületett immunválasz, és a betegek visszatérő, súlyos bakteriális fertőzésekben szenvednek. A Gaucher-kórban egy lipid természetű anyag, a glükocerebrozid lebomlása szenved zavart a lizoszómális glikozil-ceramidáz enzim hiánya, vagy nem megfelelő működése miatt. A nem elégséges lebontás és ürítés következtében a felhalmozódó GC csökkenti a monociták szuperoxid-termelését és baktériumölési képességét [88].

Munkacsoportunk sejtmentes rendszerben végzett mérésekkel bizonyította, hogy a glükocerebrozid közvetlenül gátolja a NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését. A GC

gátló hatásának hátterében a p47<sup>phox</sup> és a p67<sup>phox</sup> citokróm b<sub>558</sub>-hoz kötődésének zavara áll, de a GC nem befolyásolja a már összeépült NADPH-oxidáz működését [89].

### 3.4.2.1.3 Az oxidált foszfolipidek hatása a NADPH-oxidázra

A reaktív gyökök nagy valószínűséggel lépnek reakcióba foszfolipidekkel, amelyek a biológiai membránok legalapvetőbb alkotóelemei. A találkozás során olyan oxidált foszfolipidek keletkeznek, amelyekben a többszörösen telítetlen zsírsavoldallancok peroxidálódnak, és további lépések során rövidebb aldehid és savi oldallancokká alakulhatnak [90]. A keletkezett oxidált foszfolipidek biológiailag aktív termékek, képesek jelátviteli folyamatokat indítani és sejteket aktiválni. Szerepük van az érlemeszesedésben és a krónikus ízületi gyulladásokban [91]. Az oxidált foszfolipidekről figyelemre méltó elgondolást vetett fel Valery N. Bochkov és munkacsoportja. Megfigyelték, hogy egyes oxidált foszfolipidek gátolják a Gram-negatív baktériumok falából felszabaduló lipopoliszacharidot felismerő Toll-szerű receptor 4 aktivációját és jelátvitelét. Ezt a megfigyelést az oxidált foszfolipidek negatív visszacsatoló szerepével magyarázták. Nagy mennyiségű ROS keletkezése esetén az oxidálódott foszfolipidek gátolják a neutrofil granulociták további aktivációját, ami már szövetkárosodást okozna (10. ábra) [92]. Az oxidált foszfolipidek immunszuppresszív hatását támasztja alá az a megfigyelés is, hogy gátolhatják a makrofágok scavenger receptorokon keresztül indukált fagocitózisát [93].



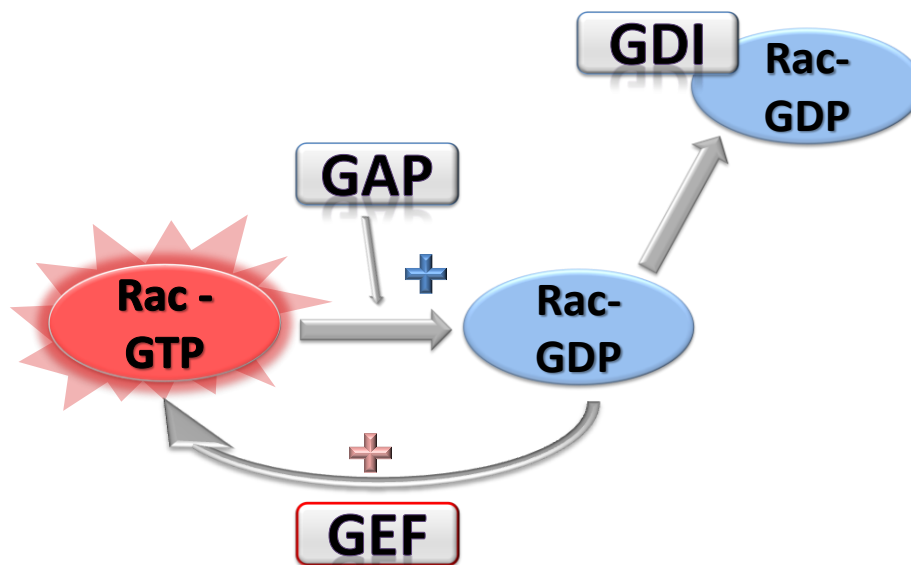
**10. ábra:** A foszfolipidek ROS-szenzor működése. Az aktiválódott neutrofil által termelt ROS oxidálja a környező szöveti sejtek foszfolipidjeit. Az így keletkező oxidált foszfolipidek egy része gátolja a további ROS képződést. (Az ábrához a „medical-dictionary.thefreedictionary.com/phagocytosis” oldalon található rajzot használtam fel.)

Ezt az elgondolást követték kollaborációs partnereink, amikor megvizsgálták a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését 10 perces oxidált 1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glicero-3-foszforsolin (oxPAPC) előkezelés után. Azt találták, hogy PMA és fMLF hatására csökkent ROS-termeléssel válaszoltak az előkezelt sejtek, valamint az alkalmazott oxPAPC koncentrációja és a szuperoxid-termelés sebessége között fordított arányosság van. Nem csökkent viszont a szuperoxid-termelés sebessége a már aktivált neutrofilekhez hozzáadott oxPAPC hatásra. Hasonló eredményre jutottak más oxidált foszfolipid-származékokkal is (oxPLPC, oxPAPS, oxPAPG), de találtak olyant is, amelyik nem befolyásolta a ROS-termelést (oxPAPE). Az oxidált lipidek valószínűleg nem az AA szekvesztrálása révén fejtik ki hatásukat, mert a ROS-termelést nem állította helyre az AA koncentrációjának emelése. Az oxidált foszfolipidek nem befolyásolták a p38MAPK és ERK1/2 fehérjék aktivációját, és nem találtak különbséget az oxidáz citoszolban található alkotórészeinek membrán-kihelyeződésében sem [94]. Az oxidált foszfolipidek közvetlen hatását a NADPH-oxidáz enzimkompleyre nem lehet egész sejtrendszerben vizsgálni, mivel ép sejtek esetén nem zárható ki az oxPL-ek hatása a jelátviteli utakra. A munkacsoportunk által használt sejtmentes rendszerben azonban jól vizsgálható a foszfolipidek közvetlen hatása az oxidázra, mivel az enzimkomplex összeépülést nem jelátviteli folyamat, hanem általunk adott AA váltja ki. Ezzel kapcsolatos eredményeinket a dolgozat 6.1 fejezetében mutatom be.

### **3.4.2.2 A Rac működését befolyásoló fehérjék**

A Rac kis G-fehérje kiváló célpont a NADPH-oxidáz enzimkomplex szabályozására. Az enzimkomplex összeépüléséhez GTP-kötött, aktív Rac-ra van szükség. A fehérje azonban időzített kapcsolóként működik: saját GTP-áz aktivitása bizonyos idő elteltével hidrolizálja a GTP gamma helyzetű foszfát csoportját, így a fehérje inaktív, GDP-kötött állapotba kerül, és az enzimkomplex elektronszállítása megszűnik. A Rac endogén GTP-áz aktivitását a GTP-áz aktiváló fehérjék (GAP) fokozhatják, ezáltal gyorsítva a szuperoxid-termelés leállítását. A GDP-GTP cserét, azaz a fehérje aktív formába kerülését a GEF-ek segítik elő. A kis G-fehérjék működését befolyásoló harmadik szabályozó fehérje a GDI, amely a kis G-fehérjét inaktív állapotban tarthatja (11. ábra) [77]. A fagocita oxidáz esetében a GEF-ek az oxidáz összeépülésében, a GAP-ok a már működő oxidáz leállításában játszhatnak szerepet.





11. ábra: A kis G-fehérjék GTP-áz ciklusa. A Rac GTP-áz aktivitása bizonyos idő elteltével hidrolizálja a GTP terminális foszfát csoportját, így a fehérje inaktív, GDP-kötött állapotba kerül. A Rac endogén GTP-áz aktivitását a GAP-ok fokozhatják, a GDP-GTP cserét a GEF-ek segítik elő. A GDI a kis G-fehérjét inaktív állapotban tartja.

#### 3.4.2.2.1 A GEF fehérjék

A GEF-ek G-fehérjecsald-specifikusak. A Rho/Rac/Cdc42 családra ható GEF-ek működésének alapja, hogy képesek a kis G-fehérjékhez kötödni és konformációváltást előidézni a nukleotidkötő zsebben [95]. A GEF kötődését követően a GDP kikerül a kötőzsebből, és GTP kötődik be. A GEF-ek nem befolyásolják a kis G-fehérjék guanin-nukleotidok iránti affinitását, az GTP bekötődése annak köszönhető, hogy a citoplazmában mintegy tízszer több GTP található, mint GDP [96]. A fagocita NADPH-oxidáz aktiválásában több GEF lehetséges szerepét is felvetették már. A legmegalapozottabb a P-Rex1 [97], a Dock2 és Dock5 [98], illetve a Tiam1 és a Vav1 aktiváló szerepe [99].

#### 3.4.2.2.2 A GDI fehérjék

A Rho/Rac/Cdc42 GDI-k a GEF-ekkel ellentétesen működnek. Stabilizálják a citoplazmában a Rac-GDP állapotot. Az oxidáz összeépüléséhez elengedhetetlen, hogy a Rac leváljon a GDI-ről és a membránba helyeződjön. A Rho/Rac/Cdc42 GDI-k szerkezetére jellemző az N-terminálisan lévő szabályozó egység, amely a kis G-fehérjéhez köt és gátolja a nukleotidok kicserélődését. A Rho/Rac/Cdc42 GDI-knek

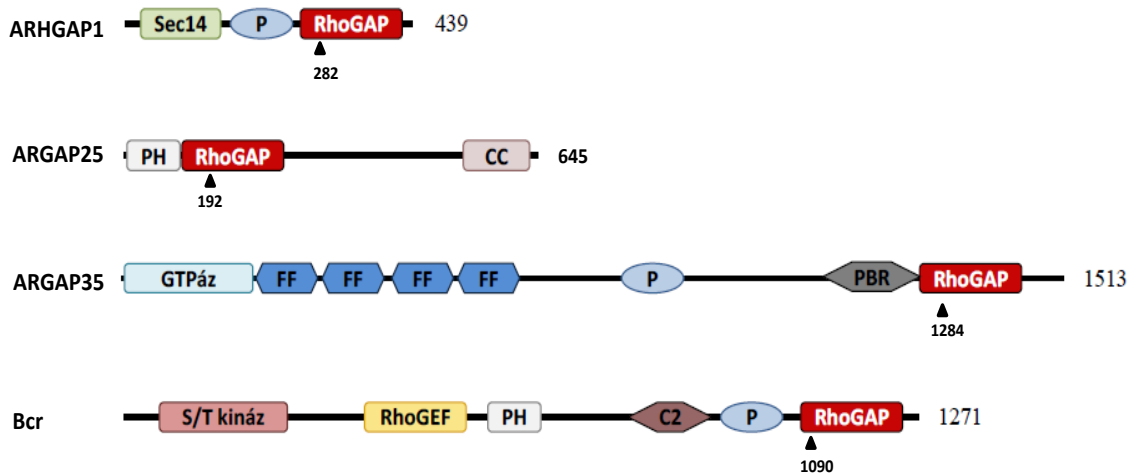
jelenleg három képviselőjét ismerjük (RhoGDI1, RhoGDI2, RhoGDI3). Közülük csak az általánosan előforduló RhoGDI1 (más néven RhoGDI $\alpha$ ) fejeződik ki a neutrofil granulocitákban és játszik szerepet a NADPH-oxidáz működésében [100].

### 3.4.2.2.3 A GAP fehérjék

A GAP fehérjék a kis G-fehérjék endogén GTP-áz aktivitását fokozzák. Ha a GAP domén a kis G-fehérjéhez köt, akkor az abban található katalitikus arginin kapcsolatot létesít a GTP terminális foszfátjával és a kis G-fehérje hidrolitikus aktivitásért felelős glutaminjával. Az ilyen módon átalakított katalitikus hely gyorsabban hidrolizálja a terminális foszfátot [101]. Az emberi genomban körülbelül 70-re tehető a Rho, Rac, és Cdc42-re ható GAP-ok száma. Munkacsoportunk korábbi microarray vizsgálatokon alapuló *in silico* kutatásában bemutatta, hogy a szervezet egyes sejtjei mely GAP-ok mRNS-ét fejezik ki. Ebből jól lehet arra következtetni, hogy egyes szövetekre milyen GAP-készlet jellemző. Az emberi neutrofil granulocitákban több, bizonyítottan a Rac-ra is ható GAP-ot azonosítottak [102]. Kísérletes munkánkban ezek közül azokra koncentráltunk, amelyek a neutrofil granulocitákban fehérjeszinten is nagy mennyiségben fejeződnek ki (ARHGAP1 [103], ARHGAP25 [104]), vagy amelyeknek korábban felvetették kapcsolatát a NADPH-oxidázzal (ARHGAP1, ARHGAP35, Bcr) [78, 103, 105, 106]. A GAP-ok szabályozó szerepét a fluoriddal elvégzett kísérletek támasztják alá. A szuperoxid-termelés jelentősen növekszik fluoridvegyületek hatására [107, 108], mert a fluorid gátolja a GAP-ok hatását [109]. A fluoridnak ugyanakkor nincs hatása a szuperoxid-termelésre, ha az oxidáz rekombináns fehérjékből, GAP-ok nélkül épül fel [78].

#### 3.4.2.2.3.1 ARHGAP1

Az ARHGAP1 (más néven p50RhoGAP, Cdc42GAP) 439 aminosav hosszúságú, a szervezetben általánosan előforduló fehérje, amely az N-terminális vége felől egy lipidkötésért felelős Sec14 (vagy CRAL-TRIO) doménből, egy közbülső prolingazdag régióból, valamint egy C-terminálisan elhelyezkedő GAP doménből áll. A fehérje 282-es pozíciójában, a RhoGAP doménben található a GAP katalitikus argininje, amelynek mutációja esetén a fehérje elveszíti GAP funkcióját (12. ábra) [102, 110].



12. ábra: A dolgozatban bemutatásra kerülő RacGAP-ok doménszerkezete. Rövidítések: PH: pleckstrin homológ domén; CC: coiled coil domén; C2: kalciumfüggő lipidkötő domén; P: prolingazdag domén; S/T kináz: szerin/treonin-kináz domén; Sec14: Sec14-szerű domén; FF: két konzervált fenilalanint tartalmazó domén; PBR: polibázikus régió (forrás: [35, 110], módosítva).

Az izolált GAP domén *in vitro* körülmények között egyaránt képes a Rac, a Rho és a Cdc42 GTP-hidrolízisét fokozni [111]. Az ARHGAP1 sejten belül a citoszolban, de a membránokhoz kötődve is megtalálható [103]. A membránkötést a Sec14 lipid- és fehérjekötő képessége teszi lehetővé [112]. Laborunk korábbi munkatársának, Patryk Moskwa-nak sikerült feltárni az ARHGAP1 intramolekuláris szabályozó mechanizmusát. Ennek alapján az N-terminális Sec14 domén ráhajlik a GAP doménre, ezáltal gátolva a GAP-aktivitást. Ezt a zárt konformációt nyitja a Rac C-terminálisára poszttranszlációs módosulás útján kerülő geranil-geranil oldallánc, megszüntetve az autoinhibíciót [81]. Az ARHGAP1 sejtmentes rendszerben dóziszfüggően gátolja a szuperoxid-termelést [103]. Az ARHGAP1 génhányos egereknél továbbá nagyfokú perinatális elhalálózást figyeltek meg, továbbá a megszületett egerek testének és szerveinek mérete lényegesen kisebb volt, mint a vad típusú társaiké. A megfigyelt vérképzési rendellenességek hátterében a megnövekedett JNK aktivitásból eredő fokozott apoptózis állt. A génhányos neutrofilek esetében migrációs zavarokat figyeltek meg, de az *in vitro* eredményekkel szemben nem számoltak be ROS-termelés zavarról [113, 114].

### 3.4.2.2.3.2 ARHGAP25

Munkacsoportunk 2012-ben klónozte meg és jellemezte ezt a neutrofil granulocitákban kifejeződő Rac-specifikus GAP-ot. A 645 aminosav hosszúságú fehérje a GAP doménon kívül N-terminálisan egy PH domént, valamint C-terminálisan egy szuperhelikális „coiled coil” szakaszt tartalmaz [102, 104]. A GAP doménon belül, a fehérje 192-es pozíciójában található a katalitikus arginin. A fehérje doménszerkezetét a 12. ábra mutatja. A sejten belül főképp a citoszolban található meg, de a PH és coiled coil doménje lehetővé teszi a membránhoz kötődését is. Sejtes rendszerben a fehérje csendesítése fokozta az opszonizált zimosán kiváltotta szuperoxid-termelést, de nem befolyásolta a PMA kiváltotta szuperoxid-termelést. A látott eredmények értelmezését nehezíti, hogy az ARHGAP25 csendesítése fokozza a sejtek fagocitózist, tehát elképzelhető, hogy a látott szuperoxidtermelés-fokozódás a nagyobb fagocitózis következménye és nem a GAP direkt hatása a NADPH-oxidázba épült Rac-on [104]. Az ARHGAP25 NADPH-oxidázra kifejtett közvetlen hatását nem vizsgálták eddig sejtmertes rendszerben. Erre vonatkozó eredményeinket a 6.2 fejezetben mutatom be.

### 3.4.2.2.3.3 ARHGAP35

Az ARHGAP35 (vagy p190A-RhoGAP) általánosan kifejeződő 1513 aminosav hosszú fehérje. Szerkezetére N-terminálisan egy még ismeretlen funkciójú GTP-kötő domén, egy közepső, difenilalanin motívumokat és SH3 domént kötő szakaszokat tartalmazó régió, valamint C-terminálisan egy polibázikus régió és egy GAP domén jellemző (12. ábra) [102, 110]. Az ARHGAP35 a Rac-kal és a Rho-val egyaránt képes együttműködni [115]. Munkacsoportunk megfigyelte, hogy a fehérje foszfolipidekhez történő kötődése, vagy foszforilációja befolyásolja a ARHGAP35 kis G-fehérjék iránti affinitását [80]. Más munkacsoportok kimutatták, hogy stimulált neutrofilekben az ARHGAP35 a citoszolból a plazmamembránhoz helyeződik [116]. Paul G. Heyworth és munkatársai azt tapasztalták, hogy *in vitro* körülmények között képes szabályozni a fagocita oxidázt [106]. Ugyanakkor az *in vitro* körülményekkel szemben az ARHGAP35 génhányos csontvelővel transzplantált egerek neutrofiljei nem mutattak eltérést a vad típusú egerek szuperoxid-termeléséhez képest (az ARHGAP35 hiánya embrionális elhaláshoz vezet, ezért volt szükség a csontvelő-transzplantációra) [117].

#### 3.4.2.2.3.4 Bcr

A *bcr* gént krónikus mieloid leukémia egy típusa kapcsán azonosították. Egy kromoszóma mutációt követően (Philadelphia kromoszóma) a 22-es kromoszómán kódolt *bcr* a 9-es kromoszómán kódolt *abl* tirozin-kináz génnel egy kiméra-proteint hoz létre [118]. A Bcr szerkezetében nagyon hasonlít a nála rövidebb Abr fehérjéhez. N-terminálisan egy szerin/treonin kináz domént találunk, ezt követi egy RhoGEF domén, melyen keresztül serkentheti a Rho fehérjék működését [119]. Ezután szorosan egy PH domén található, mely a fehérje membránhoz való kapcsolódását teszi lehetővé. A következő egy C2 domén, ami a fehérje kalcium-függő lipidkötéséért felel, végül ezt követi a RhoGAP domén. A GAP domén katalitikus argininje a 1090-es aminosav pozíciójában található (12-es ábra). Mind a Bcr-ről, mind az Abr-ről kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között képes a Rac, a Rho és a Cdc42 GTP-áz aktivitását fokozni [102, 110, 119]. A Bcr az ARHGAP1-hez hasonlóan *in vitro* sejtmentes rendszerben dóziszfüggően gátolja a szuperoxid-termelést [103]. Egy tanulmányban a Bcr génhiányos egerek fokozott immunválaszt mutattak LPS-kezelésre, majd két nappal a kezelés után elpusztultak. Ennek hátterében a neutrofilek aktivációra történő fokozott szuperoxid-termelése állt. Nem egyértelmű azonban, hogy a fokozott ROS-termelés hátterében a Bcr közvetlen, NADPH-oxidázt gátló hatásának hiánya áll. Megfigyelték ugyanis, hogy a génhiányos sejtek membránjaiban háromszor több Rac volt jelen, mint a vad típusú állatok esetében, ami a Bcr GAP-aktivitásától függetlenül is okozhatta a megnövekedett szuperoxid-termelést [105, 120].

A bemutatott GAP-ok hatását a szuperoxid-termelésére egymástól függetlenül és nem összehasonlítható módon vizsgálták (sejtes és sejtmentes rendszerekben, génhiányos állatokban). Nem készült eddig olyan tanulmány, amely az oxidázzal összefüggésbe hozott GAP-okat azonos körülmények között, egymással összemérhetően vizsgálná, vagy a membránokban található endogén, teljes hosszúságú GAP-ok funkcióját mutatná be. Az egyenlő Rac-GAP aktivitással rendelkező GAP-ok azonos körülmények melletti, szimultán vizsgálatát a NADPH-oxidáz működésére, valamint az endogén, membránkötött GAP-ok hatását az oxidáz működésére a dolgozat 6.2 fejezetében mutatom be.

### 3.5 Az extracelluláris vezikulák általános bemutatása

A neutrofil granulociták nem csak a sejten belül, a fagoszómában veszik fel a küzdelmet a kórokozókkal, hanem a sejtek közötti térben is képesek elpusztítani a patogéneket. A nagy tudományos figyelmet kapó neutrofil extracelluláris csapda (NET) [17, 18] képzése mellett a neutrofil képes antibakteriális extracelluláris vezikulák (EV) elválasztására is. A NET kialakulásához és antibakteriális hatásához szükség van a NADPH-oxidáz működésére, azonban eddig nem rendelkezünk adatokkal NADPH-oxidáz és a neutrofil granulocita eredetű EV kapcsolatáról.

Az extracelluláris vezikulák sejtekből származó, foszfolipid kettősmembrán által határolt, változó méretű struktúrák. Számos különféle elnevezésükkel találkozhatunk az irodalomban (mikropratikula, exoszóma, mikrovezikula, ektoszóma, prosztaszóma, onkoszóma, szubcelluláris vezikula stb.), amelyek méret, eredet, vagy egyéb tulajdonság alapján próbálják az EV-k egy csoportját megnevezni [121]. A jelenleg is tartó nevezéktani vita egyetértésen alapuló közös pontja, hogy összefoglaló néven extracelluláris vezikulának hívhatjuk őket. Dolgozatomban is ezt a kifejezést fogom használni.

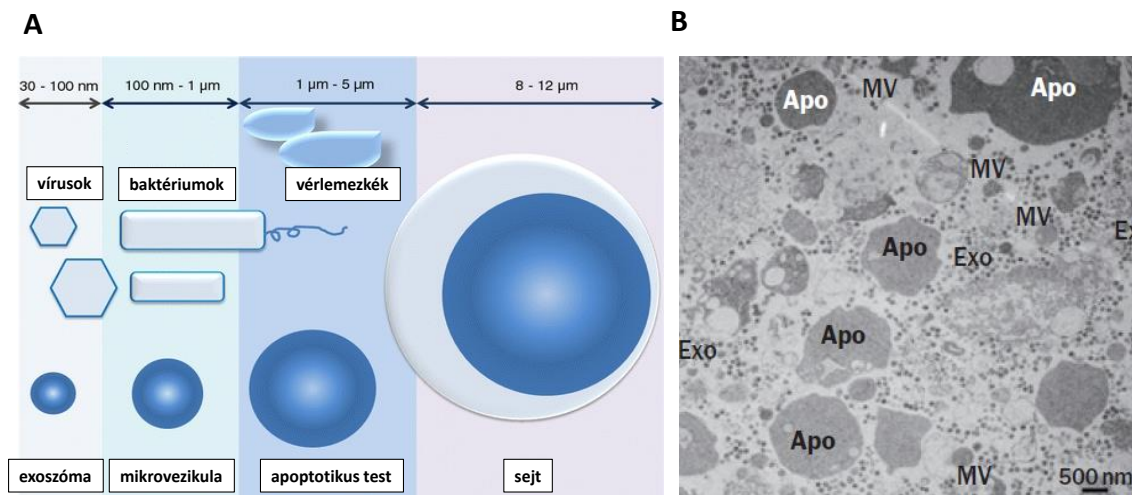
Az extracelluláris vezikulák világa egy viszonylag új területe a biológiai kutatásnak. Először az 1960-as évek derekán említették a „cellular dust”-nak elkeresztelt vérlemezke eredetű EV-kat a szakirodalomban [122]. Sokáig azonban csak sejtörmelékként tekintettek rájuk és a terület dinamikus fejlődése jóval később, a 2000-es évek elejétől indult meg. Mára alaptételként fogalmazhatjuk meg, hogy minden eddig vizsgált eukarióta sejtípus, de a prokarióta sejtek jelentős része is képes EV-k termelésére. EV-k keletkezhetnek spontán és aktiváció hatására, de nagy mennyiségben választódnak el programozott sejthalál során is. Fizikai tulajdonságaik és feltételezett, vagy bizonyított biológiai funkcióik legalább annyira sokfélék, mint ahány sejtől származhatnak [123-125]. Leírták szerepüket a véralvadásban [126], a transzferrin-receptor transzportban [127], az antigén bemutatásban [128], daganatos folyamatokban [129], illetve számos autoimmun betegségben is [130]. A sejtek EV-k termelésével képesek felszíni hírvivőket, aktivált receptorokat, másodlagos hírvivőket, sőt mRNS-t [131], miRNS-t [132], r- és tRNS-t juttatni egy másik sejtbe [133, 134]. Összefoglalóan a sejtek közötti kommunikáció egy új formája rajzolódik ki az EV működésének alaposabb megismerésével. Az EV világának feltárása nem csupán egyes élettani és

kóreltani folyamatok működésének pontosabb megértését teszi lehetővé, hanem új terápiás [135] és diagnosztikai [136] lehetőséget is jelent.

Az EV-k legelfogadottabb csoportosítása méretük alapján tesz különbséget az egyes alcsoportok között. A legkisebb méretű EV-kat exoszómáknak (30-100 nm) hívjuk. Ezek a vezikulák a multivezikuláris testek exocitózisával keletkeznek. Az exoszómák keletkezésüknek megfelelően endoszómális markereket hordoznak (pl.: CD63, CD9, CD81, Alix, Tsg101), ezáltal viszonylag könnyen azonosíthatók. Szintén jellemző rájuk a viszonylag nagy sűrűségük. Szacharózgradiens ultracentrifugálással viszonylag jól tisztíthatóak a 1,13-1,19 g/ml-es sűrűségű frakcióból. Ezek a vezikulák koleszterinben és szfingomielinben gazdag lipidraftokat hordoznak, emellett foszfatidil-szerin (PS) jelenik meg a külső felszínükön [137, 138].

A valamivel nagyobb EV-kat (100-1000 nm) mikrovezikuláknak nevezzük. Ezek a vezikulák a plazmamembránról fűződnek le, ennek megfelelően az anyasejtre jellemző markereket hordoznak felszínükön. Azonosításuk ezek és a külső foszfolipid-rétegben megjelenő PS segítségével végezhető el [138].

Az egy mikrométernél nagyobb EV-kat hagyományosan apoptotikus testeknek nevezi az irodalom. Jellegzetességük, hogy a PS felszíni megjelenése mellett DNS-t tartalmaznak [138]. Az EV-k méret szerinti csoportosítását a 13. ábrán mutatom be.



**13. ábra: Az EV-k méret szerinti csoportosítása. A) sematikus ábrán, B) transzmissziós elektronmikroszkópos felvételen (forrás:[130, 138]).**

A bemutatott felosztás legnagyobb hiányossága, hogy a különféle biológiai folyamatokban nem csak egyik, vagy másik mérettartományba eső EV-populáció keletkezik. Apoptózis során például keletkeznek 1 mikronnál kisebb átmérőjű vezikulák

is (ezt a 6.3. fejezetben én is bemutatom). Található olyan sokat idézett közlemény, amely ezért az EV keletkezést jellemző biológiai folyamat alapján elnevezett apoptorikus vezikulákról beszél, melyek mérete rendkívül változatos (50-5000 nm közötti) [139]. További kérdéseket vet fel a beosztás helyességével kapcsolatban, hogy a minta-előkészítés, a preparáció és az alkalmazott vizsgálati eljárás is befolyásolhatja a vezikulák méreteloszlását [139, 140].

### 3.5.1 A neutrofil granulocita EV-i

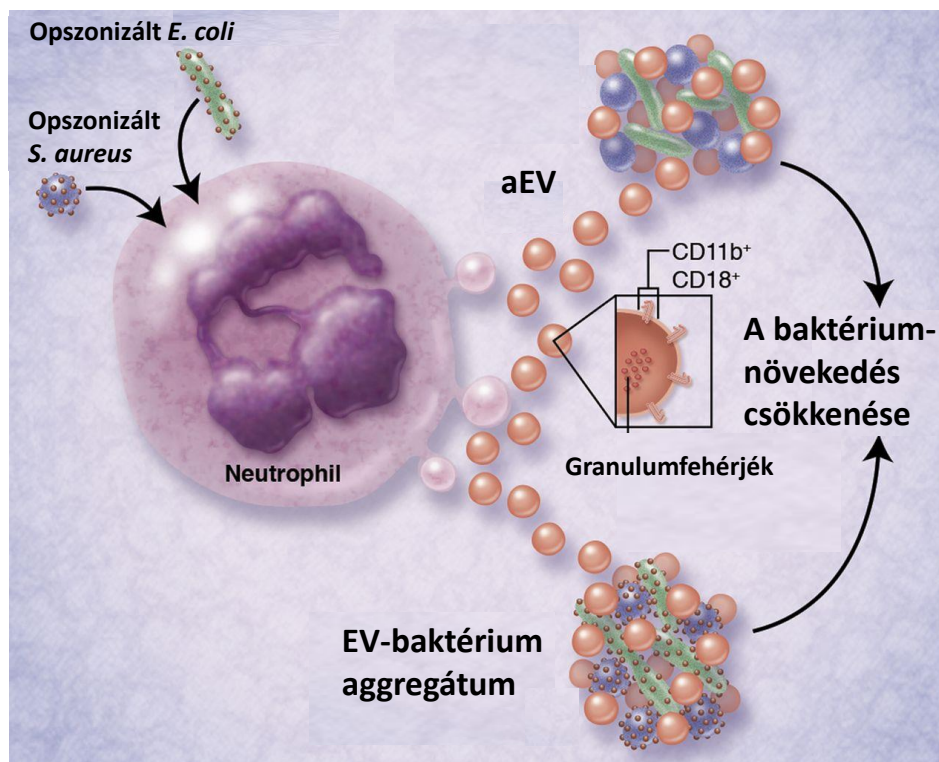
A neutrofil granulocita eredetű EV-k létezését viszonylag korán bemutatták [141, 142], élettani szerepükről mégis keveset tudunk. A különféle aktivációkra keletkező neutrofil EV-k fizikai jellemzését nagy alaposággal végezte el Jürg Schifferli és munkacsoportja. Közleményeikben ektoszómának nevezik az fMLF és PMA stimulusra keletkező EV-kat. Ezek az EV-k 200-500 nm közötti átmérővel rendelkeznek, és szelektínek, integrínek, komplementreceptort, HLA-1-et, Fc $\gamma$ RIII-t, CD66b markert és foszfatidil-szerint hordoznak a felszínükön [143]. Bemutatták, hogy ezek az EV-k megváltoztatják a monocita/makrofág sejtek citokintermelését. Az EV-k hatására a monociták anti-inflammatórikus citokineket választottak el [143-148]. Eredményeik összecseengenek más, szintén neutrofil eredetű EV-k hatásaival foglalkozó munkacsoportok közleményeivel [149, 150].

A neutrofil EV-k endotélsejtekre gyakorolt hatásával is több közlemény foglalkozik. Az endotélen alvadási folyamatokat serkentő sejt felszíni változásokat, és fokozott szöveti faktor leadást igazoltak [141, 142]. Leírták a neutrofil EV-k protrombotikus hatását *N. meningitidis* infekcióban is [151]. A hatás hátterében az EV-k PAF [152] leadása, illetve az EV-k felszínén jelenlévő aktivált konformációjú Mac-1 integrinkomplex vérlemezke-aktiváló hatását találták [153].

Munkacsoportunk az eddigiektől eltérő, új megközelítésben vizsgálta a neutrofilek EV-it. Kimutattuk, hogy opsonizált *S. aureus* bekebelezése után a sejtek erőteljesen fokozzák EV-termelésüket a nyugvó sejtek spontán EV-termeléséhez képest. A neutrofil természetes ellensége, az opsonizált baktérium vagy gomba által kiváltott EV-k (aEV) nem csak mennyiségükben, hanem fehérje-összetételükben és funkcionálisan is eltérnek a nyugalomban termelt EV-ktől (sEV). A sEV-hoz képest több granulomfehérjét és sejt felszíni receptort tartalmazó aEV frakciónak bakteriosztatikus hatása van a Gram-



pozitív *S.aureus*-ra és a Gram-negatív *E. coli*-ra, de nincs hatással a *P. mirabilis*-re. Az antibakteriális hatás hátterében egy opsonizációtól független aggregátumképződést találtunk az aEV-k és a baktériumok között, aminek létrejöttéhez glukózra, ép vezikulaszervezetre és aktinvázra, illetve működőképes PI3K-ra van szükség (14. ábra) [154]. Nem ismert azonban, hogy az antibakteriális hatásban van-e szerepe a reaktív oxigénszármazékoknak, egyáltalán képesek-e ROS-kat termelni ezek a neutrofil eredetű EV-k. Ezzel kapcsolatos eredményeinket a 6.3-as fejezetben mutatom be.



14. ábra: Az opsonizált baktériumok hatására keletkezett aEV-k antibakteriális hatása (forrás:[155], módosítva).

A neutrofilek nagy száma, rövid életideje és a szervezet szöveteire is veszélyes eszköztára miatt, gondosan szabályozott folyamat során kell eltávolítani a szervezetből az elhaló sejteket. Ennek első lépése, hogy az elhaló neutrofil olyan morfológiai változásokat mutat, amelyet a monocita/makrofág rendszer sejtjei felismernek és fagocitózissal eltakarítják a sejt maradványait [156]. A folyamat jelentőségét jelzi, hogy károsodása esetén autoimmun betegségek jelentkezhetnek [157-159]. Bár a morfológiai változások alapján a neutrofil halálának több lehetséges módja is ismert (apoptózis, autofágia, onkózis, proptózis, fagocitózis indukált sejthalál, NETózis), kevés kísérletes adat található az irodalomban a sejthalál közben képződő EV-kről. Egyes áttekintő

tanulmányok a neutrofil esetében az apoptotikus test kifejezést a lekerekedő magot is tartalmazó sejtest megnevezésére használják. Ezek a munkák nem tartják jellemzőnek az *in vitro* neutrofil apoptózis során membránhólyagok képződését és lefűződését [23, 160]. Ezzel szemben az általunk és mások által jellemzett *in vitro* neutrofil eredetű EV-k számos tulajdonságukban osztoznak az apoptotikus testekkel [143, 154]. Munkacsoportunk eredményeit a neutrofil spontán halála során képződő EV-kről az 6.3.2 fejezetben mutatom be.

### 3.6 Az EV-kutatás lehetőségei és korlátai

Az olyan klasszikus vizsgálómódszerek fejlődése, mint az áramlási citometria, elektronmikroszkópia, konfokális mikroszkópia, illetve a kimondottan kisméretű részecskék vizsgálatára kifejlesztett eljárások, mint a nanoparticle tracking analysis [161] és a tunable resistive pulse sensing [162] lehetőséget teremtenek egy új mérettartomány vizsgálatára a biológiában. Az EV-k világa pont olyan izgalmasan új területnek tűnik, mint a mikroszkopikus világ felfedezése Robert Hooke számára. A folyamatosan bővülő lehetőségek mellett, azonban számos technikai tényező nehezíti a vezikulák izolálását, elemzését. A mintavétel módja, a vizsgálati anyag előkészítése és az EV-preparálás megváltoztathatja a vizsgált minta tulajdonságait [140]. Például a leginkább elfogadott izolálási eljárás, a differenciáló centrifugálás károsíthatja a vezikulákat, ahogy a szacharógradiens, vagy a polimer alapú EV-tisztítási technikák is. Számos preparációs lépésnél veszíthetünk el vezikulákat, de új EV-populáció is megjelenhet, ha sejtek, vagy nagyobb vezikulák esnek szét a mintában. Nemkívánatos EV-populációt jelentenek a sejt kultúrák növesztéséhez használt szérumban lévő EV-k, vagy az apoptózis során keletkező EV-k [163, 164]. Nincs kialakult összhang az EV-minták megfelelő tárolási módjáról sem. A legtöbb munkacsoport fagyasztva tárolja a tisztított EV-preparátumokat, de eddig nem készült átfogó vizsgálat a fagyasztva tárolt EV-k tulajdonságainak esetleges megváltozásáról [161, 165, 166]. Munkacsoportunk EV tárolással kapcsolatos megfigyeléseit és ajánlását a 6.3 fejezetben mutatom be. Élénk vita zajlik a leggyakrabban használt vizsgálóeljárások helyes beállításáról is. Az áramlási citométeres vizsgálatoknál a „tömegdetektálás” jelensége torzíthatja az adatokat [162], az elektronmikroszkópos és atomerő-mikroszkópos felvételeknél a fixálás és beágyazás során elszenvedett deformációk kiszűrése a fő kihívás. Az újonnan

fejlesztett vizsgálómódszerek esetében az eddig még nem felismert felhasználási korlátok is téves következtetéshez vezethetnek [167]. Az EV-kutatók körében a felsorolt nehézségek miatt az az általánosan elfogadott irányelv, hogy több különböző vizsgálómódszerrel érdemes a megfigyeléseket alátámasztani [168, 169].

## 4 Célkitűzések

Az értekezés alapjául szolgáló munkám során a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését szabályozó mechanizmusokkal foglalkoztam és a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Befolyásolják-e az oxidált foszfolipidek a fagocita NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülését és szuperoxid-termelését?
2. Szabályozza-e az ARHGAP25 fehérje a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését sejtmentes rendszerben?
3. Mely membránkött GAP-ok szabályozhatják a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését?
4. Termelnek-e a neutrofil granulocita eredetű EV-k, különösképpen az antibakteriális hatással rendelkező aEV-k szuperoxidot, és van-e szerepe a reaktív oxigénszármazékoknak az antibakteriális hatásban?

## 5 Módszerek

### 5.1 Neutrofil granulociták preparálása

Méréseinkhez egészséges véradók perifériás véréből, vagy az Országos Vérellátó Szolgálatól beszerzett „buffy coat” készítményekből preparáltunk polimorfonukleáris sejteket (PMN) – a Semmelweis Egyetem etikai engedélyében meghatározott eljárás szerint – Ficoll-gradiens centrifugálással. A PMN készítményben a neutrofilek aránya 95% körül alakult (May-Grünwald Giemsa festés után mikroszkópban vizsgálva). A szennyező sejtek eozinofil granulociták és vörösvértestek voltak [170].

### 5.2 Neutrofil granulocita citoszol- és membránfrakció tisztítása

A vérkészítményből nyert PMN sejteket proteázgátlókat tartalmazó pufferben (0,34 M szacharóz, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 100  $\mu$ M leupeptin PBS-ben; pH 7,0) szuszpendáltuk fel és 10 percig 1 mM diizopropil-fluorofoszfáttal kezeltük őket jégen. Ultrahang segítségével feltártuk a sejteket (30 W / 3 x 15 másodperc), és a keletkezett lizátumot 1200 g gyorsulással centrifugáltuk 10 percig. A sejtmagoktól és a fel nem nyílt sejtektől mentes felülúszót szacharózgradiensre (17%/40% tömegszázalékos) rétegezve, 160 000 g gyorsulással ultracentrifugáltuk 30 percig. A citoszolfrakciót a gradiens tetejéről gyűjtöttük, a membránfrakciót a 17% és 40%-os szacharóz rétegek határáról [78]. A frakciók fehérjekoncentrációját Bradford-módszerrel határoztuk meg.

### 5.3 Fehérjemennyiség-meghatározás

Mintáink fehérjemennyiség-meghatározását a Bradford szerint leírtak alapján végeztük [171]. Ismert mennyiségű albumint tartalmazó oldat segítségével 600 nm-es hullámhosszon optikai denzitás (OD) kalibrációs egyenest vettünk fel, amely segítségével meghatároztuk a hasonló körülmények mellett megmért minta OD-a alapján a fehérjekoncentrációt.

#### 5.4 A felhasznált rekombináns fehérjéket kifejező baktériumtörzsek

A glutation-S-transzferázzal (GST) kapcsolt Rac1-et, Bcr-t és ARHGAP1-et kódoló plazmidokat hordozó *E. coli* baktériumtörzset Alan Hall-tól kaptuk (London, Egyesült Királyság). A p67<sup>phox</sup>-ot és a p47<sup>phox</sup>-ot kódoló plazmidot kifejező *E. coli* baktériumtörzset Frans Wientjes-től kaptuk (London, Egyesült Királyság). A GST-vel kapcsolt ARHGAP25 plazmidot hordozó *E. coli* baktériumtörzset Csépanyi-Kömi Roland munkatársam állította elő [104]. A GST-vel kapcsolt 1191 aminosav hosszúságú ARHGAP35-öt kódoló plazmidot hordozó *E. coli* baktériumtörzset Lévay Magdolna munkatársam állította elő [80].

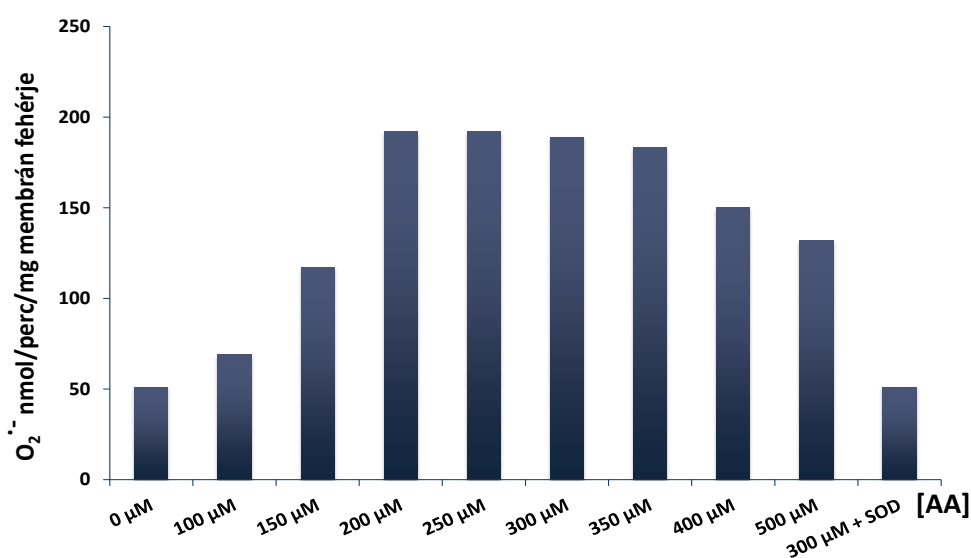
#### 5.5 Rekombináns fehérjék előállítása

A GST-fúziósfehérjék előállításához az *E. coli* baktériumokat 10 órán keresztül 37°C-on 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB oldatban (1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 0,5% NaCl, 1 mM NaOH-dal 7,0-ra állítva a pH-t) növesztettük. A fehérjetermelést 0,5 mM IPTG-vel indítottuk, majd 4 órás 37°C-os (a p47<sup>phox</sup> és p67<sup>phox</sup> fehérjék esetében 12 órás, 30°C-os) inkubáció után a baktériumokat leüleptítettük (4°C, 4000 g, 15perc). Az üleptített baktériumokat proteázgátlókat (2 µM pepstatin, 10 µM leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF) tartalmazó 6 ml hideg feltáró pufferben (50 mM Tris-Cl (pH 7,6), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) vettük fel. A baktériumokat ultrahang segítségével (30 W / 5 x 1 perc) tártuk fel. Centrifugálással (4°C, 6500 g, 30 perc) választottuk szét a baktériumfalat és membrántörmeléket tartalmazó üledéket és a megtermelt fehérjéket tartalmazó felülúszót. Az óvatosan leszívott felülúszót glutation-Sepharose gyöngyökkel 30 percig, 4°C-on forgattuk. A gyöngyöket ezután centrifugáltuk (4°C, 1000 g, 1 perc) és feltáró pufferrel ötször mostuk. A fehérjét 500 µl glutationos pufferrel (5 µg/ml glutation, 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, és 1 mM DTT) oldottuk le a gyöngyökről, és a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

#### 5.6 A szuperoxid-termelés vizsgálata sejtmentes rendszerben

Sejtmentes rendszerben a szuperoxid-termelést a citokróm c szuperoxid-dizmutázzal (SOD) gátolható redukcióján alapuló módszerrel mértük. Nyers (crude) rendszerben a PMN sejtek membránfrakcióját (10 µg fehérje) és citoszolfrakcióját (50 µg fehérje)

tartalmazó minta szuperoxid-termelését mértük 125  $\mu\text{M}$  citokróm c, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$  FAD és 3  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S jelenlétében. A félrekombináns rendszerben a citoszolt rekombináns úton előállított GST-fúziós p47<sup>phox</sup> (0,3-1  $\mu\text{g}$ ) és p67<sup>phox</sup> (0,3-1  $\mu\text{g}$ ) fehérjékkel helyettesítettük. Ebben a felállásban a NADPH-oxidáz összeépüléséhez szükséges Rac a membránfrakcióban található. A fagocita NADPH-oxidáz összeépülését arachidonsav hozzáadásával indítottuk. A szükséges AA-mennyiség meghatározására minden membrán- és citoszolpreparátum esetében AA-kalibrációt készítettünk az 50 és 800  $\mu\text{M}$ -os koncentrációtartományban (15. ábra). Az AA hozzáadása után 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a mintánkat, ezalatt épült össze a NADPH-oxidáz az alegységekből. A szuperoxid-termelést 250  $\mu\text{M}$  NADPH hozzáadásával indítottuk, és 20 percig követtük. Párhuzamosan 100  $\mu\text{g}$  szuperoxid-dizmutázt tartalmazó minták citokróm redukcióját is mértük. A termelődött szuperoxid mennyiségét a citokróm c SOD-zal gátolható redukciója alapján határoztuk meg. A citokróm redukciója során az OD arányosan növekszik a termelt szuperoxid mennyiségével az 550 nm hullámhosszúságú tartományban. Az OD leolvasását Labsystems iEMS Microplate Reader segítségével félpercenként végeztük. A kapott redukciós görbe kezdeti lineáris szakasza alapján számoltuk a termelt szuperoxid mennyiségét a citokróm c abszorpciós koefficiensét ( $21000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) használva [172].



**15. ábra:** A NADPH-oxidáz összeépülésének és a szuperoxid-termelésnek AA-koncentráció-függése 1  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S jelenléte mellett, félrekombináns rendszerben (representatív ábra). Minden membránfrakció-preparátum esetében meghatároztuk az optimális AA-koncentrációt. A méréseinket a továbbiakban a legnagyobb szuperoxid-termelést mutató AA-koncentráció jelenlétében végeztük.

### 5.7 Anti-ARHGAP1 és anti-ARHGAP25 antitestek tisztítása

A poliklonális ARHGAP1 és ARHGAP25 specifikus ellenanyag előállítása során Csépanyi-Kömi Roland munkatársam nyulakat immunizált a GST-ARHGAP25 (509-619 aminosavak közti rész) és a GST-ARHGAP1 (198–439 aminosavak közti rész) rekombináns fehérjéssel. A termelt ellenanyag szérumból történő tisztításához, glutation-agaróz gyöngyhöz kapcsolt GST-t, GST-ARHGAP1-et és GST-ARGAP25-öt állítottunk elő. A gyöngyöt 50-szeres térfogatnyi NETN pufferben (0,5% NP-40, 20 mM Tris-Cl (pH 8,0) 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk, majd 1 percig 770 g gyorsulással centrifugáltuk. Ezt követően 12 órán át 4°C-on forgattuk 10-szeres térfogatnyi NETN pufferben, majd ismételt centrifugálás után 1 ml NETN pufferben tároltuk. A gyöngyöket a felhasználás előtt közvetlenül mostuk 10 ml NETN pufferben, majd kétszer 0,1 M borát pufferben (pH 8,0). Ezután egyszer mostuk 0,1 M-os pH 9,0-s, majd még egyszer 0,2 M-os, pH 9,0-s borát pufferben. A GST-fúziós fehérjék keresztkötését 40 mM-os dimetilpimelinidát (0,2 M pH 9,0-s borát pufferben oldva) oldattal végeztük. Ennek során a gyöngyöket 1 órán át forgattuk 4°C-on. A gyöngyöket kétszer mostuk 0,1 M borát pufferben (pH 8,0), majd 40 mM etanolaminban (0,1 M, pH 8,0 borát pufferben oldva) 45 percig forgattuk 4°C-on. A gyöngyöket háromszor mostuk hideg PBS-sel, illetve egyszer 0,2 M glicin-HCl (pH 2,5) oldattal, és egyszer mostuk 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-tal, majd kétszer ismét PBS-sel. A mosási lépések után először a GST-t kötő gyöngyökhöz adtuk a megtisztítandó 8 ml hígított nyúlszérumot (a hígítás során 4 ml szérumhoz 4 ml PBS-t adtunk, amely tartalmazott 0,2% Tween20-at). Az ezt követő inkubálást forgókeverőben 4°C-on, 4 órán át végeztük. Miután eltávolítottuk a szérumból a GST-t felismerő ellenanyagok jelentős részét, a GST-gyöngyről visszanyert felülúszót tovább forgattuk a GST-ARHGAP1, illetve GST-ARHGAP25 fehérjérszt kötött gyöngyökkel, 4 órán át, 4°C-on. Ezt követően az ellenanyagokat megkötött gyöngyökből üvegcsőben oszlopot készítettünk, amelyet háromszor mostunk 10 ml, 0,2% Tween20-at tartalmazó PBS-sel, majd még kétszer tiszta PBS-sel. A kötődött ellenanyagokat 0,2 M-os glicin-HCl (pH 2,5) oldattal eluáltuk 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe (öt, egyenként 750 µl-es frakciót szedtünk), melyekbe előzőleg 250 µl, 1 M-os K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oldatot tettünk. Ezt követően Bradford módszerével meghatároztuk a frakciók fehérjemennyiségét, majd a legmagasabb fehérjetartalmat



mutató frakciókat összeöntöttük. Az ellenanyagot tartalmazó mintát 1000 ml PBS/glicerin oldatban (PBS:glicerin arány 1:1) 12 órán át dializáltuk 4°C-on.

### **5.8 Neutrofil granulocita membránfrakciójának immundepléciója**

A membránfrakciót 40 mM végkoncentrációjú oktilglikoziddal (oktil- $\beta$ -D-glukopiranozid) kezeltük 20 percig 4°C-on. Ezután antitestekkel telített protein A-Sepharose (anti-ARHGAP1, anti-ARHGAP25 és poliklonális nyúl kontrollantitest), vagy protein G-Sepharose (anti-ARHGAP35 és monoklonális IgG<sub>1</sub> izotípus kontrollantitest (mindkettő BD Transduction Laboratories)) gyöngyökkel forgattuk 15 percen keresztül 4°C-on. A forgatás után a mintát mikrocentrifuga szűrőn (0,45  $\mu$ m pórus) keresztüli centrifugálással (20 000 g, 2 perc, 4°C) szűrtük. A gyöngyök a szűrőn fennakadtak, a depletált membránfrakció a szűrletbe került. Új depléciós gyöngyök jelenlétében még kétszer ismételtük a forgatást és a szűrést. A depléció hatékonyságát Western blot segítségével ellenőriztük.

### **5.9 SDS gélelektroforézis és Western blot**

Egyenlő fehérjemennyiségeket tartalmazó mintákat négyszeres töménységű Laemmli-puffer (252 mM Tris-HCl, 40% glicerin, 8% SDS, 0,04% brómfenolkék, 4%  $\beta$ -merkaptoetanol, pH 6,8) hozzáadásával 10 percig forraltunk 100°C-on. A fehérjék méretszerinti szétválasztását 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével végeztük. A szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk, majd ezt követően a membránokat 5%-os, zsírszegény tejport és 0,1% Tween20-at tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk 12 órán át. A blokkolt membránt anti-ARHGAP1 poliklonális ellenanyaggal (1:1000 hígításban), anti-ARHGAP25 poliklonális ellenanyaggal (1:1000 hígításban), illetve anti-ARHGAP35 monoklonális ellenanyaggal (1:1000 hígításban) inkubáltuk. Második ellenanyagként kecskében termeltetett, tormaperoxidázt kötő antitesteket használtunk 10000-szeres hígításban (Sigma-Aldrich). Az első és második ellenanyagokkal történő inkubálások után a membránokat 5-6-szor mostuk 0,1% Tween20-at tartalmazó PBS-ben. Az ilyen módon kezelt membránokhoz ECL szubsztrátot adtunk és az enzimreakció során keletkezett kemilumineszcens jelet FUJI Super RX filmekken rögzítettük. A denzitometriás kiértékelést „ImageJ” programmal

(1.4 verzió, National Institutes of Health, USA) végeztük a háttér denzitásának levonásával.

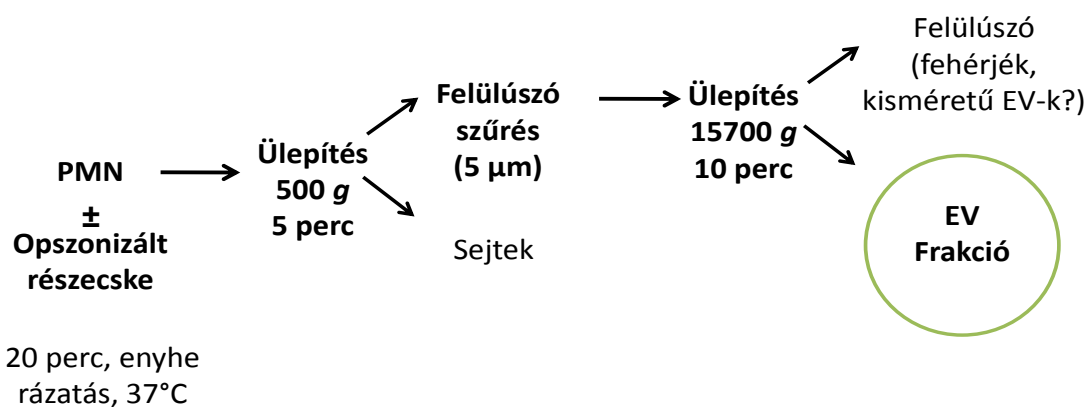
### 5.10 GTP-áz aktivitás mérése sejtmentes rendszerben

A rekombináns fehérjék GTP-áz aktivitását a Self és munkatársai által leírt nitrocellulóz-kötés módszerrel mértük [173]. A Rac radioaktív GTP-vel történő töltése során 3-4 µg rekombináns Rac1 fehérjét 5 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten radioaktív [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP-vel (több, mint 5000 Ci/mM), alacsony  $Mg^{2+}$ -koncentrációjú pufferben (16 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 5 mM EDTA és 100 nM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP). Ezt követően 20 mM  $MgCl_2$ -t adtunk az oldathoz, hogy a további nukleotidcserét gátoljuk, illetve az oldatot jégen tartottuk, hogy csökkentsük a Rac1 GTP-áz enzimaktivitását. A GTP-áz reakció során 3 µl [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP-vel töltött kis G-fehérjét adtunk 27 µl 20°C-os reakciópufferhez (16 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM DTT, 1 mg/ml albumin, 1mM nem jelölt GTP), amely már tartalmazta a vizsgálni kívánt GAP fehérje készítmény 1 µl-ét. Ezen keverékből 5 µl mennyiségeket vettünk 5 perces időközönként, és 0,45 µm pórusméretű nitrocellulóz membránon szűrtük át. A membránokat ezután kétszer mostuk 5-5 ml 4°C-os mosópufferrel (50 mM Tris-HCl, 5 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,7). Vákuumos szárítás után a membránokat szcintillációs küvettákba tettük, majd a radioaktivitást Beckman LS 5000TD folyadék-szcintillációs spektrométerben olvastuk le [80].

### 5.11 Extracelluláris vezikulák preparálása

Az extracelluláris vezikulákat minden esetben egészséges véradók perifériás véréből származó PMN sejtekből nyertük. A preparált sejtek aktiváció nélkül is elválasztottak EV-kat. Ezeket hasonlóan tisztítottuk, mint az aktiváció után, vagy a sejtek spontán sejthalála közben keletkező vezikulákat. Az EV termeltetés során  $10^7$  db sejtet fél órán át inkubáltunk 50 ml-es polipropilén csövekben, aktiváló anyag jelenlétében, vagy hiányában, enyhe lineáris rázatás (80 rpm) mellett, 37°C-on. A mintákat mikrocentrifuga-csővekbe mértük (minden csőbe 1 ml került) és a sejtes elemektől centrifugálással (500 g, 5 perc, 4°C) tisztítottuk meg. A centrifugálás után a felülúszóban maradhettek még sejtek, vagy sejtörmelék, ezért a felülúszó felső 500 µl-

ét egy 5 µm pórusú szűrőn csepegtettük át nyomás alkalmazása nélkül, a gravitáció kihasználásával. Az így kapott szűrletből egy második centrifugálással ülepítettük az EV-kat (15 700 g, 10 perc, 4 °C-os). Ezt az üledéket 500 µl HBSS-ben vettük fel (Sigma-Aldrich). A spontán sejthalál közben termelődött EV-ket hasonló módon tisztítottuk. Ez esetben az EV-preparációt megelőzően a sejteket 1, 2, vagy 3 napig DMEM médiumban (Sigma-Aldrich) tartottuk 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett 37°C-on. Az EV tisztítási stratégiánkat a 16. ábra szemlélteti. Ezzel a módszerrel valószínűleg nem ülepítettük a mintában előforduló összes EV-t. A kisebb, exoszóma méretű vezikulák jelentős része a második centrifugálás felülúszójában maradhatott és az is valószínű, hogy az első centrifugálási lépésnél is elveszítünk nagy méretű EV-kat.

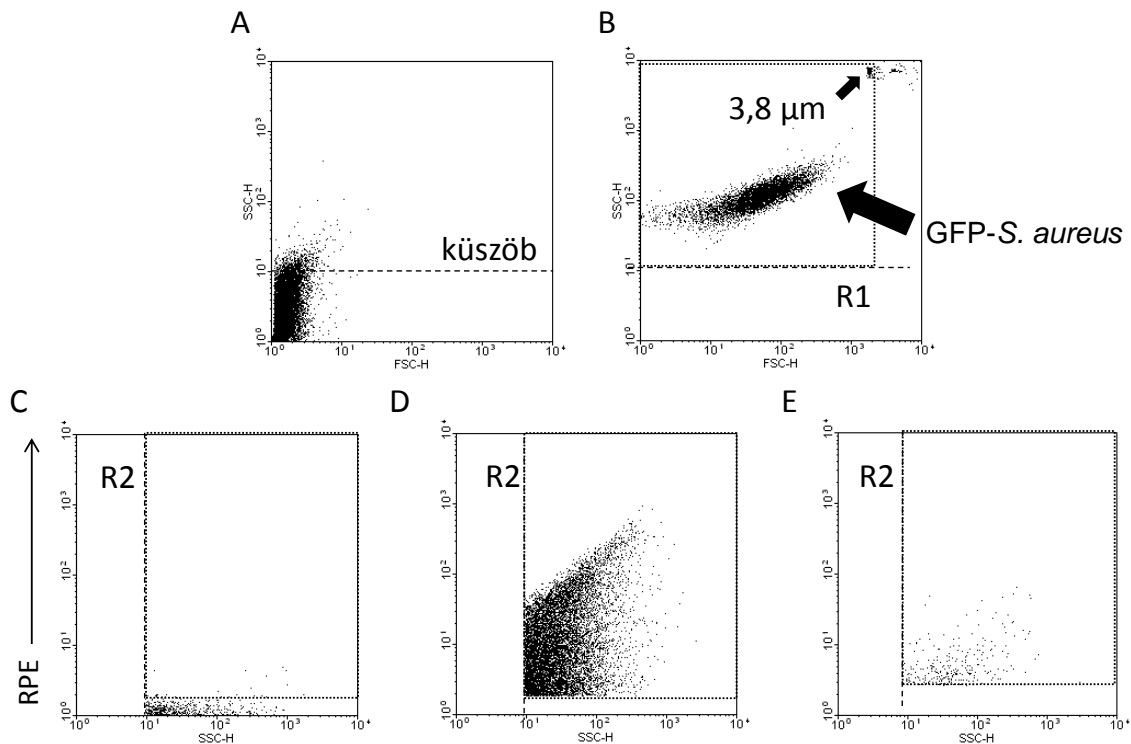


16. ábra: Az EV-preparáció stratégiánk.

## 5.12 Az extracelluláris vezikulák áramlási citométeres vizsgálata

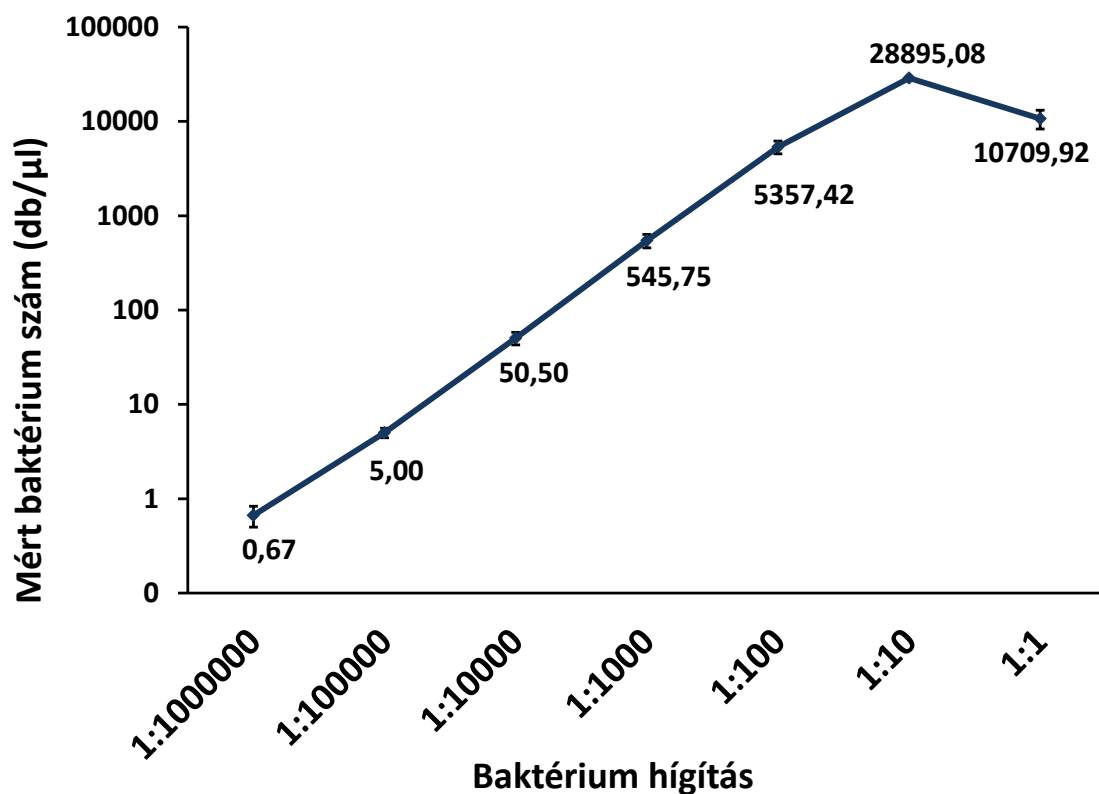
Az extracelluláris vezikulák áramlási citométeres vizsgálatához az EV-ket fluoreszcens anti-CD11b-RPE antitesttel (Dako) jelöltük (30 perc, 37°C). A jelölés után HBSS-sel mostuk az EV-kat. A méréseket FACSCalibur citométeren végeztük (Becton Dickinson). A kapuzási stratégiánkat a 17. ábrán szemléltetem. Tiszta HBSS vizsgálatával meghatároztuk a készülék saját zajszintjét és az SSC szerint felhelyezett detektálási küszöböt a zaj fölé helyeztük (17. ábra A). Az EV-k FSC és SSC szerinti mérettartomány meghatározásához 3,8 µm-es fluoreszcens gyöngyöket (SPHERO Rainbow Alignment Particles, Spherotech) és GFP-t kifejező *S. aureus* baktériumokat használtunk (17. ábra B). Az EV kapu (R1) felső értékét a 3,8 µm-es gyöngyökhöz igazítottuk. A biológiai membránnal határolt baktériumok (átmérőjük dinamikus fényszórás alapján kb. 800 nm) refraktív indexe sokkal közelebb esik a foszfolipid-

membránnal határolt EV-k refraktív indexéhez, mint a mesterséges gyöngyöké [174, 175], ezért a kaput úgy állítottuk be, hogy a teljes baktériumpopuláció beférjen. A FACSCalibur által megbízhatóan detektált legkisebb részecske körülbelül 300 nm-es lehet [175]. A fluoreszcens kapu (R2) az izotípus kontrollantitesttel jelzett EV populáció jele fölött került felvételre (17. ábra C). Azok az események kerültek EV-ként számszerűsítésre és jellemzésre, amelyekre egyaránt érvényes az R1 és R2 kapu (17. ábra D). A mért események vezikuláris természetének igazolásához 1%-os TritonX-100 detergenssel kezeltük a mintáinkat. A detergenskezelés után az EV-feltételeinknek megfelelő eseményszámot (kb. az események 5%-a) levontuk az EV-k számszerűsítésénél, mert ezek valószínűleg immunkomplexek vagy fehérjeaggregátumok voltak (17. ábra E) [140].



**17. ábra: Kapuzási stratégiánk az áramlási citométeren az EV szám meghatározás során.** A) detektálási küszöböt a nagytisztaságú HBSS oldat mérése után állítottuk be. B) Az FSC és SSC mérőfejek erősítését 3,8 µm-es gyöngyök és 0,8 µm-es fluoreszcens baktériumok segítségével állítottuk be. Az R1 kapuba a 3,8 µm-es és annál kisebb események kerültek. C) Az R2 kaput RPE-izotípus kontrollantitestekkel kezelt EV-preparátum fluoreszcens jelenél intenzívebb tartományra határoztuk meg. D) Vizsgálatainkban EV-nak tekintettünk azokat az eseményeket, amelyek RPE-anti-CD11b antitesttel jelölve egyaránt megjelentek az R1 és az R2 kapukban. E) A számszerűsítés során a detergenskezelésre nem érzékeny eseményszámot levontuk az eredményből. Reprezentatív ábra.

A tömegdetektálás elkerülése céljából fluoreszcens baktériumok segítségével határoztuk meg az optimális áramlási sebességet.  $OD_{600}=1$  töménységű baktérium oldatból 10-szeres hígításokat készítettünk, és ezeket számszerűsítettük az áramlási citométerben (18. ábra). Jó korrelációt találtunk a mért események száma és a hígítás mértéke között az 1:1000000 és 1:100 hígítási tartományban. Az 1:100 hígításnál a detektált eseménygyakoriság 2000 esemény/másodperc volt. A tömegdetektálás elkerülése miatt további méréseinkben az eseménygyakoriságot 1000 esemény/másodperc alatt tartottuk.



18. ábra: A FACSCalibur áramlási citométer mérési tartományának meghatározása. Fluoreszcens *S. aureus* szuszpenzió 600 nm-es hullámhosszon mért OD-át 1-es értékre állítottuk. Az ebből az oldatból készített 10-szeres hígítási sor koncentrációját lemértük és ábrázoltuk a hígítás függvényében. A grafikonon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam.

### 5.13 Baktériumok és elölt élesztő sejtek preparálása és opszonizálása

A kísérleteinkhez használt *S. aureus* törzset (ATCC: 29213) a Semmelweis Egyetem Mikrobiológiai Intézetéből kaptuk. A minta koncentrációját OD alapján állítottuk be 600 nm-en 1-es értékre. Az ilyen oldatokban a baktériumkoncentráció kb.  $10^9$  sejt/ml-

nek tekinthető [176]. Ezt *S. aureus* esetében egy hígítási sor áramlási citométeres vizsgálatával ellenőriztük (18. ábra). Ez alapján  $OD_{600}=1$  értéknél kb.  $5 \times 10^8$  baktérium/ml értékkel számolhattunk. A baktériumok opszonizációját legalább 3 egészséges donorból származó kevert szérummal végeztük 30 perces enyhe rázás mellett, 37°C-os inkubációval. Az opszonizált baktériumokat PBS-sel mostuk és HBSS-ben vettük fel. A sütőésztőt kiskereskedelmi áruházban vásároltuk, desztillált vízben oldottuk és főztük 95°C-on 1 órán át. A Bürker-kamra segítségével számszerűsített észtő sejteket a baktériumokhoz hasonló módon opszonizáltuk.

#### 5.14 Extracelluláris vezikulák szuperoxid-termelésének vizsgálata

Az extracelluláris vezikulák és a pozitív kontrollként használt PMN sejtek sejten kívüli térbe irányuló szuperoxid-termelését a citokróm c SOD-zal gátolható redukcióján alapuló módszerrel mértük. A fagoszómán vagy vezikulán belüli térbe történő szuperoxid-termelés mérésére lucigenint használtunk, mivel a citokróm c nem jut be a sejtbe, a lucigenin viszont igen. Mindkét módszer esetében  $2 \times 10^6$  db sejt, illetve a vezikulák esetében az  $5 \times 10^6$  db neutrofilból keletkező vezikula szuperoxid-termelését vizsgáltuk. Mindkét mérést HBSS oldatban végeztünk. A mintákhoz 50 µg/ml végkoncentrációban, dimetil-szulfoxidban oldott lucigenint, vagy 100 µM citokróm c-t adtunk. A mintákat 10 percig előinkubáltuk 37°C-on, majd 100 nM végkoncentrációjú PMA, vagy  $2 \times 10^7$  db opszonizált *S. aureus* hozzáadásával indítottuk a szuperoxid-termelést. A citokróm c-vel mért szuperoxid-termelést a korábban leírt módon (5.6 fejezet) iEMS ELISA reader-rel (Labsystems) követtük. A lucigenines mérésekben Fluoroskan Ascent FI luminométerrel (Labsystems) követtük a szuperoxid-termelést.

#### 5.15 Baktériumnövekedési teszt

A PMN sejtek és a különféle extracelluláris vezikulák antibakteriális hatását baktériumnövekedési teszttel vizsgáltuk. A módszert a korábban a laborunkban dolgozó munkatársunk, Rada Balázs fejlesztette ki [170]. Az eljárás lényege, hogy a baktériumokat ( $9 \times 10^7$  /ml-es végkoncentrációban)  $9 \times 10^6$  /ml koncentrációjú PMN sejtrel, vagy ugyanennyi PMN sejtől szeparált EV-val inkubáltuk 30 percen át, 0,5 ml ösztérfogóban, 37 °C-on, enyhe rázás mellett. Az inkubáció kezdetén, majd 30 perccel

később is mintát vettünk és ezt 10-szeres térfogatú jéghideg, 1 mg/ml szaponin tartalmú HBSS oldatba helyeztük, amely leállította a további baktériumnövekedést, illetve feltárta a sejteket és vezikulákat. A második mintavételt követően a mintákat  $-80^{\circ}\text{C}$  fokra hűtöttük, majd 20 perccel ezután szobahőmérsékletre melegítettük. A detergens jelenlétében történő fagyasztás-felolvasztás ciklus közel teljes mértékben feltárja a sejteket, ezáltal a túlélő baktériumok kiszabadulnak. Ez a kezelés nem befolyásolta lényegesen a baktériumok későbbi osztódási képességét. Ezt követően egy 10-szeres hígítási lépést közbeiktatva minden mintát további 10-szeres hígítás mellett LB tápoldatba helyeztünk. A mintáinkban túlélő baktériumokat 96 lyukú lemezen, iEMS ELISA reader-ben (Labsystems)  $37^{\circ}\text{C}$ -on, rázás mellett, 8-10 órán át növesztettük, és követtük a minták OD változását 620 nm-es hullámhosszon. A baktériumok mennyiségét az OD változása alapján számoltuk. Az eredményeket a kiindulási (0. perces) mintához képest százalékos arányban ábrázoltuk.

A NADPH-oxidáz és a keletkezett reaktív oxigénszármazékok szerepét a mintáink antibakteriális hatásában DPI hozzáadásával vizsgáltuk. A DPI a hem tartalmú fehérjék hatékony, de nem specifikus gátlószere [177-179]. Mintáinkat 10 percig kezeltük elő 1  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú DPI-vel.

### **5.16 Dinamikus fényszórásmérés**

A dinamikus fényszórásmérések szobahőmérsékleten ALV goniométer és MellesGriot diódalézer (hullámhossz: 457,5 nm) segítségével készültek nagy tisztaságú HBSS-ben. Az események átmérőjét szférikus közelítéssel számoltuk. A dinamikus fényszórási tesztek a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében végeztük Veres S. Dániel segítségével. Ő végezte a mérőkészülék beállítását és a tényleges adatgyűjtést. Munkacsoportunk a minták előkészítését és a kapott méretmegoszlási adatok kiértékelését végezte.

### **5.17 Elektronmikroszkópos felvételek készítése**

A EV-kat az elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz a 15700 g gyorsulású centrifugálást követően 4% paraformaldehiddel fixáltuk 60 percen át. A minták 30 perces utófixálása 1%-os  $\text{OsO}_4$  oldattal történt szobahőmérsékleten. Az etanolos

dehidráció után 30 perces 1% uranyl-acetát és 50% etanol kezelés történt. A beágyazást Taab 812 segítségével végeztük. A blokkok 12 órás, 60 °C-on végzett polimerizációt követően kerültek metszésre. A metszetek vizsgálatát Hitachi 7100-as elektronmikroszkóppal, illetve Veleta, 2k x 2k MegaPixel side-mounted TEM CCD kamerával (Olympus) végeztük. A kapott felvételek nem torzító feldolgozását „Adobe Photoshop CS3” segítségével végeztük. A vizsgálatot az utófixálástól Kittel Ágnes és munkatársai végezték a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében. Laborunkban a minták előkészítése, fixálása és a kapott ábrák utólagos értékelése zajlott.

### **5.18 Tömegspektrometria vizsgálat**

A tömegspektrometria vizsgálatot Kenneth R. McLeish végezte a Department of Medicine, University of Louisville-ben. Laborunkban a minták előkészítése és a kimutatott fehérjék minőségi és mennyiségi (emPAI érték alapján) értékelése zajlott.

### **5.19 Statisztikai analízis**

A kísérletek elemszámát az ábraalírásokban feltüntettem. Az adatok statisztikai elemzéséhez egymintás t-próbát, vagy kétmintás t-próbát használtunk. A szignifikancia határát minden esetben a  $p < 0,05$  értéknél húztuk meg. A statisztikai analíziseket a STATISTICA 7.0 programmal végeztük (Statsoft).



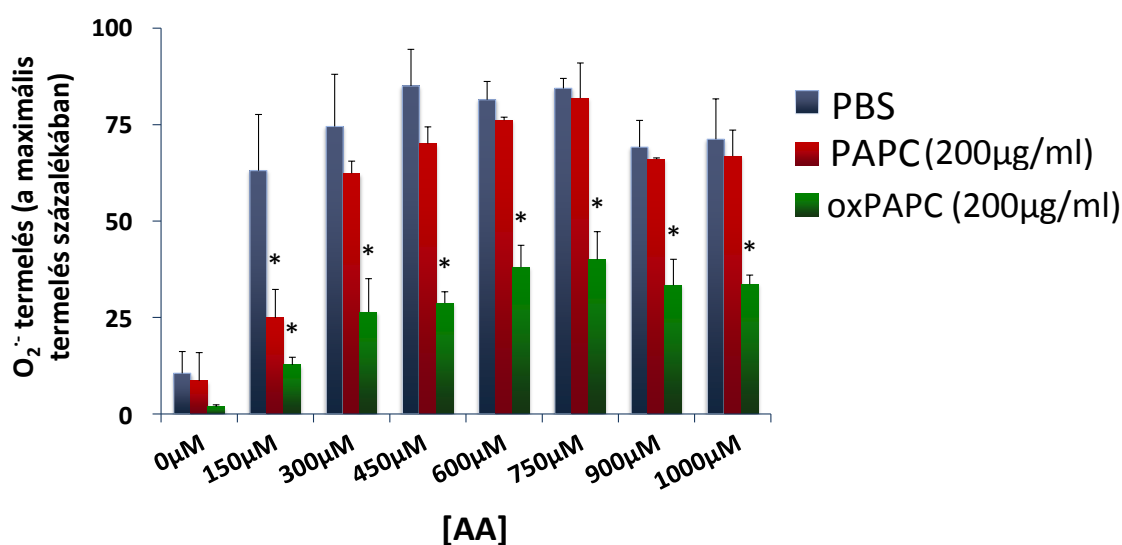
## 6 Eredmények

### 6.1 Foszfolipidek hatása a NADPH-oxidáz működésére sejtmentes rendszerben

Kollaborációs partnereink eredményei az oxidált foszfolipidek ROS-termelést gátló hatásáról [94], irodalmi adatok az oxidáz *in vivo* és *in vitro* működésének AA-függéséről [84], és munkacsoportunk korábbi eredményei a glükocerebrozidok gátlóhatásáról [89] arra sarkallottak minket, hogy megvizsgáljuk az oxidált és nem oxidált foszfolipidek közvetlen hatását a fagocita NADPH-oxidáz összeépülésére és szuperoxid-termelésére.

#### 6.1.1 Foszfolipidek hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülésére

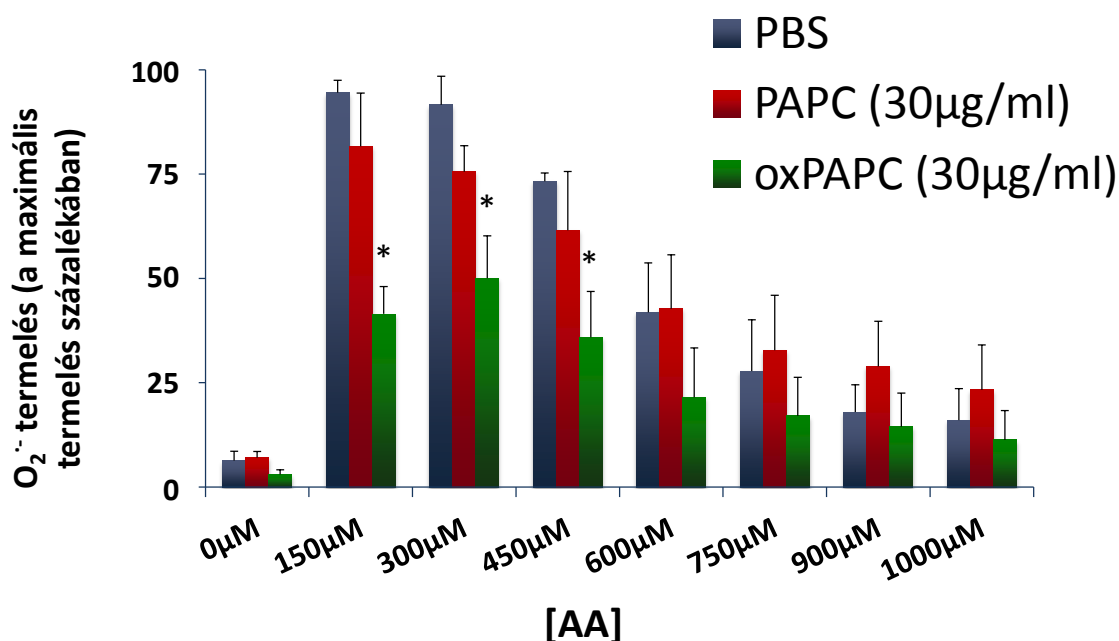
Félrekombináns rendszerben vizsgáltuk az oxidált és az oxidálatlan foszfolipidek hatását a fagocita NADPH-oxidáz összeépülésére és működésére. Az oxidált és oxidálatlan foszfolipideket kollaborációs partnerunktől, Johannes Stöckl-től kaptuk. Ők az Avanti Polar Lipids-től szerezték az oxidálatlan formát. A lipidek oxidációját 72 órás szabad levegőn tartással érték el, az oxidációt tömegspektrometriával ellenőrizték [180].



19. ábra: Nagy koncentrációban adott foszfolipidek hatása a NADPH-oxidáz összeépülésére és a  $O_2^{\cdot-}$ -termelésére félrekombináns rendszerben. Az oxidált foszfolipidek jelenléte számottevően (\*:  $p < 0,05$ ; kétmintás t-próba) csökkentette a  $O_2^{\cdot-}$ -termelést a kontrollmintához viszonyítva. A  $O_2^{\cdot-}$ -termelés mértékét az egyedi kontrollminták esetében mért maximális termelés százalékában ábrázoltam. A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. 450  $\mu M$  AA-koncentrációnál a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségének átlaga 151,48 nmol/perc/mg membránfehérje volt (S.E.M.=38,00).

A membránfrakciót 10 percig kezeltük elő nagy koncentrációban (200 µg/ml) adott PAPC-nal és oxPAPC-nal. Az előkezelés után széles koncentrációtartományban adtuk az enzimkomplex összeépülését kiváltó arachidonsavat (AA) a mintákhoz. Mindkét foszfolipid eltolta az optimális AA-koncentrációt 450 µM-ról 750 µM-ra, de az oxPAPC jelenléte minden AA-koncentráció esetében számottevően csökkentette a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét, míg a PAPC nem befolyásolta a termelés maximális sebességét (19. ábra).

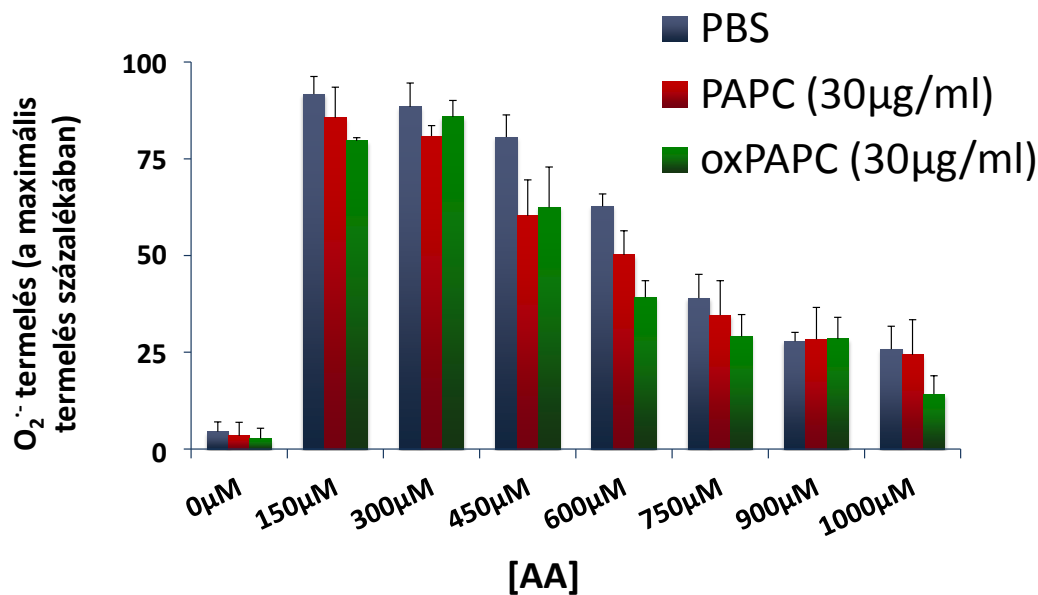
Ha a méréseinket a biológiailag valószínű 30 µg/ml koncentrációban adott PL-ekkel ismételtük meg, akkor az optimális AA-koncentráció csak az oxPAPC-előkezelés esetében tolódott el. Ugyanezekben a mintákban közel felére csökkent a  $O_2^{\cdot-}$ -termelés sebessége, ami megfelel a 200 µg/ml koncentrációjú oxPAPC esetében látottaknak. Ezzel szemben az oxidálatlan PAPC nem gátolta számottevően az enzimkomplex működését (20. ábra).



20. ábra: Biológiailag valószínű koncentrációban adott foszfolipidek hatása a NADPH-oxidáz összeépülésére és a  $O_2^{\cdot-}$ -termelésére félrekombináns rendszerben. Az oxidált foszfolipidek jelenléte számottevően (\*:  $p < 0,05$ ; kétmintás t-próba) csökkentette a  $O_2^{\cdot-}$ -termelést a kontrollmintához viszonyítva. A  $O_2^{\cdot-}$ -termelés mértékét az egyedi kontrollminták esetében mért maximális termelés százalékában ábrázoltam a y-tengelyen. A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. 150 µM AA-koncentrációnál a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségének átlaga 319,52 nmol/perc/mg membránfehérje volt (S.E.M.=37,12).

### 6.1.2 Foszfolipidek hatása az összeépült NADPH-oxidáz enzimkomplex működésére

Megvizsgáltuk a foszfolipidek hatását a már összeépült fagocita NADPH-oxidázon is. Ezeknél a méréseknél a PL-eket 5 perccel az AA adása után adtuk a mintákhoz. A már összeépült enzimkomplexre sem az oxidálatlan, sem az oxidált PL-ek nem fejtettek ki jelentős hatást, a  $O_2^{\cdot-}$ -termelés sebessége megegyezett a kezeletlen kontrollmintáéval (21. ábra). Ezek alapján az oxPAPC előzőleg bemutatott gátlóhatása nem az elektrontranszport valamely lépését, hanem az enzimkomplex alegységeinek összeszerelődését gátolja hasonlóan a glükocerebrozidokhoz.

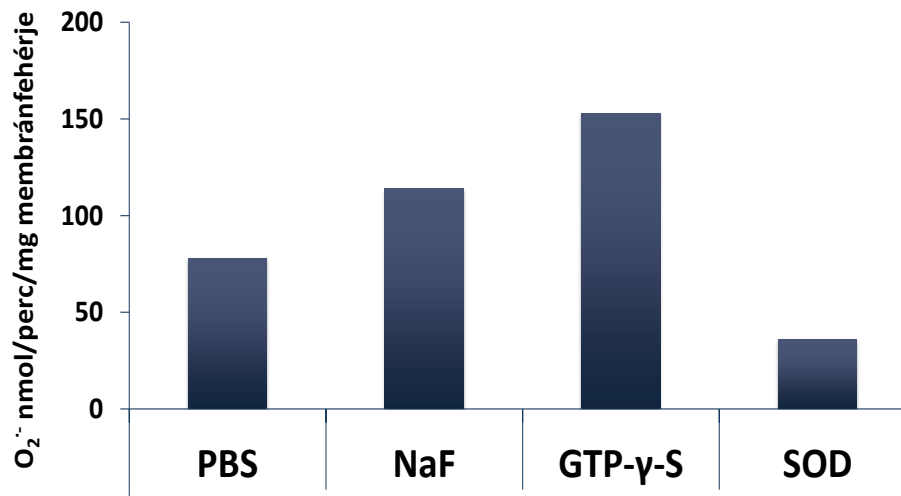


21. ábra: Biológiai valószínű koncentrációban adott foszfolipidek hatása a már összeépült NADPH-oxidáz komplex  $O_2^{\cdot-}$ -termelésére. Az oxidált és oxidálatlan foszfolipidek jelenléte nem befolyásolta a  $O_2^{\cdot-}$ -termelést az kontrollmintához viszonyítva (kétmintás t-próba). A  $O_2^{\cdot-}$ -termelés mértékét az egyedi kontrollminták esetében mért maximális termelés százalékában ábrázoltam a y-tengelyen. A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. 150 μM AA-koncentrációnál a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségének átlaga 368,18 nmol/perc/mg membránfehérje volt (S.E.M.=56,16).

### 6.2 A szuperoxid-termelés függése a Rac aktiváltsági állapotától

A NADPH-oxidáz szuperoxid-termelésének függését a Rac kis G-fehérje és az arra ható GAP-ok működésétől a 22. ábrán mutatom be. A NaF gátolja a GAP-ok működését, ezért a Rac NaF jelenlétében lassan, a saját hidrolitikus aktivitásának megfelelően hasítja le a terminális foszfátot a rendelkezésre álló GTP-ről. A GTP-γ-S

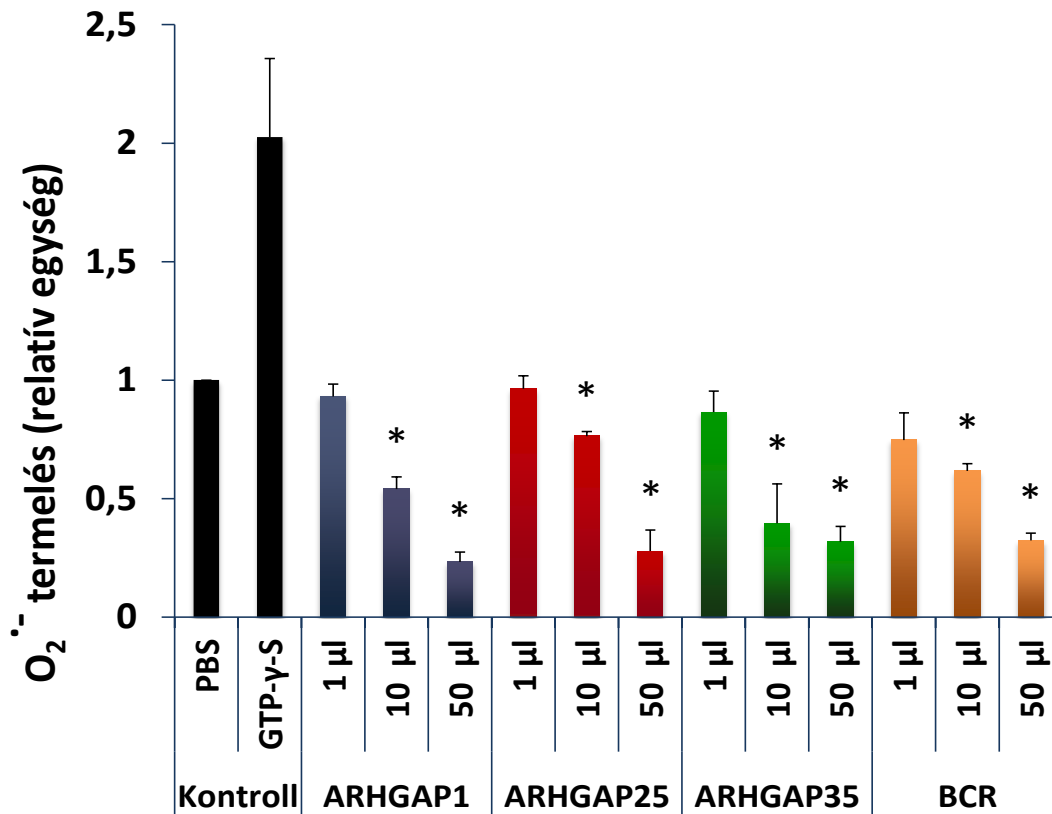
nagyon lassan hidrolizálható GTP-analóg, ezért 1  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S jelenlétében a rendszer közel maximális szuperoxid-termelését mértük.



**22. ábra:** A NADPH-oxidáz  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -termelésének függése a Rac és az arra ható GAP-ok működésétől (reprezentatív ábra, minden  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -termelés vizsgálat során mértük ezen anyagok hatását). A NaF jelenlétében növekszik a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -termés, mert a fluorid gátolja a GAP-okat. 1  $\mu\text{M}$  GTP- $\gamma$ -S jelenlétében a rendszer közel maximális szuperoxid-termelését mértük. A citokróm SOD jelenléte mellett látott,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -től független redukcióját minden minta eredményéből levontuk a kiértékelés során.

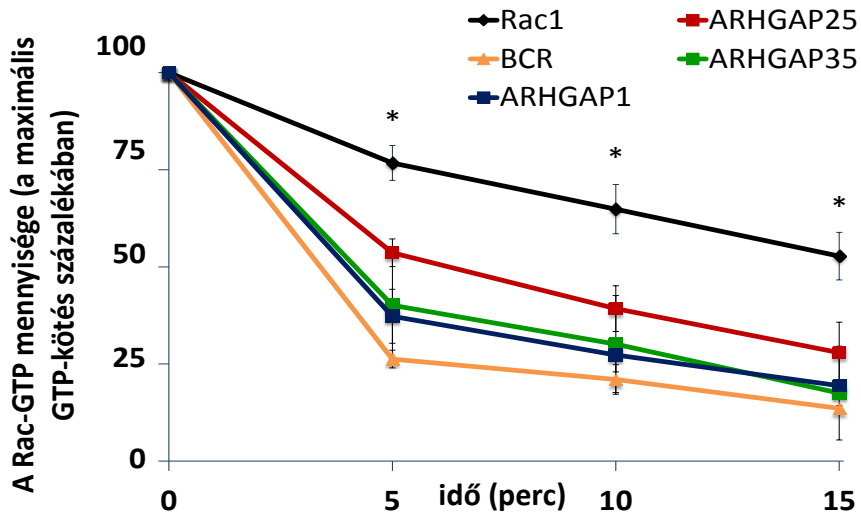
### 6.2.1 Rekombináns GAP-ok hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülésére és szuperoxid-termelésére

A fagocita NADPH-oxidáz összeépülését és működését szabályozó GAP-(ok) azonosításához félrekombináns rendszerben vizsgáltuk a szakirodalom által korábban megnevezett GAP-okat (ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és BCR). Kísérleti felállásunkban a rekombináns GAP-ok a citoszolban lévő GAP-okat modellezték. A vizsgált GAP-ok, beleértve a korábban sejtmentes rendszerben nem vizsgált ARHGAP25-öt is, kivétel nélkül dóziszfüggően csökkentették a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -termelést, ha az enzimkomplex összeépülése előtt adtuk azokat a mintáinkhoz (23. ábra).



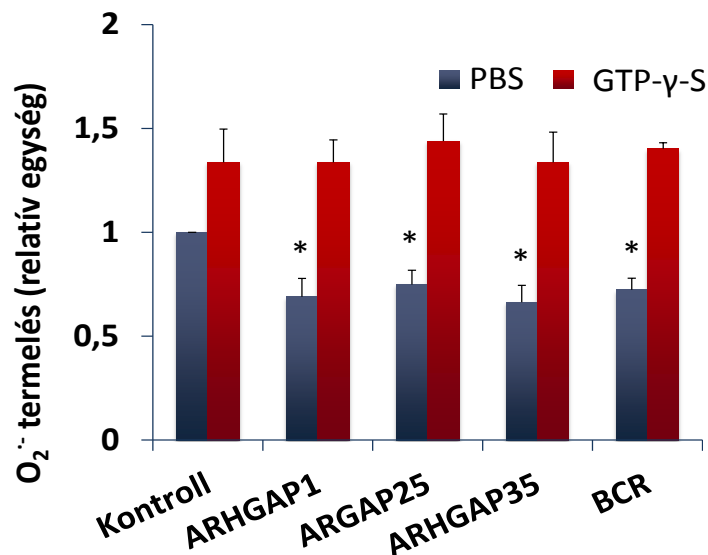
23. ábra: Rekombináns GAP-okat tartalmazó fehérjepreparátumok mennyiségfüggő hatása NADPH-oxidáz  $O_2^{\bullet-}$ -termelésére félrekombináns rendszerben. A statisztikai próbát minden esetben a kontrollmintához képest végeztük el (\*:  $p < 0,05$ ; egymintás t-próba). A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. A kontrollminták termelésének átlaga  $323 \text{ nmol } O_2^{\bullet-}/\text{perc/mg}$  membránfehérje volt (S.E.M.=61,22).

Az szolubilis GAP-ok membránkötött Rac iránti hozzáférhetőségének vizsgálatához a rekombináns GAP-preparátumainkon előzetes GAP-aktivitás meghatározást végeztünk radioaktívan jelzett GTP segítségével. Egyenlő GAP-aktivitást mutató minták esetében az oxidáz különböző mértékű gátlása azt jelentené, hogy egyes GAP-ok nagyobb valószínűséggel lehetnek az membránkötött, endogén Rac partnerei, mint mások. Azért volt szükséges minden egyes fehérjepreparátum esetében a GAP-aktivitás vizsgálatot elvégeznünk, mert az egyes GAP-ok különböző napokon készült preparátumai eltérő aktivitással rendelkezhetnek (24. ábra).



24. ábra: A rekombináns ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és a BCR fehérjék hatása a radioaktív GTP-vel töltött Rac1 GTP-hidrolízisére. Hat (Rac), öt (ARHGAP25, BCR, ARHGAP1, ARHGAP35) független kísérlet átlagát és hibáját ábrázoltam. \*:minden GAP-ot tartalmazó mintára  $p < 0,05$  a kontrollhoz (GST-Rac) képest (kétmintás t-próba).

A négyféle GAP-preparátumból egymással megegyező GAP-aktivitással rendelkező mennyiséget adtunk az oxidáz alegységeit tartalmazó mintákhoz. Öt percig inkubáltuk elő a mintát szobahőmérsékleten, majd AA-val indítottuk az enzimkomplex összeépülését.

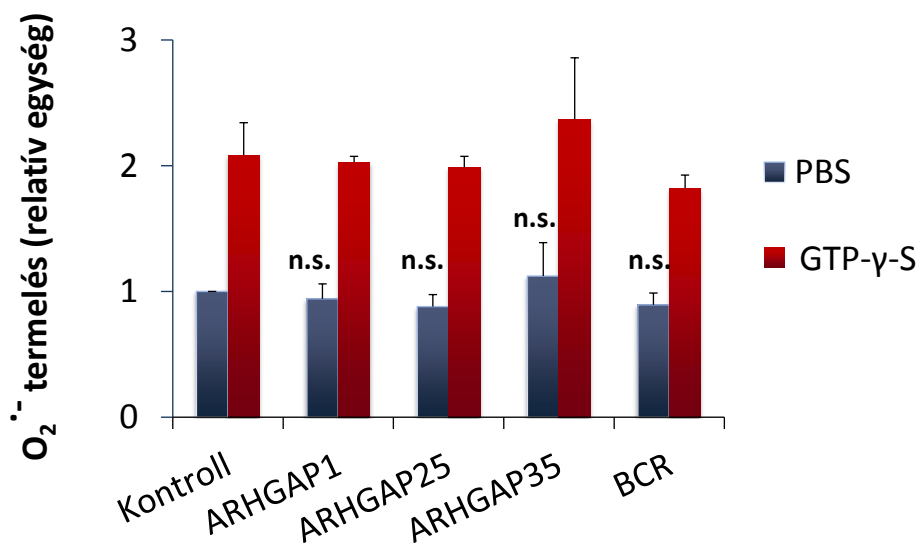


25. ábra: Az AA indukálta enzimkomplex-összeépülés előtt adott rekombináns GAP-ok hatása a  $O_2^{\cdot-}$ -termelésre. Mindegyik alkalmazott Rac-GAP számottevően ( $*: p < 0,05$ ; egymintás t-próba) csökkentette a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét a kontrollmintához viszonyítva. A diagramon öt független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. A kontrollminták átlaga  $72,6 \text{ nmol } O_2^{\cdot-}/\text{perc}/\text{mg}$  membránfehérje volt (S.E.M.=14,2).

A vizsgált GAP-ok, az egyenlő GAP-aktivitásnak megfelelően, egyenlő mértékben csökkentették  $O_2^{\cdot-}$ -termelés sebességét, vagyis nem volt különbség a Rac iránti hozzáférhetőségben a vizsgált GAP-ok között. A GTP- $\gamma$ -S-t tartalmazó párhuzamosok minden esetben a hozzáadott GAP-ot nem tartalmazó kontrollmintával megegyező mennyiségű  $O_2^{\cdot-}$ -ot termeltek. Ez bizonyítja, hogy a GAP-ok jelenlétében mért csökkent  $O_2^{\cdot-}$ -termelés a GTP felgyorsult hidrolízisének következménye, nem a rekombináns minták egyéb, aspecifikus hatása (25. ábra).

### 6.2.2 Rekombináns GAP-ok hatása a már összeépült NADPH-oxidáz működésére

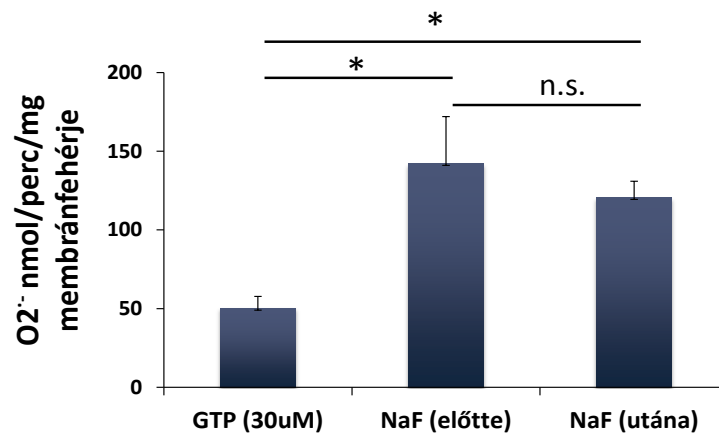
Nem csökkentették a  $O_2^{\cdot-}$ -termelést ugyanezen rekombináns GAP-ok, ha az AA indukálta enzimkomplex-összeépülés után adtuk őket a sejtmentes rendszerhez (26. ábra). Ezek alapján a már összeépült enzimkomplexben lévő Rac-GTP-hez már nem volt hozzáférése a folyadékfázisban lévő GAP-oknak. A GTP- $\gamma$ -S-t tartalmazó párhuzamosok esetében megfigyelt nagymértékű  $O_2^{\cdot-}$ -termelésnek két valószínű magyarázata lehet. Egyrészt a lassan hidrolizálható GTP-analóg a Rac endogén GTP-áz aktivitását jelentősen lelassította. Másrészt a membránfrakcióban található GAP-ok, nem tudták hatásukat kifejteni GTP- $\gamma$ -S jelenlétében. A további kísérleteinkkel ezen membránkött GAP-ok szerepét vizsgáltuk az oxidáz szabályozásában.



26. ábra: A vizsgált Rac-GAP-ok nem csökkentették a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét, ha már az enzimkomplex összeépülése után kerültek a mintákhoz (n.s.: nem szignifikáns a kontrollmintához képest; egymintás t-próba). A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. A kontrollminták termelésének átlaga 69,7 nmol  $O_2^{\cdot-}$ /perc/mg membránfehérje volt (S.E.M.=13,95).

### 6.2.3 Membránkötött GAP-ok hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex működésére

A membránkötött GAP-ok szerepének vizsgálatára gátlószeres megközelítést választottunk. A fluoridvegyületekről korábban leírták, hogy hatékonyan gátolják a GAP-ok működését [109]. Munkacsoportunk korábban azt is bizonyította, hogy a  $F^-$  nem befolyásolja a kis G-fehérje saját GTP-áz aktivitását [78]. Félrekombináns rendszerünkben a NaF növelte a  $O_2^{\cdot-}$ -termelést mind az enzimkomplex összeépülése előtt, mind az összeépülés után adva (27. ábra). Az összeépülés után látott  $F^-$ -hatás valószínűsíti, hogy vannak olyan membránkötött GAP-ok, amelyek a már összeszerelődött enzimkomplexben is képesek a Rac-hoz férközni és hidrolitikus aktivitásának fokozásával az enzimkomplex szétesését elősegíteni.



27. ábra: A GAP-ok hatása a NADPH-oxidázra a komplex összeépülése előtt és után. A NaF jelentősen (\*:  $p < 0,05$ ; kétmintás t-próba) növelte a  $O_2^{\cdot-}$ -termelést a komplex AA-indukálta összeépülése után is. Diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam.

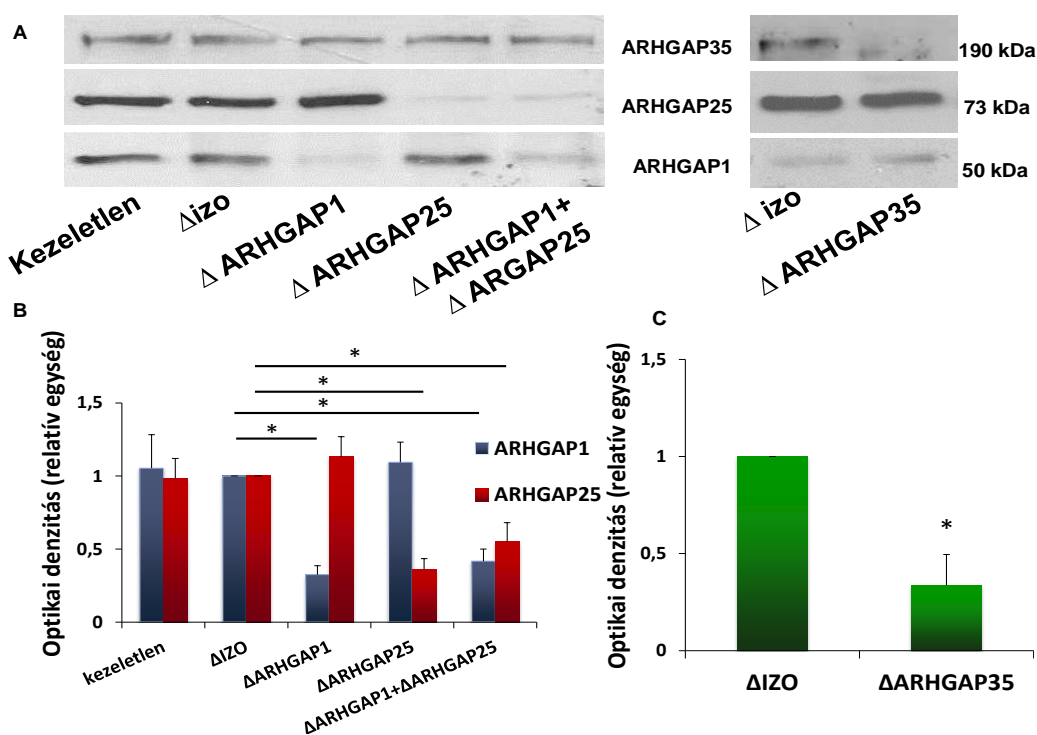
### 6.2.4 Membránkötött GAP-ok immundeplíciója

Annak kiderítésére, hogy a látott GAP-hatásért pontosan mely membránkötött fehérjék felelősek, immundeplícióval csökkentettük az egyes GAP-ok mennyiségét a membránfrakcióban. Az ARHGAP1 és az ARHGAP25 ellen poliklonális antitestet készítettünk nyulak immunizálásával. Az ARHGAP35 ellen elérhető monoklonális antitest jól működött az immundeplíció során, de a kipróbált Bcr elleni antitestek nem vezettek sikerre. Ezek valószínűleg olyan epitópot ismertek fel a Bcr-on, amely a membránkötött, vagy harmadlagos szerkezetét mutató fehérjében nem hozzáférhető.

Amint a 28. ábra A részének reprezentatív Western blotjain látható, a háromlépcsős GAP-depletálással sikerült specifikusan csökkentenünk egyes GAP-ok mennyiségét a



membránfrakcióban. Az izolált ARHGAP1-depléciónál az izotípus kontrollantitesttel kezelt mintában kimutatható ARHGAP1 mennyiségének 32%-ára sikerült csökkenteni az ARHGAP1 mennyiségét. Az ARHGAP25 esetében a depléciónál 36%-ra az ARHGAP35 esetében 34%-ra csökkentette az adott GAP mennyiségét a membránban. Az ARHGAP1 és ARHGAP25 együttes deplécióját kevert antitestkocktállal végeztük. A depléciónál egyedi GAP-okra eső sikeressége elmaradt az önálló depléciók hatékonyságától (a kontroll 41%-a az ARHGAP1 és 55%-a az ARHGAP25 esetében, 28. ábra B). A kezeletlen és az izotípus kontrollantitesttel kezelt mintákban egyenlő mennyiségű GAP-ot mutatott a Western blot, a minták egyenlő összfehérje-mennyiségének megfelelően. Vagyis a depléciós eljárás nem változtatta meg számottevően a GAP-ok mennyiségét a membránfrakcióban, és a többi mintánál látott változások a specifikus depléciók következményei.

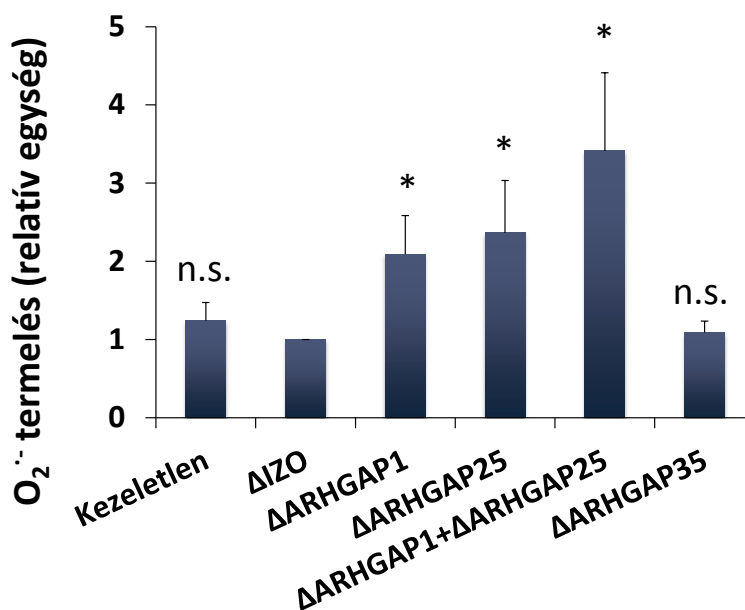


28. ábra: A Rac-GAP-immundepléciónál hatékonyságának ellenőrzése Western blottal. A) Az ARHGAP1 és ARHGAP25 antitestekkel, illetve az ARHGAP35 antitesttel immundepletált membrán reprezentatív Western blot képe (2013.02.05.). A zsebekbe egyenlő fehérjemennyiséget töltöttünk, töltéskontrollként a nem depletált GAP-okat használtuk. B) Tizenöt (ARHGAP1), tizennégy (ARHGAP25) illetve nyolc (kettős depletált) független kísérlet denzitometriás elemzése. A B diagramon a kísérletek átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltam. \*:p<0,05 az izotípus kontrollhoz képest (egymintás t-próba). C) négy független ARHGAP35 immundepléciós Western blot denzitometriás elemzése. A diagramon a kísérletek átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltam. \*:p<0,05 az izotípus kontrollhoz képest (egymintás t-próba).

### 6.2.5 Membránkötött GAP-ok immundepléciójának hatása a NADPH-oxidáz működésére

A GAP-depletált membránfrakciók szuperoxid-termelését a félrekombináns rendszerünkkel vizsgáltuk. Minden depléció után egyedileg meghatároztuk az optimális AA-koncentrációt. A depléció gyakran megváltoztatta a membránfrakció fehérjemennyiségre vonatkoztatott maximális  $O_2^{\cdot-}$ -termelését. Ezért a minták  $O_2^{\cdot-}$ -termelését korrigáltuk a GTP- $\gamma$ -S-t tartalmazó párhuzamosoknál látott maximális  $O_2^{\cdot-}$ -termelés értékével, mint a működőképes enzimkomplex-mennyiséget jellemző értékkel.

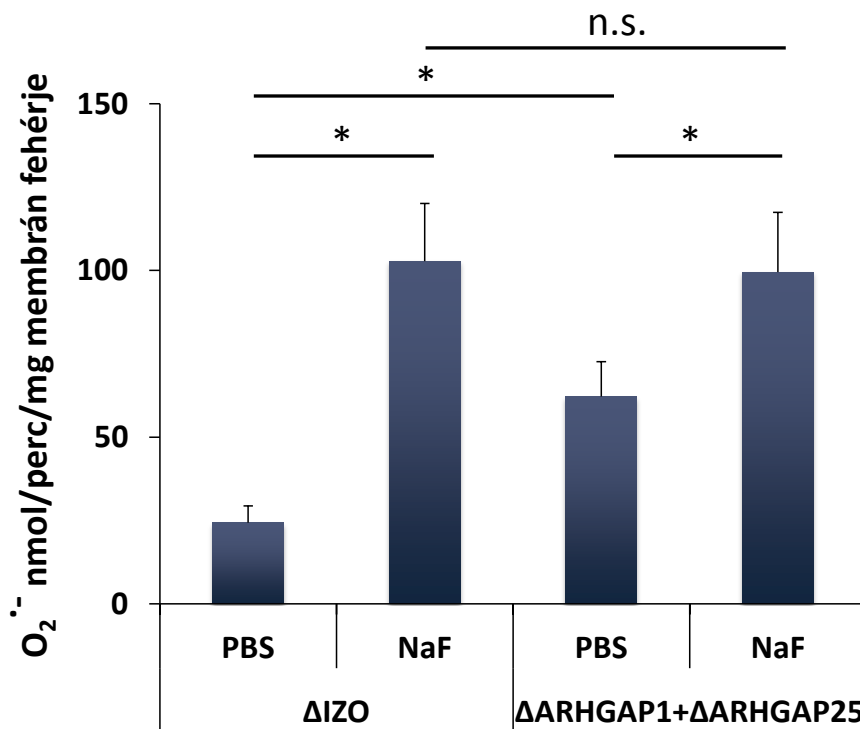
Az izotípus kontrollantitesttel kezelt és az immundeplécióknak nem kitett membránok átlagos szuperoxid-termelése nem különbözött egymástól. Az izotípus kontrollantitesttel kezelt membránhoz viszonyítva azonban számottevően, a kétszeresére fokozódott az ARHGAP1 és ARHGAP25 depletált membránok  $O_2^{\cdot-}$ -termelése. A két GAP együttes depléciója után az enzimkomplex aktivitása tovább nőtt, hozzávetőleg az egyes GAP-ok izolált depléciójánál látott hatások összeadódását tapasztaltuk. Nem mértünk azonban aktivitásnövekedést az ARHGAP35-depléció esetében (29. ábra). Ez a megfigyelés egybehangzik a Németh Tamás és munkatársai által korábban leírt eredményekkel [117].



29. ábra: Az immundepléciók hatása a NADPH-oxidáz  $O_2^{\cdot-}$ -termelésére. Az ARHGAP1 és ARHGAP25 izolált immundepléciója számottevően növelte a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét. A két GAP együttes depléciója esetén a  $O_2^{\cdot-}$ -termelés tovább nőtt. Nem találtunk különbséget a  $O_2^{\cdot-}$ -termelésben, ha az ARHGAP35-öt depletáltuk (\*:  $p < 0,05$ ; n.s.: nem szignifikáns; egymintás t-próba). A  $O_2^{\cdot-}$ -termelés mértékét a kontrollminta termeléséhez viszonyítva ábrázoltam. A diagramon tizenöt (ARHGAP1), tizennégy (ARHGAP25), nyolc (kettős depletált), illetve négy (ARHGAP35) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. A kontrollminták átlaga  $39,5 \text{ nmol } O_2^{\cdot-}/\text{perc}/\text{mg}$  membránfehérje volt (S.E.M.=9,2).

Az ARHGAP35 immundepléciójának hatástalansága a szuperoxid-termelésre felveti annak a lehetőségét, hogy a NADPH-oxidáz valamilyen GAP-szelektivitással rendelkezik. Ez alapján bizonyos GAP-ok képesek az összeépült enzimkomplexben lévő Rac-hoz férkőzni, ugyanakkor más GAP-ok számára a Rac hozzáférhetetlen.

Az ARHGAP1-re és ARHGAP25-re együttesen depletált membránok és az izotípus kontrollantitesttel kezelt membránok NaF jelenlétében ugyanannyi  $O_2^{\cdot-}$ -t termeltek, de a  $F^-$  hatása lényegesen kisebb volt a kétszeresen depletált membrán esetében, mint a kontrollmintánál (30.ábra). A kettős depletált membrán esetében a  $F^-$  megfigyelt hatásának magyarázata az lehet, hogy bár a depléciók jelentősen csökkentették a GAP-ok mennyiségét a membránfrakcióban, közel sem depletálták az összes ARHGAP1 és ARHGAP25 fehérjét. További lehetséges magyarázat a részben megtartott fluoridhatásra, hogy más membránkött GAP-ok, például a Bcr és rokona az Abl is képesek hatni az oxidázba épült Rac-ra, és ezeket továbbra is gátolta a fluorid.



30. ábra: A NaF hatása az immundepletált membránok  $O_2^{\cdot-}$ -termelésére félrekombinációs rendszerben. Az ARHGAP1 és az ARHGAP25 együttes immundepléciója számottevően növelte a termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét az izotípus kontrollmintához viszonyítva. NaF jelenlétében mindkét minta esetében növekedett a  $O_2^{\cdot-}$ -termelés (\*:  $p < 0,05$ ; kétmintás t-próba). Nem volt különbség a két NaF-os minta  $O_2^{\cdot-}$ -termelésében (n.s.: nem szignifikáns; kétmintás t-próba). A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam.

### **6.3 Neutrofil granulocita eredetű EV-k vizsgálata**

Az eddig általam bemutatott eredmények és munkacsoportunk korábbi megfigyelései alapján, a neutrofil granulocitában összetett szabályozás működik a ROS-termelés megfelelő térbeli és időbeli korlátozása érdekében. Kíváncsiak voltunk, hogy a neutrofil körültekintő ROS-kezelése kiterjed-e a nem régiben leírt neutrofil eredetű EV-kra. Különösen érdekes volt számunkra, hogy megvizsgáljuk az aktivációra keletkező EV esetleges szuperoxid-termelését, és annak szerepét az EV-k antibakteriális hatásában.

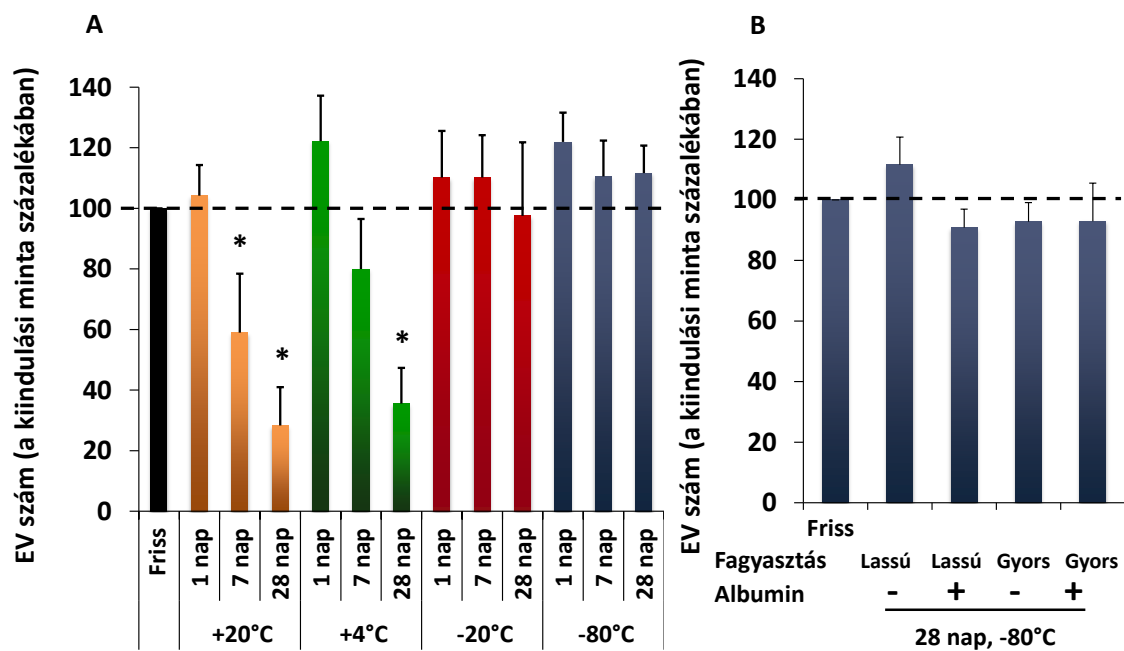
#### **6.3.1 A tárolási körülmények hatása a neutrofil granulocita eredetű EV-k tulajdonságaira és biológiai funkciójára**

Az EV-k világa új terület a biológiában, ezért számos olyan technikai nehézségbe ütköztünk kísérlettervezésünk során, amire nem találtunk választ az irodalomban. A hosszadalmas EV-preparációs folyamat miatt a legtöbb fejtörést az EV-kat tartalmazó minták megbízható tárolása jelentette. A szakirodalomban fellelhető iránymutatások inkább megszokásokon és elgondolásokon alapultak, nem találtunk jól kontrollált összehasonlító vizsgálatot a különböző tárolási hőmérsékletekről és fagyasztóoldatokról. A Timár Csaba munkatársam által leírt és alaposan jellemzett opszonizált részecskék hatására keletkezett aEV-kat és azok antibakteriális hatását használtuk modellként az EV-tárolás ideális körülményeinek meghatározására.

##### **6.3.1.1 Neutrofil granulocita eredetű EV minták vezikulaszámának változása 1 hónapos tárolás során**

Áramlási citométerrel vizsgáltuk a neutrofil granulocita eredetű aEV számának változását 1 nap, 1 hét és 1 hónapos tárolás után. A preparáció után azonnal megmértük az anti-CD11b-vel jelölődő vezikulák számát, míg a szintén jelölt párhuzamosokat négy eltérő hőmérsékleten, fénytől védett helyen tároltuk. A +20°C-on, a +4°C-on és a -20°C-on tárolt mintákat HBSS-ben tartottuk, a -80°C-on tárolt minták esetében készítettünk 5% glicerint, 1% DMSO-t és 1 mg/ml koncentrációjú albumint tartalmazó HBSS alapú fagyasztóoldatokat is. A glicerint és DMSO-t tartalmazó oldatok azonban a vezikulák azonnali lízisét okozták – az áramlási citométerrel detektált események nem feleltek meg az EV kapuzási feltételeinknek.

A +20°C-on és +4°C-on tárolt minták esetében a kapuzási stratégiánknak megfelelő EV-szám a tárolási idő növelésével jelentősen csökkent. A -20°C-on és a -80°C-on tárolt minták esetében 1 hónapos tárolási időtartam alatt a vezikulaszám nem mutatott változást (31. ábra A). Szintén nem találtunk vezikulaszám-változást, ha a -80°C-on tárolt mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és a felolvasztást 37°C-os vízfürdőben végeztük, vagy ha 1 mg/ml albumin jelenlétében tároltuk a mintákat (31. ábra B).

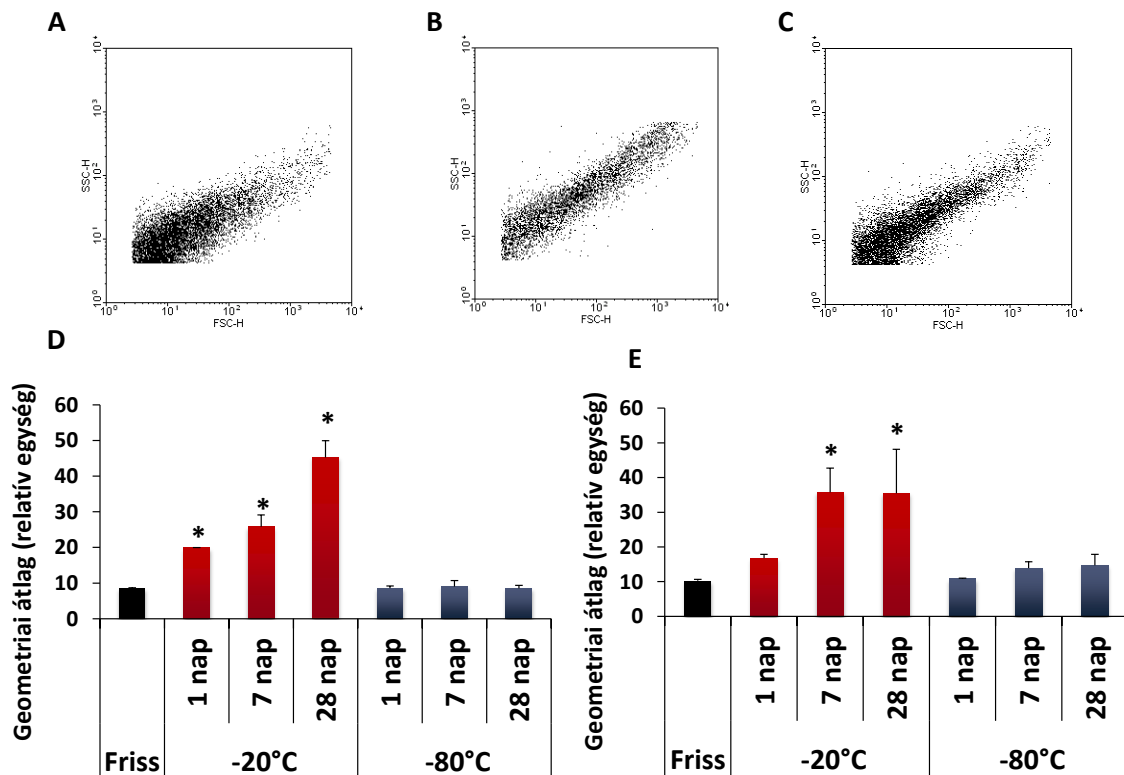


31. ábra: A tárolás hatása az EV-számra. A) A preparálás után azonnal megmért EV-számhoz viszonyítva a +20°C-on és a +4°C-on tárolt minták EV-k száma a tárolási idő növelésével folyamatosan csökkent. A -20°C-on és a -80°C-on tárolt mintákban az EV-szám nem változott. A diagramon nyolc illetve négy (-80°C) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:p<0,05; egymintás t-próba). B Nem befolyásolta vezikulaszámot, ha a -80°C-on tartott mintát gyorsfagyasztottuk, vagy albumin jelenlétében tároltuk. A diagramon négy független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam.

### 6.3.1.2 Neutrofil granulocita eredetű EV-k áramlási citométeres tulajdonságainak változása 1 hónapos tárolás során

Az áramlási citométerben mért EV-szám nem változott a -20°C-on és a -80°C-on tárolt minták esetében, azonban megváltozott az EV-populáció megjelenése FSC és SSC tulajdonságok szerint. Az FSC és SSC értékek a vezikulák fényszórási képességétől függenek. Minél nagyobb egy vezikula, annál nagyobb a fényszórása és az őt jellemző FSC és SSC értékek is. A friss mintához képest a -20°C-on tárolt mintáknál

az EV-populáció a nagyobb FSC és SSC értékek irányába tolódott el, ami valószínűen a vezikulák duzzadását jelentette. Ilyen változás nem, vagy csak alig volt megfigyelhető a  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minták esetében (32. ábra A-C). A populáció méretbeli tulajdonságainak változását jól jellemzi a minták FSC és SSC szerinti geometriai átlagának változása. A  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minták esetében a tárolási idő előrehaladtával a geometriai átlag értéke folyamatosan nőtt. A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minták geometriai átlagai nem különböztek a frissen megvizsgált minták átlagaitól (32. ábra D-E).

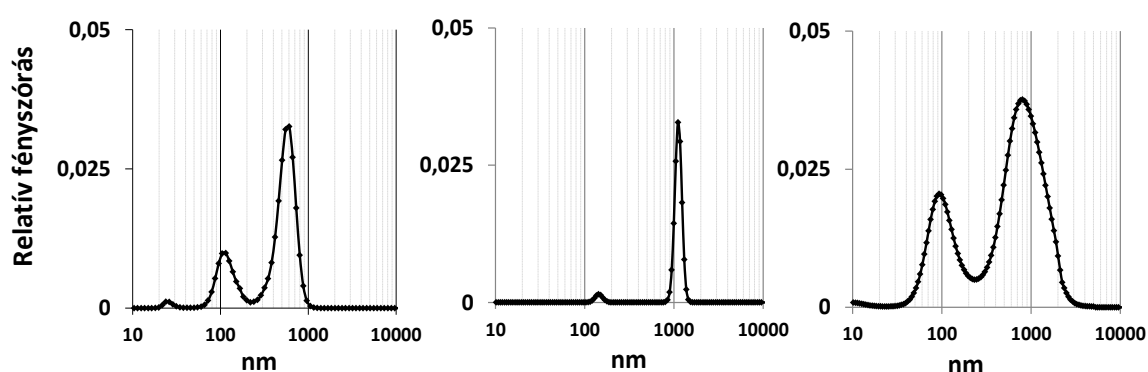


32. ábra: A tárolás hatása az EV-frakció áramlási citométeres tulajdonságaira. A-C: reprezentatív pontdiagramok az EV-k áramlási citométeres megjelenéséről. A) A preparáció után azonnal megvizsgált frakció. B) Az 1 hónapig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt frakció. C) Az 1 hónapig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt frakció. D) A vizsgált frakciók SSC geometriai átlaga. E) A vizsgált frakciók FSC geometriai átlaga. A D és E diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:  $p < 0,05$ ; kétmintás t-próba).

### 6.3.1.3 A tárolt EV-k méretmegoszlásának változása tárolás hatására

Az áramlási citométeres méret-meghatározás pontosságát több tényező is korlátozza, különösen nehéz a méret-meghatározás a kisméretű biológiai minták esetében [174, 175]. Megbízhatóbb és pontosabb vizsgálatot tesz lehetővé a dinamikus fényszóráson (DLS) alapuló vizsgálómódszer. A Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai

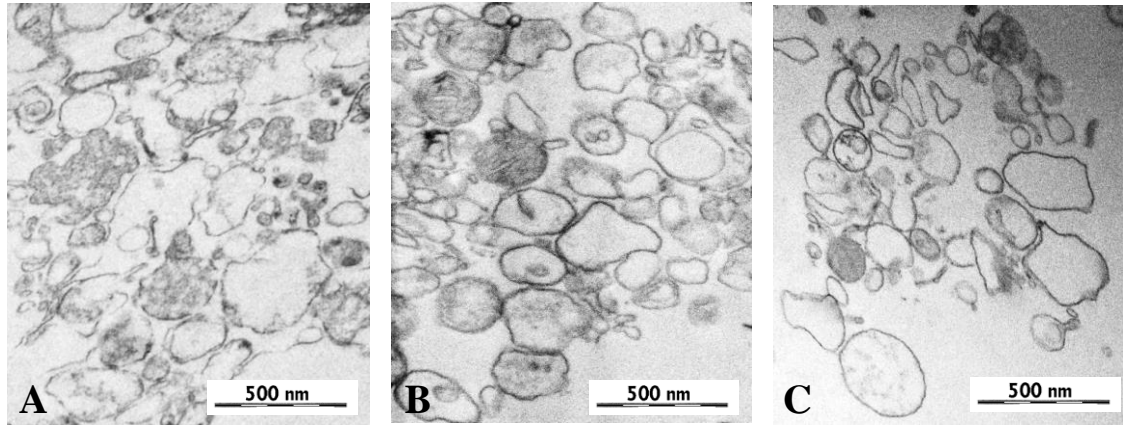
Intézetben működő DLS vizsgálókészülékkel mértük meg az EV-k méretváltozását Veres S. Dániel segítségével. A preparáció után azonnal megvizsgált aEV mintában két jellemző populációt találtunk. Egy, az exoszómák méretének megfelelő, 100 nm-es átmérővel rendelkező populációt és egy 600 nm körüli, mikrovezikula méretű populációt. A  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt mintát 1  $\mu\text{m}$  körüli vezikulák jellemezték. A nagyobb vezikulaátmérő megfelel az áramlási citométerben látott FSC és SSC változásnak, vagyis mindkét módszer szerint duzzadtak a  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt vezikulák. A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt mintákban a megőrzött megjelenésű exoszómafrakció mellett kiszélesedett, 800 nm-es csúccsal jellemezhető mikrovezikula populációt találtunk (33. ábra).



33. ábra: A tárolás hatása az EV-k méret szerinti megoszlására. A) A preparáció után azonnal megvizsgált aEV. B) Az egy hónapig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minta. C) Az egy hónapig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minta. Reprerzentatív ábrák.

#### 6.3.1.4 A tárolt EV-k elektronmikroszkópos megjelenése tárolás után

A tárolás nélkül fixált és beágyazott aEV-k meglehetősen heterogén kinézetűek az elektronmikroszkópos felvételeken. Az áramlási citométer és a DLS által meghatározott mérettartományba eső, egyszeres membránnal határolt vezikulák változatos bennéssel rendelkeztek. Voltak a citoplazmáéhoz hasonló megjelenésű bennéket tartalmazó vezikulák, találtunk egészen elektron-denz és egészen világos bennéket mutató struktúrákat is. A vezikulák formája nem szabályos kör volt, inkább ellipszis, vagy szabálytalan alakú. Elvértve találtunk „vezikula a vezikulában” jelenséget, amikor egy nagyobb EV-ban kisebb vezikula látható (34. ábra A). A  $-20^{\circ}\text{C}$ -on és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on 1 hónapig tárolt EV-k megjelenése nem különbözött látványosan a friss mintáéhoz képest. Változatos megjelenésű 100-600 nm-es vezikulákat találtunk, amelyek minden említett szempontból hasonlítottak a friss EV-khoz (34. ábra B, C).

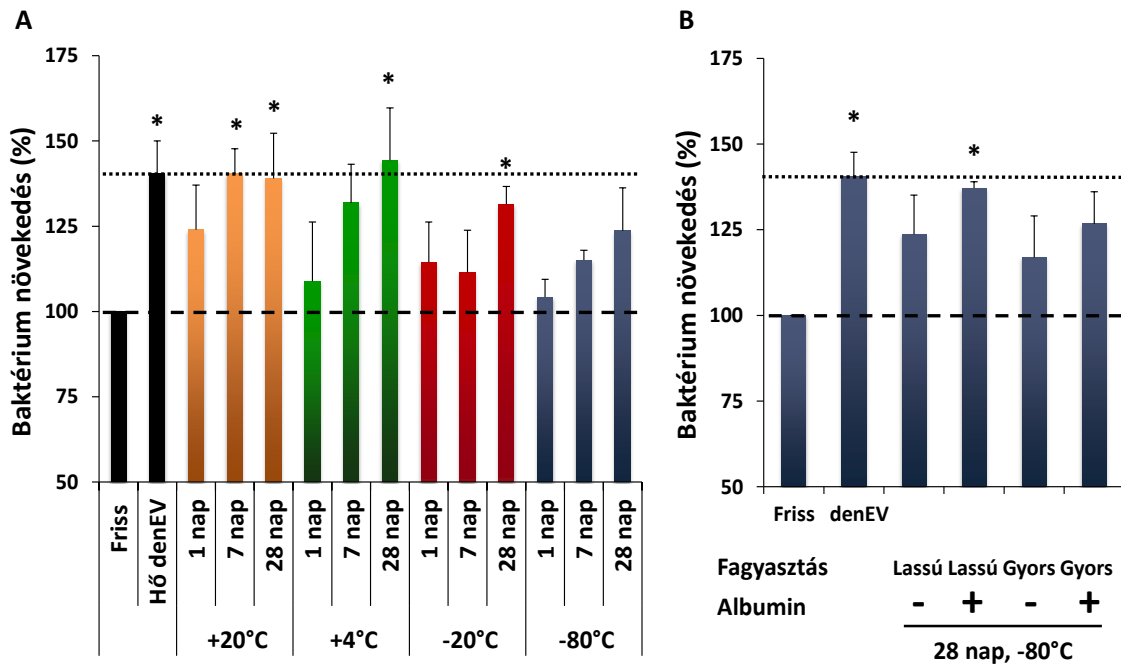


**34. ábra:** A tárolás hatása az EV-k elektronmikroszkópos megjelenésére. A) A preparáció után azonnal fixált frakció. B) Az egy hónapig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minta. C) Az egy hónapig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minta. Reprezentatív ábrák.

### 6.3.1.5 A tárolt aEV-k antibakteriális hatásának változása

Munkacsoportunk bemutatta, hogy az aEV-k antibakteriális hatással rendelkeznek. Ha *S. aureus*-t 30 percen keresztül  $37^{\circ}\text{C}$ -on, enyhe rázatás mellett a frissen preparált aEV-kal inkubáljuk, akkor a behatási idő elteltével a baktériumok 20-30%-kal lassabb növekedést mutatnak, mint a kezdeti baktériumkolónia. A lassabb növekedés hátterében vagy a lecsökkent baktériumszám vagy egy bakteriosztatikus hatás áll. Ezt az ismételhető és számszerűsíthető biológiai hatást használtuk a tárolás EV-funkcióra gyakorolt következményeinek vizsgálatára. A frissen megvizsgált aEV minta antibakteriális hatását 100%-nak vettük és ehhez hasonlítottuk a különféle körülmények mellett tárolt párhuzamosok antibakteriális hatását. A teljesen denaturálódott EV-minta modellezésére 10 percig  $100^{\circ}\text{C}$ -on főzött EV-frakciót használtunk. Ebben a denaturált mintában 30 perc alatt a baktériumok 40%-kal gyorsabb növekedést mutattak, mint a friss aEV-k esetében. A  $+20^{\circ}\text{C}$ -on és a  $+4^{\circ}\text{C}$  tárolt EV-k esetében az antibakteriális hatás már 1 hetes tárolás után teljesen eltűnt. A  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tárolt EV-k esetében az antibakteriális hatás részben megtartott maradt az 1 hetes tárolási idő alatt, de az 1 hónapig tárolt frakciók esetében a baktériumok már jelentős növekedésgyorsulást mutattak. A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minta esetében tapasztaltuk a funkció legkisebb romlását, azonban a tárolási idő növelésével az antibakteriális hatás itt is tendenciózusan csökkent (35. ábra A). Nem javított a tárolt EV-k antibakteriális hatásán a folyékony nitrogénes gyorsfagyasztás, vagy az albumin jelenléte a fagyasztóoldatban sem (35. ábra B).





35. ábra: A tárolás hatása az EV-k antibakteriális hatására. A preparálás után frissen vizsgált minta antibakteriális hatásához viszonyítva a hődenaturált EV-frakció 40%-kal rosszabb antibakteriális hatást mutatott. A) A +20°C-on, a +4°C-on és a -20°C-on tárolt minták antibakteriális hatása a tárolási idő növelésével folyamatosan csökkent. A -80°C-on tárolt minták antibakteriális hatása kisebb mértékben csökkent a tárolási idő növelésével. A diagramon hat, illetve négy (-80°C) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:p<0,05; egymintás t-próba). B) A tárolás hatáskörét nem javította a gyorsfagyasztás, vagy az albumin jelenléte. A diagramon négy független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:p<0,05; egymintás t-próba).

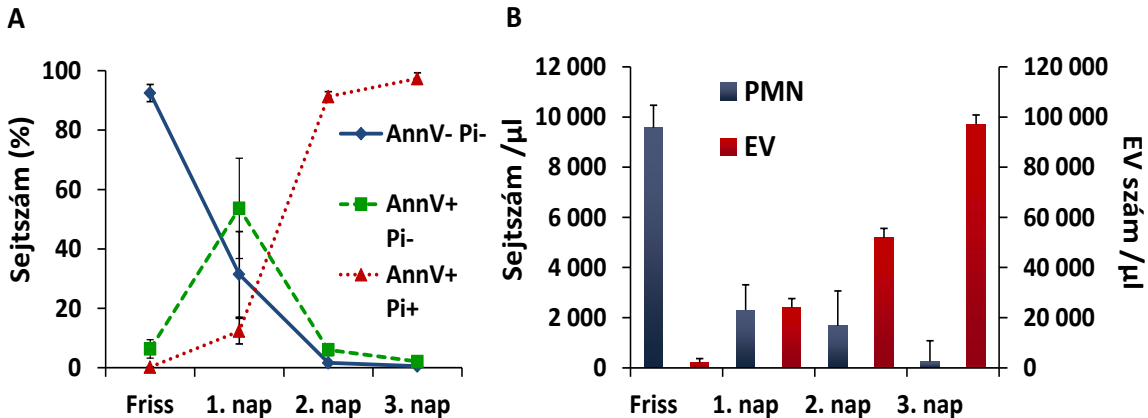
Nem találtunk olyan tárolási körülményeket, amelyek alkalmazásával hosszútávon tárolni lehet az EV-kat. Bár a rövid, 1 hét körüli -80°C-on történő tárolás nem okozott lényeges megjelenésbeli, vagy funkcióvesztéssel járó változásokat, a további vizsgálatainkhoz az EV-kat frissen preparáltuk és teszteltük. A tömegspektrométeres vizsgálatok 3 napig -60°C-on tárolt és szállított EV-kból készültek.

### 6.3.2 A spontán sejthalál során keletkező EV jellemzése

Munkacsoportunk az EV-k képződését egy dinamikus folyamatnak gondolja, ahol a sejtek a különféle biológiai környezet hatására más és más összetételű és funkciójú EV-termeléssel válaszolnak. Ezen elgondolást követve a neutrofilek három biológiailag valószínű állapotában képződött EV-it vizsgáltuk. A nyugvó, de aktiválható sejtek által termelt EV-kat (sEV), a neutrofilek természetes ellenségei (opszonizált baktériumok vagy gombák) hatására termelt EV-kat (aEV) és a neutrofilek spontán sejthalála közben

termelődött EV-kat. A sEV és az aEV általános jellemzését Tímár Csaba munkatársam végezte el, én a különféle EV-k szuperoxid-termelését és a spontán sejthalál során keletkező EV-kat vizsgáltam.

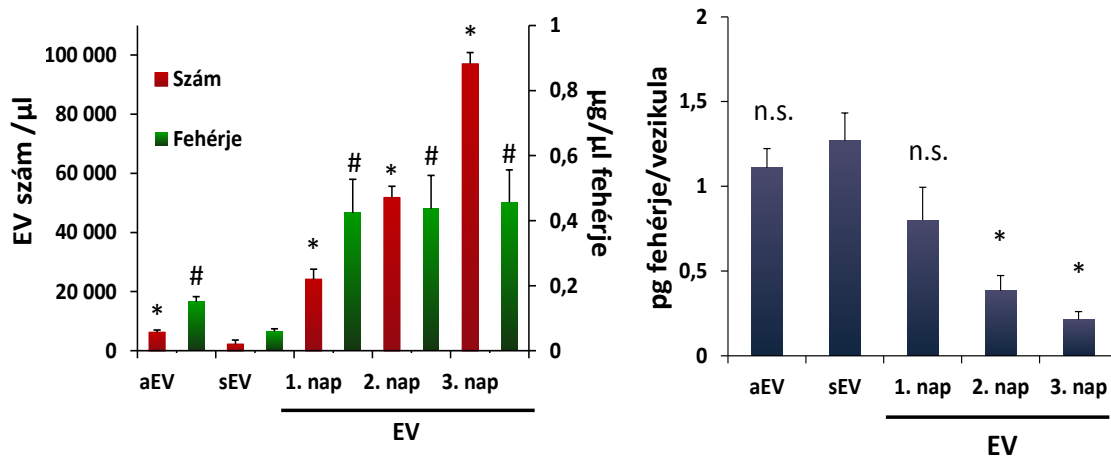
A neutrofil granulociták rövid életidejű sejtek. Sejtmédiumban 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett tartott nyugvó sejtek hamar a sejthalál jeleit mutatták *in vitro*. A frissen preparált sejtek mindössze 8%-a jelölődött a PS-hez nagy affinitással kötődő annexin V-FITC-tal (BD Pharmigen) és a DNS-hez kötődő PI-dal (Sigma-Aldrich). Egy nap elteltével azonban a sejtek 53%-a jelölődött annexin V-tel és további 12% már PI-dal is. A PS tartós kihelyeződését a sejtfelületre a korai sejthalál jellemzőjének, a PI jelölődést a késői sejthalál jellemzőjének tartják [181, 182]. További 1, illetve 2 nap elteltével az áramlási citométerrel detektálható sejtek túlnyomó többsége a késői sejthalál állapotába került (36. ábra A). A sejtszám a három napos inkubáció alatt a kiindulási érték töredékére csökkent (36. ábra B). A sejtszám csökkenésével ellentétesen változott a mintából preparált 300 nm és 3,8 µm közötti átmérővel rendelkező, CD11b markert hordozó EV-k mennyisége. A 3. napra sejtenként kb. 10 vezikula képződött (36. ábra B).



36. ábra: A neutrofilek spontán halála és az eközben megfigyelt EV-termelődés. A) A sejtek életképességének időbeli változása. A grafikonon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam. B) A sejtszám csökkenésével párhuzamosan nő az áramlási citométerrel detektálható EV-k száma. A diagramon három független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam.

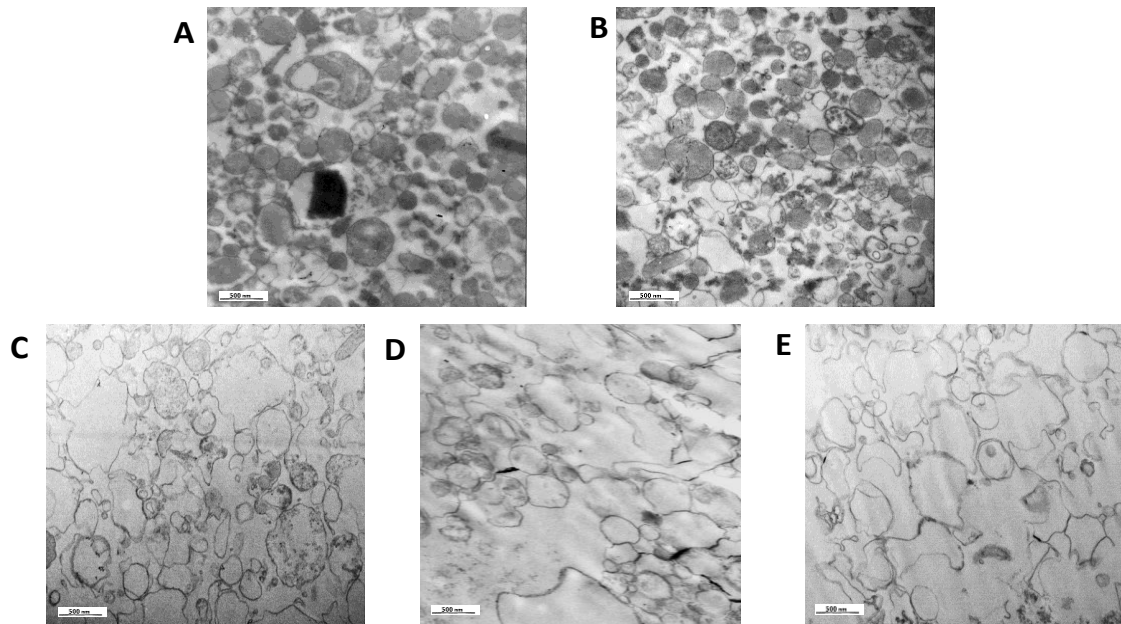
A több nap alatt képződött EV-k áramlási citométerrel detektálható száma és összfehérje-tartalma lényegesen nagyobb volt, mint a félóra alatt képződött sEV-k, vagy a szintén félórás opsonizált élesztő aktiváció kiváltotta aEV-k száma és összfehérje-tartalma (37. ábra A). A különféle EV-minták vezikuláinak átlagos fehérjetartalmát

kiszámolva, a félóra alatt képződött sEV és az aEV esetében 1,2 pg/vezikula körüli értéket kaptunk. A spontán sejthalál során képződő vezikuláknál az átlagos vezikula-fehérjetartalom folyamatos csökkenését találtuk (37. ábra B).



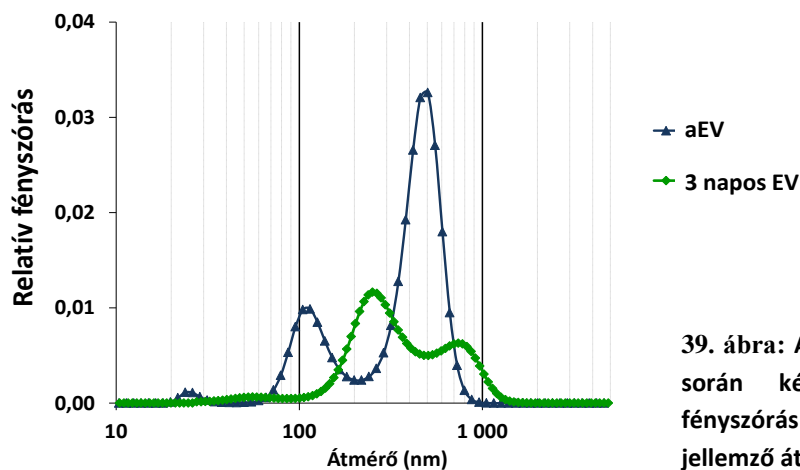
37. ábra: A) A neutrofilek spontán halála közben képződött EV-k számának és fehérjetartalmának összevetése az sEV és az aEV-k számával és fehérjemennyiségével. A diagramon 5 független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:p<0,05; kétmintás t-próba a sEV-k számához viszonyítva; #:p<0,05; kétmintás t-próba a sEV-k fehérjemennyiségéhez viszonyítva). B) Az átlagos vezikula-fehérjetartalom a sEV, az aEV és a spontán sejthalál során képződő EV-frakciókban. A diagramon 5 független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:p<0,05; kétmintás t-próba a sEV-k-hoz viszonyítva).

Összhangban van az egyedi vezikulák fehérjetartalmának változásával az EV-k elektronmikroszkópos megjelenése is. A rövid idő alatt keletkező EV-k elektrondenz bennéssel rendelkeznek, ami a fehérjedús struktúrákra jellemző. Ezzel szemben a spontán sejthalál során képződött EV-k esetében ritkán látható elektrondenz bennék. A sEV és az aEV esetében ép határolómembránnal rendelkező, kör vagy ellipszis formájú, túlnyomóan elektrondenz, vagy a citoplazmához hasonló megjelenésű bennéssel rendelkező, 100 nm és 500 nm közötti heterogén vezikulákat találtunk. A spontán sejthalál során képződő EV esetében az anyasejtek korának előrehaladtával egyre kevesebb ép határolómembránt találtunk. Ezzel párhuzamosan fogynak az elektrondenz, vagy citoplazmatikus megjelenést mutató bennéssel rendelkező struktúrák is. A vezikulák deformálódtak, nem ritkán 500 nm-nél lényegesen nagyobb átmérőt mutatnak (38. ábra).



**38. ábra:** A sEV (A) az aEV (B) és a spontán sejthalál (C: 1 napos, D: 2 napos, E: 3 napos neutrofilek) során keletkező EV-k elektronmikroszkópos képe. A rövid idő alatt keletkező EV-k ép határolómembránnal és elektrondenz bennéssel rendelkeznek. A spontán sejthalál során képződött EV-k nagyobbak, a határolómembránok nehezen kivehetők, elektrondenz bennék ritkán látható. Reprezentatív EM felvételek.

Az elektronmikroszkópos felvételek által mutatott méretbeli különbséget DLS-en alapuló méretmeghatározással is megvizsgáltuk. A sEV és az aEV-frakciók között nem rajzolódott ki jellemző különbség több mérés eredményének összevetése után sem. A 6.3.1.4 fejezetben leírtakhoz hasonlóan az aEV-k egy exoszóma méretű 100 nm-es csúccsal és egy nagyobb, a mikrovezikula mérettartományba eső 500-600 nm-es csúccsal jellemezhető populációt mutattak. A spontán sejthalál során nyerhető EV-k széles megoszlást mutattak a 150 és 1000 nm közötti tartományban. Ezt a heterogén populációt leginkább egy 250 nm-es és egy 800 nm-es csúcs jellemezte (39. ábra).



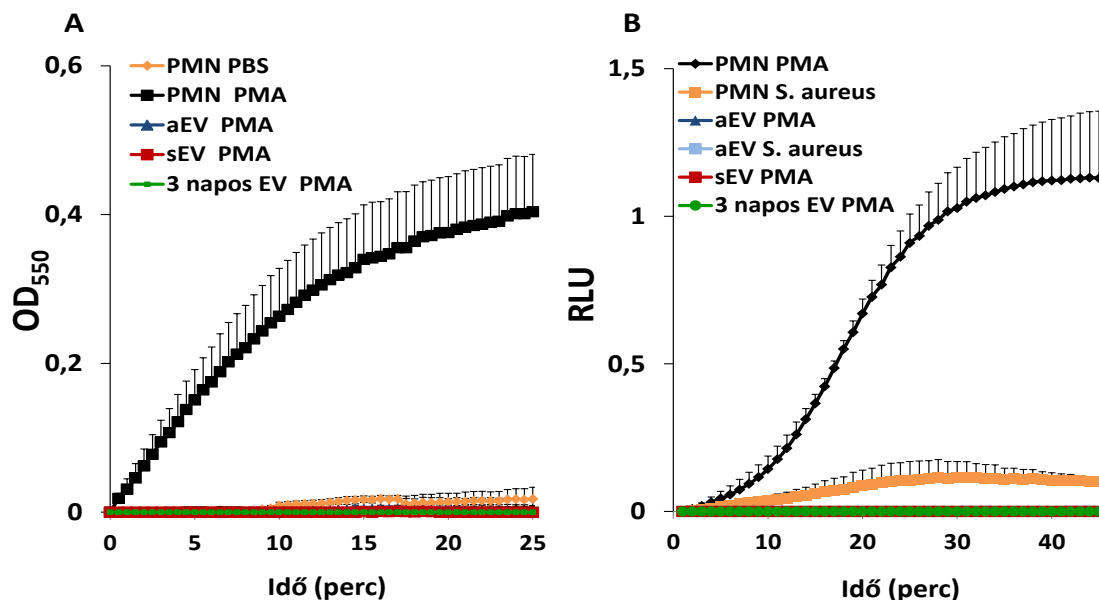
**39. ábra:** Az aEV és a spontán sejthalál során képződő EV-ok dinamikus fényszórás alapján meghatározott jellemző átmérőit. Reprezentatív ábra.

### 6.3.3 Neutrofil granulocita eredetű EV szuperoxid-termelése

Eredeti kérdésünkhöz, hogy a neutrofil granulociták EV-i termelnek-e szuperoxid-ot csak mindezen kontroll és tulajdonság meghatározó mérések után tudtunk visszatérni.

A PMN eredetű EV-k szuperoxid-termelését SOD-zal gátolható citokróm redukción alapuló módszerrel vizsgáltuk. A pozitív kontrollként használt PMN sejtek a PKC-t erőteljesen aktiváló farmakológiai stimulus, a PMA hatására intenzív szuperoxid-termeléssel válaszoltak. Azonban a PMA sem a nyugvó sejtekből származó sEV-k, sem az aEV-k, sem a spontán sejthalál közben keletkező EV-k esetében nem okozott citokróm redukciót (40. ábra A).

A sejten, vagy vezikulán belüli térbe történő  $O_2^{\cdot-}$ -termelést kemolumineszcencia-változáson alapuló módszerrel vizsgáltuk. A PMN sejtek mind PMA-ra, mind opszonizált baktériumok hatására jól detektálható  $O_2^{\cdot-}$ -termeléssel válaszoltak. A különféle módon keletkezett EV-k ezzel a módszerrel sem mutattak detektálható  $O_2^{\cdot-}$ -termelést (a 40. ábra B részén az áttekinthetőség kedvéért az EV minták közül csak az aEV esetében mutatom az opszonizált baktérium hozzáadása után mért kemolumineszcies jelet).



40. ábra: A különféle EV-frakciók  $O_2^{\cdot-}$ -termelése. A) Egyik EV-frakció sem mutatott citokróm c redukcióval kimutatható  $O_2^{\cdot-}$ -termelést PMA aktivációra. A diagramon 6 (PMN), 5 (aEV, sEV), illetve 4 (sejthalál során képződő EV) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam B) Egyik EV-frakció sem mutatott kemolumineszcencia-változással kimutatható  $O_2^{\cdot-}$ -termelést PMA, vagy opszonizált *S. aureus* aktivációra. A diagramon 3 független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam.

### 6.3.4 A NADPH-oxidáz alegységeinek tömegspektrométeres kimutatása a neutrofil granulocita eredetű EV-kban

A fagocita NADPH-oxidáz alegységeinek jelenlétét az EV-frakciókban tömegspektrométerrel vizsgálta meg számunkra Kenneth Mcleash. Az általa elvégzett mérés egy félkvantitatív módszer, amely a fehérjék mennyiségével arányos exponenciálisan módosított fehérje gyakorisági indexet (emPAI) adja eredményül. Az emPAI szám a vizsgált fehérje méretével korigálja a fehérjére jellemző, azonosított peptidek számát, és nagymértékben korrelál egy fehérje abszolút mennyiségével az adott mintában [183]. Az oxidázalegységekre vonatkozó emPAI értékeket tüntettem fel az II. táblázatban. Az aEV-frakcióban kimutathatók voltak a membránkött oxidázalegységek (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> és Rac), és megtalálható volt a citoszolikus p67<sup>phox</sup> fehérje is, de hiányzott az oxidáz összeépüléséhez elengedhetetlen p47<sup>phox</sup>, és a funkcióját bizonyos esetben betöltő p40<sup>phox</sup>. A többi EV-frakcióban minden oxidázalegység jelen volt.

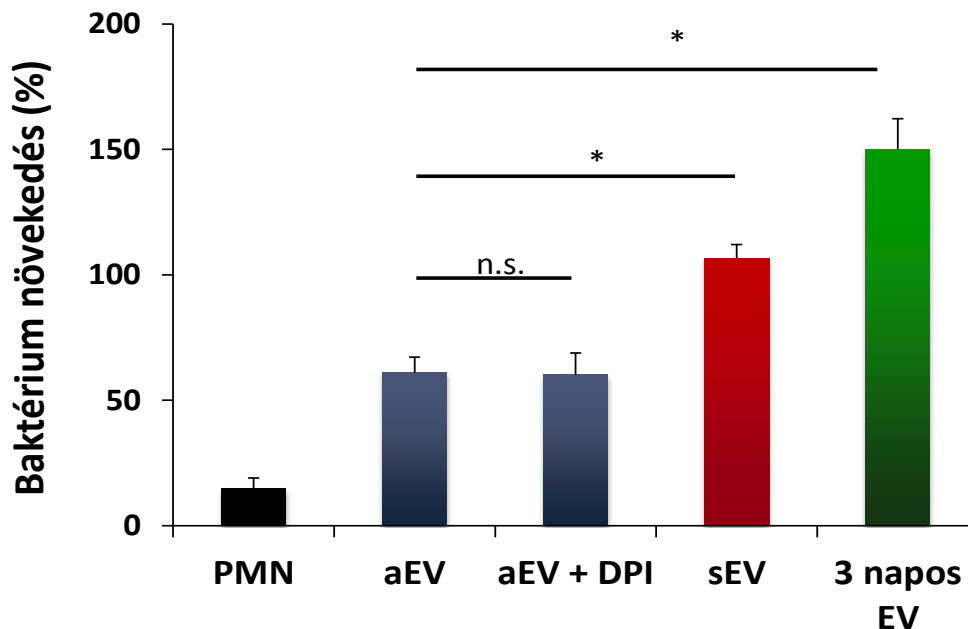
**II. táblázat: Az EV-frakciókban kvantitatív tömegspektrometriával kimutatott NADPH-oxidáz alkotórészek. A feltüntetett számértékek a spektrális számon alapuló emPAI értékek.**

	gp91 <sup>phox</sup>	p22 <sup>phox</sup>	p67 <sup>phox</sup>	p47 <sup>phox</sup>	Rac1/2	p40 <sup>phox</sup>
<b>aEV</b>	0,77	0,78	0,12	-	4,96	-
<b>sEV</b>	0,68	0,68	0,14	0,40	5,22	0,22
<b>1 napos EV</b>	0,35	0,41	0,23	0,77	3,37	0,13
<b>2 napos EV</b>	0,57	1,89	0,32	0,93	5,06	0,09
<b>3 napos EV</b>	0,44	0,57	0,17	0,83	3,00	0,12

### 6.3.5 A reaktív oxigénszármazékok szerepe az aEV-k antibakteriális hatásában

A reaktív oxigénszármazékok esetleges szerepét a PMN eredetű aEV-k antibakteriális hatásában baktériumnövekedés-teszttel vizsgáltuk. A aEV-minták átlagos antibakteriális hatása a vizsgálati idő 30 perce alatt az eredeti baktériumnövekedés 61%-ára csökkentette az *S. aureus* növekedési ütemét. Ugyanennyi nem aktivált sejtből képződő sEV-n a baktériumok szaporodni tudtak, és a 30 perc elteltével a baktériumnövekedés 7%-kal gyorsult a kezdeti értékhez képest. Még látványosabb baktériumszaporulatot láttunk a spontán sejthalál során képződött EV-k esetében. A *S. aureus* növekedési sebessége a kezdeti érték 150%-ra nőtt. (41. ábra)

Az aEV esetében látott antibakteriális hatást DPI jelenlétében is megvizsgáltuk. A DPI a hem csoportot tartalmazó fehérjék nem specifikus gátlószere, a ROS-képzés folyamatában gátolja a fagocita NADPH-oxidáz és a mieloperoxidáz működését is. PMN sejtek esetében a DPI ROS-termelést gátló hatása megmutatkozik a sejtek antibakteriális hatásának csökkenésében is [170]. Az aEV-minta 1  $\mu$ M DPI-vel történő előkezelése után nem találtunk különbséget az antibakteriális hatásban a DPI-vel nem kezelt aEV-frakcióhoz képest (41. ábra).



41. ábra: A különféle EV-k antibakteriális hatása. Az y-tengelyen a baktériumnövekedést ábrázoltam a kezdeti baktériumnövekedés százalékában. Az aEV-frakció DPI-vel nem gátlható módon csökkentette a *S. aureus* növekedési képességét. A sEV-kon és a spontán sejthalál során keletkező EV-kon a baktériumok növekedést mutatnak. A diagramon 4 (PMN, aEV, aEV+DPI, sEV), illetve 8 független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) ábrázoltam (\*:  $p < 0,05$ ; kétmintás t-próba).

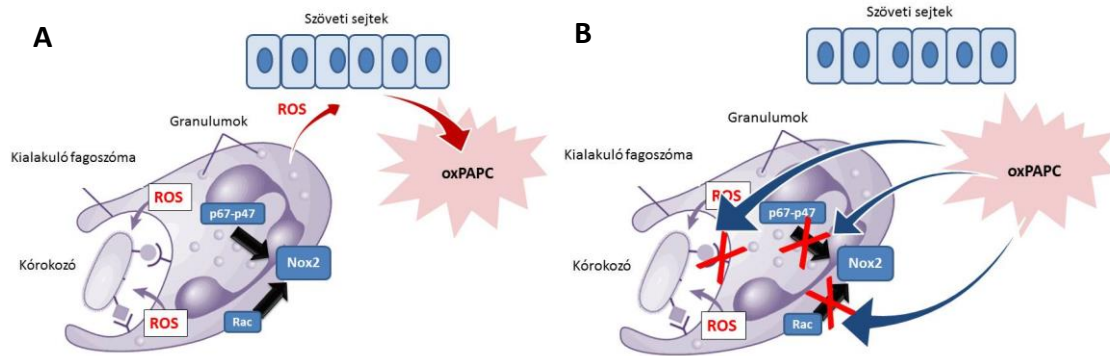
Azokban a EV-frakciókban, ahol kimutattuk minden NADPH-oxidáz alegység jelenlétét, nem volt antibakteriális hatás, ugyanakkor ahol volt antibakteriális hatást ott nem volt jelen minden oxidáz alegység. Ezzel a megfigyeléssel összhangban van, hogy a DPI nem gátolta az antibakteriális hatást, vagyis a fagocita NADPH-oxidáz nem játszik szerepet a munkacsoportunk által leírt aEV-k antibakteriális hatásában.



## 7 Megbeszélés

Az irodalmi áttekintés során igyekeztem hangsúlyozni, hogy a megfelelő helyen, időben és mennyiségben termelt reaktív oxigénszármazékok létfontosságú folyamatokban vesznek részt, de a ROS-termelés szabályozásának kisiklása, súlyos betegségek kialakulásához vezethet. Az alulműködéses állapotok jellemzően ritka előfordulású genetikai betegségeket takarnak, a túlzott ROS-termeléssel zajló kórfolyamatok azonban széles tömegeket érintő, az életminőséget súlyosan csökkentő betegségekért tehetők felelőssé. Az utóbbiak az egészségügyi ellátórendszert is egyre nagyobb kihívások elé állítják. PhD-munkám során azokat a szabályozó mechanizmusokat vizsgáltam, amelyek egészséges körülmények között kordában tartják a neutrofil granulocita NADPH-oxidázának ROS-termelését.

Munkám első részében a gyulladáshoz oxidatív stressz során képződő oxidált foszfolipidekkel foglalkoztam. Valery N. Bochkov elképzelésén továbbhaladva együttműködő partnereink kimutatták, hogy az oxidált foszfolipidek úgy gátolják a neutrofilek oxidatív robbanását, hogy a sejtek aktiválódása szempontjából lényeges jelátviteli utakat (ERK és p38MAPK foszforiláció) és a fagocitózist nem gátolják. Ennek háttérében részben az az általunk sejtmentes rendszerben megfigyelt hatás állhat, hogy az oxPAPC gátolja a NADPH-oxidáz szuperoxid-termelést. Nem gátolja azonban a már összeépült NADPH-oxidázt, így valószínű, hogy az oxPL-ek közvetlenül az enzimkomplex összeépülését zavarják meg, nem az enzim aktivitását. Sejtes rendszerben az oxPL-ek hatása kifejezettebb volt a ROS-termelésre, mint a sejtmentes rendszerünkben, ami felveti, hogy az oxPL nem csak közvetlenül gátolja az enzimkomplex összeépülését, hanem valamilyen közvetett, jelátvitelhez kapcsolt módon is. Ezt támasztja alá az is, hogy sejtmentes rendszerben nem tapasztaltuk a nem oxidált PL-ek szuperoxidtermelés-fokozó hatását, amit kollaborációs partnereink megfigyeltek sejtes rendszerben. Összegezve úgy gondoljuk, hogy egyes PL-ek szöveti oxidatívstressz-érzékelők, amelyek negatív visszacsatolással közvetlen és közvetett módon gátolják az akut gyulladások legjelentősebb ROS-forrását, a fagocita oxidázt (42.ábra).



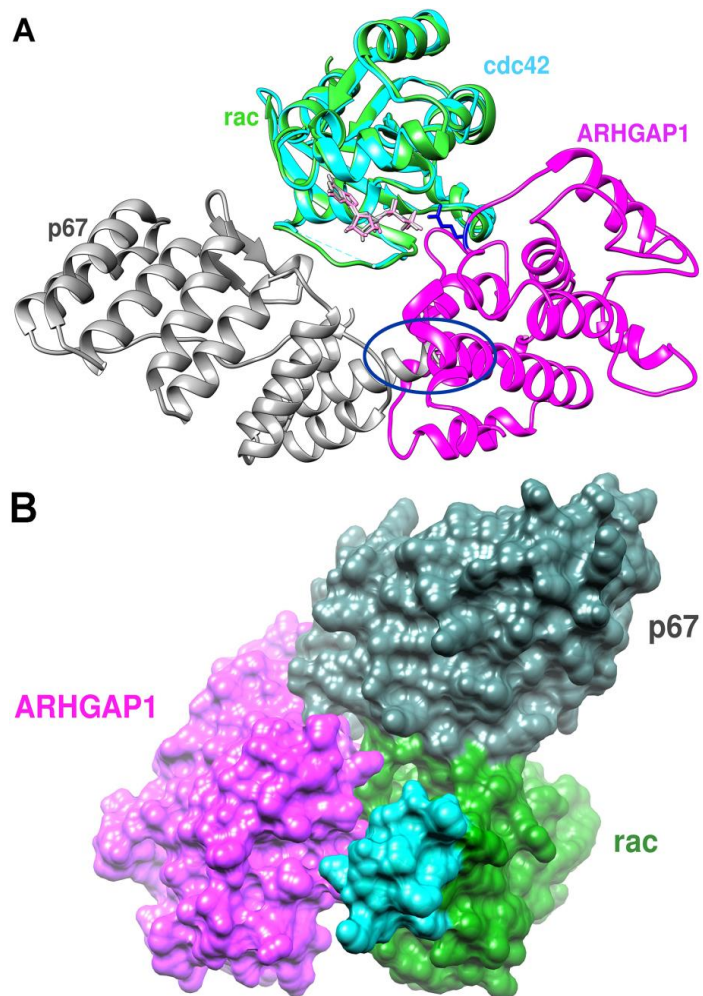
**42. ábra: A foszfolipidek ROS-szenzor működése. A) Az aktiválódott neutrofil által termelt ROS oxidálja a környező szöveti sejtek foszfolipidjeit. B) Az így keletkező oxPAPC egyrészt közvetlenül gátolja a NADPH-oxidáz alegységeinek összeépülését, másrészt valószínűleg gátolja a ROS-termelést kiváltó jelátviteli ut(aka)t is. (Az ábrához a „medical-dictionary.thefreedictionary.com/phagocytosis” oldalon található rajzot használtam fel.)**

A neutrofil granulocitákban kifejeződő RacGAP-ok szintén a szuperoxid-termelés negatív szabályozói. Az általunk vizsgált GAP-ok membránhoz nem kötött formában a NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülésének gátlói lehetnek. Nem találtunk különbséget a rekombináns ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és a Bcr membránkötött Rac-GTP iránti hozzáférhetőségben. A folyadékfázisban található GAP-ok azonban nem közvetlen szabályozói a már összeépült NADPH-oxidáz enzimkomplexnek. Ennek valószínű magyarázata, hogy az összeépült komplexben a Rac, olyan helyzetbe kerül, ahol nem férnek hozzá a szolubilis GAP-ok. Azonban fontos megjegyezni, hogy kísérleteinkben rekombináns módon előállított, GST-fúziós GAP-okat vizsgáltunk. Elképzelhető, hogy ezen GAP-ok endogén szolubilis formái az általunk megfigyelteltől eltérően viselkednek *in vivo*.

A szuperoxid-termelés szabályozásában membránkötött GAP-ok is részt vesznek. Ezt támasztja alá a félrekombináns rendszerben korábban is és most is megfigyelt fluoridhatás, amely a szuperoxid-termelést a GAP-ok gátlásán keresztül fokozza [78]. Nincs lényeges különbség a fluoridhatásban az enzimkomplex összeépülése előtt és után, vagyis a membránfrakcióban lévő GAP-ok az összeépült komplexben is szabályozzák a Rac-ot. Így a membránkötött GAP-ok nem csak az enzimkomplex összeépülésének gátlásával, hanem a már működő NADPH-oxidáz szabályozásával is csökkenthetik a szuperoxid-termelést. A membránban lévő kisméretű GAP-ok, az ARHGAP1 (50 kDa) és az ARHGAP25 (73 kDa) mennyiségének csökkentésével növekedett a szuperoxid-termelés sebessége. Ezzel szemben a lényegesen nagyobb, 190

kDa méretű ARGAP35 mennyiségének csökkentése nem befolyásolta a szuperoxid-termelést. A megfigyelt GAP-szelektivitás hátterében a vizsgált GAP-ok eltérő mérete, vagy egy fehérje-kölcsönhatás állhat, ami szelektivitásszűrőként egyes GAP-okat a Rac-hoz enged, másokat nem. Ilyen szelektivitásszűrő kapcsolatot megfigyeltek már kis G-fehérje, a rá ható GEF és a kis G-fehérje célfehérjéje között, ahol a célfehérjéje „választja meg” a GEF-et a Rac számára [184, 185]. Susan M. E. Smith (Department of Biology and Physics, Kennesaw State University, USA) kollaborációs partnerünk a kis G-fehérjék hasonlóságát kihasználva megvizsgálta, hogy milyen viszonyba kerül a Rac célfehérje p67<sup>phox</sup> és a Rac-ra

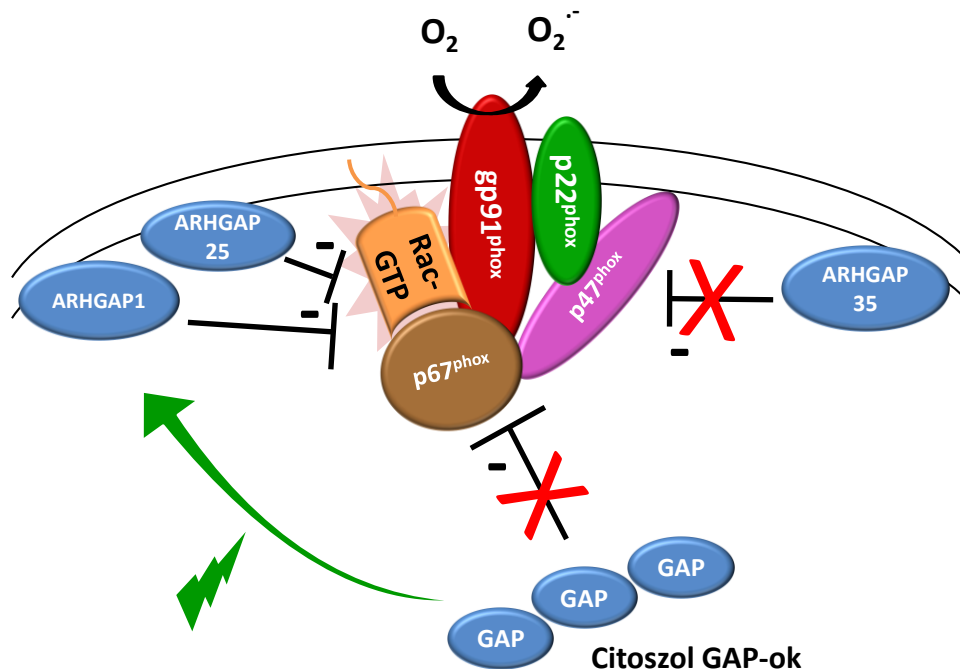
ható GAP egymással, ha mindketten a Rac-hoz kötnek. A már meglévő Rac-p67<sup>phox</sup> (a Rac-kötésben fontos p67<sup>phox</sup>TRP domén kristályszerkezete ismert) [186] és Cdc42-ARHGAP1 (csak a GAP domén kristályszerkezete ismert) [101, 187, 188] fehérjekapcsolatok kristályszerkezeteit a kis G-fehérjék egymásnak való megfeleltetésével egymásra vetítette, és a kapott GAP-Rac-p67<sup>phox</sup> komplexben megvizsgálta, hogy van-e térbeli ütközés. Azt találta, hogy a GAP és a p67<sup>phox</sup> eltérő felszíneken kapcsolódik a Rac-kal, és mindössze egy minimális térbeli ütközést talált a p67<sup>phox</sup> N-terminálisa és a GAP domén között (43. ábra). A fehérjevégek



43. ábra: A p67<sup>phox</sup>-Rac-ARHGAP1 trimer számításon alapuló lehetséges szerkezete. A) A Rac és a CDC42 hasonló szerkezetét kihasználó szalagmodell. A kék aminosav a GAP domén a katalitikus argininje. A kék ellipszis a térbeli ütközést jelzi. B) A trimerszerkezet felszíneinek bemutatása. A három fehérjerész úgy fekszik össze, hogy szabad marad a rac „inzert” régiója, ami a gp91<sup>phox</sup> kötésében vehet részt.

mozgékonyasága miatt ez az ütközés valószínűleg nem jelenti tényleges gátját a fehérjék kölcsönhatásának, sőt ez, illetve a GAP és a  $p67^{\text{phox}}$  számottevő összefekvő felszínei alapjai lehetnek a megfigyelt GAP-szelektivitásnak. A  $p67^{\text{phox}}$ - és a GAP-kötő felszínek szabadon hagyják a Rac „inzer” régióját, ami  $gp91^{\text{phox}}$  kötésben játszhat szerepet [76, 77], továbbá marad elég hely a  $p67^{\text{phox}}$  TRP doméntól C-terminálisan elhelyezkedő részének és az ARHGAP1 GAP doménon kívüli részeinek is.

Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy az összeépült fagocita NADPH-oxidáz gátlásában, és ezáltal a szuperoxid-termelés leállításában legalább két, különböző, membránkött GAP játszhat szerepet. Az ARHGAP1 és ARHGAP25 *in vitro* helyettesíthetőségének lehetséges magyarázata, hogy a működő sejtben eltérő jelátviteli utak célpontjai lehetnek a különféle GAP-ok. Számos példa ismert egyes GAP-ok aktivitását és lokalizációját megváltoztató foszforiláción és lipid-fehérje kölcsönhatáson alapuló jelátviteli folyamatra [189]. Ez a szabályozási sokszínűség teszi lehetővé az olyan kis G-fehérje kapcsolt biológiai folyamatok finom szabályozását, mint a szuperoxid-termelés. Elképzelésünket NADPH-oxidáz GAP-ok általi szabályozásáról a 44. ábrán összegzem.



44. ábra: Az összeépült NADPH-oxidáz leállításában valószínűleg nem játszanak közvetlen szerepet a citoszol GAP-jai és a membránkött ARHGAP35. Ha azonban az addig a citoszolban található ARHGAP1 és ARHGAP25 különféle jelátviteli utak hatására kihelyeződnek a membránhoz, akkor képesek a Rac-hoz férkőzni és a NADPH-oxidázt gátolni.

PhD munkám további részében a neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulák reaktív oxigénszármazék-termelését megvizsgáltam. Azonban ahhoz, hogy hiteles és megbízható eredményeket kapjunk szükség volt a funkcióvesztés nélküli EV-tárolás körülményeinek meghatározására. A szobahőmérsékleten, vagy 4°C-on tárolt EV-minták esetében már 1 hét leforgása alatt jelentős vezikulaszám-változást tapasztaltunk. Ezzel összhangban az antibakteriális hatással rendelkező aEV-k teljesen elvesztették funkciójukat ugyanezen tárolási idő alatt. A -20°C-on, fagyasztva tárolt EV-k esetében, bár nem tapasztaltunk jelentős számbeli változást az 1 hónapos vizsgálati idő alatt, de a vezikulák jelentős morfológiai változásokat mutattak áramlási citométerrel és DLS-sel vizsgálva. A látott változásokat valószínűleg duzzadás következtében szenvedték el az EV-k. Az 1 hónapos tárolási időtartam alatt számottevő mértékben csökkent a -20°C-on tárolt aEV antibakteriális hatása is. A legkisebb mértékű morfológiai változást és funkcióvesztést a -80°C-on tárolt EV-k esetében tapasztaltuk, függetlenül a fagyasztás és a felolvasztás sebességétől. Sajnos az antibakteriális hatás romlása a tárolási idő növelésével ebben a mintában is tendenciózusan erősödött. Ezen eredmények alapján úgy ítéltük meg, hogy funkcionális vizsgálatokhoz célszerű frissen készített EV-mintát használni, illetve ha technikai okokból a tárolás elkerülhetetlen, akkor az EV-kat -80°C-on érdemes tartani.

Munkacsoportunk a neutrofil granulocita három, biológiailag valószínű állapotában képzett EV-ival foglalkozott. A neutrofilek nyugvó és aktivált állapotban is jól detektálható mennyiségben termelnek EV-kat. Számos EV képződik azonban a sejtek *in vitro* spontán sejthalála közben is. Bár ez utóbbi esetben lényegesen hosszabb idő alatt képződött vezikulákat számszerűsítettünk, mégis fontos felhívni a figyelmet arra, hogy egy biológiai mintában – például szövetkultúrákban – mindig megfigyelhető a sejtek egy részénél a programozott sejthalál valamilyen formája. Különösen igaz ez a rövid életidejű neutrofil granulocitákat tartalmazó készítményekre. A legtöbb neutrofil eredetű EV-kal foglalkozó publikációban nem található adat az EV-kat termelő neutrofilek életképességéről, így nem zárható ki, hogy a megfigyelt hatások egy részéért a neutrofilek sejthalála során képződött EV-k a felelősek. Ezt támasztja alá a neutrofil eredetű EV-k több munkacsoport által is megfigyelt anti-imflammatórikus hatása is [144, 145, 147], ami hasonló az apoptotikus neutrofilek bekebelezése által kiváltott anti-imflammatórikus makrofág válaszokhoz [23]. A neutrofilek spontán sejthalála közben

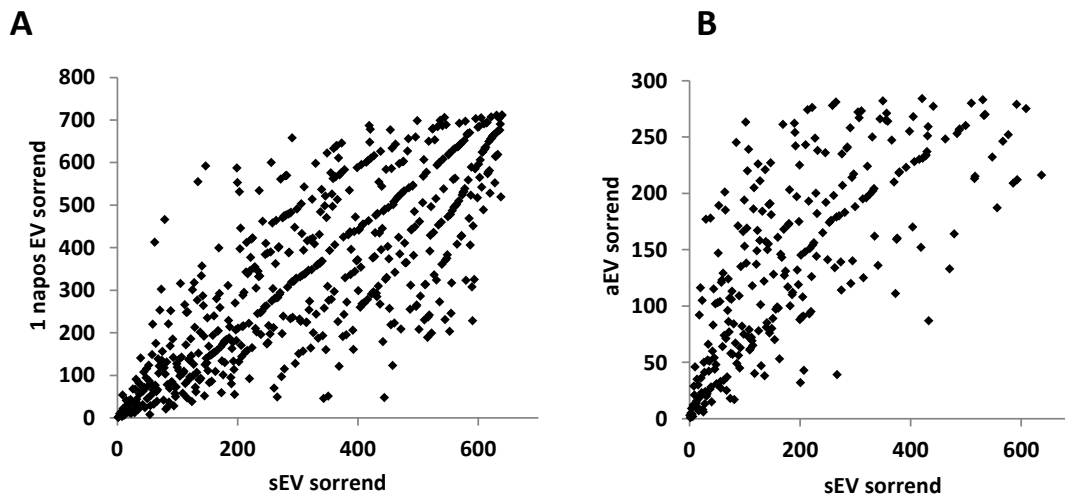
képződött EV-k számos tulajdonságukban hasonlítanak az aktivációra képződött és specifikus hatással rendelkező EV-kra. Áramlási citométerrel vizsgálva széles mérettartományban megoszló, helyes orientáltságú (a foszfolipid kettős membrán eredetileg is külső rétege található kívül), vezikuláris természettel rendelkező eseményeket találtunk, amelyek az aktivációra keletkezett EV-khoz hasonlóan jelölődtek annexin V-tel és az anyasejtre jellemző felszíni markerrel (CD11b). DLS vizsgálatnak alávetve az aEV-kal nagyban átfedő méretmegoszlást találtunk a sejthalál kiváltotta EV-knál, amelyben exoszóma és mikrovezikula méretű részecskék egyaránt előfordulnak. Elképzelhető, hogy a nagyobb vezikulák (amelyeket az irodalom hagyományosan apoptotikus testnek nevez) a mintakészítési eljárásunk első, 500 g gyorsulású centrifugálásánál leülepednek, ezért nem találunk 1  $\mu\text{m}$ -nél lényegesen nagyobb átmérőjű vezikulákat. Az eddigi eredményektől eltérően lényeges különbséget találtunk a spontán halál során képződő EV-k és az aktivációra képződő EV-k elektron mikroszkópos megjelenésében. Míg utóbbiakra elektrondenz és citoplazma megjelenésű bennék a jellemző, addig a spontán sejthalál eredetű EV-k sokkal ritkábban tartalmaznak jellemző bennéket. Az utóbbi vezikulák mérete eltolódott a nagyobb struktúrák fele, és az idő előrehaladtával egyre kevesebb ép határolómembránt találtunk. Ennek megfelelően az egyedi vezikulák átlagos fehérjetartalma a sejthalál előrehaladtával egyre alacsonyabb. Szintén a sejthalál során képződő EV-ra jellemző munkacsoportunk azon megfigyelése, hogy az aEV-től és a sEV-től eltérően az spontán sejthalál kiváltotta EV-kban kimutatható mennyiségben található DNS (nem publikált eredmény). A különféle EV-frakciókra jellemző tulajdonságokat a III. táblázatban foglalom össze.

**III. táblázat: Az neutrofil eredetű EV-k jellegzetességei.**

	Anyasejt életképessége	PS az EV külsőjén	Neutrofil marker	EM megjelenés	Átmérő	ROS- termelés	Antibakte- riális hatás	DNS
<b>sEV</b>	AnnV <sup>-</sup> ; PI nem mutatja jelét a sejthalálnak	Van	Van	Elektronrendez és citoplazmaszerű bennék; ép határolómembrán	100 és 500 nm körüli csúcsok	Nincs	Nincs	Nincs
<b>aEV</b>	AnnV <sup>-</sup> ; PI nem mutatja jelét a sejthalálnak	Van	Van	Elektronrendez és citoplazmaszerű bennék; ép határolómembrán	100 és 500 nm körüli csúcsok	Nincs	Van	Nincs
<b>Sejt- halál EV</b>	AnnV <sup>+</sup> ; Pi <sup>+</sup> Korai, és késői apoptózis jel	Van	Van	Üres struktúrák, sérült membrántöréde- kek	250 és 800 nm körüli csúcsok	Nincs	Nincs	Van

A vizsgált EV-frakciók további közös tulajdonsága, hogy sem PMA, sem opszonizált baktérium jelenlétére nem válaszoltak kimutatható szuperoxid-termeléssel. Elképzelésünk szerint ennek háttérében eltérő folyamatok állhatnak az egyes EV-frakciók esetében. Az aEV-frakció tömegspektrometriával azonosított viszonylag kevés, 298 fehérjéje között nem található meg a NADPH-oxidáz összeépüléséhez elengedhetetlen p47<sup>phox</sup>. Figyelembe véve, hogy a többi oxidázegység, beleértve a p47<sup>phox</sup>-szal gyakran komplexben lévő p67<sup>phox</sup>-ot is, az egyéb EV-mintákban kimutatott mennyiséghez képest hasonló mértékben van jelen, valamilyen szelektálási, csomagolási folyamatot kell feltételeznünk a jelenség háttérben. Ez a csomagolási folyamat tehető felelőssé a munkacsoportunk által bemutatott granulumfehérjedúsulásért, a leszűkölt fehérjeprofiliért és a p47<sup>phox</sup>-hiányáért az aEV-kban [190]. Ettől a csomagolási stratégiától eltérő képet mutat a nyugalomban és a spontán sejthalál során képződött EV-k fehérjeprofíljára. Az aktiváció nélkül képződő EV-k lényegesen szélesebb és az antibakteriális fehérjékre kevésbé kielezett fehérjeprofílt mutatnak (kb. 700 azonosított fehérje). Ez felveti a lehetőséget, hogy a nyugalomban termelődött sEV-k valójában a frissen preparált PMN mintában is jelenlévő öreg, apoptotizáló sejtekből származó EV-k. Ezt az elképzelésünket támasztja alá a tömegspektrometria által kimutatott fehérjék mennyiségi sorrendjének megfeleltetése a különféle EV-frakciók

között. A kirajzolódott fehérjegyakorisági mintázatokat (45. ábra A-B) jellemző regressziós koefficienseket megvizsgálva azt találtuk, hogy az sEV-frakció fehérjeprofíljája jobban hasonlít a spontán sejthalál közben képződött EV-k profiljára, mint az aEV-kéra (45. ábra C). A spontán képződő EV szélesebb fehérjeprofíljának köszönhetően minden oxidázalegység megtalálható volt ezekben a mintákban. Az egyik lehetséges magyarázat arra, hogy ennek ellenére nem tudtunk szuperoxid-termelést kimutatni, az, hogy az együtt veszélyes oxidázalegységeket a programozott sejthalál során eltérő „halottaskocsikba” csomagolja a sejt. Szintén magyarázhatja a megfigyelteket, hogy az alegységek inaktív, vagy tartósan gátolt formában vannak jelen az EV-kban, illetve hiányozhat az összeépülés elindításához szükséges jelátvitel is.



C

$R^2$	aEV	sEV	1 napos EV	2 napos EV	3 napos EV
aEV	1	0,517	0,402	0,436	0,304
sEV	0,517	1	0,624	0,595	0,627
1 napos EV	0,402	0,624	1	0,814	0,732
2 napos EV	0,436	0,595	0,814	1	0,783
3 napos EV	0,304	0,627	0,732	0,783	1

45. ábra: A neutrofil EV-k fehérjemintázatainak összehasonlítása. A) A sEV-mintában kimutatott fehérjék mennyiségi sorrendjének megfeleltetése az 1 napos sejtekből keletkező EV-k fehérjesorrendjének. B) A sEV-k fehérjesorrendjének megfeleltetése az aEV-k fehérjesorrendjének. C) Az egyes EV-k fehérjesorrendjének megfeleltetésén elvégzett lineáris regresszió  $R^2$  értékeinek hődiagramja. A piros árnyalat nagy, a zöld kis hasonlóságot jelent az adott minták között.

A DPI a NADPH-oxidáz nem specifikus gátlószereként gátolja a neutrofilek ROS-közvetítette baktériumölését [170]. Jelenlétében az általunk alkalmazott vizsgálómódszerek érzékenységi korlátai miatt nem kimutatható kismennyiségű ROS-



termelés is gátolt. Az eddigi megfigyeléseknek megfelelően, nem találtunk különbséget az aEV-k antibakteriális hatásában DPI jelenléte mellett, vagy hiányában. Ez alapján kimondhatjuk, hogy az aEV-k antibakteriális hatásában biztosan nincs szerepe a reaktív oxigénszármazékoknak.

Eredményeinket összegezve az rajzolódik ki, hogy a neutrofil granulocita komplex és kifinomult szabályozással tartja kontroll alatt a könnyen veszélyessé váló NADPH-oxidázt. Az ellenőrzés kiterjed a teljes aktiváció, vagy a sejthalál állapotában lefűződő EV-k működésére is, nem engedélyezve a kontrollálatlan ROS-felszabadulást. Az olyan precíz szabályozást biztosító faktorok, mint a PLA<sub>2</sub> és a hozzákapcsolt szabályozási lehetőségek, vagy az értekezésben bemutatott GAP-ok működésének alapos feltérképezése lehetővé teszi számunka a kóros folyamatok okainak jobb megértését és új terápiás megközelítések kidolgozását.

## 8 Következtetések

Az értekezés alapjául szolgáló munkám során a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését kordában tartó mechanizmusokkal kapcsolatos eredményeinket ismerttettem. Ezek alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

1. Az oxidált 1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glicero-3-foszforserin gátolja a fagocita NADPH-oxidáz összeépülését sejtmentes rendszerben. A foszfolipid oxidálatlan formája azonban nincs hatással a fagocita oxidázra. Ez alátámasztja azt az elképzelést, hogy az oxidált foszfolipidek negatív visszacsatolással gátolják a gyulladásos sejtek ROS-termelését.
2. A membránhoz nem kötött ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és Bcr egyenlő mértékben képes a membrán kötött Rac-hoz férközni és ez által a NADPH-oxidáz összeépülését gátolni sejtmentes rendszerben. A rekombináns ARHGAP1, ARHGAP35 és Bcr fehérjékhez hasonlóan a rekombináns ARHGAP25 sem képes szabályozni a már összeépült NADPH-oxidáz enzimkomplex működését.
3. Az összeépült fagocita NADPH-oxidáz enzimkomplex szuperoxid-termelését a membránkötött ARHGAP1 és ARHGAP25 gátolja sejtmentes rendszerben. Nincs jelentős gátlóhatása azonban a membránkötött ARHGAP35-nek az összeépült oxidázra. A kimutatott GAP-szelektivitás felveti egyes GAP-ok és a NADPH-oxidáz Rac-tól eltérő alegységeinek kölcsönhatását.
4. A neutrofil granulocita nyugalomban, opsonizált részecske felvétele után és *in vitro* spontán sejthalála közben elválasztott EV-i nem termelnek kimutatható mennyiségű szuperoxid-aniont, és az aEV-k korábban megfigyelt antibakteriális hatásában nem játszik szerepet a NADPH-oxidáz enzimaktivitása.

## 9 Összefoglalás

A neutrofil granulociták által termelt reaktív oxigénszármazékok (ROS) nélkülözhetetlenek a megfelelő immunválasz kialakulásához. Ugyanakkor a térben és időben nem megfelelő mértékben termelt ROS népegészségügyileg is jelentős kórképekért tehető felelőssé. Munkám céljával a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését szabályozó folyamatok pontosabb megértését tűztük ki.

Sejtmentes rendszerben bemutattuk, hogy az oxidált foszfolipidek megzavarják a NADPH-oxidáz összeépülését, de nem befolyásolják annak enzimaktivitását. Ez molekuláris magyarázatát adja a mások által sejtes rendszerben megfigyelt oxidált foszfolipid hatásnak és alátámasztja azt az elképzelést, hogy a ROS hatására képződött oxidált foszfolipidek negatív visszacsatolással gátolják a további ROS felszabadulást.

További kísérleteinkben bemutattuk, hogy a Rac-ra ható rekombináns GTP-áz aktiváló proteinek (GAP) közül az ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és Bcr egyenlő mértékben képes a membránkött Rac-hoz férközni és a NADPH-oxidáz összeépülését gátolni. Ugyanakkor ezek a nem membránrögzült GAP-ok nem szabályozzák a már összeépült oxidáz szuperoxid termelését. Munkacsoportunk korábbi megfigyelésével összhangban ismételten bemutattuk, hogy a membránkött GAP-ok azonban képesek gátolni a NADPH-oxidázt. Immundepléciós kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a gátlásban biztosan szerepet játszik az ARHGAP1 és ARHGAP25, de az ARHGAP35 nem. Fehérjeszerkezet-számításon alapuló elképzelésünk szerint az oxidáz GAP-szelektivitását egy fehérje-kölcsönhatás biztosíthatja a Rac célfehérje p67<sup>phox</sup> és a GAP között.

Végül jellemeztük a neutrofil granulocita *in vitro* sejthalála közben képződött extracelluláris vezikulákat (EV). Ezek a partikulák nem termeltek szuperoxid-aniont, hasonlóan a nyugalomban, illetve az opsonizált részecske felvétele után elválasztott EV-khoz. Ennek megfelelően az aktivált neutrofil eredetű EV-khoz köthető antibakteriális hatásban nem játszik szerepet a NADPH-oxidáz enzimaktivitása.

Eredményeinket összegezve az rajzolódik ki, hogy a neutrofil granulocita komplex és kifinomult szabályozással tartja kontroll alatt a könnyen veszélyessé váló NADPH-oxidázt. Az ellenőrzés kiterjed a teljes aktiváció, vagy a sejthalál állapotában lefűződő EV-k működésére is, nem engedélyezve a kontrollálatlan ROS-felszabadulást. A precíz szabályozást biztosító eszköztárnak alapos feltérképezése lehetővé teszi számunka a kóros folyamatok okainak jobb megértését és új terápiás megközelítések kidolgozását.

## 10 Summary

Reactive oxygen species (ROS) produced by neutrophilic granulocytes are essential for adequate immune responses. However, the inadequate spatiotemporal regulation of ROS production leads to epidemiologically significant diseases. The aim of our work was to investigate new aspects of regulation of phagocyte NADPH oxidase.

We demonstrated that oxidized phospholipids inhibit the assembly of NADPH oxidase subunits in cell-free system without affecting the enzymatic activity. This result gives molecular explanation for the previously observed effect of oxidized phospholipids in a whole-cell system. It also supports the negative feedback effect of oxidized phospholipids on ROS production.

It was also demonstrated in subsequent experiments that the recombinant forms of some Rac GTPase activating proteins (GAP), as ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 and Bcr are equally effective in accessing the membrane-bound Rac and in inhibiting the assembly of NADPH oxidase. In contrast, these soluble GAPs are not able to regulate superoxide production of the already assembled enzyme complex. In accordance with previous data from our workgroup, it was demonstrated that the membrane-bound GAPs are indeed able to regulate the assembled oxidase. Immunodepletion showed that ARHGAP1 and ARHGAP25 inhibit the superoxide production but ARHGAP35 does not. Based on structural studies we propose that the interaction of GAP with the Rac effector protein p67<sup>phox</sup> underlies the discrimination between different GAPs.

Finally we have characterized the extracellular vesicles (EV) derived of neutrophilic granulocytes undergoing spontaneous death. These particles – similar to spontaneously formed and phagocytosis induced EVs – are not able to produce superoxide. Therefore enzymatic function of NADPH oxidase does not have a role in the antibacterial effect of activation induced EVs.

Our data reveal the complex and sophisticated control of neutrophils over the potentially dangerous NADPH oxidase. Their function does not allow uncontrolled ROS production by EVs produced in fully activated state or during spontaneous cell death. Better understanding of the careful regulation of ROS production by neutrophils gives us a chance to find better therapeutic targets and to develop new therapeutic approaches.

## 11 Irodalomjegyzék

1. Nathan C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6: 173-82.
2. Erdei A, Sármay G, Prechl J. *Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2012: 62-65.*
3. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33: 657-70.
4. Kolaczkowska E, Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13: 159-75.
5. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. (2010) Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 366-78.
6. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*, 7: 678-89.
7. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. (2013) Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, 17: 1185-97.
8. Erdei A, Sármay G, Prechl J. *Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2012: 213-221.*
9. Segal AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23: 197-223.
10. Rada B, Hably C, Meczner A, Timar C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E. (2008) Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol*, 30: 237-53.
11. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28: 340-5.
12. Soehnlein O. (2009) Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med (Berl)*, 87: 1157-64.
13. Pham CT. (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 6: 541-50.
14. Rada BK, Geiszt M, Hably C, Ligeti E. (2005) Consequences of the electrogenic function of the phagocytic NADPH oxidase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360:

2293-300.

15. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*, 416: 291-7.
16. Geiszt M, Kapus A, Ligeti E. (2001) Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *J Leukoc Biol*, 69: 191-6.
17. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-5.
18. Brinkmann V, Zychlinsky A. (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 198: 773-83.
19. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11: 519-31.
20. Geering B, Simon HU. (2011) Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ*, 18: 1457-69.
21. Witko-Sarsat V, Pederzoli-Ribeil M, Hirsch E, Sozzani S, Cassatella MA. (2011) Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol*, 32: 117-24.
22. El Kebir D, Filep JG. (2010) Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal*, 10: 1731-48.
23. Bratton DL, Henson PM. (2011) Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*, 32: 350-7.
24. Gibson C, Berliner N. (2014) How we evaluate and treat neutropenia in adults. *Blood*, 124: 1251-8; quiz 378.
25. Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. (2002) Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol*, 9: 30-5.
26. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med*, 343: 1703-14.
27. Dinuer MC, Orkin SH. (1992) Chronic granulomatous disease. *Annu Rev Med*, 43: 117-24.

28. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. (1999) Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab*, 68: 283-303.
29. Song Y, Ruf J, Lothaire P, Dequanter D, Andry G, Willemse E, Dumont JE, Van Sande J, De Deken X. (2010) Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 375-82.
30. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, 275: 23227-33.
31. Holmstrom KM, Finkel T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 411-21.
32. Finkel T. (2005) Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 971-6.
33. Sabharwal SS, Schumacker PT. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*, 14: 709-21.
34. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 205-14.
35. Rodrigo R, Gonzalez J, Paoletto F. (2011) The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res*, 34: 431-40.
36. Nathan C, Cunningham-Bussel A. (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*, 13: 349-61.
37. Rada B, Leto TL. (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol*, 15: 164-87.
38. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. (2000) Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*, 79: 170-200.
39. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. (2003) Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol*, 15: 578-84.
40. Dallegri F, Ottonello L. (1997) Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res*, 46: 382-91.
41. Saeed SA, Waqar MA, Zubairi AJ, Bhurgri H, Khan A, Gowani SA, Waqar SN, Choudhary MI, Jalil S, Zaidi AH, Ara I. (2005) Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. *J Coll Physicians Surg Pak*,

15: 507-14.

42. Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Jr., Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. (1999) CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke*, 30: 1110-7.

43. Galkina E, Ley K. (2006) Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 17: 368-77.

44. Schaller B, Graf R. (2004) Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24: 351-71.

45. Loukogeorgakis SP, van den Berg MJ, Sofat R, Nitsch D, Charakida M, Haiyee B, de Groot E, MacAllister RJ, Kuijpers TW, Deanfield JE. (2010) Role of NADPH oxidase in endothelial ischemia/reperfusion injury in humans. *Circulation*, 121: 2310-6.

46. Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR. (1997) Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke*, 28: 2252-8.

47. Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhofer S, Radermacher KA, Janssen B, Gorchach A, Schmidt HH. (2012) NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med (Berl)*, 90: 1391-406.

48. Geiszt M. (2006) NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res*, 71: 289-99.

49. Light DR, Walsh C, O'Callaghan AM, Goetzl EJ, Tauber AI. (1981) Characteristics of the cofactor requirements for the superoxide-generating NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemistry*, 20: 1468-76.

50. Bedard K, Krause KH. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87: 245-313.

51. Quinn MT, Gauss KA. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*, 76: 760-81.

52. Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*, 278: 3510-3.

53. Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. (2003) Proteins homologous to



p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem*, 278: 20006-12.

54. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*, 279: 46065-72.

55. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev*, 18: 486-91.

56. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. (2015) NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*, 12: 5-23.

57. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. (2000) Identification of *renox*, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 8010-4.

58. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. (2009) NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*, 15: 1077-81.

59. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, Krause KH. (2001) A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*, 276: 37594-601.

60. Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, Cox JA. (2004) Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem*, 279: 18583-91.

61. Donko A, Morand S, Korzeniowska A, Boudreau HE, Zana M, Hunyady L, Geiszt M, Leto TL. (2014) Hypothyroidism-associated missense mutation impairs NADPH oxidase activity and intracellular trafficking of Duox2. *Free Radic Biol Med*, 73: 190-200.

62. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. (2003) Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*, 17: 1502-4.

63. Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC. (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem*, 276: 31105-12.

64. Yu L, Quinn MT, Cross AR, Dinauer MC. (1998) Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 7993-8.
65. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol*, 78: 1025-42.
66. Lambeth JD. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4: 181-9.
67. Ponting CP. (1996) Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci*, 5: 2353-7.
68. Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM, Dinauer MC. (2009) A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, 114: 3309-15.
69. Suh CI, Stull ND, Li XJ, Tian W, Price MO, Grinstein S, Yaffe MB, Atkinson S, Dinauer MC. (2006) The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during FcγRIIA receptor-induced phagocytosis. *J Exp Med*, 203: 1915-25.
70. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*, 353: 668-70.
71. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*, 254: 1512-5.
72. Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, Gonzalez-Aller C, Hiester A, deBoer M, Harbeck RJ, Oyer R, Johnson GL, Roos D. (2000) Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4654-9.
73. Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J*, 298 Pt 3:

585-91.

74. Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. (1993) Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem*, 268: 20983-7.

75. Dusi S, Donini M, Rossi F. (1995) Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *Biochem J*, 308 ( Pt 3): 991-4.

76. Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M, Lambeth JD. (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*, 272: 18834-41.

77. Diebold BA, Bokoch GM. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*, 2: 211-5.

78. Moskwa P, Dagher MC, Pacllet MH, Morel F, Ligeti E. (2002) Participation of Rac GTPase activating proteins in the deactivation of the phagocytic NADPH oxidase. *Biochemistry*, 41: 10710-6.

79. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*, 76: 208-26.

80. Levay M, Settleman J, Ligeti E. (2009) Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry*, 48: 8615-23.

81. Moskwa P, Pacllet MH, Dagher MC, Ligeti E. (2005) Autoinhibition of p50 Rho GTPase-activating protein (GAP) is released by prenylated small GTPases. *J Biol Chem*, 280: 6716-20.

82. Dana R, Leto TL, Malech HL, Levy R. (1998) Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 273: 441-5.

83. Shiose A, Sumimoto H. (2000) Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 275: 13793-801.

84. Swain SD, Helgerson SL, Davis AR, Nelson LK, Quinn MT. (1997) Analysis of activation-induced conformational changes in p47phox using tryptophan fluorescence

spectroscopy. *J Biol Chem*, 272: 29502-10.

85. Rubinek T, Levy R. (1993) Arachidonic acid increases the activity of the assembled NADPH oxidase in cytoplasmic membranes and endosomes. *Biochim Biophys Acta*, 1176: 51-8.

86. Dana R, Malech HL, Levy R. (1994) The requirement for phospholipase A2 for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J*, 297 ( Pt 1): 217-23.

87. Shmelzer Z, Karter M, Eisenstein M, Leto TL, Hadad N, Ben-Menahem D, Gitler D, Banani S, Wolach B, Rotem M, Levy R. (2008) Cytosolic phospholipase A2alpha is targeted to the p47phox-PX domain of the assembled NADPH oxidase via a novel binding site in its C2 domain. *J Biol Chem*, 283: 31898-908.

88. Marodi L, Kaposzta R, Toth J, Laszlo A. (1995) Impaired microbicidal capacity of mononuclear phagocytes from patients with type I Gaucher disease: partial correction by enzyme replacement therapy. *Blood*, 86: 4645-9.

89. Moskwa P, Palicz A, Paclet MH, Dagher MC, Erdos M, Marodi L, Ligeti E. (2004) Glucocerebroside inhibits NADPH oxidase activation in cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, 1688: 197-203.

90. Salomon RG. (2012) Structural identification and cardiovascular activities of oxidized phospholipids. *Circ Res*, 111: 930-46.

91. Leitinger N. (2008) The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell Biochem*, 49: 325-50.

92. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, Gruber F, Binder BR, Leitinger N. (2002) Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature*, 419: 77-81.

93. Knapp S, Matt U, Leitinger N, van der Poll T. (2007) Oxidized phospholipids inhibit phagocytosis and impair outcome in gram-negative sepsis in vivo. *J Immunol*, 178: 993-1001.

94. Bluml S, Rosc B, Lorincz A, Seyerl M, Kirchberger S, Oskolkova O, Bochkov VN, Majdic O, Ligeti E, Stockl J. (2008) The oxidation state of phospholipids controls the oxidative burst in neutrophil granulocytes. *J Immunol*, 181: 4347-53.

95. Worthylake DK, Rossman KL, Sondek J. (2000) Crystal structure of Rac1 in

- complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, 408: 682-8.
96. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129: 865-77.
97. Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT, Stephens LR. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, 108: 809-21.
98. Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Uruno T, Sanematsu F, Nishikimi A, Cote JF, Sumimoto H, Fukui Y. (2014) DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. *J Immunol*, 193: 5660-7.
99. Price MO, Atkinson SJ, Knaus UG, Dinauer MC. (2002) Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COSphox cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. *J Biol Chem*, 277: 19220-8.
100. Pick E. (2014) Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases*, 5: e27952.
101. Nassar N, Hoffman GR, Manor D, Clardy JC, Cerione RA. (1998) Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat Struct Biol*, 5: 1047-52.
102. Csepanyi-Komi R, Safar D, Grosz V, Tarjan ZL, Ligeti E. (2013) In silico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins. *Small GTPases*, 4: 90-101.
103. Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. (2001) Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J*, 355: 851-8.
104. Csepanyi-Komi R, Levay M, Ligeti E. (2012) Small G proteins and their regulators in cellular signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 353: 10-20.
105. Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, et al. (1995) Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell*, 80: 719-28.
106. Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. (1993)

Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*, 4: 1217-23.

107. Wolf J, Dagher MC, Fuchs A, Geiszt M, Ligeti E. (1996) In vitro activation of the NADPH oxidase by fluoride. Possible involvement of a factor activating GTP hydrolysis on Rac (Rac-GAP). *Eur J Biochem*, 239: 369-75.

108. Szaszi K, Korda A, Wolf J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. (1999) Possible role of RAC-GTPase-activating protein in the termination of superoxide production in phagocytic cells. *Free Radic Biol Med*, 27: 764-72.

109. Mittal R, Ahmadian MR, Goody RS, Wittinghofer A. (1996) Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science*, 273: 115-7.

110. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*, 99: 67-86.

111. Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A. (1994) Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem*, 269: 1137-42.

112. Sirokmany G, Szidonya L, Kaldi K, Gaborik Z, Ligeti E, Geiszt M. (2006) Sec14 homology domain targets p50RhoGAP to endosomes and provides a link between Rab and Rho GTPases. *J Biol Chem*, 281: 6096-105.

113. Wang L, Yang L, Filippi MD, Williams DA, Zheng Y. (2006) Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood*, 107: 98-105.

114. Wang L, Yang L, Burns K, Kuan CY, Zheng Y. (2005) Cdc42GAP regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated apoptosis and cell number during mammalian perinatal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 13484-9.

115. Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. (1992) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature*, 359: 153-4.

116. Dusi S, Donini M, Wientjes F, Rossi F. (1996) Translocation of p19rho guanosine triphosphatase-activating protein from cytosol to the membrane in human neutrophils stimulated with different agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 859-62.

117. Nemeth T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovacs M, Kertesz Z,

- Walzog B, Settleman J, Mocsai A. (2010) Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol*, 185: 3064-75.
118. Heisterkamp N, Groffen J. (1991) Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol Pathol*, 5: 1-10.
119. Chuang TH, Xu X, Kaartinen V, Heisterkamp N, Groffen J, Bokoch GM. (1995) Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10282-6.
120. Cho YJ, Cunnick JM, Yi SJ, Kaartinen V, Groffen J, Heisterkamp N. (2007) Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages. *Mol Cell Biol*, 27: 899-911.
121. Gould SJ, Raposo G. (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2.
122. Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13: 269-88.
123. Thery C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9: 581-93.
124. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2: 569-79.
125. Raposo G, Stoorvogel W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200: 373-83.
126. Bastida E, Ordinas A, Escolar G, Jamieson GA. (1984) Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. *Blood*, 64: 177-84.
127. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262: 9412-20.
128. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183: 1161-72.
129. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from

tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10: 619-24.

130. Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, Falus A, Gay S. (2014) Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 10: 356-64.

131. Batagov AO, Kurochkin IV. (2013) Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*, 8: 12.

132. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L. (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, 14: 319.

133. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10: 1470-6.

134. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9: 654-9.

135. S ELA, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013) Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 12: 347-57.

136. Nawaz M, Camussi G, Valadi H, Nazarenko I, Ekstrom K, Wang X, Principe S, Shah N, Ashraf NM, Fatima F, Neder L, Kislinger T. (2014) The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol*, 11: 688-701.

137. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3: Unit 3 22.

138. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68: 2667-88.

139. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*, 64: 676-705.

140. Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA,



- Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzas EI. (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 117: e39-48.
141. Mesri M, Altieri DC. (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, 161: 4382-7.
142. Mesri M, Altieri DC. (1999) Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 274: 23111-8.
143. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. (2003) Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*, 285: 243-57.
144. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. (2008) Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 180: 817-24.
145. Eken C, Martin PJ, Sadallah S, Treves S, Schaller M, Schifferli JA. (2010) Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *J Biol Chem*, 285: 39914-21.
146. Eken C, Sadallah S, Martin PJ, Treves S, Schifferli JA. (2013) Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 218: 382-92.
147. Gasser O, Schifferli JA. (2004) Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*, 104: 2543-8.
148. Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. (1999) Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol*, 163: 4564-73.
149. Duarte TA, Noronha-Dutra AA, Nery JS, Ribeiro SB, Pitanga TN, Lapa ESJR, Arruda S, Boechat N. (2012) Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. *Tuberculosis (Edinb)*, 92: 218-25.
150. Dalli J, Serhan CN. (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, 120: e60-72.

151. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 95: 930-5.
152. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, Zimmerman GA, McIntyre TM. (2003) Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem*, 278: 33161-8.
153. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF. (2008) Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 112: 2327-35.
154. Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-8.
155. Lacy P. (2013) A new way of trapping bugs: neutrophil microvesicles. *Blood*, 121: 420-1.
156. Newman SL, Henson JE, Henson PM. (1982) Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*, 156: 430-42.
157. Wright HL, Chikura B, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW. (2011) Changes in expression of membrane TNF, NF- $\kappa$ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann Rheum Dis*, 70: 537-43.
158. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Amir-Moazami O, Gausson-Dorey V, Moura IC, Lecomte MC, Benhamou M, Witko-Sarsat V. (2007) Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood*, 110: 4086-95.
159. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. (1999) Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis*, 58: 309-14.
160. Kennedy AD, DeLeo FR. (2009) Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res*, 43: 25-61.

161. Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, Giebel B. (2011) Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 87: 146-50.
162. van der Pol E, Coumans FA, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R. (2014) Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost*, 12: 1182-92.
163. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. (2012) Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost*, 10: 437-46.
164. Artoni A, Merati G, Padovan L, Scalabrino E, Chantarangkul V, Tripodi A. (2012) Residual platelets are the main determinants of microparticles count in frozen-thawed plasma. *Thromb Res*, 130: 561-2.
165. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. (2011) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost*, 105: 396-408.
166. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. (2012) Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods*, 375: 207-14.
167. van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R. (2013) Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1: 36-45.
168. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Thery C. (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3: 26913.
169. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2.
170. Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E. (2004) Dual role of phagocytic

NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*, 104: 2947-53.

171. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-54.

172. Ligeti E, Doussiere J, Vignais PV. (1988) Activation of the O<sub>2</sub>(-)-generating oxidase in plasma membrane from bovine polymorphonuclear neutrophils by arachidonic acid, a cytosolic factor of protein nature, and nonhydrolyzable analogues of GTP. *Biochemistry*, 27: 193-200.

173. Self AJ, Hall A. (1995) Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol*, 256: 67-76.

174. Chandler WL, Yeung W, Tait JF. (2011) A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost*, 9: 1216-24.

175. van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost*, 10: 919-30.

176. Chang Y-C, Yang C-Y, Sun R-L, Cheng Y-F, Kao W-C, Yang P-C. (2013) Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep*, 3.

177. Tew DG. (1993) Inhibition of cytochrome P450 reductase by the diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications. *Biochemistry*, 32: 10209-15.

178. O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J*, 290 ( Pt 1): 41-9.

179. Chakraborty S, Massey V. (2002) Reaction of reduced flavins and flavoproteins with diphenyliodonium chloride. *J Biol Chem*, 277: 41507-16.

180. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA. (1997) Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem*, 272: 13597-607.

181. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184: 39-51.
182. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 243: 167-90.
183. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*, 4: 1265-72.
184. Jaffe AB, Hall A, Schmidt A. (2005) Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr Biol*, 15: 405-12.
185. Connolly BA, Rice J, Feig LA, Buchsbaum RJ. (2005) Tiam1-IRS<sub>p53</sub> complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Mol Cell Biol*, 25: 4602-14.
186. Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell*, 6: 899-907.
187. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ, Gamblin SJ. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, 389: 758-62.
188. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, Gamblin SJ, Smerdon SJ. (1997) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, 388: 693-7.
189. Ligeti E, Welti S, Scheffzek K. (2012) Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev*, 92: 237-72.
190. Timar CI, Lorincz AM, Ligeti E. (2013) Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch*, 465: 1521-33.
191. Erdei A, Sármay G, Prechl J. *Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest*, 2012: 30-153.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények időrendben:

- I. Bluml S, Rosc B, Lorincz A, Seyerl M, Kirchberger S, Oskolkova O, Bochkov VN, Majdic O, Ligeti E, Stockl J. (2008) The oxidation state of phospholipids controls the oxidative burst in neutrophil granulocytes. *J Immunol*, 181: 4347-53.
- II. Timar CI\*, Lorincz AM\*, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-8. (*\*megosztott elsőszerzős közlemény*)
- III. Lorincz AM, Szarvas G, Smith SM, Ligeti E. (2014) Role of Rac GTPase activating proteins in regulation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Free Radic Biol Med*, 68: 65-71.
- IV. Lorincz AM, Timar CI, Marosvari KA, Veres DS, Otrókocsi L, Kittel A, Ligeti E. (2014) Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*, 3: 25465.

Az értekezés témájához kapcsolódó áttekintő közlemény:

- V. Timar CI, Lorincz AM, Ligeti E. (2013) Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch*, 465: 1521-33.

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemény:

Wuertz CM\*, Lorincz A\*, Vettel C, Thomas MA, Wieland T, Lutz S. (2010) p63RhoGEF--a key mediator of angiotensin II-dependent signaling and processes in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*, 24: 4865-76. (*\*megosztott elsőszerzős közlemény*)

## 12 A társszerzők közötti munkamegosztás

A doktori értekezésemben bemutatott kutatási eredmények létrejöttében több kutatótársam is segítségemre volt. Az „Eredmények” fejezetben bemutatott kísérletek saját, vagy a felügyeletem mellett dolgozó TDK hallgatókkal közös munka során születtek és nem szerepelnek más PhD értekezés eredményei között. A NADPH-oxidáz működését befolyásoló GAP-ok vizsgálatában Lázár Enikő Marina és Szarvas Gábor Zsombor voltak segítségemre mint TDK hallgatók. Az EV-k megfelelő tárolási körülményének keresésében Marosvári Krisztina Anna TDK hallgató segített. A neutrofilek *in vitro* spontán halála közben képződött EV jellemzésén Maria Schütte TDK hallgatóval dolgoztunk közösen.

Az opszonizált részecske kiváltotta és spontán keletkező EV-k szuperoxid-termelésének vizsgálatát dr. Timár Csaba Istvánnal közös projektünk keretében végeztem.

Az elektronmikroszkópos felvételek, a dinamikus fényszórási kísérletek, valamint a tömegspektrometriás vizsgálatok az adott módszert jól ismerő kutatótársak segítségével készültek, a módszerek leírásánál bemutatott megosztásban.

Susan M. E. Smith társszerzőnk kizárólagos munkája révén született kristályszerkezet-számításon alapuló modellezés eredményét az értekezés „Megbeszélés” fejezetében tárgyaltam.

A felhasznált rekombináns fehérjéket kifejező baktériumok elkészítőjét a módszerek leírásánál feltüntettem.

### **13 Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Ligeti Erzsébetnek, aki TDK-hallgató korom óta segíti, irányítja és figyelemmel kíséri munkámat. Személye, módszeressége és tudományos kíváncsisága nem pusztán a követendő kutatói példát jelenti számomra, hanem egyben megtestesíti azt a „Főnököt” is, aki mellett élvezet beletanulni a munka világába. Hálával tartozom dr. Patryk Moskwának és dr. Tímár Csabának a segítő szándékért és fáradhatatlan türelméért, amellyel bevezettek a pipettaforgatás alapjaiba. Külön köszönöm Dr. Spät András és Dr. Hunyady László professzor uraknak, hogy a magas szintű tudományos műhely biztosításával lehetővé tették és segítették munkámat. Köszönet illeti az Élettani Intézet minden munkatársát egy olyan inspiráló szakmai és mindennapi légkör megteremtéséért, amelyben öröm dolgozni.

Külön köszönet dr. Csépanyi-Kömi Rolandnak, aki számos módszer helyesebb használatára hívta fel a figyelmemet, állandó partner volt a kísérleti eredmények értékelésében, és nem sajnálta az időt ezen értekezés figyelmes, kritikus átnézésétől.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Thomas Wielandnak és dr. Susanne Lutznak, akik befogadtak mannheimi laborjukba és kitárták előttem a világot.

Hálával tartozom továbbá korábbi és jelenlegi TDK hallgatóinknak: dr. Lázár Enikőnek, dr. Szarvas Gábornak, dr. Marosvári Krisztinának, Maria Schüttének, Szombath Dávidnak és Szeifert Viktóriának kitartó lelkesedésükért, kritikus hozzáállásukért és szorgalmas munkájukért. Köszönöm a munkánkat lehetővé tevő fáradozásukat a volt és jelenlegi asszisztenseinknek, Fedina Editnek, Horváthné Seres Erzsébetnek, Tóth-Kun Reginának és Rébb Anikónak. Köszönöm továbbá a laborban kutató valamennyi munkatársamnak a munkámhoz nyújtott segítséget.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a határtalan türelmet, megértést, támogatást és szeretetet feleségemnek, Annának, valamint fiamnak, Marcinak, akik nélkül sokkal kevesebb lennék. Köszönöm a szerető támogatást, türelmet és iránymutatást Szüleimnek, Bátyámnak, családom minden tagjának és barátaimnak.



## 14 Függelék

### 1. függelék: A neutrofil granulociták legfontosabb receptorai, az őket aktiváló ligandok és az általuk jellemzően kiváltott sejtválaszok (forrás: [7, 191]).

Receptorcsalád	Receptoralsalád	Ligandum	Kiváltott sejtválasz
G-fehérje kapcsolt receptorok	Formilpeptid-receptorok	fMLF	<b>ROS-termelés</b> Degranuláció Kemotaxis
	Klasszikus kemoattraktáns receptorok	LTB <sub>4</sub> PAF C5a	
	Kemokinreceptorok	IL-8, és számos más CXCL és CCL	
Fc-receptorok	ITAM kapcsolt Fc-receptorok	IgG, IgA, IgE	<b>ROS-termelés</b> Fagocitózis Degranuláció Gyulladásmediátor-termelés
	ITIM kapcsolt Fc-receptor	IgG	Aktiválódás gátlása
Adhéziós receptorok	Szelektinek és szelektin ligandok	PSGL-1, P- és E-szelektin	Kapcsolat a véredény falához (gördülés)
	Integrinek	ICAM-ek, fibronectin, iC3b, VCAM-1	<b>ROS-termelés</b> Kapcsolat a véredény falához (kitapadás), Fagocitózis Degranuláció Gyulladásmediátor-termelés
Citokinreceptorok	1-es típusú citokinreceptorok	IL-4, IL-6, IL-12, G-CSF, GM-CSF	Sejtérés Túlélési jel Előaktiváció
	2-es típusú citokinreceptorok	IFN-ok, IL-10	<b>ROS-termelés</b> Túlélési jel Gyulladásmediátor-termelés gátlása
	IL-1 receptorcsalád	IL-1, IL-18	<b>ROS-termelés</b> Túlélési jel Gyulladásmediátor-termelés
	TNF receptorcsalád	TNF $\alpha$ , FasL	<b>ROS-termelés</b> előaktiváció Gyulladásmediátor-termelés Programozott sejthalál
Mintázatfelismerő receptorok	Toll-szerű receptorok	Peptidoglikán, LPS, flagellin, lipoteikolsav	Túlélési jel Előaktiváció Gyulladásmediátor-termelés
	C-típusú lektinek	Glukánok, patogénekre jellemző szénhidrátok	<b>ROS-termelés</b> Fagocitózis Degranuláció
	NOD-szerű receptorok	Peptidoglikán	Gyulladásmediátor-termelés
	RIG-szerű receptorok	Virális RNS	Gyulladásmediátor-termelés

**2. függelék: A neutrofil granulocita granulumjainak jellemző összetevői (forrás:[11-13]).**

<b>Azurofil granulumok</b>	<b>Specifikus granulumok</b>	<b>Zselatináz granulumok</b>	<b>Szekretoros granulumok</b>
Neutrofil elasztáz	CR3	CR3	CR3
Proteináz 3	NOX2	NOX2	NOX2
Katepszin G	TNFR	MMP25	MMP25
Lizozim	Kollagenáz	TNFR	Számos jelátviteli
MPO	Zselatináz	Zselatináz	receptor
BPI	Lizozim	Lizozim	
Defenzinek	Katelicidinek	$\beta$ -2 mikroglobulin	
Azurocidin	NGAL		
Szialidáz	Alfa1-anti tripszin		