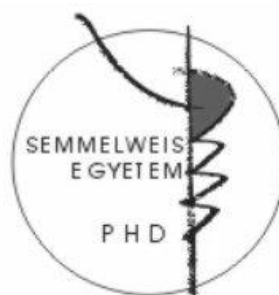


# A T-limfociták aktivációjának és egyes mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata

Doktori értekezés

**Molnár-Érsek Barbara**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy György PhD, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Vásárhelyi Barna DSc, egyetemi tanár

Dr. Kovács László PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prohászka Zoltán DSc, egyetemi tanár

Dr. Bajtai Zsuzsa PhD, egyetemi docens

Budapest  
2012

# Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>11</b>
1.1 Jelátviteli útvonalak áttekintése .....	12
1.1.1 A T-limfociták.....	12
1.1.1.1 A T-sejt receptor.....	13
1.1.1.2 A T-sejt receptor komplex által közvetített jelátviteli folyamatok..	13
1.1.1.2.1 A CD3 $\zeta$ -lánc .....	17
1.1.1.2.2 Az Src-like adaptor fehérje.....	18
1.1.1.3 Kostimuláció és adhézións molekulák szerepe T-sejt aktivációban .	19
1.1.1.4 Az aktivációt gátló mechanizmusok.....	20
1.1.2 Hízósejtek és jelátviteli mechanizmusaik .....	21
1.2 A mikroRNS-ek által közvetített poszttranszkripcionális szabályozás .....	23
1.2.1 A későbbiekben vizsgált mikroRNS-ek jellemzése .....	25
1.3 A TNF $\alpha$ és jelátvitele. ....	27
1.4 A rheumatoid arthritis .....	30
1.4.1 A TNF szerepe RA-ban.....	31
1.4.2 A T-sejtek szerepe RA-ban .....	32
1.4.3 A hízósejtek szerepe RA-ban .....	33
1.4.4 A mikroRNS-ek szerepe RA-ban.....	33
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>37</b>
3.1 Sejtkultúrák.....	37
3.1.1 Jurkat humán T-sejtes limfóma fenntartása .....	37
3.1.2 Perifériás mononukleáris sejtek izolálása, fenntartása.....	37
3.1.3 CD4+ T-limfociták szeparálása .....	37
3.1.4 Humán hízósejtek differenciáltatása és fenntartása .....	38
3.2 Humán minták.....	39
3.2.1 Rheumatoid arthritises betegek .....	39
3.2.2 Humán köldökzsínórvér minták.....	40
3.3 Sejtek aktiválása, kezelése.....	40

3.3.1 T-limfociták.....	40
3.3.2 Hízósejtek.....	42
3.4 Western blot.....	43
3.5 Áramlási citometria.....	44
3.5.1 Életképesség meghatározása .....	45
3.5.2 Intracelluláris Ca-szint mérése.....	45
3.5.3 Sejt proliferáció mérése.....	45
3.6 Transzfekció.....	46
3.6.1 Kis interferáló RNS (siRNS).....	46
3.6.2 DNS Vektorok.....	47
3.7 Konfokális mikroszkópia.....	48
3.7.1 A CD3 $\zeta$ -lánc lokalizációjának és mennyiségének meghatározása .....	48
3.7.2 A CD3 $\zeta$ -lánc és a SLAP kolokalizációjának meghatározása.....	49
3.7.3 A CD3 $\zeta$ és a lizoszóma kolokalizációjának vizsgálata .....	49
3.8 Kvantitatív valós idejű RT PCR .....	51
3.8.1 mRNA expresszió mérése.....	51
3.8.2 MikroRNS expresszió mérése.....	51
3.9 MikroRNS target predikció .....	52
3.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	52
3.11 Statisztika.....	53
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>54</b>
4.1 A CD3 $\zeta$ -lánc szabályozása T-limfocitákban .....	54
4.1.1 A TNF szabályozza a CD3 $\zeta$ -lánc expresszióját .....	54
4.1.1.1 A TNF hatása a $\zeta$ -lánc mennyiségére.....	54
4.1.1.2 A TNF $\zeta$ -láncra gyakorolt hatásának időbeli vizsgálata.....	55
4.1.1.3 A CD3 $\zeta$ sejtfelszíni csökkenésének és internalizációjának vizsgálata 56	
4.1.1.4 Az intracellulárisan elhelyezkedő $\zeta$ -láncok vizsgálata.....	58
4.1.2 A TNF nem befolyásolja a CD3 komplex egyéb láncainak mennyiségét 60	
4.1.3 A TNF befolyásolja a sejtek aktiválhatóságát, de nincs hatással proliferációs kapacitásukra.....	61
4.1.3.1 Az IL-2 termelés mérése .....	61
4.1.3.2 A Ca <sup>2+</sup> válasz vizsgálata.....	62

4.1.3.3 A sejt proliferáció vizsgálata.....	64
4.1.4 Az mRNA expresszió változása és az NF- $\kappa$ B jelpálya nem játszik szerepet a TNF $\zeta$ -lánc csökkentő hatásában.....	65
4.1.4.1 Az mRNA expresszió vizsgálata.....	65
4.1.4.2 Az NF- $\kappa$ B szerepének vizsgálata .....	66
4.1.5 A TNF a proteaszómális degradáció elősegítésével csökkenti a CD3 $\zeta$ -láncot.....	67
4.1.5.1 Fehérje lebontási folyamatok gátlásának vizsgálata .....	67
4.1.5.2 A CD3 $\zeta$ lizoszómális lokalizációjának vizsgálata.....	68
4.1.6 Az src-like adaptor protein (SLAP) felelős a TNF indukált $\zeta$ -lánc csökkenésért .....	71
4.1.6.1 A SLAP expressziójának vizsgálata TNF hatására .....	72
4.1.6.2 A SLAP-CD3 $\zeta$ kolokalizációjának vizsgálata.....	73
4.1.6.3 A SLAP csendesítése siRNS-sel .....	74
4.1.7 A SLAP mennyisége emelkedett RA-s betegekben.....	75
4.1.7.1 A SLAP expressziója emelkedett RA-s betegek T-limfocitáiban...	75
4.1.7.2 A TNF hatásának vizsgálata RA-s betegekben .....	76
4.1.8 A TNF elősegíti a $\zeta$ -láncok foszforilációját.....	77
4.1.9 A SLAP szabályozásának vizsgálata .....	78
4.2 MikroRNS-ek szerepének vizsgálata sejtaktivációs mechanizmusokban .....	81
4.2.1 A TNF hatása a mikroRNS expresszióra T-limfocitákban .....	81
4.2.1.1 A mir-155 vizsgálata .....	81
4.2.1.2 A mir-181a vizsgálata .....	85
4.2.1.3 A mir-146a vizsgálata .....	86
4.2.2 A mir-132 expressziója megnövekszik humán hízósejt aktivációban ....	87
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>89</b>
5.1 A TNF T-sejt aktivációra kifejtett hatása .....	90
5.2 MikroRNS-ek szerepe sejtek aktivációjában .....	94
<b>6. Következtetések .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>100</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>9. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>102</b>

<b>10. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>128</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>129</b>

## Rövidítések jegyzéke

ACK	Ammónium-klorid-kálium oldat
ACPA	Anti-citrullinated Protein Antibodies (anti-citrullinált fehérje ellenes antitestek)
ADAP	Adhesion and Degranulation-promoting Adapter Protein (adhéziót és degranulációt elősegítő fehérje)
AGO	Argonauta fehérje
Akt-kináz	nem rövidítés, megegyezik protein kináz B-vel
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1 (apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1)
APC	Antigen Presenting Cell (antigén prezentáló sejt)
ATCC	American Type Culture Collection
Bak	Bcl-2-Antagonist/Killer 1
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
c-Cbl	cellular-Casitas b-lineage lymphoma
Cbl-b	Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene b
CCL	Chemokine Ligand (kemokin ligand)
CD*	Cluster of Differentiation (differenciálódási klaszter)
CDK	Ciklin Dependens Kináz
CEBP	CCAAT-enhancer-binding Proteins
c-Fos	nem rövidítés, transzkripció faktor
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (karboxifluoreszcein szukcinimidil-észter)
cGMP	cyclic Guanosine Monophosphate (ciklikus guanozin-monofoszfát)
CI	Colocalization Index (ko-lokalizációs index)
c-Jun	nem rövidítés, transzkripció faktor
cSMAC	Central Supramolecular Activation Cluster (centrális szupramolekuláris aktivációs klaszter)
Csk	Cellular-src tyrosine kinase (c-src tirozin kináz)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4 (citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4)

CTX	Cholera Toxin (kolera toxin)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand (kemokin (C-X-C motívumot tartalmazó) ligand)
CXCR	C-X-C Chemokine Receptor (C-X-C motívumot tartalmazó kemokin receptor)
DAG	Diacil-glicerol
DD	Death Domain (halál domén)
DMARD	Disease-modifying Antirheumatic Drug (betegségfolyást befolyásoló antireumatikus szer)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
DP	dupla pozitív
DUSP	Dual Specificity Phosphatase (kettős specificitású foszfatáz)
E2F1	nem rövidítés, transzkripció faktor
ECL	Enhanced Chemiluminescence (erősített kemilumineszcencia)
EDTA	Etilén-Diamin-Tetraecetsav
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (etilén-glikol tetraecetsav)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Elk1	E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1
ER	Endoplazmatikus Retikulum
Erk1,2	Extracellular Signal-regulated Kinase (extracelluláris jel által regulált kináz)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (áramlási citometria)
FBS	Foetal Bovine Serum (embrionális borjúsavó)
FcεRI	Fc epszilon receptor I
FADD	Fas-associated Death Domain (Fas-asszociált halál domén fehérje)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (fluoreszcein-izotiocianát)
FoxP3	Forkhead box Protein 3
Fyn	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase (proto-onkogén tirozin protein kináz)
<i>g</i>	gravitáció, nehézségi erő

Gads	GRB2-related Adapter Downstream of Shc (Src homology 2 domain-containing)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz)
GFP	Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor
GO	Gene Ontology
GRB2	Growth Factor Receptor-bound protein 2 (növekedési faktor receptor által kötött fehérje 2)
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like Growth Factor (heparin-kötő EGF-szerű növekedési faktor)
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution (Hank's-féle pufferelt sóoldat)
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hipoxantin-guanin foszforibozil transzferáz 1)
HLA	Humán Leukocita Antigén
HPK1	Hematopoietic Progenitor Kinase 1 (hematopoetikus progenitor kináz)
HRP	Horseradish Peroxidase (tormaperoxidáz)
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (intracelluláris adhéziós molekula 1)
ICOS	Inducible T-cell COStimulator (indukálható T-sejt kostimulátor)
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL-*	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
I $\kappa$ B $\zeta$	Inhibítor $\kappa$ B $\zeta$
I $\kappa$ K	Inhibitor $\kappa$ B kináz
IP3	Inozitol 1,4,5-triszfoszfát
IRAK-1	Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 1 (interleukin-1 receptor asszociált kináz 1)
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
Itk	IL-2-induced tyrosine kinase (IL-2 által indukált tirozin kináz)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminális kináz)
KIT	nem rövidítés, gén elnevezés



KO	Knock-out (génkiütött)
LAMP1	Lysosome-Associated Membrane Protein 1 (lizoszóma-asszociált membrán fehérje 1)
LAT	Linker of Activated T cells
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (limfocita specifikus protein tirozin kináz)
LFA1, 3	Leukocyte Function Associated antigen 1 (leukocita funkcionális antigén 1, 3)
Lyp	Lymphoid tyrosine phosphatase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1 (monocita kemotaktikus protein 1)
MHC	Major Histocompatibility Complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
miRNS	mikroRNS
MMP	Mátrix Metalloproteináz
NBD	NEMO-Binding Domain
Nck	Noncatalytic region of tyrosine kinase
NEMO	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NH <sub>4</sub> Cl	Ammónium-klorid
NO	Nitric Oxide (nitrogén-monoxid)
NOS	Nitric Oxide Synthase (nitrogén-monoxid szintáz)
NP-40	Nonidet P-40 (octyl phenoxy polyethoxy ethanol)
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting
MAPK	Mitogén-asszociált Protein Kináz
MMP	Matrix Metalloproteinase (mátrix metalloproteináz)
mRNS	messenger RNS (hírvivő RNS)
PADI4	Peptidyl Arginine Deiminase 4 (peptidil-arginin deimináz 4)
PAF	Platelet-activating Factor (trombocita aktiváló faktor)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (perifériás vér-eredetű mononukleáris sejt)
PBS	Phosphate Buffered Saline (foszfát-pufferelt sóoldat)
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz-lánreakció)

PE	Phycoerythrin (fikoeritrin)
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein (peridinin-klorofill fehérje)
PHA-L	Leukoagglutinin
PI	propidium-jodid
PI3K	foszfo-inozitol 3 kináz
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha (foszfatidil-inozitol 3-kináz regulációs alegységének $\alpha$ -lánca)
PIP2	foszfatidil-inozitol 4, 5 biszfoszfát
PKA	Protein-kináz A
PKC $\theta$	Protein-kináz C $\theta$
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2 (foszfolipáz A2)
PRR	Proline-riched Region (prolinban gazdag régió)
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22
RA	Rheumatoid Arthritis (reumatoid artritisz)
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa$ B
RANTES	Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted
RIP	Receptor-inetacting Kinase (receptor-interakciós kináz)
RISC	RNA-induced silencing complex (RNS-indukált csendesítő komplex)
RNS	ribonukleinsav
ROI	Region Of Interest (figyelembe vett régió)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-ban Moore és mtsai által kifejlesztett tápfolyadék
RT	reverz transzkripció
SCF	Stem Cell Factor (össejt faktor)
SH2, 3	Src Homology domain 2, 3 (src homológia domén 2, 3)
SHIP-1	SH2 domain containing Inositol-5-phosphatase
SHP-1	SH2 domain-containing Phosphatase-1
siRNS	small interfering RNS (kis interferáló RNS)
SLAP	Src-Like Adaptor Protein (src-szerű adaptor fehérje)
SLE	Szisztémás Lupusz Eritematosus
SLP-76	SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa
src	sarcoma (szarkóma)

STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBS	Tris-Buffered Saline (tris-pufferelt sóoldat)
TACE	TNF Alpha Converting Enzyme (TNF $\alpha$ konvertáló enzim)
Tc	Citotoxikus T-sejt
TCR	T cell receptor (T-sejt receptor)
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Th	Helper T-sejt (segítő T-sejt)
TIMM9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit 9
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrózis Faktor $\alpha$
TNFR1, -2	Tumor Nekrózis Faktor Receptor 1, -2
TRAF	TNF receptor-associated factor (TNF receptor-asszociált faktor)
TRADD	TNFRSF1A-associated via Death Domain
Treg	Regulatórikus T-sejt
UTR	Untranslated Region (nem transzlálódó régió)
Vav1	nem rövidítés, guanin nukleotid kicserélő faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZAP-70	$\zeta$ -Associated Protein 70 ( $\zeta$ -asszociált protein 70)

## 1. Bevezetés

Az immunrendszer szerteágazó feladatai közé tartozik a saját és nem saját antigének elkülönítése révén azonosított kórokozók eliminációja, a daganatok növekedésének megakadályozása és a saját struktúrák aktív védelme. A fertőzések elleni védelem első vonalát képezi a filogenetikailag ősbibb természetes immunrendszer, amelynek előnye a gyors válaszadás képessége, ugyanakkor nem specifikus módon reagál a patogénekre, és immunológiai memória kialakítására sem képes. Az adaptív immunrendszer aktivációja jóllehet időigényesebb, de specifikus egy adott kórokozóra, és hosszú életű memória sejtek képzése révén, immunológiai memóriával rendelkezik. A természetes immunitás sejtjes elemeihez tartoznak a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, hízósejtek, NK sejtek és a granulociták. A T- és B-limfociták az adaptív immunválasz sejtjei.

Az immunrendszer fiziológias működését az immunsejtek jelátviteli utakon keresztül szabályozott, külső szignálokra adott válasza és e folyamatok összehangolt együttműködése biztosítja. Ha az immunrendszer összetett hálózatának valamely eleme, vagy ezek egy csoportja, működésbeli eltéréshez vezető változást szenved el, az kóros folyamatok kialakulását eredményezheti, ami végső soron betegségek kialakulásában manifesztálódhat. Ezen működésbeli változások között első helyen szerepel a jelátviteli útvonalak megváltozása, amelyek meghatározzák a sejtek aktuális állapotát és működését. A sejtek felszínén a különböző ligandokat kötő receptorok, az intracellulárisan rendelkezésre álló jelátvivő fehérjék aránya és mennyisége bonyolult szabályozási rendszerek közreműködésével kerül kialakításra. A transzkripciós faktorok, az újonnan leírt mikroRNS-ek és a sejtek környezetében lévő citokinek egy-egy meghatározó, kombinatorikus szabályozási pontjait képviselik a fent említett folyamatoknak.

Az immunrendszer betegségei között megkülönböztethetünk alul,- illetve túlműködéssel járó kórképeket. Alulműködéssel járnak a veleszületett és szerzett immunhiányos állapotok, míg az immunrendszer egyes funkcióinak fokozott működésével jellemezhető többek között számos gyulladással járó autoimmun betegség vagy az asztma. Az autoimmun betegségek kialakulásában komplex mechanizmusok játszanak szerepet, amelyekben nem tehető egyértelműen felelőssé egy adott sejtípus

vagy folyamat sem, és mind genetikai, mind környezeti faktorok alapvető szerepet játszanak kialakulásukban. Mégis, a betegséghez vezető folyamatokban kiemelhetőek bizonyos, kulcsszerepet betöltő jelátviteli útvonalak, amelyek jellemzőek a kóros válaszokra és kialakítják a betegség karakterét. Munkánk során néhány, az immunrendszer sejtjeinek szabályozásában alapvető szerepet játszó jelátviteli folyamatot vizsgáltunk.

## 1.1 Jelátviteli útvonalak áttekintése

A természetes és adaptív immunrendszer képviselői a rájuk specifikus kombinációban jellemző receptor hálózaton keresztül aktiválódnak, és az arra a receptorra specifikus jelátviteli útvonallal reagálnak. A természetes immunrendszer sejtjei egyrészt általánosan előforduló, a patogénekre jellemző struktúrákat ismernek fel, továbbá a már immunglobulin molekulákkal megjelölt kórokozók azonosítására is képesek Fc-receptoraikon keresztül. Az adaptív immunrendszerhez tartozó T- és B-sejtek antigén receptoruk segítségével különböztetik meg a saját és nem-saját struktúrákat. Az antigén receptorok egy adott molekuláris motívumot ismernek fel, amihez kapcsolódva a receptor sejten belüli szerkezeti eleme egy körülírt válaszprogram elindulását váltja ki.

### 1.1.1 A T-limfociták

A T-limfociták az adaptív immunrendszer sejtjeihez tartoznak, és nagy specificitással ismerik föl a fő hisztokompatibilitási komplexszel (MHC) együtt bemutatott epitópokat T-sejt receptorukon (TCR) keresztül. A TCR-ok összetétele alapján megkülönböztethetünk konvencionális  $\alpha\beta$ , illetve korlátozott specificitással rendelkező  $\gamma\delta$  T-sejteket. Az  $\alpha\beta$  TCR-rel rendelkező sejtek esetében funkcionális szempontból elkülönülnek az CD4 molekulát hordozó helper (segítő, Th) T-sejtek, és a CD8 koreceptort expresszáló citotoxikus (Tc) T-sejtek. Mindkét csoport tagjaiból kialakulhatnak limfoid és nem limfoid szövet-specifikus memória sejtek. A Th sejtek, az általuk termelt citokinek alapján további alcsoportokra oszthatóak, klasszikus felosztásban: Th1, Th2 és Th17 sejtekre, azonban legújabb publikációk szerint több

alcsoport is megkülönböztethető: Th3, TR1, Th9, Th22, Tfh (follikuláris helper T-sejt). A CD4<sup>+</sup> T-sejtek csoportjába tartoznak a FoxP3<sup>+</sup> regulatórikus T-limfociták is (Treg), melyek szuppresszív kapacitásukról ismertek, és szintén több képviselőjük ismert (1, 2).

#### *1.1.1.1 A T-sejt receptor*

A T-sejtek specificitását, vagyis azt a képességét, hogy bizonyos háromdimenziós molekuláris mintát képes felismerni, a T-sejt receptor biztosítja.

Az  $\alpha\beta$  T-sejtek esetében TCR komplex kialakításában az antigén felismerő  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncok működnek közre, amelyek diszulfid híddal kapcsolódnak egymáshoz, és hosszú extracelluláris, valamint rövid, jelátviteli molekulákat nem tartalmazó, intracelluláris doménnel rendelkeznek. TCR komplexről beszélünk, ha az  $\alpha\beta$ -láncokhoz hozzákapcsolódnak a CD3 molekula nem kovalensen összekapcsolt invariáns, heterodimert alkotó  $\gamma\epsilon$ -, és  $\delta\epsilon$ -láncai, és az egymással kovalensen kapcsolódó  $\zeta\zeta$ -láncok. Az újonnan szintetizálódott  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ -láncok, a  $\zeta\zeta$ -homodimerrel kapcsolódva kerülnek a sejtfelszínre (3, 4).

A megszentizálódott  $\alpha\beta\gamma\delta$ -láncok a szintézist követően az endoplazmatikus retikulumban állnak össze, majd a transz-Golgi hálózatban találkoznak a  $\zeta\zeta$ -dimerrel, és komplexet alkotva a sejt felszínére jutnak (5). A sejtfelszínre kerülő TCR mennyiségét az elérhető  $\zeta$ -láncok száma határozza meg, mivel ennek hiányában a többi lánc a transz-Golgi hálózatból lizoszómális lebontásra kerül (6). Az  $\alpha\beta\gamma\delta$ -láncok 85-95%-a a szintézist követő 4 órában lebontásra kerül, míg a  $\zeta$ -láncok az endoplazmatikus retikulumban (ER), illetve a Golgi-vezikulumokban maradnak (7), és 10-20 óras féléletidővel rendelkeznek (5). A teljesen összeállt TCR dinamikus expresszióval rendelkezik: állandó internalizáció, majd újra sejtfelszínre kerülés jellemzi, amely meghatározza a sejt aktuális aktiválhatósági állapotát (8). Irodalmi adatok alapján a  $\zeta$ -láncok önálló ciklizációs dinamikával rendelkeznek, és a többi lánctól függetlenül expresszálódhatnak, illetve internalizálódhatnak (9, 10).

#### *1.1.1.2 A T-sejt receptor komplex által közvetített jelátviteli folyamatok*

A T-sejtek aktiválódásának feltétele az antigén prezentáló sejtek (APC) MHC molekuláival asszociált antigén peptid kötődése a T-sejt receptor komplex  $\alpha\beta$  láncával,

valamint ugyanezen MHC molekula konzervatív, negatív töltésű szakaszának kötődése a T-sejten lévő CD4 vagy CD8 molekulával (11).

A TCR komplex a sejt felszínén nanoklaszterekbe rendeződve található, ahol az aktivációhoz szükséges molekulák egy csoportban helyezkednek el, míg az aktivációt gátló molekulák kizáródnak ebből (12). A specifikus és hosszantartó kapcsolat a T-sejtek és az antigén prezentáló sejtek között, azaz immunológiai szinapszis kialakulása, az adaptív immunválasz létrejöttének előfeltétele. A szinapszis kialakulásának első lépése a T-sejtek antigén receptora és a megfelelő MHC-antigénpeptid kapcsolódása, amely mikroklaszter képződéséhez és a jelátvivő molekulák összegyűjtéséhez vezet, másodpercek alatt kialakítva a szignalizómát (13). A mikroklaszter kialakulását követően, a kapcsolódási területen egy külső gyűrű alakul ki integrinek közvetítésével, amelynek közepén a már meglévő TCR mikroklaszterek összeolvadnak és centrális szupramolekuláris aktivációs klaszter (cSMAC) képződményt formálnak (14). Mivel a cSMAC-ban kevés foszforilációs esemény történik, azt feltételezik, hogy ez a központi régió éppen a korábban létrejött mikroklaszterek inaktivációjának helye, miközben az aktivációt jelentő foszforiláció inkább a periférián formálódó új mikroklaszterekre jellemző (15).

Az aktivációs folyamat első lépése az immunreceptor-asszociált aktivációs motívumon (ITAM) lévő tirozinok foszforilálódása a  $p56^{Lck}$  és a  $p59^{Fyn}$ , Src családba tartozó tirozin-kinázok által (16). Ezek a kinázok a CD4, illetve CD8 molekulákkal asszociáltan találhatók meg (17) és aktív-inaktív formájuk dinamikusan változik (18). Konvencionális nézet szerint a CD4 és CD8 molekulák MHC-hez való kötődése konformáció változást indukál az enzimen, amelynek hatására szabaddá válik az aktivációval asszociált tirozin-foszforilációs hely, majd a kináz transz-autofoszforilálódik (19). Legújabb kutatások azonban azt bizonyítják, hogy aktiválódásukat nem a TCR-MHC-CD4 kapcsolat során bekövetkező konformáció változás szabályozza, hanem a gátlásukért felelős tirozin defoszforilációjának mértékével áll kapcsolatban (20, 21), és a koreceptorok szerepe főként a kinázok TCR közelébe történő juttatása (22).

Az aktív  $p56^{Lck}$  többek között a CD3 láncait foszforilálja (23). A CD3  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - és  $\delta$ -láncai egy-egy ITAM motívumot tartalmaznak, míg  $\zeta$ -láncai egyenként hármat (24). A foszforilált ITAM-ok kapcsolódási felületet biztosítanak olyan további Src homológia

domén 2-vel (SH2) rendelkező molekuláknak, mint a Syk családba tartozó protein tirozin kináz, a  $\zeta$ -asszociált protein 70 (ZAP-70) (25). A ZAP-70 szintén a  $p56^{\text{Lck}}$  és a  $p59^{\text{Fyn}}$  kinázok segítségével foszforilálódik. Legfontosabb szubsztrátjai a membránkötött LAT és a citoplazmatikus adaptor fehérje, az SLP-76 (26).

A LAT kilenc tirozinon foszforilálódik és SH2 doménen át kapcsolódik hozzá a foszfolipáz  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), a foszfo-inozitol 3 kináz (PI3K) és két adaptor fehérje: a GRB2 és a Gads (27).

Az SLP-76 a Gads-on keresztül a foszforilált LAT-hoz kötődik, és három különböző doménjéhez további molekulák kapcsolódnak: N-terminálisan elhelyezkedő foszforilált tirozinjaihoz kötődik a Vav1 guanin nukleotid kicserélő faktor, az Nck adaptor fehérje és az Itk kináz; prolinban gazdag régiójához (PRR) konstitutívan kötődik a PLC $\gamma$  és a Gads; C-terminális részén pedig SH2 domén található, ami az adaptor fehérje ADAP-pal és a HPK1 kinázzal létesít kapcsolatot (28).

A jeltovábbítás egyik központi eleme a PLC $\gamma$ , amelyet az Itk foszforilál (29). Az aktivált PLC $\gamma$  hidrolizálja a membrán-lipid foszfátidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>), amely két termékre hasítódik: diacil-glicerolra (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfátra (IP<sub>3</sub>) (30). Az IP<sub>3</sub> szolubilis molekula, amely az ER membránjában található receptorához kötődve elősegíti az intracelluláris kalcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) felszabadulását. A DAG két folyamat elindításához szükséges: egyrészt a protein-kináz C $\theta$  aktivációjához (PKC $\theta$ ) (31), amely az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor szabályozója; másrészt MAPK–ERK1, 2 protein kináz aktivációt hoz létre, amely a STAT3, az Elk1 és a c-Jun/c-Fos transzkripció faktor aktiválódását indukálja (32). Utóbbi például az aktiváció során legkorábban megjelenő, sejtosztódást szabályozó marker, a CD69 sejt felszíni megjelenését indukálja (33).

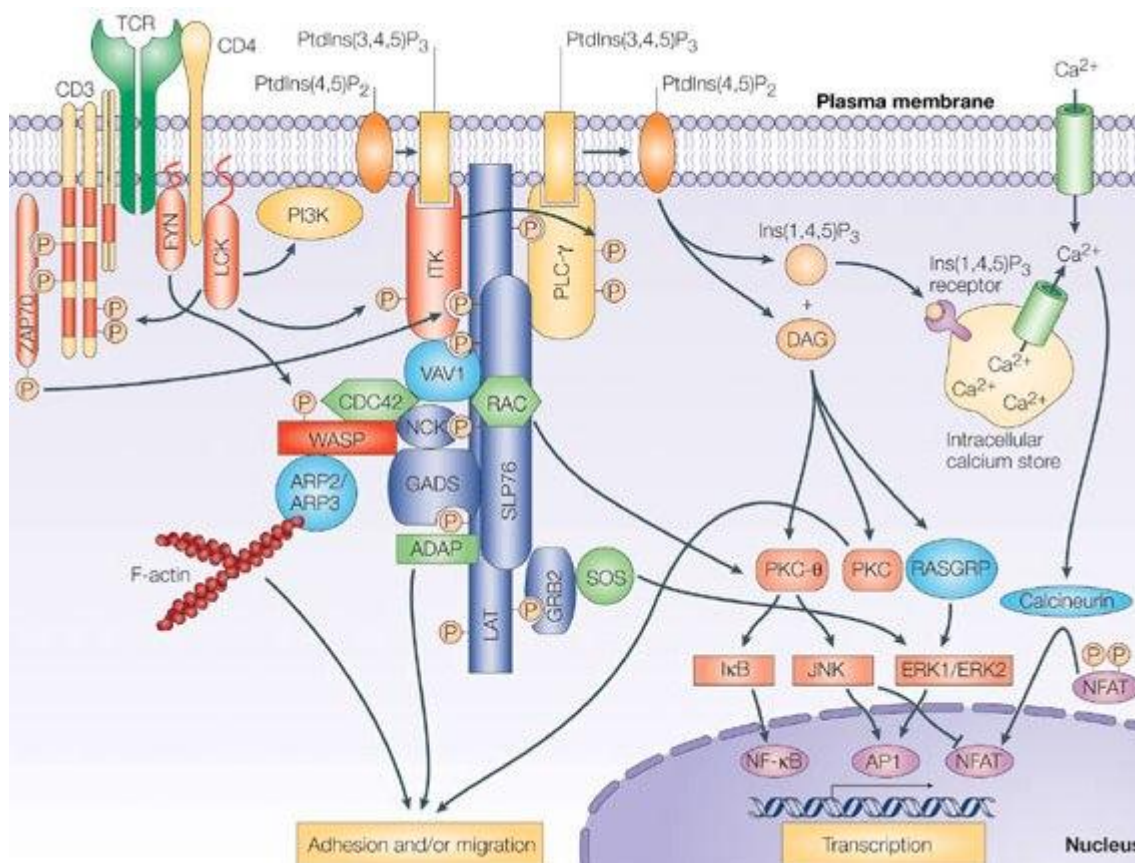
A  $\text{Ca}^{2+}$  szignál számos folyamat szabályozója a T-limfocitákban. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak kiürülése, más tényezőkkel együtt előidézi a sejtmembránban található  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák kinyílását, így tovább növekszik a  $\text{Ca}^{2+}$  mennyisége a sejtben (34). A  $\text{Ca}^{2+}$  többek között kalmodulinhoz kötődik, amely aktiválja a nitrogén-monoxid szintáz (NOS), így nitrogén-monoxid (NO) termelődik a sejtben (35). Az NO a sejtmembránon átjutva, hem-prosztetikus csoportokhoz kötődve ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) felszabadulást idéz elő (36). Az NO szerepét számos munkacsoport vizsgálta szisztémás autoimmun betegségekben, különösen



rheumatoid arthritisben (RA) és szisztémás lupus erythematosusban (SLE) (37). A monociták fokozott NO termelésének munkacsoportunk korábbi eredményei szerint szerepe lehet abban, hogy SLE-ben szenvedő betegek T-limfocitáiban igen nagyszámú mitokondrium mutatható ki (38). A  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin fontos szabályozója továbbá az NFAT transzkripciós faktornak (39), amelynek hiányában alacsonyabb IL-2 és interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) termelés figyelhető meg, ami a Th2 irányú differenciálódásnak kedvez (40, 41). Az NFAT szerepét feltételezik a FoxP3 transzkripciós faktor szabályozásában is, amely a Treg sejtekben magasan expresszálandó transzkripciós faktor (42).

A transzkripciós faktorok, mint a gén átíródás szabályozó egységei, meghatározott gének expresszióját irányítják, ezáltal befolyásolják a citokin termelés megindulását és mértékét is. A szolubilis citokinek specifikus receptoraikhoz kötődve számos sejtfunkciót irányítanak, többek között gyulladási és differenciálódási folyamatokat, továbbá túlélési szignálokat közvetítenek. A Th1 sejtek szempontjából egyik legfontosabb mediátor az IL-2. A megtermelt citokin egyrészt autokrin módon szabályozza a sejtek osztódását és túlélését (43), másrészt részt vesz a sejtfelszíni receptor arányok kialakításában (44), továbbá szuppressálja a Th17 irányú differenciálódást és az Treg irányú eltolódásnak kedvez (43).

A TCR jelátvitelt az 1. ábra foglalja össze.



**TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation.** 2005 Pamela L. Schwartzberg, Lisa D. Finkelstein and Julie A. Readinger Nature Reviews Immunology 5, 284-295 doi:10.1038/nri1591 (45).

### 1. ábra. A TCR-on keresztül elindított jelpályák áttekintése.

#### 1.1.1.2.1 A CD3ζ-lánc

A ζ-lánc a TCR keresztükötése következtében mind a hat lehetséges tirozin molekulán foszforilálódik. A CD3ζ foszforilációja jellemzően 21 és 23 kDa (p21, p23) molekulásúlyú formák kialakulását eredményezi, ahol a p21 esetében a két lánc négy membrántól disztálisan elhelyezkedő ITAM-ja, míg p23-nál mind a hat ITAM foszforilálódik (46). Korábbi megfigyelések szerint a membránkötött ζ-láncok egy része konstitutívan foszforilált a 21 kDa formában (47) és stabil komplexet alkot az inaktív formában található ZAP-70-nel (46, 48). A konstitutívan foszforilált láncok szerepe még nem teljesen tisztázott: egyrészt befolyásolhatja az idegen peptidekre adott válasz erősségét (49), másrészt "molekuláris szenzorként" is működhet azáltal, hogy a különböző foszforilált variánsok arányával "különbséget tesz" az agonista peptidek és

az alternatív peptid ligandok között (50, 51), de szerepe lehet a sejtek túlélésében (52) is. Legújabb eredmények szerint a p21 jelenléte p23 hiányában elősegíti az autoreaktív T-sejtek perifériára kerülését és potenciálisan autoreaktívvá válását (53).

A TCR az aktivációs szignálok közvetítése után internalizálódik. Az internalizáció klatrin mediált endocitózis útján történik. Ennek során a receptor-ligand komplexek a sejtmembrán klatrinnal kitöltött mélyedésébe kerülnek, amelyek betűrődve és összezáródva klatrin burokkal ellátott vezikulákat alkotnak. A kötődés a CD3 $\zeta$ -lánc esetében a klatrin, és a  $\zeta$ -lánc egy di-leucin valamint a tőle N-terminális pozícióban lévő aszparaginsav oldallánc között jön létre. A vezikula nem sokkal a lefűződése után elveszíti klatrin-burkát, lehetővé téve a korai endoszómával való asszociációt (54). A  $\zeta$ -lánc a többi TCR láncától függetlenül is internalizálódhat (9), amelynek mechanizmusa még nem teljesen ismert, ugyanakkor lehetőséget ad az egyedi szabályozásra.

A CD3 $\zeta$ , mint sejt felszíni receptor, bomlása elsődlegesen a lizoszómális útvonalon keresztül történik irodalmi adatok alapján (55, 56). Ugyanakkor, Wang és mtsai kimutatták a CD3 $\zeta$  ubiquitinizációját és proteaszómális bomlását (57), amit más munkacsoportok is megfigyeltek (8). Ezek alapján valószínűnek tűnik, hogy mindkét útvonal érintett a  $\zeta$ -lánc lebontásában, és a lebontást befolyásoló egyéb tényezők határozzák meg az útvonal típusát. A  $\zeta$ -lánc ciklizációjának és lebontásának egyik fő regulátora az src-like adaptor fehérje, a SLAP.

#### 1.1.1.2.2 Az src-like adaptor fehérje (SLAP)

A SLAP adaptor protein nagy hasonlóságot mutat az src családba tartozó kinázokkal, azonban nem rendelkezik kináz aktivitással. Rövid N-terminális végét követően SH2 és SH3 domént tartalmaz, C-terminális végén pedig egy ~100 aminosavból álló szekvencia található, amelynek pontos funkciója ma még nem ismert (58).

A SLAP expresszióját T-limfocitákban először Tang és mtsai írták le, akik kimutatták, hogy C-terminális régióján keresztül homodimerizálódik és SH2 doménon keresztül kapcsolatot létesít a ZAP-70-nel, a LAT-tal, a Syk-vel és a CD3 $\zeta$ -val (59). Több megfigyelés is bizonyította, hogy a SLAP expressziójának változása számos folyamat szabályozásában részt vesz. *In vivo* dupla pozitív (DP) timocitákban magasabb expressziót mutat, mint érett T-sejtekben, amelynek a pozitív szelekció irányításában

van szerepe, mivel hiányában a DP sejtek nagyobb számban kerülnek a perifériára. A SLAP részt vesz a  $\zeta$ -lánc internalizációjában, és c-Cbl-lel közreműködve a láncok ubiquitinizációján keresztül elősegíti azok lebontását (60). Erre utal, hogy SLAP génkiütött (knock-out, KO) állat érett T-sejtjeiben mind a ciklizáló TCR komplexek száma, mind a  $\zeta$ -lánc mennyisége jóval magasabb (61), annak következtében, hogy gátolt a CD3 $\zeta$ -lánc lebontása, így a komplexek visszajutnak a sejt felszínre (62). Az endoszómális kompartmenttel bekövetkező kolokalizációját is leírták aktiváció hatására (63). A SLAP expresszió növelése hatékonyan gátolja a mitogenezist (64), a TCR keresztkötés indukálta NFAT aktivációt és IL-2 termelést. Peterson és mtsai 2011-ben publikált cikkükben kimutatták, hogy a SLAP hiánya gátolja az autoimmun arthritis kialakulását. Munkájukban olyan KO állatok létrehozására került sor, amelyek mind a ZAP-70-re, mind a SLAP-ra nézve mutációt hordoznak (DSSKO). A ZAP-70 mutáns állatokat (SKG) korábbi megfigyelések alapján arthritis modellként használják, mivel fogékonyak a zymosan-indukált arthritisre (65). DSSKO állatokban mind a betegség kialakulása, mind a lefolyásának súlyossága csökkent a SLAP hiánya miatt, továbbá megnövekedett a perifériális regulatórikus T-limfociták aránya (66). Újabb eredmények szerint, a SLAP deficienciája megnöveli a TCR aviditását, eltérő TCR repertoárt létrehozva ezzel, ami a sejtek negatív szelekciójához vezet (67).

A SLAP ugyanakkor nem csak a T-limfociták aktivációjában, hanem a hízósejtek Fc $\epsilon$ RI-mediált aktivációjában is fontos szerepet tölt be. A SLAP expressziója koncentrációfüggően megnő az IgE-vel történő keresztkötés hatására, és hiányában megnő az Fc $\epsilon$ RI sejt felszíni expressziója, ami arra enged következtetni, hogy részt vesz a Fc $\epsilon$ RI szabályozásában (68). Szintén irodalmi adatok szerint, a SLAP fontos szerepet tölt be B limfocitákban (69), dendritikus sejtek érésében (70) és szerepet játszik az oszteoklaszt differenciálódásban (71) is. Mindezek bizonyítják, hogy a SLAP szerepe sokrétű az immunválasz szabályozásában.

### *1.1.1.3 Kostimuláció és adhéziós molekulák szerepe T-sejt aktivációban*

A T-limfociták aktivációjában a TCR komplexen keresztül érkező jelek mellett a kostimulációban résztvevő receptorok szerepe is alapvető. A kostimuláció szabályozza az aktivációt; hozzájárul az effektor mechanizmusok beindulásához, továbbá túlélő szignálokat biztosíthat.

A T-sejtek felszínén konstitutívan jelen lévő CD28 az APC felszínén található CD80/CD86 molekulákkal létesít kapcsolatot, amely elsősorban a PI3K aktiválódásához vezet (72). A jelpálya az Akt kináz aktiválódását eredményezi, amelynek szubsztrátjai között szerepel az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor, amely ebben a folyamatban a túléléshez szükséges molekulák, például a Bcl-xl expresszióját segíti elő (73). Az NFAT transzkripciós faktornak is ismeretes Akt általi szabályozása, amely szintén a túlélési szignálokat indukálja, mint amilyen az IL-2 termelés (74). A CD28 jelpálya további jellegzetessége a Ca<sup>2+</sup> szignál elindítása, amely a CD28-hoz közvetlenül asszociáló Itk aktiválásnak a következménye (75).

Ebbe a molekulacsaládba tartozik az aktivált T-sejteken megjelenő indukálható T-sejt kostimulátor (ICOS) és az APC-ken expresszálandó ligandja, az ICOS-L is. Kapcsolódásuk elsősorban a T-sejtek differenciálódását és citokin termelését befolyásolja: IL-4, IL-10 és IFN $\gamma$  szekrécióját segíti elő (76).

Hasonló fontosságú kostimulációs jeleket közvetít a tumor nekrozis faktor receptor (TNFR) szupercsaládba tartozó, T-sejteken az aktiváció hatására megjelenő CD40L és OX40, amelyek az APC felszínén szintén aktiváció-indukált expressziót mutató CD40-nel és OX40L-dal lépnek kapcsolatba. A CD40-CD40L kapcsolat többek között a *helper* funkciók és a memória kialakításában játszik szerepet (77), míg az OX40-OX40L a TNF receptor-asszociált faktorokon (TRAFs) keresztül NF- $\kappa$ B-mediált túlélési szignálokat biztosít (78).

A sejt-sejt kapcsolat kialakításában, stabilizációjában és a citoszkeletális átrendeződés elindításában az adhéziós molekuláknak van fontos szerepe, amelyek közül legfontosabb az antigén prezentáló sejten található intracelluláris adhéziós molekula (ICAM-1) és liganduma, a T-sejtek felszínén lévő leukocita funkcionális antigén (LFA-1) (79). Az adhéziós molekulák kapcsolata azonban nem csak a fizikai kontaktusban, hanem a kostimulációban is szerepet játszik: az LFA-1 kötődése pozitív visszacsatolást biztosít a TCR keresztkötetést követő Ras aktivációnak (80).

#### *1.1.1.4 Az aktivációt gátló mechanizmusok*

A jelátvitel befejeződéséért felelős molekulák, mint például a CD45, a Csk tirozin kináz, a Lyp defoszfataz és a citotoxikus T-limfocita asszociált antigén 4 (CTLA-4), az aktivációs szignál gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat (81, 82). A Lyp és

a Csk komplexet alkotva, a p56<sup>Lck</sup> defoszforilációjában (Lyp), illetve inhibíciós tirozinjának foszforilálásában játszanak szerepet (Csk) (83), de számos egyéb szubsztráttal rendelkeznek (84, 85). A CTLA-4 aktiváció hatására jelenik meg a T-sejtek felszínén, és a CD28-al verseng a CD80/CD86-hoz való kötődésben. Affinitása egy nagyságrenddel nagyobb, mint a CD28-nak és negatív szignált közvetít, amely végső soron a stimuláció csökkentésén keresztül vezet a jeltovábbítás befejeződéséhez (86, 87).

Fontos további résztvevők az ubiquitin molekulákat kovalensen a jelátvivő molekulákhoz rögzítő E3-típusú ubiquitin ligázok, a c-Cbl és a Cbl-b, amelyek ezáltal degradációra irányítják a megjelölt fehérjéket (88, 89).

### *1.1.2 Hízósejtek és jelátviteli mechanizmusaik*

A hízósejtek az immunrendszer természetes immunválaszának ágához tartoznak, ugyanakkor szerepük nem választható el az adaptív immunitástól sem.

Legtöbb adat allergiás reakciók vonatkozásában áll rendelkezésre, ugyanakkor számos egyéb kórképben, többek között fertőzésekben, sebgyógyulásban, krónikus gyulladásokban és daganatok növekedésének szabályozásában is jól ismert a szerepük (90).

A humán hízósejtek CD34+/CD117+ csontvelői progenitor sejtekből differenciálódnak, és fejlődésük nagymértékben KIT függő folyamat, amelynek expresszióját az őssejt faktor (SCF) szabályozza. Az elkötelezett hízósejt progenitorok a véráramba kerülnek, ahonnan a perifériás szövetekbe vándorolnak, mialatt érésük befejeződik, majd a citokin környezet által meghatározott teljesen differenciálódott hízósejtekké érnek. A szöveti rezidens hízósejtek hosszú életűek és túlélésüket elsősorban a jelen lévő SCF biztosítja (91).

A hízósejtek aktivációjának egyik jellemző módja a nagy affinitású FcεRI aggregációja a specifikus IgE-vel. Az FcεRI α-lánca az IgE-vel történő kapcsolódásban játszik szerepet, transzmembrán β-lánca és a receptor intracelluláris részén található homodimert alkotó γ-láncok fő feladata pedig az ITAM motívumokon bekövetkező foszforiláción keresztül a jeltovábbítás (92). A jelátvivő láncok foszforilációját a p56<sup>Lyn</sup> és a p59<sup>Fyn</sup> kinázok biztosítják, előidézve ezzel a ZAP-70 családba tartozó Syk kináz kapcsolódását a γγ-homodimerhez. A Syk a membránkött LAT foszforilálását végzi,

ami elősegíti a jelátviteli kaszkád többi résztvevőjének kapcsolódását. A sejten belüli jelátvitel fő irányítói az SLP-76, Grb2, PLC $\gamma$ , Gads és a Ras-Raf, amelyek Ca<sup>2+</sup> felszabadulást, MAPK által közvetített transzkripciós faktor (NF- $\kappa$ B, NFAT) aktivációt és degranulációt idéznek elő (93).

A citokin környezet függvényében azonban további receptorok is megjelennek a hízósejtek felszínén, mint az IgG-t kötő Fc $\gamma$ RI és Fc $\gamma$ RIII, amelyek az Fc $\epsilon$ RI-hez hasonlóan degranulációt indukálnak, valamint nagy mennyiségű tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , a továbbiakban TNF) termelést váltanak ki (94).

A hízósejtek szerepe a természetes immunválasz szabályozásában számos vizsgálat tárgyát képezi. A mikrobiális motívumok Toll-like receptorokon (TLR) keresztül váltják ki a hízósejtek aktivációját, aminek következtében elsősorban inkább proinflammatorikus citokineket termelnek (95). Az Fc $\epsilon$ RI-en és TLR-eken érkező jelek szinergista módon erősítik egymást (96).

A hízósejt aktiváció első lépése a citoplazmatikus granulumok exocitózissal a sejtek közötti térbe történő kiürülése. Ezen granulumok bioaktív aminokat, például a hisztamint, proteoglikánokat és 30-50%-ban proteázokat tartalmaznak (97). Az aktiváció szintén korai következménye, a proinflammatorikus lipid-származékok gyors szintézise, amely a citoplazmatikus foszfolipáz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) receptor mediált aktiválódásának eredménye. A PLA<sub>2</sub> bizonyos membránkomponensek hidrolízise révén (arachidonil-tartalmú komponensek) segíti elő az eikozanoidok, prosztaglandinok és leukotriének, továbbá a trombocita aktiváló faktor (PAF) termelődését (98). A hízósejtek számos citokin és mediátor fő forrásai, mint például a TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-6, CXCL8, CCL2, RANTES, valamint az SCF és a VEGF faktorok (99).

A hízósejtek a felszínükön található adhéziós molekulák (ICAM-1, LFA-1), továbbá az ICOS-L és a TNF/TNFR szupercsaládba tartozó molekuláik (pl. OX40L) segítségével kapcsolatot létesítenek mind az effektor, mind a regulatórikus T-limfocitákkal, és kölcsönösen gátolhatják (Treg), illetve elősegíthetik (Teff) egymás funkcióját (100).

## 1.2 A mikroRNS-ek által közvetített poszttranszkripcionális szabályozás

A mikroRNS-ek a genom által kódolt információ érvényre jutását, a gének expresszióját szabályozó szövevényes rendszer közelmúltban felfedezett részét képezik. Szerkezetét, méretét és funkcióját tekintve is jól körülírható, szabályozó RNS család első képviselőjét a differenciálódás vizsgálata során ismerték fel *C. elegansban* (101).

A felismerést, hogy rövid, 20-25 nukleotid hosszú RNS-darabok jelennek meg, sőt esszenciális szerepet játszanak a fejlődési program végrehajtása során, számos új, fehérjét nem kódoló, ún. kis RNS kódolásáért felelős gén felfedezése követte (102). A mikroRNS-ek előalakjait kódoló gének többségében önálló transzkripciók egységekként működnek. Genomi lokalizációjukra főleg az intergenikus elhelyezkedés a jellemző, expressziójuk saját promóter által vezérelt. Ritkán intronokban, még inkább elvétve exonokban helyezkedhetnek el. Igen érdekes, hogy az ismert miRNS-ek mintegy fele egymás közelében lokalizálódik, és nem egyszer ezek a klaszterek policisztronikus egységekként íródnak át (103).

A miRNS génekről képződő hosszú elsődleges átírat, amelynek szintézisében a DNS-polimeráz II vesz részt, a primer azaz pri-miRNS, amely már magában hordozza az igen jellemző hajtú struktúrát, ugyanakkor rendelkezik 3'-végi poli-A farokkal és 5'-végi sapkával is (104). Az említett hajtú, a sejtmagban, a Drosha enzimet is tartalmazó komplex segítségével vágódik ki, amely felszabadítja a prekursor, azaz a pre-miRNS-t (105). A pre-miRNS sejtmagból történő kijutásához az Exportin-5 fehérjére és a GTP-t kötő Ran G-fehérjére van szükség (106). A körülbelül 70 nukleotid hosszúságú pre-miRNS-ek citoplazmába kerülését követően, az RNáz III családba tartozó Dicer-1 enzim hasítja le a ~22 nukleotid hosszú, érett miRNS-nek megfelelő kettősszálú duplexet (107). Ezt követően a duplex hozzákötődik a miRNS csendesítő komplexnek nevezett, miRISC-hez, aminek következtében a miRNS egyik szála degradációra kerül. Az így felszabaduló érett, egyszálú miRNS szekvencia hozzákapcsolódik a Dicer komplex „magját” alkotó Argonauta fehérjéhez (AGO), lehetővé téve a miRNS meghatározott mRNS célpontjaival való szelektív találkozást. A miRNS a vele komplementer szakaszokat hordozó mRNS szálakhoz kapcsolódik, előidézve ezzel a transláció és végső soron a géntermék érvényre jutásának gátlását (108).



A miRNS-ek specifikus hatását meghatározó tényező a komplementaritás mértéke a miRNS 5'-végi 6-8 bázisa és tipikusan a cél mRNS 3'-végi nem transzlálódó régiójában (UTR) fekvő kötőhely között. Majdnem teljes egyezés esetén, ami egyébként ritkán figyelhető meg emlősök esetében, a következmény endonukleotikus hasítás vagy deadeniláció, míg kisebb fokú, részleges (8mer-6mer), jóval tipikusabb kapcsolódási forma esetén a transzláció gátlása következik be. A represszált RNS-ek a citoplazmatikus térben elkülönülő, ún. P-testekben aggregálódnak, amely az RNS-destabilizáció ismert színtere (109).

A miRNS-ek jelentőségének felfedezésével közel egy időben ismerték fel, hogy a mesterségesen bejuttatott kettősszálú RNS molekulák (siRNS) az egyetlen szálból állókhöz képest hatékonyabban és igen specifikus módon képesek a velük komplementer RNS szekvenciákat gátolni. Bejuttatásuk eredményeképpen a célgén funkcióvesztéses mutációjához hasonló hatást idéz elő (110). Az azóta RNS-interferenciaként leírt jelenséget kihasználó RNS-függő géncsendesítési mechanizmus igen nagy népszerűsége miatt a laboratóriumokban. A szekvencia komplementaritás által biztosítottan nagy specificitással lehetséges egy adott gén termékét „elcsendesíteni”, ezáltal mesterségesen lehet egy differenciálódott sejt által termelt fehérje mennyiségét radikálisan csökkenteni, amely lehetőséget teremt arra, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással bír annak hiánya a sejtben zajló folyamatokra (111).

A mikroRNS-ekre az RNS közvetített poszttranszkripcionális génextpressziós szabályozás endogén kulcsmolekuláiként kell tekintenünk. A tökéletes szekvencia illeszkedéssel jellemezhető siRNS-cél RNS kapcsolattal szemben azonban a miRNS-ek esetében általánosan több célponttal kell számolnunk. Tehát egy adott cél mRNS 3'UTR-je jellemzően több miRNS számára tartalmaz kötőhelyet, ami a kombinációs lehetőségek számát igen jelentősen megnöveli (112).

Jóllehet, a miRNS és célpontja közötti szekvencia komplementaritási sajátosságok ismeretében, pusztán bioinformatikai módszerekkel azonosítani lehet a lehetséges célpontok körét, azonban tekintettel arra, hogy a miRNS-ek hatása fehérje szinten érvényesül, a genom szintű célpont azonosítási kísérletek egyelőre korlátozott számban állnak rendelkezésre. Az elektronikusan elérhető target predikciós eljárások a miRNS-cél RNS kötése erősségét, a szekvencia komplementaritást és az evolúciós konzerváltság mértékét veszik figyelembe (113). Az ezzel kapcsolatos tanulmányok

tanúsága szerint a cél mRNS-ek pusztán szekvencia alapján történő azonosítása során kapott eredmények sajnos mintegy 2/3-a fals-pozitív lehet, így a target predikciós algoritmusok teljesítőképessége a befolyásolt celluláris folyamatok körének megbecsléséhez jobban elfogadható lehet. Eszerint a miRNS-ek által szabályozott regulációs hálózatok között viszonylag ritkák az alapvető, metabolizmushoz és energiaellátáshoz kapcsolódóak, ugyanakkor felülreprezentáltak a magasabb rendű funkciókban, mint amilyen az idegrendszer fejlődésében és a sejtek közötti kommunikációban résztvevő elemek (114).

A miRNS-ek mind az immunrendszer fejlődésében, mind megfelelő működésében betöltött szerepéről nagyszámú közlemény látott napvilágot. A különböző funkciókhoz kötődő miRNS-ek igencsak változatos példát szolgáltatnak arra, hogy milyen pontokon képesek beavatkozni: kondicionális Dicer KO állatban a B-sejtek pro-B-, pre-B-sejt átmenete sérül; míg a sokat vizsgált miR-17~92 klaszter hiányában tüdő hipoplázia, kamrai szeptum defektus, alacsony születési súly, a vérképző rendszerben pedig leginkább fokozott pro-B-sejt apoptózis figyelhető meg (115). A mikroRNS-ek fontos szabályozói a különböző T-limfocita populációk differenciálódásának és az effektor sejtek kialakulásának is (116).

### *1.2.1 A későbbiekben vizsgált mikroRNS-ek jellemzése*

*Mir-181a.* A mir-181a többféle sejt típusban is expresszálódik, de funkcióját leginkább immun kompetens sejtekben vizsgálták. Magas expressziót mutat a tímuszban, és a T- és B-limfocita fejlődésben is igazolták szerepét (117). A mir-181a kifejeződésének mesterséges növelése érett T-sejtekben megnöveli a sejtek szenzitivitását a peptid antigénekre, ami lehetővé teszi a gátló peptidek agonista, azaz aktiváló peptidként való azonosítását. Éretlen T-limfocitákban expressziójának csökkentése csökkenti a sejtek szenzitivitását, ezáltal befolyásolja a pozitív és negatív szelekciót (118). Mir-181a hiányában a T-sejtérés során olyan T-limfociták is pozitívan szelektálódnak, amelyek endogén saját peptidekre adott válasza nagyobb, mint az ehhez szükséges küszöbérték, elősegítve ezzel autoreaktív T-sejtek kialakulását (119). CD4+ memória T-sejtekben mennyisége nagy mértékben megnövekszik naív T-sejtekhez képest, ami hozzájárulhat a memória sejtek gyors aktiválódásához (120). A mir-181a célpontjai T-limfocitákban elsősorban az aktivációt gátló foszfatázok, mint a Lyp-et

kódoló PTPN22, a DUSP5 és 6, és az SHP-1 és -2 (118). B-sejtes krónikus limfoid leukémiában a mir-181a szintje szignifikánsan csökkent egészségesekhez viszonyítva, azonban a sejtek mir-181a és mir-181b szintjének mesterséges visszaállítása fokozza sejtek apoptózisát azáltal, hogy az apoptózist gátló Bcl-x1 és MCL-1 expresszióját csökkentik (121).

*Mir-146a.* A mir-146a azon kevés mikroRNS-ek egyike, amely eltérően expresszálódik a Th1 és Th2 populációk között. Hiányában megnövekszik az IFN $\gamma$  termelő T-sejtek aránya, valamint T-limfocita hiperreaktivitást eredményez mind az antigénekre adott válaszban, mind krónikus gyulladással járó autoimmun folyamatokban (122). Naiv T-limfocitákban alacsonyan expresszálódik, azonban aktiváció hatására növekszik expressziója, amely memória T-sejtekben és Treg-ekben éri el a legmagasabb szintet (123). A Treg sejtek működéséhez esszenciális, hiányában sérül az immunológiai tolerancia és konstans T-limfocita aktiváció figyelhető meg (124). Több funkciója az IRAK1 kináz és a TNF receptor asszociált faktor (TRAF6) csendesítésén keresztül, az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor szabályozásában nyilvánul meg (123). Befolyásolja a T-sejtek aktiváció indukálta sejthalálát és IL-2 termelését is (125). Emelkedett szintje az NF- $\kappa$ B-től független módon csökkenti bizonyos proinflammatorikus citokinek, mint például az IL-8 és a RANTES termelődését (126). Szerepet játszik hízósejtek túlélésében (127), monociták (128) és dendritikus sejtek aktivációjában, ahol a TLR szignalizációban is leírták szerepét (129).

*Mir-132.* A mir-132 funkciója legjobban az idegrendszeri fejlődésben ismert, ugyanakkor működésének számos immunológiai vonatkozása is van. Mint endotoxin rezponzív mikroRNS-t írták le humán monocitákban TLR indukció következtében (123), ugyanakkor cAMP közvetített szabályozását is kimutatták (130). Csökkent szintjét figyelték meg HTLV-1 vírus asszociált T-sejtes leukémiában (131), de a DNS-metiláció következtében kialakuló csendesítése is hozzájárulhat tumorok kialakulásához (prosztata és hasnyálmirigy), mivel szintjének visszaállítása elősegítheti a tumoros sejtek elpusztulását (132, 133). Szerepe van az angiogenezisben (134), és a p300 transzkripciós faktor koaktivátor csendesítésével számos gén átíródásának mértékét befolyásolja (130).

*Mir-155.* KO állatokban tett megfigyelések alapján a mir-155 esszenciális szerepet tölt be az immunrendszer normális immunfejlődésben és szerepe meghatározó

a germinális centrumok kialakításában is. Hiánya csökkenti a germinális centrumok B-limfocita számát, de a gyulladással eredetű szöveti átépülésben is fontos (135, 136). A FoxP3 transzkripciós faktor csendesítésén keresztül elsődleges szerepe van a Treg sejtek kialakulásában, mivel génkiütött állatokban alacsonyabb mennyiségű Treg jelenik meg a periférián. Ugyanakkor nincs hatással sem a Treg sejtek életképességére, sem szuppressziós kapacitásukra (137). Expressziója megnövekszik T-sejt aktiváció során mind Treg sejtekben, mind Th sejtekben, amelynek funkcionális szerepe feltehetően a Treg mediált szuppresszióban van. Mesterséges csendesítése mind humán, mind egér sejtekben a szuppressziót erősíti, mesterséges növelése viszont ezzel ellentétes reakciót vált ki (138). A FoxP3 gén kiütése cAMP-függő módon megszünteti az aktiváció során bekövetkező mir-155 emelkedést, amely egy pozitív visszacsatolást eredményez saját átíródásában (139). A sejtaktivációt gátló TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) citokin hatására szintje emelkedik, és az Itk csendesítésén keresztül szabályozza az IL-2 expressziót (140). Ugyanakkor a sejtaktiváció elősegítéséhez is hozzájárul, mivel számos, az aktiváció gátlásában fontos gén csendesítését végzi. Ilyen például a foszfátáz SHIP-1 (141), amely az IFN $\gamma$  termelés gátlásában játszik szerepet (142), vagy a PIK3R1, amely a PI3K-Akt útvonal egyik inhibitora (143). A sejtek túlélésére gyakorolt hatását a mir-125b-vel közösen, a Bcl-2 csendesítésével szabályozza (144).

### 1.3 A TNF $\alpha$ és jelátvittele

A gyulladás kialakításában elsődleges szerepe van a különböző sejtek által termelt citokineknek, amelyek hatásukat autokrin, parakrin és endokrin módon kifejtve határozzák meg a sejtek viselkedését. A gyulladással citokinek közül is kiemelkedik az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és a TNF $\alpha$ , mivel elsőként jelennek meg az akut gyulladás folyamán, folyamatosan jelen vannak a gyulladással környezetben és részt vesznek annak fenntartásában.

A TNF $\alpha$  egy rendkívül sokoldalú proinflammatorikus citokin, amely helyi és szervezetszintű hatásokkal egyaránt rendelkezik. A szöveti környezetben nagy mennyiségben szabadul fel bakteriális fertőzés következtében bakteriális komponensek, például lipopoliszacharidok (LPS) hatására. Nevét a daganatsejtekre kifejtett gátló

hatásáról kapta (145). Makrofágok, hízósejtek, limfoid sejtek (T és NK), endotelsejtek, fibroblasztok termelik, de előfordul az idegszövetekben is (146). A neutrofil granulociták fontos kemoattraktánsa, az endotelsejtek adhéziós molekuláinak megjelenését kiváltva elősegíti az érfalon való átjutást, valamint fokozza a makrofágok fagocita-tevékenységét (147). Más citokinekkal együtt, mint az IL-6 és az IL-1, a hipotalamuszban endogén pirogénként, a májban az akut-fázis reakció jellemezte program induktoraként, a szervezetszintű gyulladáshoz vezető kulcsszereplőjeként működik közre (148). A gyulladást elősegítő funkciója bizonyos körülmények között nélkülözhetetlen (pl. bakteriális fertőzések elleni védekezés), ugyanakkor éppen ezen tulajdonsága miatt számos akut vagy krónikus gyulladással járó betegséggel asszociált, mint az autoimmun folyamatok okozta betegségek vagy a szepszis.

A TNF elsődlegesen mint 2-es típusú transzmembrán fehérje termelődik és szintézise után trimerizálódik (149). A membrán-integrált forma foszforilálódik (150), majd a TNF $\alpha$  konvertáló metalloproteáz (TACE) hasítja, amelynek következtében felszabadul a szolubilis TNF (151). A TNF membránkötött formában és szolubilis ligandként is számos folyamatra és sejt típusra fejti ki hatását (147). A TNF-et kötő receptorok a TNF receptor 1 és 2 (TNFR1, TNFR2), amelyek a plazmamembránban szintén trimereket alkotnak (152). Mindkettő köthet szolubilis és a membránhoz kötött TNF-et is (153).

A TNFR1 által közvetített jelek alapvetően két irányba ágaznak el: a sejtaktiváció, és az apoptózis felé. A TNFR1 intracelluláris részén halál doménnel (DD) rendelkezik. A TNF kötődése után a TNFR1 DD-jéhez homofil interakcióval kapcsolódik a TRADD, amivel kötődési felületet biztosít további proteinek számára. Ezek közül az egyik legfontosabb a TNF receptor asszociált faktor 2 (TRAF2), illetve egy szerin/reonin kináz, a RIP. A TRAF2 RIP-en keresztül aktiválja az inhibitor- $\kappa$ B kinázt (IKK), aminek következménye, hogy az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor felszabadul a gátlás alól és a PKC $\zeta$  által végzett foszforilációja után a sejtmagba jutva segíti elő bizonyos gének átíródását. A TRAF2-höz további kinázok is kapcsolódnak, amelyek a MAPK családba tartozó kinázokat, például a c-Jun N-terminális kinázt (JNK) aktiválják tirozin és reonin oldalláncok foszforilálásával (154, 155). A JNK a sejtmagba jutva a c-Jun vagy az ATF2 transzkripciós faktorok átírását fokozza. Ennek hatására megnövekszik a kollagenáz, az E-szelektin és az MCP-1 gének kifejeződése, továbbá

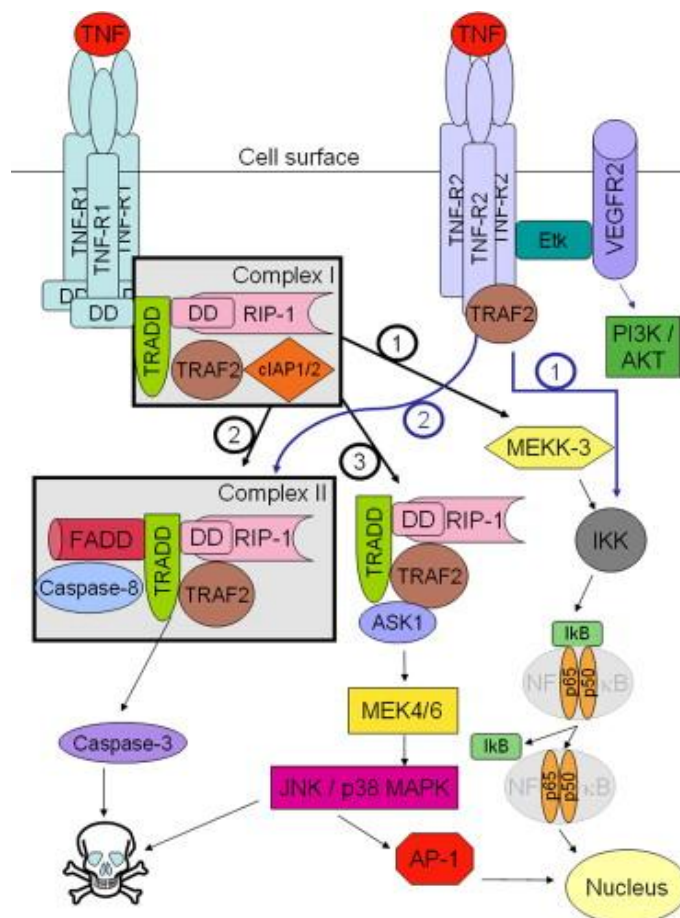
számos fehérje termelődése fokozódik, mint például az anti-apoptotikus Bcl-2, Bcl-x1, valamint az IL-2,-1,-6, IFN $\gamma$  és a RANTES (156).

A TNF által közvetített apoptózis első lépése a FADD kapcsolódása a TNFR1-hez TRADD-on keresztül. A FADD egy citoplazmatikus protein, amely a plazmamembrán citoszolikus oldalán található kaszpáz-8-cal létesít kapcsolatot. A kaszpáz-8 aktivációjának következtében egy proapoptotikus molekula szabadul fel, ami a mitokondrium külső membránjában helyet foglaló Bak oligomerizációját segíti elő, amely ezáltal egy póruskomplexet hoz létre, így citokróm c szabadul fel a mitokondriumból. A citokróm c elősegíti az apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1 (Apaf-1) oligomerizációját, és adenzin-trifoszfát, valamint kaszpáz-9 jelenlétében létrejön a funkcionális apoptoszóma. Az apoptoszóma komplex a prokaspáz-3/-6/-7 hasítása révén létrehozza az effektor kaszpázok aktív formáját (157, 158). A folyamat végeredményben sejthalálhoz vezet.

A TNFR2-t maximálisan a membrán kötött TNF aktiválja (159), és intracelluláris részén nem tartalmaz DD-t. A receptorhoz közvetlenül kapcsolódik a TRAF2, és a jelátviteli folyamat ebben az esetben is NF- $\kappa$ B, továbbá AP-1 aktivációt idéz elő (160). TNFR2 génkiütött állatokban folytatott kísérletek rávilágítottak a receptor esszenciális szerepére az antigén indukálta T-sejt differenciációban és túlélésben (161, 162), adhéziós molekulák expressziójának szabályozásában (163) és a sejtmigrációban (164). Protektív szerepét igazolták több betegségben (165, 166), de megváltozott expressziója összefüggésbe hozható például familiáris (családi halmozódást mutató) rheumatoid arthritisszel (167) és szisztémás lupus erythematosusszal (SLE) is (168). Szolubilis formájának vérben lévő mennyiségét prediktív markerként használják bizonyos tumorokban (169) és gyulladásoos betegségekben (170). CD4+ T-sejteken a TNFR2 magas expressziója gátolja a sejtek fogékonyságát a Treg mediált szuppresszióra (171). A TNFR2 szerepe egyre jobban ismert a Treg sejtek működésében. Nagy mennyiségben van jelen felszínükön (172), és a Treg sejtek TNFR2 környezetbe bocsátása révén gátolják a TNF hatásait (173). Ugyanakkor a TNF TNFR2-függő módon elősegíti a Treg sejtek aktiválódását (174) és proliferációját, továbbá indukálja mind a CD25, mind a FoxP3 expresszióját (175), de gátolja szuppresszív kapacitásukat (176). A TNF hatására bekövetkező apoptózis vagy

aktiváció a TNFR1 és TNFR2 arányától, a citokin környezettől, a reaktív oxigén intermedierek termelődésétől és a sejt aktuális állapotától függ (177).

A TNFR jelátvitelt a 2. ábra foglalja össze.



**Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium.** 2009 Haider S, Knöfler M. Placenta 30(2):111-23. Review. PMID: 19027157 (178)

**2. ábra.** A TNFR által közvetített főbb jelátviteli folyamatok összefoglalása.

## 1.4 A rheumatoid arthritis

A rheumatoid arthritis (RA) egy krónikus, főként a kéz és a láb kisízületeit érintő szisztémás autoimmun betegség. Progresszív porc- és csontkárosodást okozhat, az ízületek fájdalmával és duzzanatával, valamint ízületi deformációval járhat. Az RA etiológiája pontosan nem ismert, kialakulásához genetikai és környezeti tényezők egyaránt hozzájárulnak.

A genetikai tényezők között első helyen említendők a hajlamosító humán leukocita antigén (HLA) haplotípusok. A HLA-DRB1\*04 klaszter egy vagy több alléljának jelenléte szoros összefüggést mutat a betegség kialakulásával (179), de napjainkban a nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok segítségével újabb régiókat sikerült azonosítani, amelyek bizonyos polimorfizmusai szintén hajlamosító tényezők lehetnek (HLA-C lókuszt variánsok, ZNF311 lókuszt, DQA2 lókuszt, és HLA-DPB1) (180, 181). További fontos hajlamosító polimorfizmusokat írtak le a fehérjék citrullinációját végző PADI4 enzim génjében (182), illetve a T-limfocita aktiváció terminációjában fontos Lyp-et kódoló PTPN22 génben (183).

A környezeti tényező között legtöbbször a dohányzás szerepét vizsgálták a betegség kialakulásában (184). A betegségre jellemző citrullinált proteinek (ACPA) és az immunglobulinok Fc része ellen termelődő antitestek (rheumatoid faktor, RF) jelenléte rossz prognosztikus faktornak tekinthető (185).

#### *1.4.1 A TNF szerepe RA-ban*

A gyulladás kialakulásának egyik kulcseleme az emelkedett TNF, - amelyet mind RA-s betegek szérumban, mind a szinoviális folyadékból származó mintákban megfigyeltek (186)-, valamint a T-sejtek megnövekedett TNFR expressziója (187). A TNF $\alpha$  felszabadulása további gyulladásos citokinek felszabadulását okozza, mint például IL-6, IL-1 és GM-CSF, aminek következtében krónikus gyulladás alakul ki a szinoviumban (188). A TNF hatására akár szub-oszteoklasztogénus mennyiségű RANKL jelenlétében is megindul az oszteoklaszt differenciálódás és aktiváció, amelynek következménye a betegségben megfigyelhető ízületi destrukció (189).

A TNF elsődleges szerepét a betegség kialakulásában jól mutatja, hogy napjainkban öt kereskedelmi forgalomban kapható TNF gátló készítmény létezik, amelyek ma az egyik leghatékonyabb terápiás lehetőséget jelentik RA-ban. A betegség korai stádiumában alkalmazott TNF blokkolók megelőzhetik a gyulladás és az ízületi destrukciók kialakulását. Ezen hatóanyagok (infiximab, etanercept, adalimumab, golimumab és certolizumab pegol) a szekretált, illetve a sejtfelszíni TNF-et kötik meg nagy affinitással, megakadályozva annak a receptorához való kötődését (190). RA-s betegekben a TNF blokkolása visszaállítja a fiziológiai T-sejt választ (191, 192).



#### 1.4.2 A T-sejtek szerepe RA-ban

Az RA gyulladássos szöveti környezete nagyban különbözik a nem autoimmun eredetű gyulladásoktól: módosult pH viszonyok és oxidatív státusz jellemzi (193), továbbá domináns a makrofágok által termelt citokin környezet (194). RA szinoviális szövetekben a Th1 típusú T-sejt differenciálódás van túlsúlyban, amelynek eredménye a citokin termelés proinflammatorikus irányba történő eltolódása (195, 196). A Th1-es polarizáció ellenére azonban nem figyelhető meg konstitutív citokin termelés, például IL-2 felszabadulást vizsgálva (197), emellett a sejtek kevésbé reaktívak mitogén, antigén vagy anti-CD3 stimulációra (198). RA-ból származó szinoviális T-sejtek fenotípusára jellemző a csökkent válaszkészség (199), a CD3 $\zeta$ -lánc alacsonyabb kifejeződése (200) és bizonyos sejt felszíni antigének (CD69, RANK,  $\beta$ -integrinek) megváltozott megjelenése (201). RA szinoviális szöveteiben szignifikánsan növekedett a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek száma, amelyek *in vitro* autoreaktív potenciállal rendelkeznek (202). Csökkent a p36 foszfo-LAT mennyisége (203), alacsonyabb Ca<sup>2+</sup>-válasz figyelhető meg (204), ugyanakkor konstitutív NF- $\kappa$ B és MAPK aktiváció jellemzi őket (205, 206).

A redox egyensúlyban tapasztalható eltérések további fontos tényezői az RA-ban szenvedő betegek T-limfocitáinak alacsony válaszkészségének: a glutation intracelluláris szintje szignifikánsan csökkent szinoviális T-sejtekben (207), ugyanakkor a tioredoxin (208) és a nitrogén monoxid (209) szintje emelkedést mutat. A T-limfociták központi szerepére utal, hogy az RA terápiájában rendkívül hatékonyak bizonyulnak a T-sejt válasz gátlásán alapuló készítmények, mint például a forgalomban lévő rekombináns CTLA-4-IgG1 fúziós protein (abatacept) (210) vagy a klinikai kísérleti stádiumban lévő anti-ICAM-1, anti-CD80/86 és az LFA-3-IgG1 fúziós fehérje (211). A T-sejtek megnövekedett TNFR expressziója, amely ligandjával kolokalizálódva mutatható ki (212), illetve, hogy TNF transzgenikus egérben súlyos destruktív polyarthritist alakul ki (213), arra enged következtetni, hogy a TNF központi szerepet tölt be a kóros T-limfocita aktivációban.

Kísérletes állatmodellekben a szinoviális T-sejtekben megfigyelhető eltérések hasonlóak a primer sejteken és a sejt vonalakon *in vitro* TNF kezelés hatására kialakuló eltérésekhez (214).

#### 1.4.3 A hízósejtek szerepe RA-ban

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a hízósejt funkciók is érintettek az RA patomechanizmusában (215). Mind humán mintákban elemezve (216, 217), mind experimentális egérmodellben (218) számuk jelentősen emelkedett a szinoviális szövetekben. Felhalmozódásuk módjáról több elképzelés is létezik, amelyek feltehetően kiegészítik egymást: egyrészt a gyulladás helyszínén a membránról felszabaduló SCF korrelál a hízósejt hiperpláziával (219), másrészt az RA-s szinoviumban magasan expresszálódik a CXCL9 és a CXCL10, amelyek a hízósejteken RA-ban megjelenő CXCR3 ligandjai (220). Bizonyítottan bekövetkezik aktivációjuk és degranulációjuk is (221, 222), mivel RA szinoviális folyadékban, oszteoarthritishez (OA) viszonyítva, mind a triptáz (223), mind a hisztamin (224) szintje emelkedett, bár ez utóbbi nem minden esetben figyelhető meg.

Az RA-s szinoviális hízósejtek nagy mennyiségben expresszálják a nagy affinitású FcεRI-et és megjelenik rajtuk az aktiváló típusú FcγRIIa is, azonban nem találtak rajtuk FcγRI-et és III-at (225). A hízósejtek aktivációja széles körben tanulmányozott allergiás folyamatokban, azonban kevésbé tisztázott RA-ban. Egyik lehetséges mechanizmusként az allergiához hasonló, FcεRI-en keresztüli aktiváció merül fel. Az IgE izotípusú kollagén ellenes antitestek, valamint az ezek ellen termelődött RF jelen vannak (226, 227) a betegek egy részében. Ezen antitestek hízósejtekre gyakorolt degranulációs hatását is bizonyították *in vitro*, szérummal történő szenzitizáció után (228, 229). Mindezek ellenére kollagén indukált experimentális egérmodellben nem sikerült összefüggést találni a betegség aktivitása és ezen antitestek jelenléte között, sőt a hízósejtek által termelt IL-4-et inkább a remisszió kialakulásával hozták összefüggésbe (230). Felmerült az FcγRIIa-n, TLR-okon és C5a receptoron keresztüli aktiváció lehetősége is, azonban ezeket kevésbé vizsgálták. Szerepüket hangsúlyozza azonban, hogy az RA patomechanizmusában meghatározó szerepet játszó proinflammatorikus citokinek (IL-17, IL-1β és TNFα) jelentős része hízósejt aktiváció során szabadul fel (221, 231).

#### 1.4.4 A mikroRNS-ek szerepe RA-ban

A mikroRNS-ek, mint legújabban felfedezett szabályozó molekulák szerepét egyre több publikációban vizsgálják RA-val összefüggésben (1. táblázat, (232)). Több

összefüggést találtak az RA patomechanizmusa és a megváltozott miRNS expresszió között (232), továbbá terápiás célpontként és diagnosztikus markerként való felhasználásuk lehetősége is felmerült (233). A legjobban tanulmányozott RA-ban résztvevő miRNS-eket a 1. táblázat foglalja össze.

<b>MikroRNS</b>	<b>Forrás</b>	<b>Változás iránya</b>	<b>Hatás/Célpont</b>
<b>mir-146a</b>	CD4+ T-limfocita, Th17 sejt, PBMC, szinoviális szövet, szérum, plazma	emelkedett	magasabb TNF szekréció, apoptózis csökkenése; <u>TRAF6, IRAK1</u>
<b>mir-155</b>	PBMC, szinoviális szövet, szinoviális folyadék, szérum, plazma	emelkedett	gyulladás befolyásolása, MMP szekréció növekedés
<b>mir-132</b>	PBMC, szinoviális szövet, szinoviális folyadék	emelkedett	<u>HB-EGF, DUSP9, TIMM3</u>
	szérum, plazma	csökkent	
<b>mir-223</b>	CD4+ T-sejt, PBMC, szinoviális szövet, szinoviális folyadék, szérum, plazma	emelkedett	<u>E2F1, CEBP</u>
<b>mir-203</b>	fibroblaszt-szerű szinoviocita	emelkedett	<u>MMP1, IL-6</u>
<b>mir-16</b>	PBMC, szinoviális szövet, szinoviális folyadék, szérum, plazma	emelkedett	apoptózis, proliferáció
<b>mir-124a</b>	fibroblaszt-szerű szinoviocita	csökkent	<u>CDK-2, MCP-1, IκBζ</u>

**1. táblázat: RA-ban érintett mikroRNS-ek összefoglalása (232).**

A mir-146a expressziója szignifikánsan növekedett RA-s betegek szinoviális fibroblasztjaiban, ami tovább fokozható LPS és IL-1 $\beta$  hozzáadásával (234), illetve TNF $\alpha$  kezeléssel (235). Szintje emelkedett az RA-s szinoviális szövetben is, elsősorban makrofágokban, CD3+ sejtekben és B sejtekben (235), de ugyanez figyelhető meg RA-s betegek perifériás véréből izolált mononukleáris sejtekben (PBMC) is (236). Szinoviális szövet eredetű CD4+ T-sejteket vizsgálva szintén emelkedett mir-146a expresszió figyelhető meg, ami pozitívan korrelál a TNF $\alpha$  mennyiségével. Az emelkedett mir-146a nem korrelál a célpontjai között szereplő TRAF6 és IRAK-1 expressziójával, mivel ezek a kontrollokhoz hasonló kifejeződést mutatnak. Azonban az IRAK-1 3'UTR régiójának polimorfizmusa hajlamosít RA kialakulására (237), míg mesterséges csendesítése csökkenti a TNF termelését (236).

A mir-155 emelkedett expresszióját igazolták RA szinoviális szövetekben, szinoviális fibroblasztokban, szérumban és plazmában mintákban és PBMC sejtekben (234, 236). RA-s szinoviális eredetű és perifériás CD14+ sejtekben a magasabb mir-155 expresszió korrelál a gyulladási citokinek termelésével és a célpontjaként ismert SHP-1 foszfatáz alacsonyabb szintjével, amelyet a gyulladás kialakulását gátló molekulaként tartanak számon (238). Mir-155 génkiütött állatban nem fejlődik ki kollagén indukált experimentális arthritis (239), valamint K/BxN szérumban transzfer arthritis modellben a mir-155 kiütése csökkent csontdestrukciót és osteoklaszt generációt eredményez (239). RA-s betegek PBMC sejtjeiben és szinoviális folyadék mintáiban a mir-132 szintje emelkedett, azonban a plazmában található mennyisége szignifikánsan kevesebb, ami markerként is használható lehet a betegség követésében (236, 240).

## 2. Célkitűzések

### **A CD3 $\zeta$ -lánc szabályozásának vizsgálata humán T-limfocitákban**

#### **1. A TNF hatásának vizsgálata a CD3 $\zeta$ -lánc kifejeződésére:**

- a. A  $\zeta$ -lánc expresszió mérése különböző koncentrációjú és időtartamú TNF kezelés mellett.
- b. A  $\zeta$ -lánc internalizáció vizsgálata.
- c. A CD3 komplex egyéb láncainak vizsgálata TNF hatására.
- d. A  $\zeta$ -lánc mRNS expressziójának mérése.
- e. A  $\zeta$ -lánc foszforiláció vizsgálata.

#### **2. A T-limfocita aktiváció vizsgálata TNF jelenlétében:**

- a. A Ca<sup>2+</sup>-válasz mérése.
- b. Az IL-2 termelés meghatározása.
- c. Proliferáció vizsgálata

#### **3. A CD3 $\zeta$ lebomlásának vizsgálata:**

- a. A bomlás helyszínének meghatározása.
- b. A SLAP fehérje expressziójának vizsgálata TNF hatására.
- c. A SLAP-CD3 $\zeta$  kolokalizációjának vizsgálata.
- d. A SLAP szerepének vizsgálata a CD3  $\zeta$ -lánc bomlásában.

#### **4. A SLAP vizsgálata RA-s betegekben:**

- a. A SLAP expresszió mérése RA-s betegek és egészséges kontrollok T-limfocitáiban.
- b. A SLAP expresszió mérése RA-ban szenvedő betegek T-limfocitáiban TNF hatására.

#### **5. A SLAP szabályozásának vizsgálata.**

### **MikroRNS-ek vizsgálata humán T-sejtekben és hízósejtekben**

#### **1. A mir-155, mir-181a és mir-146a vizsgálata TNF hatására T-limfocitákban.**

#### **2. A mir-132 vizsgálata hízósejtekben.**

### 3. Módszerek

#### 3.1 Sejtkultúrák

##### *3.1.1 Jurkat humán T-sejtes limfóma fenntartása*

A Jurkat T-sejteket (ATCC E6.1) gyárilag előkészített RPMI 1640, 10% FBS (foetal bovine serum), 2 mM glutamint tartalmazó tápoldatban (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) tartottuk fenn. A sejtkultúrák denzitását  $1 \times 10^6$  sejt/ml-re állítottuk be, és a tápoldatot minden második napon cseréltünk. A sejtek viabilitását a kísérletek előtt tripánkék festéssel vagy annexinV/propidium jodid (PI) jelöléssel, áramlási citometriával ellenőriztük.

##### *3.1.2 Perifériás mononukleáris sejtek izolálása, fenntartása*

A K<sub>2</sub>EDTA tartalmú vérvételi csövekben (BD Vacutainer, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA) levett, térfogatának az általánosan használt HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) oldattal kétszeresére hígított vért Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatra rétegeztük, majd 30 percig 400×g nehézségi erővel, 25°C-on centrifugáltuk. Ezt követően a mononukleáris sejteket (PBMC) szérumentes RPMI 1640 folyadékban mostuk, és a vörösvértesteket ACK pufferrel (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA desztillált vízben oldva) lizáltuk, végül a fehérvérsejt szuszpenziót PBS oldattal mostuk. Az így kinyert sejteket használatra kész RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM glutamint tartalmazó tápoldatban (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) tenyésztettük.

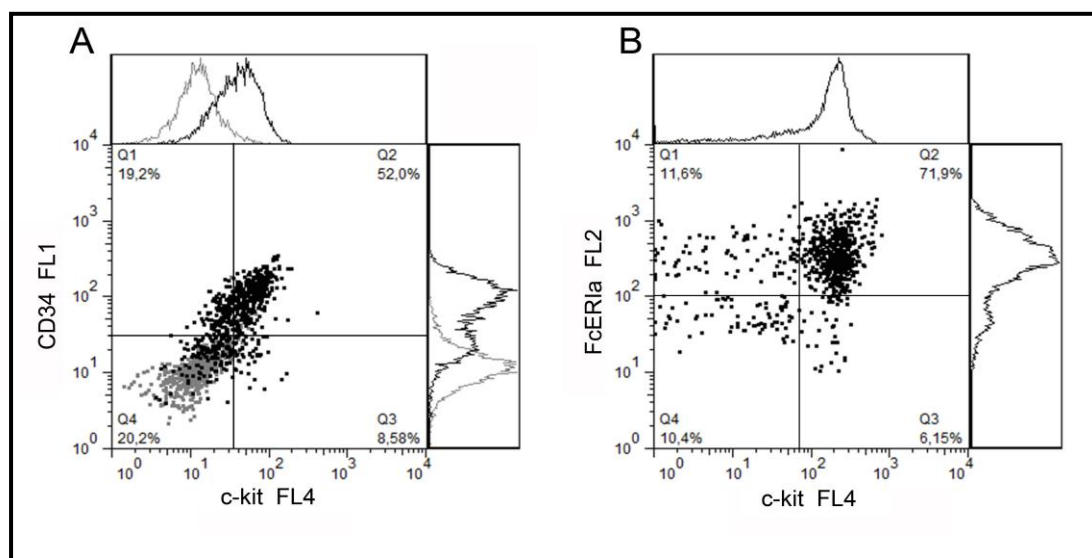
##### *3.1.3 CD4+ T-limfociták szeparálása*

A CD4+ T-limfocitákat negatív szelekcióval, mágneses elven (MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) történő izolálási technika segítségével nyertük ki. Ehhez a frissen izolált PBMC sejteket a gyártó által ajánlott pufferben (MACS puffer: 0,5% BSA, 2 mM EDTA PBS-ben oldva) szuszpendáltuk fel és a gyártó által javasolt protokoll szerint dolgoztunk. A sejteket használatra kész RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM glutamint tartalmazó tápoldatban (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) tenyésztettük.

A kísérletek során >90% tisztaságú populációkat használtunk, amit áramlási citometriával igazoltunk.

#### *3.1.4 Humán hízósejtek differenciálítása és fenntartása*

A köldökzsinórból származó, RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) médiummal kétszeres térfogatra hígított vérből gradiens centrifugálással nyertük ki a mononukleáris sejteket Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldat felhasználásával. A megmaradt vörösvérsejteket hipotónikus lízissel távolítottuk el. A MACS-pufferben felszuszpendált sejteket mágneses gyöngyökkel konjugált anti-CD34 antitesttel (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) történő inkubációt követően két egymást követő alkalommal LS-oszlopon (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) átengedve szeparáltuk. Az így nyert sejtek tenyésztése 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint és 0,1 mM nem esszenciális aminosav oldatot (Invitrogen, Gibco, Paisley, USA) tartalmazó DMEM-ben (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) történt,  $1 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban, 100 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-6 (ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany) és 3  $\mu$ M lizofoszfatisav (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) jelenlétében. 8 hetet követően, a differenciálódás mértékét áramlási citometriával ellenőriztük, és a CD34+, Fc $\epsilon$ RI+, CD117+ populációt tekintettük az éretlen hízósejteket reprezentáló populációnak (241) (3. ábra).



**3. ábra: Hízósejt differenciáció ellenőrzése.** A sejteket CD34-FITC, FcεRI-PE és CD117-APC (c-kit) festékekkel jelöltük, majd áramlási citometriával mértük.

## 3.2 Humán minták

### 3.2.1 Rheumatoid arthritises betegek

Az RA diagnózisának felállítása az *American College of Rheumatology* által meghatározott klasszifikációs kritériumok (242) alapján történt. A vérmintákat (n=10) a Budai Irgalmasrendi Kórházban gondozott betegektől nyertük az etikai engedélyeknek megfelelően, miután minden beteg aláírta a vizsgálatra vonatkozó beleegyező nyilatkozatot. A betegek egy része TNF-blokkoló, míg másik része a betegség lefolyását módosító terápiában (DMARD) részesült. Korban és nemből illesztett egészséges donorok (n=7) mintáit használtunk kontrollként (2. táblázat).



sorszám	nem	születési idő	terápia
1	Nő	1955	etanercept
2	Nő	1986	certolizumab pegol
3	Nő	1947	etanercept
4	Nő	1975	certolizumab pegol
5	Nő	1979	certolizumab pegol
6	Nő	1951	DMARD, glükokortikoid
7	Nő	1969	DMARD, glükokortikoid
8	Nő	1946	DMARD
9	Férfi	1957	DMARD
10	Férfi	1951	DMARD, glükokortikoid
1	Nő	1957	–
2	Nő	1983	–
3	Nő	1950	–
4	Nő	1964	–
5	Nő	1982	–
6	Férfi	1972?	–
7	Férfi	1982	–

**2. táblázat: A felhasznált betegminták és kontrollok nemre, korra és terápiára vonatkozó adatai. Átlagéletkor: 45,9±14,2, 13/17 nő.**

### 3.2.2 Humán köldökszinórvér minták

A mintagyűjtés a Semmelweis Egyetem I. számú Szülészeti- és Nőgyógyászati klinikáján történt egészséges anyák újszülött gyermekeiből származó köldökszinórvér mintáinak felhasználásával, a megfelelő etikai szabályok és engedélyek mellett a páciensek beleegyezésével.

A mikroRNS mérésekhez egészséges, önkéntes donoroktól származó vérmintákat használtunk fel (n=4).

### 3.3 Sejtek aktiválása, kezelése

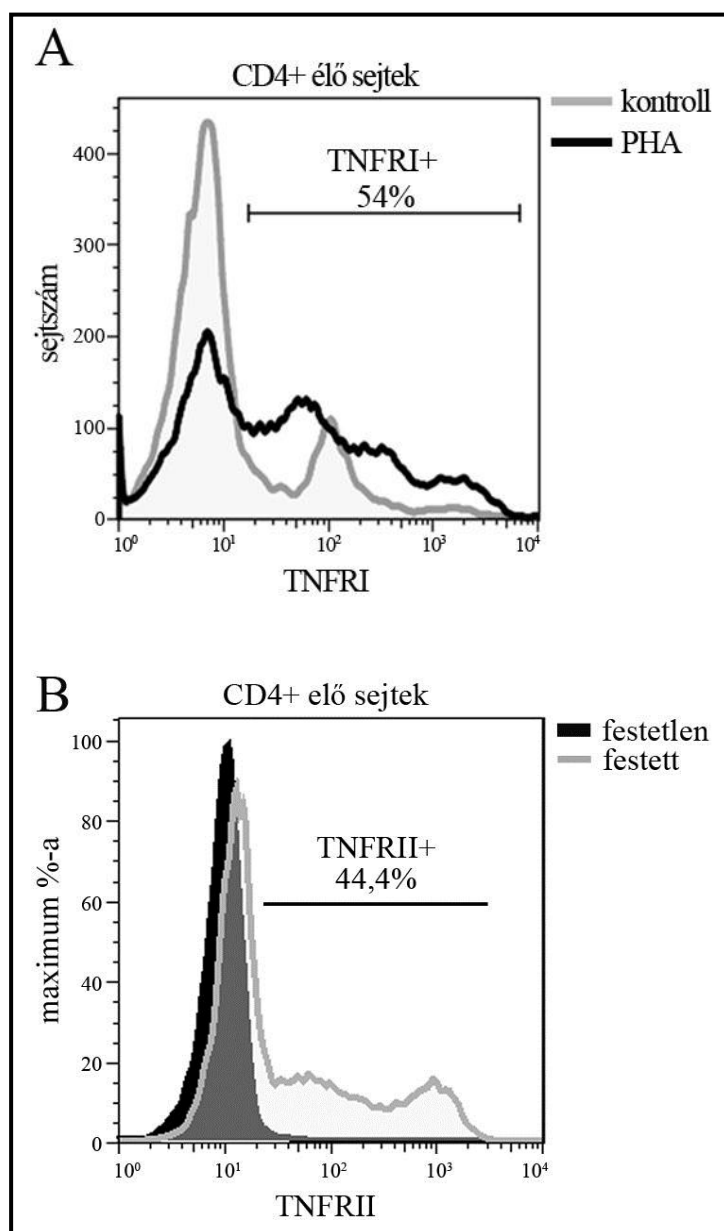
#### 3.3.1 *T*-limfociták

Jurkat T-sejtvonal: a sejteket  $1 \times 10^6$  sejt/lyuk (24 lyukú tenyésztőedény,  $2 \text{ cm}^2$ ) denzitásban osztottuk szét, majd különböző koncentrációjú (5-80 ng/ml, 40 ng/ml ha külön nincs jelölve) rekombináns humán TNF $\alpha$ -val (BD Biosciences, San Jose, California, USA) kezeltük őket meghatározott ideig (4-24 óra). Gátlószeres kísérleteink esetében mind a lizoszóma- ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mind a proteaszóma (MG-132, 100 nM, Calbiochem, San Diego, CA, USA) inhibitorral 2 órás előkezelést alkalmaztunk.

Munkánk során az NF- $\kappa$ B aktivitás mérésére használható  $\beta$ -galaktozidáz riporter enzimet tartalmazó Jurkat sejteket is használtunk (243). A galaktozidáz enzim szubsztrátjának hasítása (chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside, Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA), amely spektrofotometriával meghatározható, arányos az NF- $\kappa$ B aktivációval (244). Ezekbe a sejtekbe az NF- $\kappa$ B transzkripció faktort gátló NBD peptidet (NEMO-Binding Domain Binding Peptide, Merck Millipore, New York, NJ, USA) juttatunk be (100, 200  $\mu\text{M}$ ) bizonyos kísérletekben. Az NBD peptid a sejtek membránján szabadon átjut, majd az NF- $\kappa$ B aktivációjában résztvevő regulátor fehérje, a NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) I $\kappa$ K komplexhez való kötődésének megakadályozásával gátolja a citokinek által indukált NF- $\kappa$ B aktivációt és az általa közvetített génátíródást (245).

PBMC sejtek esetén a TNF kezelést 2 órás leukoagglutinin (PHA-L, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) előkezelés előzte meg a TNFR1 expressziójának indukálása érdekében (emelkedés: 41%; 4A ábra). A TNFR2 expresszióját is meghatároztuk a CD4<sup>+</sup> sejteken a kezelésekk előtt (4B ábra; ellenanyagok jellemzői: 4. táblázat).

A mikroRNS-ek expressziójának meghatározásához a primer CD4<sup>+</sup> limfocitákat TNF-fel kezeltünk 2 órán át, majd aktiválásukhoz anti-CD3/CD28-al konjugált gyöngyöket (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alkalmaztunk.



**4. ábra: PBMC sejtek TNFR expressziójának mérése.** (A) A sejteket 2 órás PHA stimulációt követően TNFRI-FITC festékkel jelöltük. (B) A sejteket TNFRII-PE konjugált festékkel jelöltük. Mindkét esetben áramlási citometriával mértünk.

### 3.3.2 Hízósejtek

A hízósejtek aktivációjához a sejteket egy éjszakán át mielóma eredetű IgE-vel (1 µg/ml, Serotec, Düsseldorf, Germany) előszenzitizáltuk, majd tápfolyadékkal történő mosást

követően anti-humán IgE antitesttel (1,5 µg/ml, Dako Corp., Glostrup, Denmark) keresztkötöttük 2 órán keresztül 0.5% BSA DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tápoldatban.

### 3.4 Western blot

A kísérletek befejeztével a sejteket centrifugáltuk (400×g, 10 perc) és jéghideg PBS-ben (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kétszer mostuk, majd 30-100 µl jéghideg lízis pufferben (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), foszfátáz- és proteáz gátló jelenlétében (Sigma-Aldrich) 30 percig jégen lizáltuk. Ezután a lizátumot 14000×g-vel 4°C-on centrifugáltuk és a felülúszóval dolgoztunk tovább. A minták összfehérje tartalmát Lowry módszerrel mértük (Lowry micro protein kit, Peterson's modification, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vagy *BCA micro kit*-tel (Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A futtatáshoz 10-50 µg fehérjét tartalmazó lizátumot egészítettünk ki vízzel, valamint redukáló *loading* pufferrel (Lane Marker Reducing Sample Buffer, Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL, USA), majd az így elkészített mintát 10 percig 100°C-on, majd jégen inkubáltuk. A futtatáshoz 12%-os gyári géleket (Lonza, Basel, Switzerland) használtunk és az elektroforézist 35 mA-en végeztük, majd polivinil-difluorid membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) blottoltunk. A membrán blokkolásához 5% zsírmentes tejpor TBS 0,05% Tween-20 oldatát használtunk szobahőn 1 órán át, majd a megfelelő antitesttel történő inkubációhoz (1 óra szobahőn vagy egy éjszakán át 4°C-on) az oldatot 1%-osra hígítottuk. Egyes esetekben *SuperSignal Western blot Enhancer*-t (Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL, USA) használtunk a jelek felerősítése céljából. A membrán mosása (TBS 0,05% Tween-20, 5×10 perc) után, a membránt a kiválasztott tormaperoxidázzal (HRP) konjugált szekunder antitesttel 1 órán át szobahőn inkubáltunk. A mosási lépéseket követően, a fehérjéket *enhanced chemiluminescence* (ECL, ECL Plus reagent, Amersham Biosciences, Little Chalfont, U.K.) módszerrel standard röntgen filmen (Kodak) tettük láthatóvá. A jelek optikai denzitás értékét ImageJ program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével

határoztuk meg. A diagramokon a specifikus sávok háztartási kontrollra (aktin vagy tubulin vagy Ponceau-festés (246)) és kezeletlen mintára normalizált értékei kerültek ábrázolásra.

A használt antitesteket az 3. táblázat foglalja össze.

<b>Célfehérje</b>	<b>Primer antitest</b>	<b>Szekunder antitest</b>
<b>CD3<math>\zeta</math></b>	egér anti-humán CD3 $\zeta$ (6B10.2) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)	kecske anti-egér IgG HRP (Dako, Copenhagen, Denmark)
<b>SLAP</b>	egér anti-humán SLAP (2A1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	kecske anti-egér IgG HRP (Dako)
<b><math>\beta</math>-aktin</b>	egér anti- $\beta$ -aktin (Sigma-Aldrich)	kecske anti-egér IgG HRP (Dako)
<b>CD3<math>\epsilon</math></b>	egér anti-humán CD3 $\epsilon$ (A-1) (Santa Cruz Biotechnology)	kecske anti-egér IgG HRP (Dako)
<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>	patkány anti- $\alpha$ -tubulin (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany)	kecske anti-patkány $\kappa$ és $\lambda$ lánc HRP (Sigma-Aldrich)
<b>foszfo-CD3<math>\zeta</math></b>	egér anti-p-CD3 $\zeta$ (C415.9A) (Santa Cruz Biotechnology)	kecske anti-egér IgG HRP (Dako)
<b>CD3<math>\gamma</math></b>	nyúl anti-humán CD3 $\gamma$ (H-80) (Santa Cruz Biotechnology)	kecske anti-nyúl IgG HRP (Sigma-Aldrich)

**3. táblázat: Western blot-hoz használt antitestek összefoglalása.**

### 3.5 Áramlási citometria

A sejteket hideg 0,5% BSA PBS oldatban mostuk, majd 4°C-on jelöltük a megfelelő antitestekkel 30 percig. Egyszeri mosást követően, a méréseket BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) áramlási citométerrel végeztük. Az eredményeket FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) program segítségével értékeltük ki. A hisztogramokon a különböző eseményszámok eloszlásának együttes megjelenítéséhez a

méréshez tartozó az egyes rekesztartományokban detektált események számát, a legmagasabb eseményszámot (azaz a legtöbb elemet) tartalmazó intervallumban található elemszámmal osztjuk el, így fluoreszcencia-intenzitás eloszlásai a "maximum" százalékában kifejezve ábrázolhatóak (maximum %-a). Az áramlási citometria során felhasznált reagenseket a 4. táblázat foglalja össze.

### *3.5.1 Életképesség meghatározása*

A sejteket annexin-kötő pufferben mostuk két alkalommal, majd Annexin V FITC festékkel jelöltük 30 percig szobahőn, szintén annexin-kötő pufferben. Mosás után a sejteket annexin-kötő pufferben mértük és a mérés előtt 5 perccel PI-ot adtunk a csövekhez.

### *3.5.2 Intracelluláris $Ca^{2+}$ szint mérése*

A sejteket RPMI 10% FBS-t tartalmazó tápoldatban egyszer mostuk, majd  $1 \times 10^6$ /ml koncentrációban osztottuk szét és  $1 \mu\text{M}$  Fluo-4 AM jelenlétében 30 percig inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on. A feltöltött sejteket két alkalommal mostuk és tömény FBS oldatban további 20 percig  $37^\circ\text{C}$ -on tartottuk. Újabb két mosási lépést követően tápoldatban vettük fel a sejteket. A mérés során az alapvonal rögzítését követően  $1-5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3-at adtunk a sejtekhez, végül a maximális válasz meghatározásához  $0,5 \mu\text{g/ml}$  ionomicint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adagoltunk a csövekhez.

### *3.5.3 Sejt proliferáció mérése*

PBMC sejteket  $0,1\%$  BSA-t tartalmazó PBS oldatban szuszpendáltunk fel, és a sejtmembránon átjutni képes CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) festéket ( $5 \mu\text{M}$ ) adtunk hozzájuk. Fél óra  $37^\circ\text{C}$ -os inkubáció után a sejteket centrifugáltuk és kétszer mostuk RPMI 10% FBS oldatban. Ezután tömény FBS oldatban tartottuk a sejteket további fél órán át  $37^\circ\text{C}$ -on, majd újból megmostuk őket RPMI 10% FBS tartalmú tápban.  $40 \text{ ng/ml}$  TNF jelenlétében 2 órán át inkubáltuk a sejteket, ezután  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3-mal aktiváluk őket.

<b>Primer antitest/festék</b>	<b>Gyártó</b>
<b>egér anti-CD3<math>\epsilon</math> FITC (HIT3a)</b>	BD Biosciences (San Jose, California, USA)
<b>anti-humán CD4 PerCP (SK3)</b>	BD Biosciences
<b>anti-humán TNFR1 FITC (55R-170)</b>	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
<b>anti-humán TNFR2-PE</b>	BD Biosciences
<b>anti-humán CD34-FITC</b>	BD Biosciences
<b>anti-humán Fc<math>\epsilon</math>RI-PE</b>	BD Biosciences
<b>anti-humán CD117 APC (c-kit)</b>	BD Biosciences
<b>Annexin V FITC</b>	BD Biosciences
<b>Fluo-4 AM</b>	Invitrogen, Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA)
<b>CFSE</b>	Invitrogen, Molecular Probes

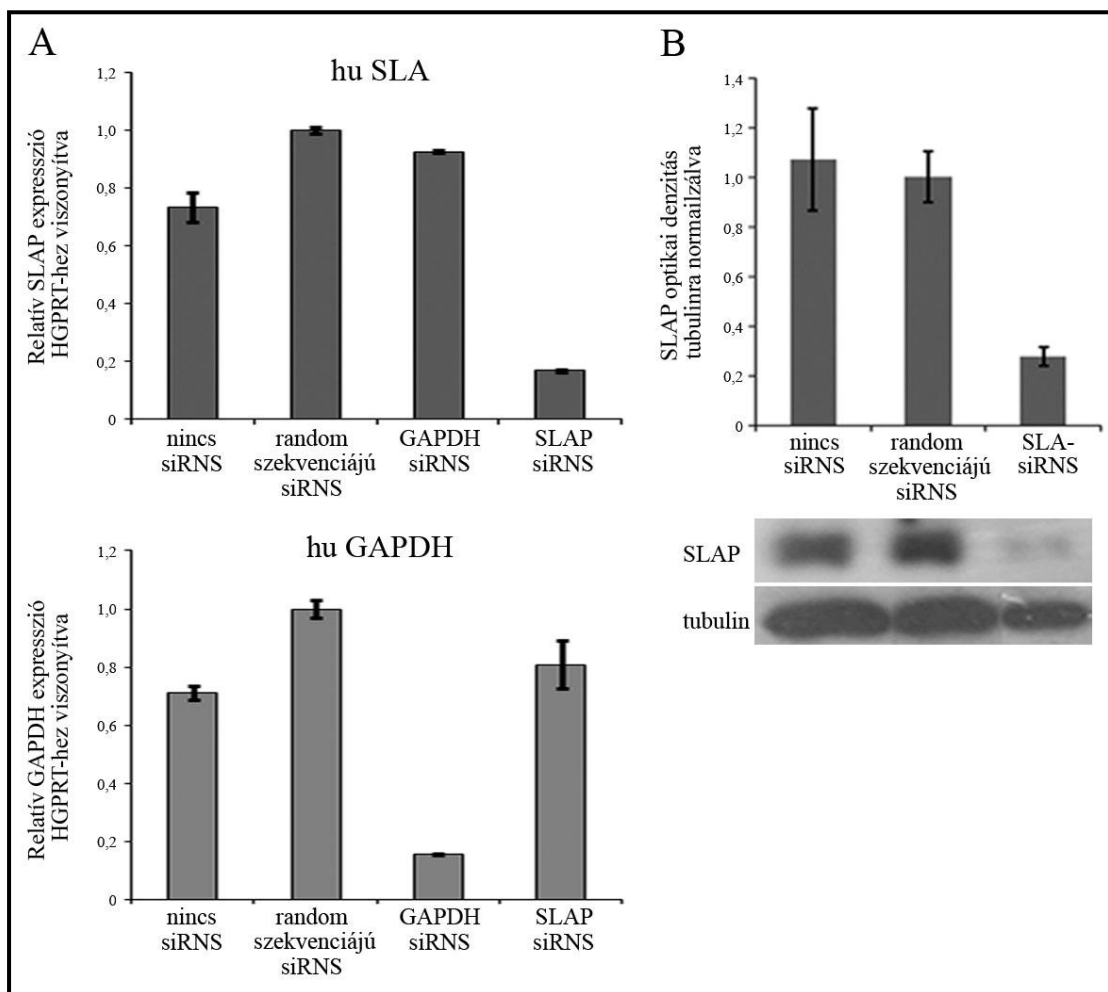
**4. táblázat: Az áramlási citometriához használt antitestek áttekintése.**

### **3.6 Transzfekció**

A Jurkat sejteket a gyártó által előírt protokollnak megfelelően transzfektáltuk Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Basel, Switzerland) segítségével, Amaxa Nucleofector Device II (Lonza, Basel, Switzerland) elektroporátorral X-001 programon, majd éjszakán át 20% savót tartalmazó tápoldatban tartottuk őket a kezelések előtt.

#### *3.6.1 Kis interferáló RNS (siRNS)*

A SLAP csendesítéséhez a sejteket tranziensen transzfektáltuk vagy két különböző random szekvenciát tartalmazó siRNS-sel (300-300 nM) vagy két különböző a SLAP-ra specifikus siRNS-sel (300-300 nM) (mindegyik Life Technologies, Applied Biosciences, Carlsbad, CA, USA). A csendesítés hatékonyságát valós idejű RT PCR-rel és Western blottal is igazoltuk (5. ábra).



**5. ábra: A transzekció hatékonyságának ellenőrzése.** (A) Jurkat sejteket két random szekvenciájú, két a GAPDH-ra, vagy két a SLAP-ra specifikus siRNS-sel transzekáltuk, és éjszakán át 37°C-on pihentettük őket. Ezután RNS-t izoláltunk és valós idejű PCR-rel vizsgáltuk a SLAP illetve a GAPDH expresszióját. (B) Jurkat sejteket vagy két random szekvenciájú vagy két a SLAP-ra specifikus siRNS-sel transzekáltuk. Kontrollként nem transzekált sejteket is vizsgálatunk. Az éjszakán át történő inkubációt követően fehérjét izoláltunk és Western blot rendszerben néztük a SLAP fehérje expresszióját.

### 3.6.2 DNS Vektorok

A sejteket vagy *enhanced* GFP (eGFP)–SLAP felhasználásra kész, teljes hosszúságú, nyitott leolvasási keretű cDNS vektorral vagy kontroll eGFP vektorral (mindkettő 10



$\mu\text{g}$ ; GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) transzfektáltuk, majd éjszakán át pihentettük őket. Az transzfekció hatékonyságát áramlási citometriával ellenőriztük.

### 3.7 Konfokális mikroszkópia

A Jurkat sejteket a kísérleteket követően PBS-sel mostuk, majd BD Cell-Tak<sup>®</sup> (BD Biosciences, San Jose, California, USA) oldatban reszuszpendáltuk és 8 kamrás sejt tenyésztő edény (BD Biosciences, San Jose, California, USA) lyukaiba vittük fel  $0,5 \times 10^6$ /lyuk koncentrációban, majd 1 órán át inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on. A lyukakat egyszer mostuk hideg PBS-sel, majd Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, California, USA) oldatot mértünk rájuk és fél órán át tartottuk jégen. A mosásokat minden esetben Perm/Wash (BD Biosciences, San Jose, California, USA) oldattal végeztük, és a festéseket (1% BSA Perm/Wash oldatban) követően 10% FBS 0,01% nátrium-azid PBS pufferben mértük a sejteket. A felvételeket négy optikai csatornával felszerelt FluoView 500 konfokális lézerpasztázó mikroszkópon (Olympus, Hamburg, Germany) készítettük,  $60\times$ -os olaj-immersziós objektíven, magas numerikus apertúra (NA:1,45) beállítással. A kolokalizációs vizsgálatok során Pearson-féle korrelációs koefficiens (CI) kalkuláltunk.  $\text{CI}=-1$  esetében a két jelölt objektum a térben egymást kizáró módon helyezkedik el, míg  $\text{CI}=0$ -nál elhelyezkedésük egymástól független.  $\text{CI}=1$  a két jelölés teljes átfedését jelenti. Az módszernél alkalmazott jelölések az 5. táblázatban találhatóak.

#### 3.7.1 A CD3 $\zeta$ -lánc lokalizációjának és mennyiségének meghatározása

A sejteket 40 ng/ml TNF-fel kezeltük (4, 24 óra), majd fixálás előtt a sejtmembránt CTX Alexa488-al jelöltük. Primer antitestként anti-CD3 $\zeta$  antitestet vagy izotípus kontrollt használtunk, amellyel 2 órán át jelöltük szobahőn a sejteket. Anti-egér IgG Alexa555 antitesttel, illetve a sejtmag vizualizálására Draq5 festéssel folytattuk a jelölést 1 órán át.

A  $\zeta$ -lánc relatív mennyiségének meghatározásához, az integrált fluoreszcencia intenzitást FluoView 5.0 (Olympus, Hamburg, Germany) software segítségével mértük

a kezeletlen és a TNF-fel kezelt sejtek között, ahol az egyedi sejtek voltak egységként (ROI) definiálva.

### *3.7.2 A CD3 $\zeta$ -lánc és a SLAP kolokalizációjának meghatározása*

Az előző napon a SLAP-GFP vektorral, illetve kontroll vektorral transzfektált sejteket TNF-fel kezeltük (40 ng/ml, 4 óra), majd a 3.7.1 alpontban leírtaknak megfelelően jelöltük, azonban ebben az esetben CTX festést nem alkalmaztunk. A kolokalizáció mértékének meghatározásához az ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) software CDA plugin-jét használtunk és ebben az esetben is egyedi sejtek kerültek ROI-ként definiálásra a kiértékelés során.

### *3.7.3 A CD3 $\zeta$ és a lizoszóma kolokalizációjának vizsgálata*

A kísérletek egy részében a lizoszóma jelölését oly módon végeztük, hogy 3 órás TNF (40 ng/ml) kezelés után a sejtekhez LysoTracker festéket (75 nM) adtunk, és további 1 órán át inkubáltuk őket 37°C-on. Más esetben LAMP1-PE festést alkalmaztunk (2 óra, szobahő). A CD3 $\zeta$  festéséhez az antitestet direkt fluoreszcensen jelöltük Mix-n-Stain CF Dye Ab Labeling Kit CF488A (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) segítségével (2 óra szobahő). A sejtmagot itt is Draq5 festékekkel tettük láthatóvá. Pozitív kontrollként a sejteket anti-CD3 antitesttel aktiváltuk, amely indukálja a CD3-lizoszómába kerülését. A kiértékelés során CI-t kalkuláltunk, és ezt ábrázoltuk.

Célfehérje	Kimutatás módja	Primer antitest	Szekunder antitest	Ábrázolt szín
<b>CD3<math>\zeta</math></b>	antitest	egér anti-humán CD3 $\zeta$ (6B10.2) (Santa Cruz Biotechnology)	kecske anti-egér IgG AlexaFluor555 (LifeTechnologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	piros
	antitest	hőrcsög anti-humán/egér CD3 $\zeta$ CF488A (H146-968; Acris Antibodies, Herford, Germany)	–	piros
<b>SLAP</b>	GFP-tag	–	–	zöld
<b>Golgi</b>	antitest	egér anti-Golgi 58K marker fehérje (Abcam, Cambridge, UK)	kecske anti-egér IgG AlexaFluor647 (LifeTechnologies, Invitrogen)	zöld
<b>lizoszóma</b>	LysoTracker (Life Technologies, Invitrogen)	–	–	piros
	antitest	egér anti-humán LAMP1-PE (H4A3, Santa Cruz Biotechnology)	–	piros
<b>sejtmembrán</b>	kolera toxin (CTX) AlexaFluor488, vagy AlexaFluor555 (Life Technologies, Invitrogen)	–	–	zöld vagy kék
<b>sejtmag</b>	Draq5 (Biostatus, Leicestershire, U.K.)	–	–	kék

**5. táblázat: Konfokális mikroszkópiához használt jelölések.**

### 3.8 Kvantitatív valós idejű RT PCR

#### 3.8.1 *mRNS expresszió mérése*

Különböző idejű (4-72 óra) és koncentrációjú (2,5-80 ng/ml) TNF kezelést követően a sejtekből RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével vontuk ki az mRNS-t. Az minták RNS tartalmát és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg, és 260/280 nm emissziós arány  $>1.8$  esetében dolgoztunk vele, egyébként a mintákat tisztítottuk. Mintánként 1  $\mu\text{g}$  RNS-t írtunk át cDNS-sé 55 perces  $42^\circ\text{C}$ -on történő reakciós idő, majd 5 perces  $95^\circ\text{C}$ -on végzett enzim inaktiválás során. A reakcióhoz 5 mM  $\text{MgCl}_2$ -t, 1 mM dNTP-t, random hexamer oligonukleotidot, RNasin RN-áz gátlót és reverz transzkriptázt (valamennyi: Promega, Madison, WI, USA) használtunk 40  $\mu\text{l}$  végtérfogatban. Az így kapott cDNS-ből 2  $\mu\text{l}$ -t SensiFast Hi-Rox PCR master mix-el (Bioline Reagents Ltd, London, UK) és a specifikus primerekkel (CD247 (Hs00609515\_m1); SLAP (Hs00277129\_m1); HGPRT (Hs99999909\_m1)) elegyítve, (mindegyik Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) standard valós idejű PCR protokollal futtattunk ABIPrism 7000 típusú berendezésen. A PCR reakciókat 96 lyukú lemezen végeztük. A teljes térfogat 25  $\mu\text{l}$ /lyuk volt. A PCR protokollt templát nélküli negatív kontrollok esetében is elvégeztük. Valamennyi mintából három párhuzamost mértünk. A kapott eredményeket a komparatív CT ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ) módszer segítségével értékeltük ki, az eredményt minden esetben a megfelelő háztartási gén mRNS (HGPRT) szintre vonatkoztatva.

#### 3.8.2 *MikroRNS expresszió mérése*

Total RNS izolálásához a sejteket Qiazol lizáló oldatban vettük fel és a gyártó utasításait betartva miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével izoláltuk, majd szintén NanoDrop-pal mértük az RNS tartalmat és minőséget. 10 ng RNS-sel dolgoztunk tovább, amit először TaqMan mikroRNS reagensek segítségével (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Applied Biosystems), specifikus RT primerekkel reverz transzkripciónak (RT) vetettük alá ( $16^\circ\text{C}$  30 perc,  $42^\circ\text{C}$  30 perc,  $85^\circ\text{C}$  5 perc). Ebből a reakcióból származó 1,33  $\mu\text{l}$  térfogattal végeztük a PCR amplifikációt, az mRNS módszernél leírtaknak megfelelően,

15 µl végtérfogatban. A következő specifikus assay-eket használtuk: hsa-miR-181a, hsa-miR-155, hsa-mir-146a, hsa-miR-132; az expressziós értékeket hsa-RNU6B kontrollhoz viszonyítottuk.

### **3.9 MikroRNS target predikció**

Az online elérhető target predikció pontosságának növelése céljából a különböző algoritmusokat használó programokkal (pl. PicTar, MiRBase, TargetScan) azonosított valószínű targetekből vagy miRNS-ekből listát állítottunk fel. A listán különböző azonosítókkal szereplő cél mRNS-ek közös rendszerbe konvertálása a BioMART adatbázis segítségével történt, de a mirDIP fúziós adatbázis használatára is sor került. A különböző kapcsolódási valószínűséget meghatározó pontokból rangsort állítottunk fel.

### **3.10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

A PBMC sejtek izolálását követően a sejteket két részre osztottuk: egyik részükhöz PHA-t adtunk 26 órára, másik részükhöz pedig 2 óra PHA elő-aktivációt követően TNF-et adtunk 24 órára. Másnap a sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben, majd a csak PHA-val kezelt csoportot újból kétfelé vettük: egyik felét kezeletlenül hagytuk, másik felét pedig 5 µg/ml anti-humán CD3-mal (UCHT1, BD Biosciences) aktiváltuk. A TNF-fel is kezelt sejteket szintén megfeleztük, és egyik részüket az előzőnek megfelelően aktiváltuk. Az aktiváció 6, 24, 72 óráig tartott. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk és a felülúszókból IL-2 ELISA-t (BD OptEIA Human IL-2 ELISA Kit, BD Biosciences) készítettünk a gyártó cég előírásainak megfelelően. A minták pontos IL-2 tartalmát Multiskan Transmit MS microplate olvasón (Laboratory Systems Group Pty Ltd, Kilsyth, Victoria, Australia) 405 nm-en mérve, az ELISA kit saját standard görbéjével összehasonlításban állapítottuk meg. Az IL-2 mennyiségét a teljes felülúszóban 1 ml-re vonatkoztatva pg-ban adtuk meg.

### **3.11 Statisztika**

A statisztikai módszerek a kísérleti körülmények figyelembevételével alkalmaztuk. A következő módszereket használtuk: Student-féle t-teszt, Mann–Whitney U rank-sum teszt, Wilcoxon matched pairs teszt és ANOVA.

## 4. Eredmények

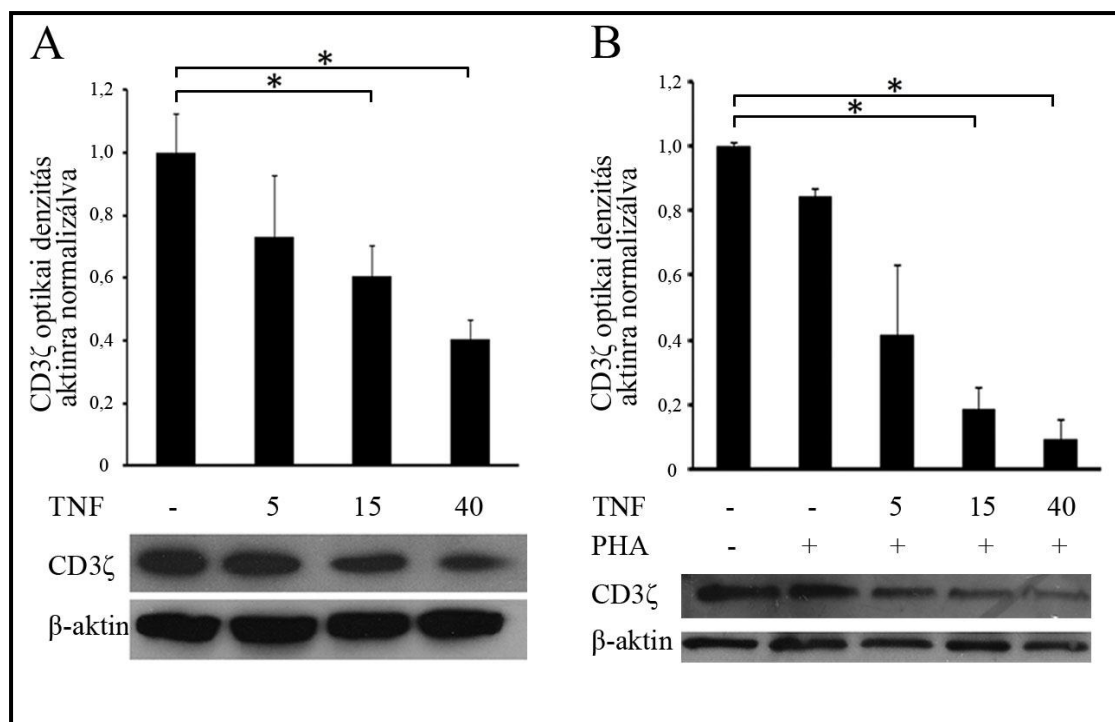
### 4.1 A CD3 $\zeta$ -lánc szabályozása T-limfocitákban

#### 4.1.1 A TNF szabályozza a CD3 $\zeta$ -lánc expresszióját.

Munkánk kezdetekor arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a bizonyos autoimmun betegségekben megfigyelhető kóros T-limfocita funkció, illetve a sejtek környezetében nagy koncentrációban jelen lévő TNF $\alpha$  összefüggésbe hozható-e egymással, valamint, hogy a jelátvivő láncok érintettsége releváns-e ilyen körülmények között.

##### 4.1.1.1 TNF hatása a $\zeta$ -lánc mennyiségére

Elsőként megvizsgáltuk, hogy a TNF direkt módon befolyásolja-e a CD3 jelátvivő láncainak mennyiségét Jurkat sejteken. Ahogyan a 6A ábrán jól látható, a különböző koncentrációjú TNF hatására dóziszfüggő módon csökken a  $\zeta$ -lánc mennyisége, ami 40 ng/ml koncentrációnál éri el maximumát, azonban már 15 ng/ml-nél szignifikáns különbséget eredményez. Tekintettel arra, hogy a sejtvonalak, habár sok esetben jól reprezentálják az *in vivo* lezajló eseményeket, számos szempontból különböznek a primer sejtektől, megvizsgáltuk a jelenséget PBMC sejteken is. Míg a Jurkat sejtek konstans módon expresszálják mindkét típusú TNF receptort, primer sejtek esetében eltérő irodalmi adatok állnak erről rendelkezésre, ezért PHA-val növeltük a receptorok expresszióját (4. ábra). PBMC sejtek esetében is látható (6B ábra), hogy a TNF szintén szignifikánsan csökkenti a CD3 $\zeta$  mennyiségét, sőt a hatás kifejezettebbnek mutatkozik.

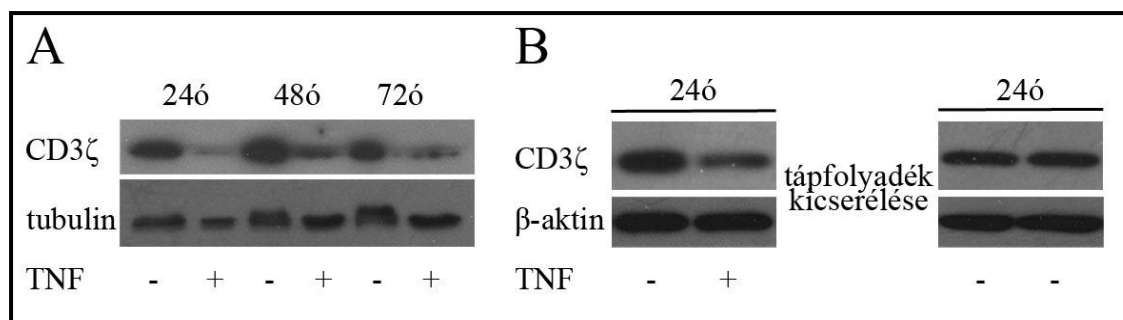


**6. ábra:** A  $TNF\alpha$  dóziszfüggően csökkenti a  $CD3\zeta$  expresszióját humán *T*-limfocitákon. Reprezentatív Western blot és az aktinra normalizált optikai denzitás értékek (átlag $\pm$ SEM) (A) Jurkat, (B) PBMC sejtek különböző koncentrációjú TNF-fel történő 24 órás kezelését követően. A diagramok három független kísérlet eredményeit ábrázolják (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.2 A $TNF\zeta$ -láncra gyakorolt hatásának időbeli vizsgálata

Figyelembe véve, hogy a  $\zeta$ -láncok *in vivo* ciklikus expressziót mutatnak és különböző hatások következtében internalizálódhatnak, majd újra a sejtfelszínre kerülhetnek, kíváncsiak voltunk arra, hogy a TNF hatása csak az ismételt sejtfelszínre történő kerülés időtartamig befolyásolja-e az expressziót, vagy hosszú távon csökkenti a láncok mennyiségét. Western blot rendszerben különböző idejű TNF kezelésnek kitéve a sejteket, meggyőződünk róla, hogy amíg a TNF jelen van a sejtek környezetében ez a hatás fenntartott (7A ábra). Azt a kérdést is szeretnénk tisztázni, hogy abban az esetben, ha eltávolítjuk a TNF-et a rendszerből, mi történik a  $\zeta$ -lánc expresszióval. Eredményeink szerint a TNF kezelésre mérhető  $\zeta$ -lánc csökkenés teljesen reverzibilis (7B ábra).

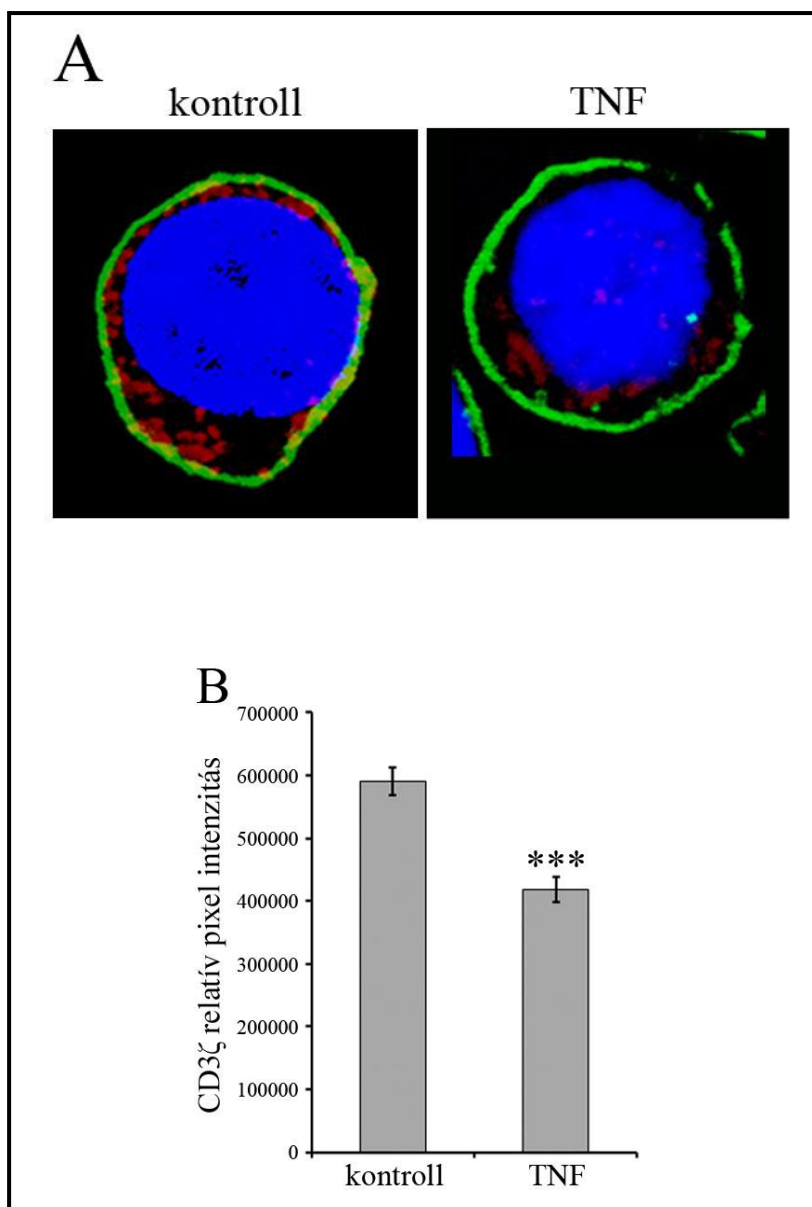




**7. ábra: A TNF $\alpha$  hatásának időbeli vizsgálata.** (A) Jurkat sejteket kezeltünk különböző időtartamig 40 ng/ml TNF-fel, majd Western blot rendszerben vizsgáltuk CD3 $\zeta$  expresszióját. (B) Jurkat sejteket 24 órás 40 ng/ml TNF kezelésnek vettünk alá vagy kezeletlenül hagytuk, majd a sejtek egy részét fehérje lízis pufferben lizáltuk, másik felét pedig kétszeri PBS mosás után további 24 órán át tenyésztettük. Reprezentatív Western blot, mindkét kísérletet két független alkalommal végeztük el.

#### 4.1.1.3 A CD3 $\zeta$ sejt felszíni csökkenésének és internalizációjának vizsgálata

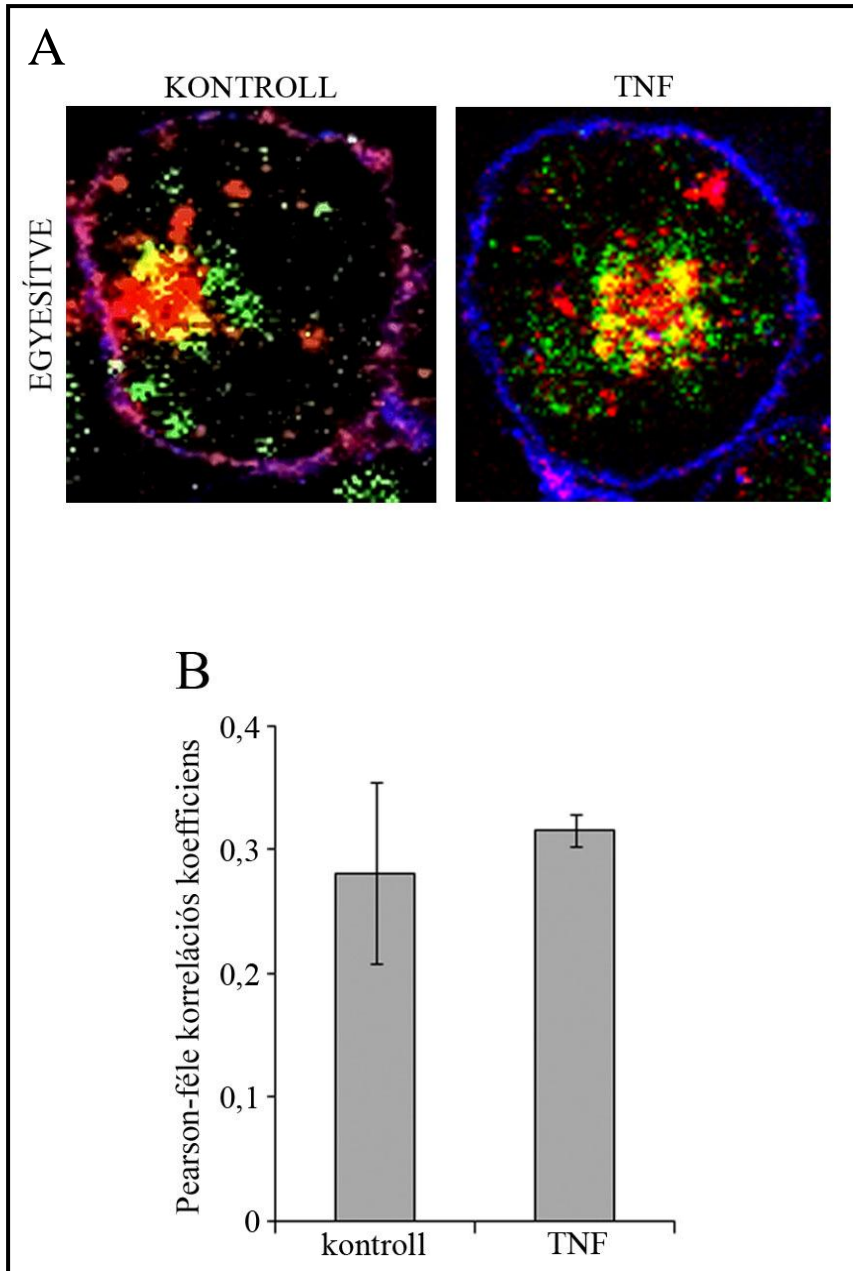
Annak céljából, hogy ezen kiindulási eredményünket tovább igazoljuk, illetve, hogy a sejtben lezajló folyamatokra jobb rálátásunk legyen, konfokális mikroszkópiával is láthatóvá tettük a TNF hatását. A 8A ábrán megfigyelhető, hogy 4 órával a TNF sejtekhez való hozzáadását követően a  $\zeta$ -láncok internalizálódnak. A kezeletlen mintához képest, ahol a láncok legfőképpen a sejtmembrán belső részéhez asszociáltnak helyezkednek el, a TNF-fel kezelt sejtekben inkább citoplazmatikus lokalizációt mutatnak. Megvizsgáltuk a sejtekben található összes  $\zeta$ -lánc mennyiségét is ezzel a módszerrel. Eredményeink szerint a kezeletlen csoporthoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb  $\zeta$ -lánc festődési intenzitás értékek mérhetőek az erre specifikusan alkalmazható software segítségével mérve (8B ábra), ami megerősíti az előzőekben kapott Western blot eredményeinket.



**8. ábra:** A TNF elősegíti a ζ-láncok internalizációját. Jurkat sejteket konfokális mikroszkópiához a következő módon jelöltük: sejtmembrán CTX (zöld), CD3ζ (piros), sejtmag (kék). (A) Reprezentatív konfokális mikroszkópia felvétel 4 órás 40 ng/ml TNF kezelést követően. Eredeti nagyítás:  $\times 6348$ . (B) 24 órás 40 ng/ml TNF kezelést követően úgy hasonlítottuk össze a kezeletlen sejtek és a TNF-et kapott sejtek integrált pixel intenzitás értékeit, hogy egyedi sejteket ( $>100$  sejt/csoport) definiáltunk ROI-ként. A diagramon a pixel intenzitás átlaga ( $\pm$ SEM) látható (\*\*\*) $p=0,00002$ .

#### *4.1.1.4 Az intracellulárisan elhelyezkedő ζ-láncok vizsgálata*

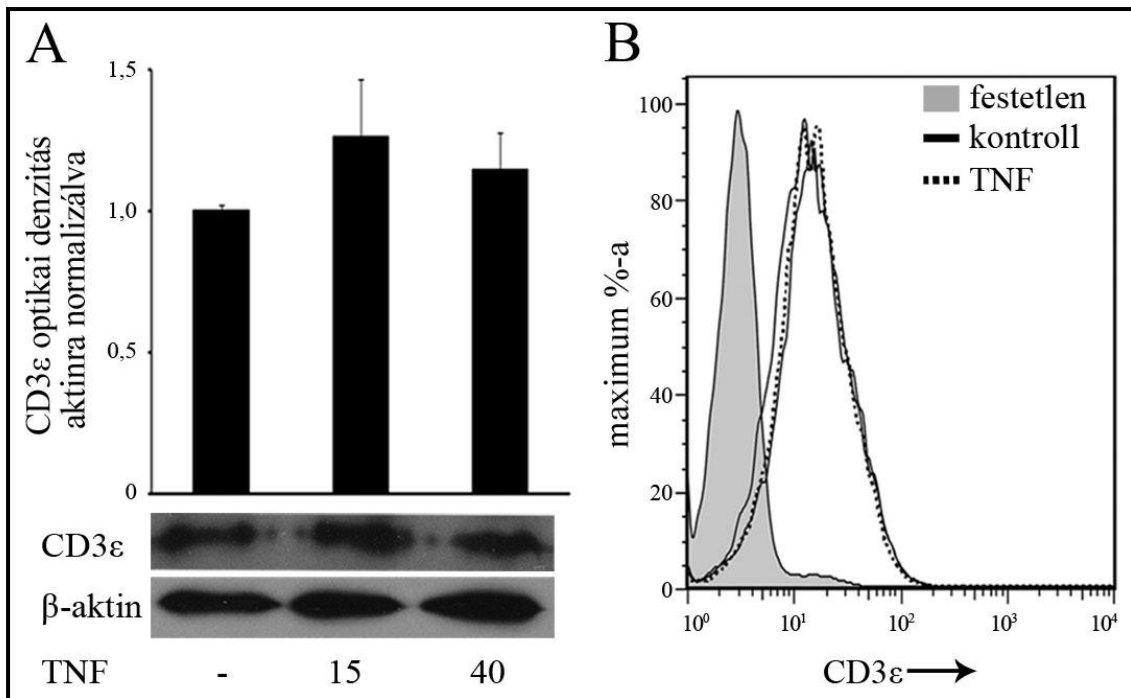
Abból kiindulva, hogy a CD3ζ-lánc egy jelentős része az intracelluláris raktárakban foglal helyet felmerült, hogy a 8A ábrán megfigyelhető internalizáció és sejtfelszíni megjelenés csökkenése mellett, esetleg a Golgi-vezikulumokban található (7) láncok mennyisége is csökkenhet. Ennek lehetőségét konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk TNF kezelést követően, Jurkat sejteken (9. ábra). A felvételekből látható, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően, a ζ-láncok egy jelentős hányada megtalálható a Golgi membránrendszerével asszociáltan, azonban a TNF kezelés nem érinti az itt raktározott láncok mennyiségét.

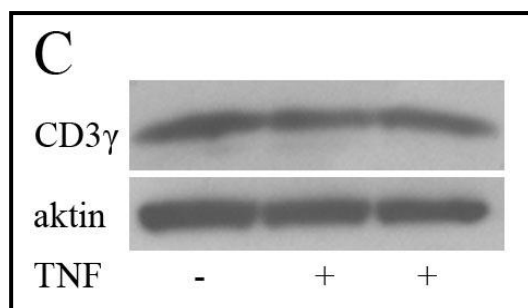


**9. ábra:** A TNF nem csökkenti a Golgi apparátusban lévő CD3 $\zeta$  mennyiségét. (A) Jurkat sejtek 24 órás TNF (40 ng/ml) kezelését követően a sejteket konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk, ahol a sejtmembránt (CTX, kék), a Golgi markereként használt 58K fehérjét (Golgi 58K, zöld) és a CD3 $\zeta$ -láncot (piros) jelöltük (kolokalizáció: sárga). (B) A kolokalizáció mértékének számszerűsítése (>100 sejtet vizsgálva, CI értékek ábrázolva).

#### 4.1.2 A TNF nem befolyásolja a CD3 komplex egyéb láncainak mennyiségét.

Tekintve, hogy a CD3 molekula komplex láncai funkcionális egységet alkotnak és az irodalomban több, eltérő adat ismeretes arról, hogy a CD3 láncok együtt vagy külön-külön internalizálódnak-e, megvizsgáltuk, hogy a CD3 $\epsilon$  és  $\gamma$ -lánc expresszióját hogyan befolyásolja TNF. Elsőként összefehérje szinten határoztuk meg a CD3 $\epsilon$  mennyiségét Western blot rendszerben, Jurkat sejteken, 24 órás TNF kezelést követően (10A ábra). Látható, hogy a TNF hatására nem változik az  $\epsilon$ -lánc mennyisége a sejtben. További fontos kérdés a sejt felszíni expresszió változása, amely az  $\epsilon$ -lánc esetében direkt jelöléssel mérhető. PBMC sejteken vizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációjú TNF kezelés befolyásolja-e a CD3 $\epsilon$  sejt felszíni expresszióját (10B ábra). Az összefehérje szinten tapasztaltakkal megegyezően, itt sem következett be változás a TNF hatására. A független szabályozás megerősítésére további vizsgálatokat végeztünk a CD3 $\gamma$ -lánc esetében szintén Western blottal (10C ábra), ami igazolta a feltevést, hogy a mi kísérleti rendszerünkben  $\zeta$ -lánc külön szabályozódik a többi CD3 lánctól. Eredményeink arra utalnak, hogy a TNF szelektíven szabályozza a CD3 $\zeta$  expresszióját.





**10. ábra: A TNF nem befolyásolja CD3 $\epsilon$  és  $\gamma$ -lánc expresszióját.** (A) Jurkat sejtek 24 órás TNF (40 ng/ml) kezelését követően fehérjét izoláltunk és Western blottal vizsgáltuk a CD3 $\epsilon$  mennyiségét teljes sejt lizátumokból. A diagramon az aktinra, majd kontrollra normalizált optikai densitás értékek láthatóak ( $\pm$ SD) három független kísérlet eredményeként, míg alatta egy reprezentatív Western blot található. (B) PBMC sejtek reprezentatív (két független kísérlet alapján) FACS analízise 5 és 40 ng/ml (ábrán feltüntetett koncentráció) TNF kezelést követően. (C) A CD3 $\gamma$ -lánc mennyiségének meghatározása Western blot módszerrel 5, 40 ng/ml TNF kezelést (24 óra) követően.

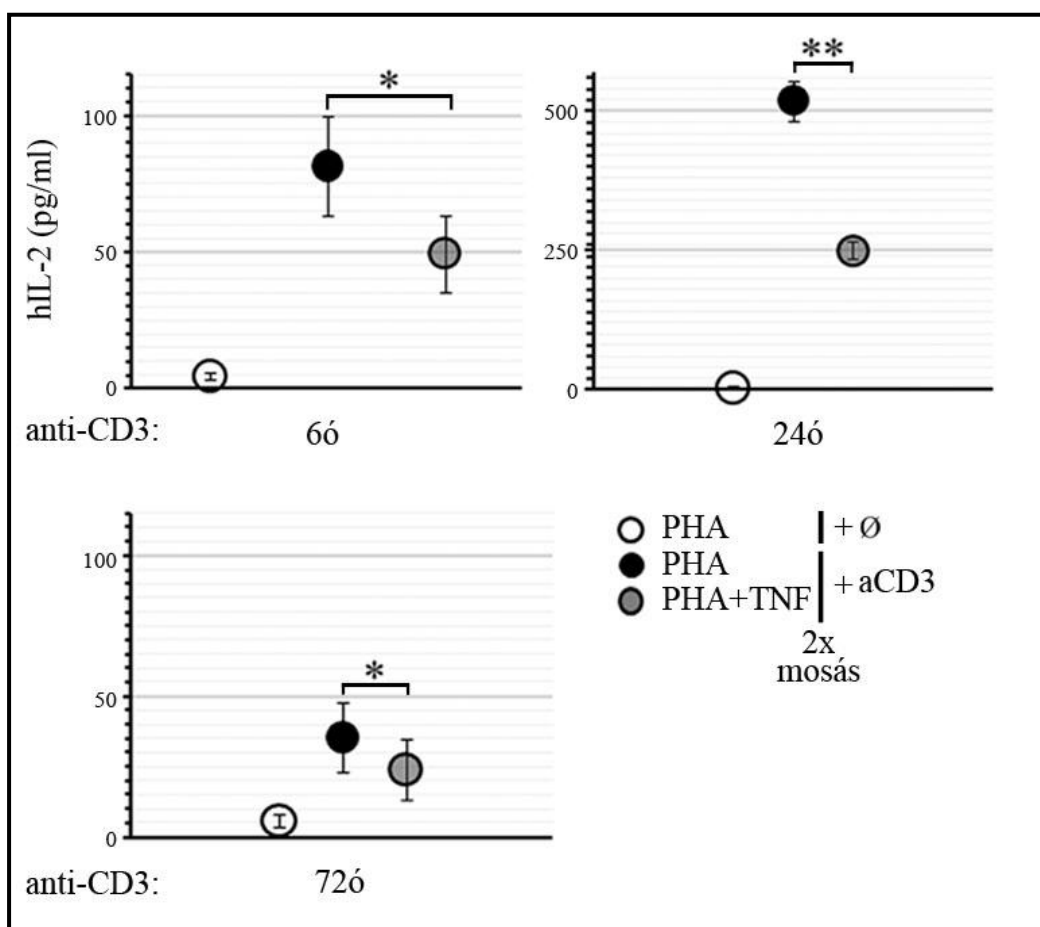
#### 4.1.3 A TNF befolyásolja a sejtek aktiválhatóságát, de nincs hatással proliferációs kapacitásukra.

Tekintettel arra, hogy a CD3 $\zeta$  három ITAM motívumával az egyik legfontosabb jelátvivő lánc T-limfocita aktiváció során, kíváncsiak voltunk arra, hogy a TNF környezetében létrejövő alacsonyabb  $\zeta$ -lánc szint befolyásolja-e a sejtek aktiválhatóságát.

##### 4.1.3.1 Az IL-2 termelés mérése

Az IL-2 az egyik legfontosabb Th1-es citokin, amely a sejtek proliferációs és túlélési szignálja. PBMC sejteket TNF-fel kezeltünk, hogy csökkentsük a  $\zeta$ -lánc mennyiségét (ennek visszamérése minden kísérletben megtörtént Western blot módszerrel), majd anti-CD3 segítségével aktiváltuk őket (6, 24, 72 óra) és a felülúszóból mértük az IL-2 szintjét. Minden esetben a TNF-fel előkezelt csoportokban az IL-2 szintje jóval alulmarad a csak aktivált csoportokhoz képest (11. ábra), ami legkifejezettebben a 24

óras aktivációt követően nyilvánul meg. A megfigyelés arra utal, hogy a sejtek aktivációja is érintett a TNF kezelés következtében.

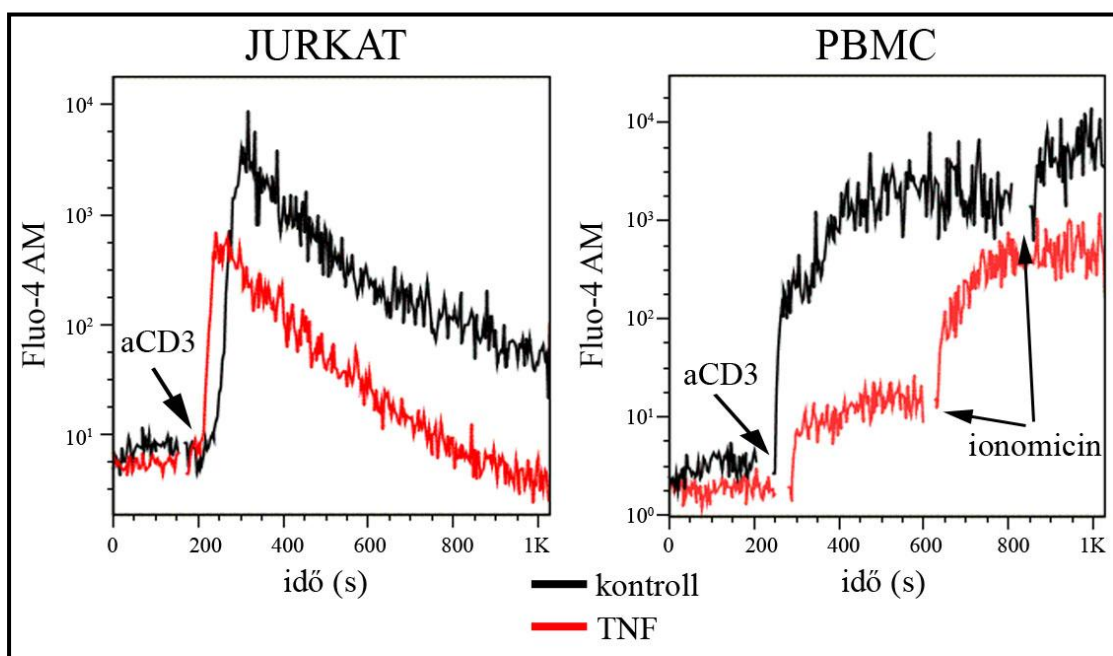


**11. ábra: A TNF csökkenti a sejtek IL-2 termelését.** Frissen izolált PBMC sejtek egy csoportja 2 óra PHA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) kezelést követően TNF-et is kapott további 24 órára, a másik csoportot pedig csak PHA-val stimuláltuk 26 órán át. Másnap a sejteket 2 $\times$  mostuk, majd különböző időtartamig anti-CD3-al (5  $\mu\text{g/ml}$ ) aktiváltuk őket vagy kezeletlenül hagytuk. A felülírókból ELISA rendszerben IL-2-t mértünk és két független kísérlet eredményeit ( $\pm\text{SEM}$ ) ábrázoltuk (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.1.3.2 A $\text{Ca}^{2+}$ -válasz vizsgálata

A sejtek válaszát az aktivációs szignálokra a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok intracelluláris raktárból való gyors felszabadulása jellemzi, ezért specifikus  $\text{Ca}^{2+}$  festékekkel mértük, hogy a 24 órán át TNF-fel kezelt sejtekben hogyan változik ez a folyamat. A reprezentatív felvételen

látható (12. ábra), hogy Jurkat sejtek esetében alacsonyabb amplitúdójú, gyorsabban lecsengő válasz figyelhető meg, ami egyrészt lehetséges az intracelluláris raktárakban alacsonyabb mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  miatt, másrészt magyarázhatja a felszabadulás mértékének gátlása is. PBMC sejtekben az aktiváció szintén nem éri el ugyanazt a szintet, mint a TNF-mentes sejtek esetén, tehát itt is amplitúdó csökkenésről beszélhetünk, amit azonban ebben az esetben nem követ egy hamarabb lezajló válasz. PBMC-ben továbbá, az ionomicin sem vált ki ugyan olyan mértékű  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást, mint a TNF-fel nem kezelt csoportban. A két sejtípus viselkedése közötti különbséget magyarázhatja, hogy PBMC sejtek esetében összetett sejt kultúráról van szó.

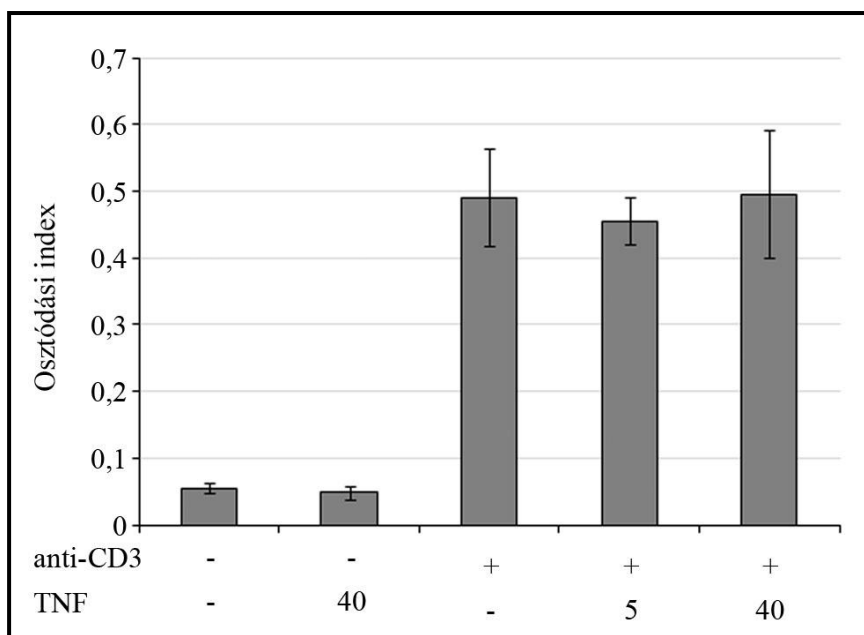


**12. ábra:** A TNF befolyásolja a  $\text{Ca}^{2+}$  választ. Jurkat vagy PBMC sejteket 24 órán át TNF-fel kezeltünk (40 ng/ml), majd Fluo-4 AM festékkel töltöttük fel őket. Áramlási citometriával mértük a felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségét, alapvonal felvétele után, a hozzáadott anti-CD3, illetve ionomicin hatására. Reprezentatív felvétel, amely három független kísérlet eredményét tükrözi.



#### 4.1.3.3 A sejt proliferáció vizsgálata

További funkcionális eltérést keresve megvizsgáltuk a sejtek proliferációs kapacitását is TNF jelenlétében. A PBMC sejteket CFSE festékkel töltöttük fel, és 2 órás TNF előkezelés után, anti-CD3 hozzáadásával aktiváltuk őket 24 órán át. Az osztódási indexből látható (13. ábra), hogy szemben az előzőekkel, nem találtunk különbséget az osztódás mértékét illetően a TNF hatására.

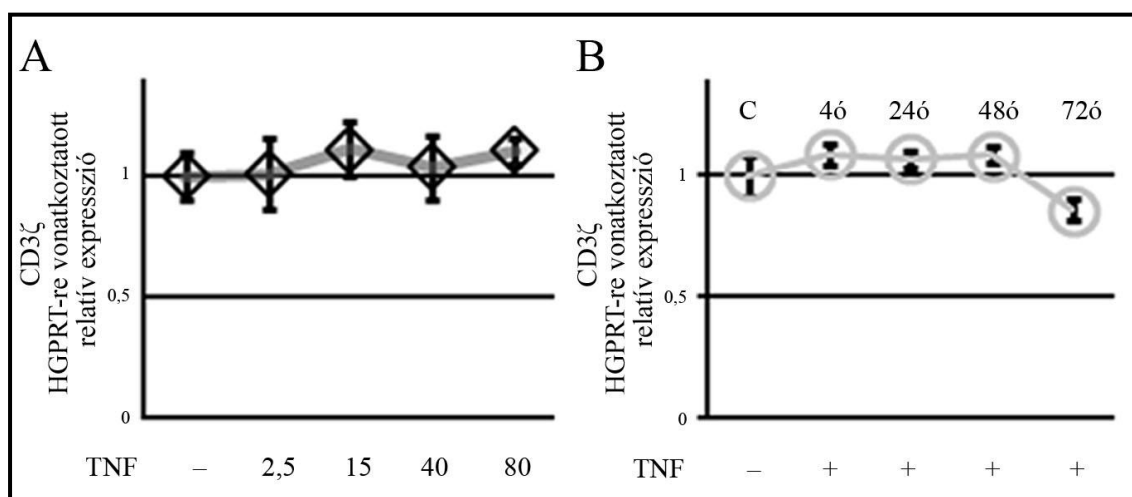


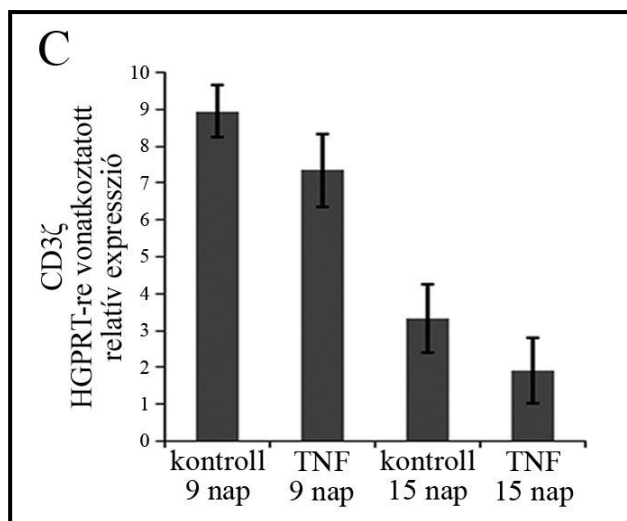
**13. ábra:** A TNF nem befolyásolja a sejtek proliferációs kapacitását. A sejteket CFSE jelölés után TNF-el kezeltül 2 órán át, majd 5 µg/ml anti-CD3-mat adtunk hozzájuk. A mérést áramlási citometriával végeztük, ahol az FL-1 csatornán mérhető értékeket a FlowJo program „proliferation”eszközével elemeztük és az osztódási index értékeit ábrázoltuk (átlag±SEM).

#### 4.1.4 Az mRNA expresszió változása és az NF- $\kappa$ B jelpálya nem játszik szerepet a TNF $\zeta$ -lánc csökkentő hatásában

##### 4.1.4.1 Az mRNA expresszió vizsgálata

Az előzőekben leírtak alapján a TNF szelektíven szabályozza a CD3 $\zeta$ -lánc expresszióját és befolyásolja a sejtek működését. Annak kiderítése céljából, hogy milyen mechanizmus áll a jelenség háttérében megvizsgáltuk, hogy ez a fehérjeszinten tapasztalható csökkenés összhangban van-e az mRNA expresszió csökkenésével. Ennek vizsgálatához Jurkat sejtek TNF kezelését követően valós idejű PCR-rel vizsgáltuk a CD3 $\zeta$  kifejeződését (14A és B ábra). Egyik esetben sem tapasztaltunk eltérést mRNA szinten. Korábbi egér kísérleteken alapuló publikáció (214) alapján felmerült annak a lehetősége, hogy mRNA szinten hosszabb időtartam szükséges a TNF CD3 $\zeta$  mRNA-re kifejtett hatásához. Ennek vizsgálatára primer humán CD4+ T-limfocitákon megvizsgáltuk, hogy krónikus TNF kezelés hatására hogyan változik a CD3 $\zeta$  expressziója. Mint azt a 14C ábra is jól mutatja, nem találtunk szignifikáns különbséget ebben az esetben sem, így eredményeink alapján a TNF fehérje szinten befolyásolja a  $\zeta$ -lánc expresszióját és a jelenség nem magyarázható az mRNA szinten bekövetkezett expresszió változással.

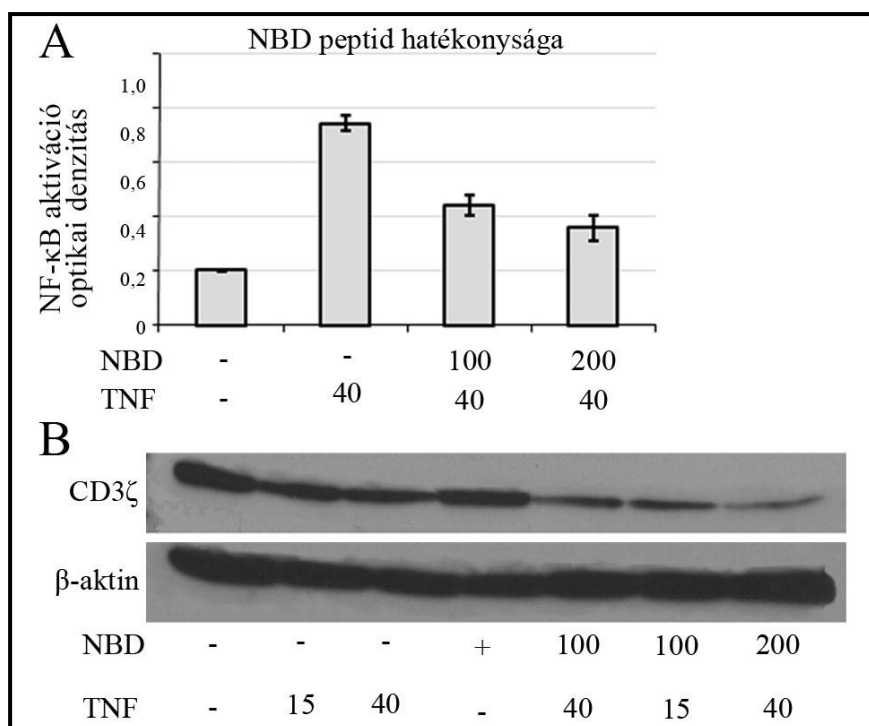




**14. ábra: A TNF nem befolyásolja CD3 $\zeta$  mRNS expresszióját.** Jurkat sejtek 24 órás (A) különböző koncentrációjú és (B) különböző ideig tartó 40 ng/ml TNF kezelése után RNS-t izoláltunk és valós idejű PCR-rel mértük  $\zeta$ -lánc expresszióját. (C) 9, illetve 15 napos 40 ng/ml-es TNF kezelést követően CD4<sup>+</sup> T-limfociták CD3 $\zeta$  expressziója. A diagramok három független kísérlet eredményéből származnak.

#### 4.1.4.2 Az NF- $\kappa$ B szerepének vizsgálata

A fehérje szintű változások háttérében állhat, a TNF jelátviteli útvonal során aktiválódó, NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor által befolyásolt fehérje, amely expressziójának megváltozása indirekt módon vezethet a  $\zeta$ -lánc csökkenéséhez. Ennek a feltevésnek a vizsgálatára NF- $\kappa$ B deficiensé tett Jurkat sejtekben határoztuk meg a  $\zeta$ -lánc mennyiségét TNF jelenlétében. A sejtekbe NBD peptidet (100, 200  $\mu$ M) vittünk be, majd különböző koncentrációjú (15, 40 ng/ml) 24 órás TNF kezelésnek vetettük alá őket. A Western blot vizsgálatból kiderül (15. ábra), hogy az NF- $\kappa$ B gátlása nem védi ki a TNF által elősegített  $\zeta$ -lánc csökkenést, sőt meglepő módon, inkább fokozza azt. Így feltehetően más útvonalak állnak a jelenség háttérében.



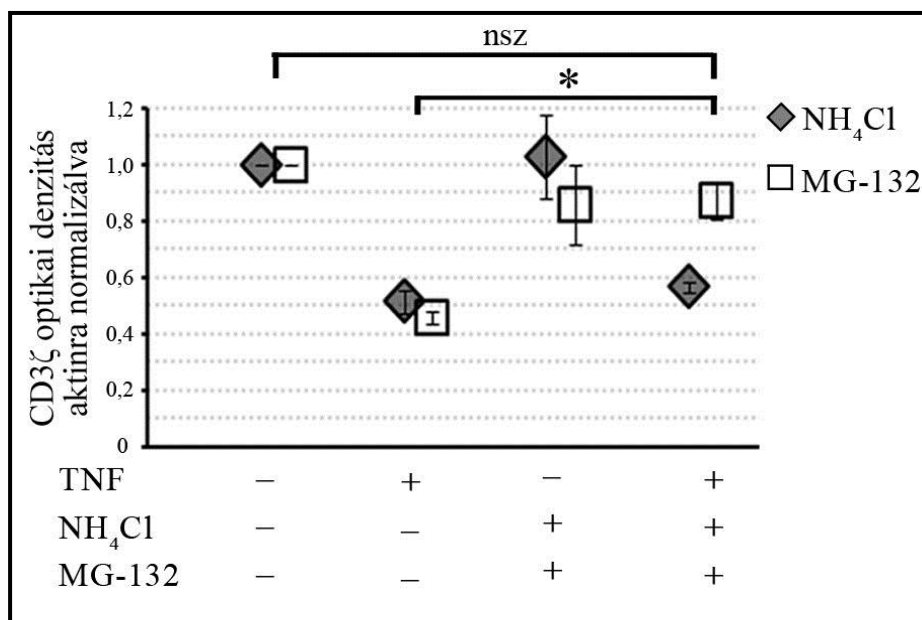
**15. ábra:** Az  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  szelektív gátlása nem csökkenti a TNF  $\zeta$ -láncra kifejtett expresszió csökkentő hatását. (A) Az NBD peptid hatékonyságának meghatározása. Az ábrán az NBD peptid és a TNF kezelést követő  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  aktiváció látható. (B) Jurkat sejtek 1 órás 100 illetve 200  $\mu\text{M}$  NBD peptiddel történő előkezelését követően TNF-fel kezeltünk (24 óra), majd a  $\zeta$ -lánc expressziót vizsgáltuk Western blot rendszerben.

#### 4.1.5 A TNF a proteaszómális degradáció elősegítésével csökkenti a CD3 $\zeta$ -láncot.

##### 4.1.5.1 Fehérje lebontási folyamatok gátlásának vizsgálata

Előző kísérleteinkből kiderül, hogy a TNF nem transzkripcionális úton szabályozza a  $\zeta$ -lánc mennyiségét, illetve láttuk, hogy elősegíti a láncok internalizációját, ezért megvizsgáltuk a lebontási folyamatok érintettségét. Irodalmi adatok szerint a  $\zeta$ -lánc mind lizoszómális, mind proteaszómális úton degradálódhat, ezért mindkét folyamatot gátoltuk Jurkat sejtekben, majd a TNF hatását vizsgáltuk Western blot rendszerben. A lizoszóma inhibitor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nem okozott változást a TNF által indukált  $\zeta$ -lánc csökkenésben, míg a szelektív proteaszóma gátlószer MG-132 megakadályozta ezt a

folyamatot (16. ábra). Mindebből úgy tűnik, hogy a TNF a lebontáson keresztül fejt ki  $\zeta$ -lánc csökkentő hatását, amelyben a proteaszómális degradáció dominál.



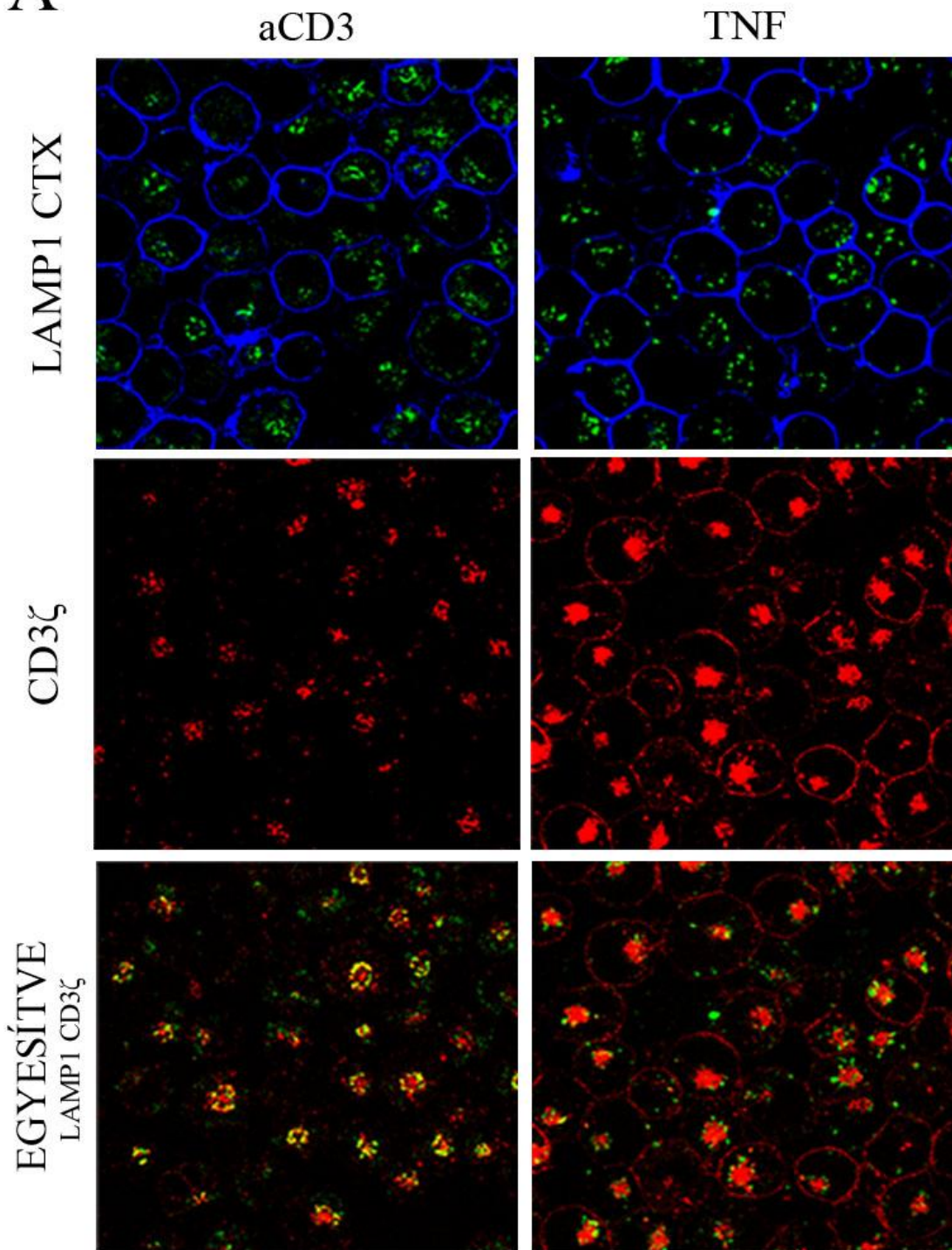
**16. ábra:** A TNF  $\zeta$ -lánc csökkentő hatása a proteaszóma gátlásával kivédhető. Jurkat sejteket NH<sub>4</sub>Cl-al (lizoszóma gátlása) vagy MG-132-vel (proteaszóma gátlása) 2 órán keresztül előkezeltünk, majd a TNF hozzáadása után 24 órát tenyésztettük. A fehérje izolálást követően Western blottot készítettünk, ahol a  $\zeta$ -lánc expressziót vizsgáltuk. A grafikonon a normalizált optikai denzitás értékek ( $\pm$ SEM) látszanak három független mérést követően (\* $p < 0,05$ ).

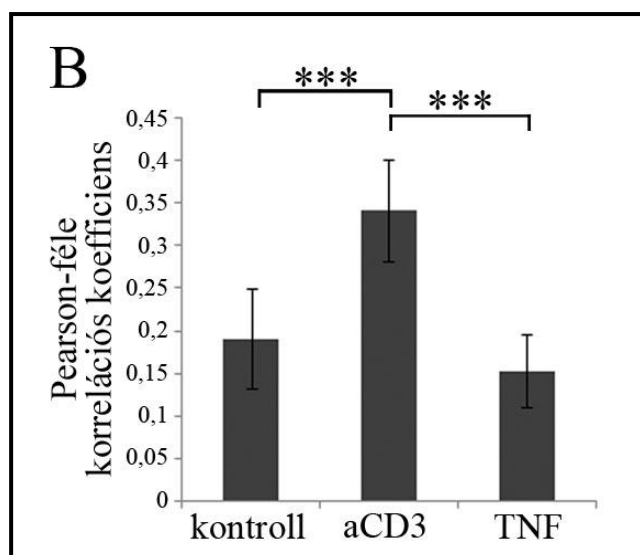
#### 4.1.5.2 A CD3 $\zeta$ lizoszómális lokalizációjának vizsgálata

Annak érdekében, hogy megerősítsük fenti eredményünket, konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a  $\zeta$ -láncok bomlását. Indirekt módon, a lizoszómába kerülés kizárásával igazoltuk eredményünket. A vizsgálat során a CD3 $\zeta$  és a LAMP1 lizoszóma asszociált fehérje kolokalizációját vizsgáltuk. Pozitív kontrollként anti-CD3 kezelést alkalmaztunk, amely az *in vivo* T-sejt aktivációhoz hasonlóan biztosan előidézi a láncok internalizációját és lizoszómális bomlását (55). Az előzőeknek megfelelően, látható

(17A ábra), hogy míg az anti-CD3 hatására erős kolokalizáció figyelhető meg a lizoszóma és a  $\zeta$ -láncok között, addig a TNF kezelés esetében nem látható ilyen irányú változás. Mivel a degradáció bekövetkezik, tovább erősödik azon feltevésünk, hogy a TNF hatására proteaszómális úton történik a bomlás. Az eredmény számszerűsítése a kolokalizáció mértékének meghatározásával szintén szignifikáns eredményt mutat anti-CD3-ra, míg nincs különbség a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva TNF esetében (17B ábra).

A





**17. ábra:** *TNF hatására a  $\zeta$ -lánc nem kerül a lizoszómába.* (A) Reprezentatív konfokális mikroszkópia kép, eredeti nagyítás:  $\times 2280$ . Jurkat sejtek 4 órás TNF (40 ng/ml) vagy anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) kezelése után a következő jelöléseket használtuk: LAMP1 (zöld), CTX (kék), CD3 $\zeta$  (piros); kolokalizáció: sárga. (B) Négy független kísérletből származó (>100 sejtet analizálva/kísérlet), a kolokalizáció mértékét Pearson-féle korrelációs koefficiensben kifejező diagram (\*\*\*) $p < 0,001$ .

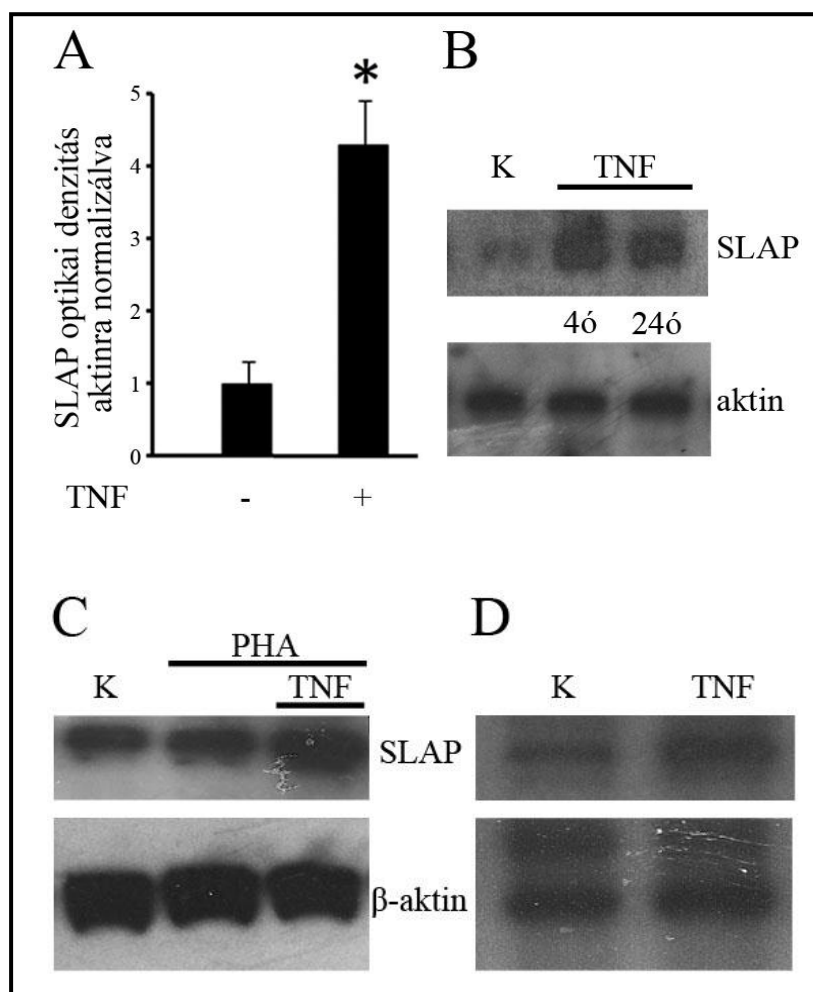
#### 4.1.6 Az src-like adaptor protein (SLAP) felelős a TNF indukált $\zeta$ -lánc csökkenésért.

Eredményeink szerint a TNF a proteaszómális bomlás elősegítésével vesz részt a CD3 $\zeta$  mennyiségének csökkentésében, ezért számba vettük azon fehérjéket, amelyek a  $\zeta$ -lánc degradációjában szerepet játszanak. Irodalmi adatok alapján a SLAP közreműködik a T-sejt aktiváció során bekövetkező CD3 $\zeta$  internalizációjában, valamint a c-Cbl E3 ubiquitin ligázzal együttműködve azok lebontásában (62). Ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogy a SLAP szerepet játszik-e a TNF által indukált  $\zeta$ -lánc szabályozásban.



#### 4.1.6.1 A SLAP expressziójának vizsgálata TNF hatására

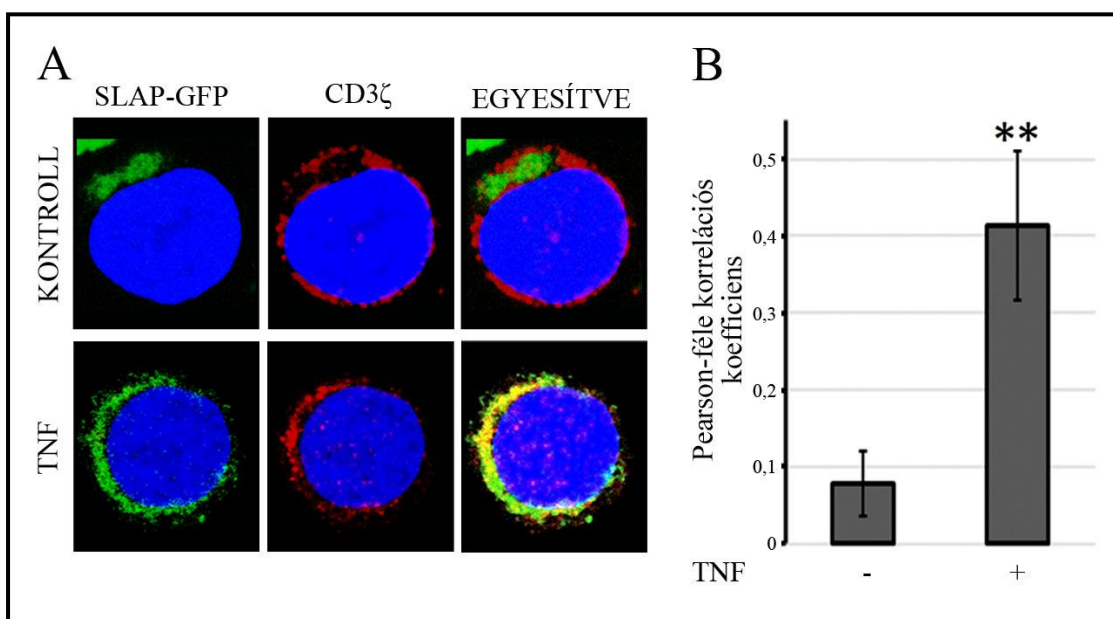
Kísérleteink során különböző ideig (4-24 óra) TNF-fel (40 ng/ml) kezeltünk Jurkat, PBMC és CD4<sup>+</sup> T-limfocitákat, majd Western blot rendszerben vizsgáltuk, hogy bekövetkezik-e változás a SLAP expressziójában. Eredményeink szerint a TNF kezelés hatására a SLAP fehérje szintje több mint 4-szeresére emelkedik (18A ábra).



**18. ábra:** A SLAP expressziója növekszik TNF hatására. (A) Jurkat sejtek SLAP expressziója 24 óra TNF kezelést követően Western blot rendszerben vizsgálva. A diagramon az aktinra normalizált optikai densitás értékek láthatóak ( $\pm$ SD) négy független kísérlet eredményeként (\* $p < 0,05$ ). Reprezentatív Western blot kép a SLAP expressziójáról különböző idejű TNF kezelést követően (B) Jurkat sejteken, (C) PBMC sejteken, (D) primer CD4<sup>+</sup> T-sejteken.

#### 4.1.6.2 A SLAP-CD3 $\zeta$ kolokalizációjának vizsgálata

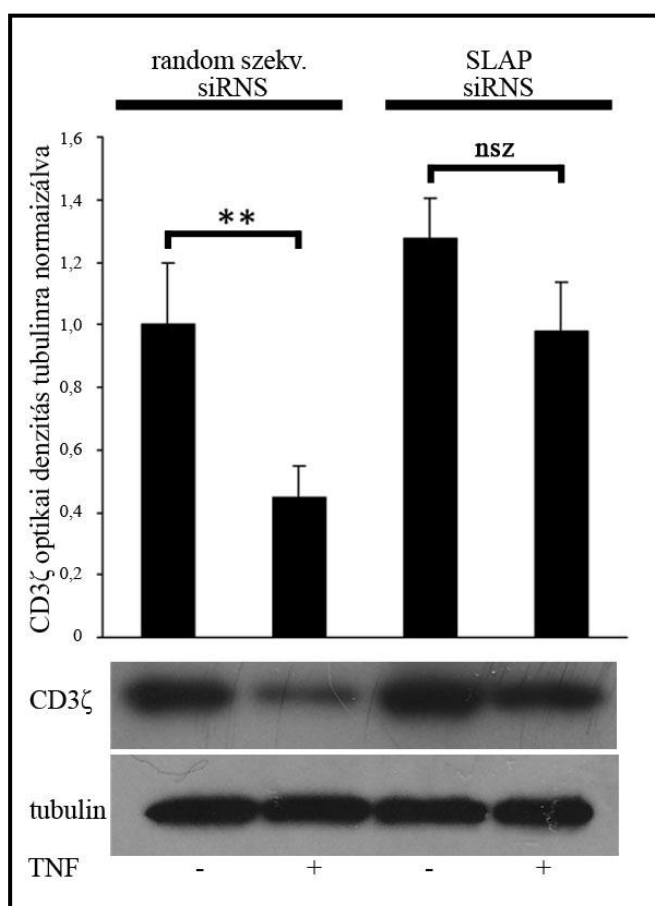
Mivel azt tapasztaltuk, hogy a TNF befolyásolja a SLAP expresszióját, kíváncsiak voltunk rá, hogy létrejön-e fizikai asszociáció a két molekula között TNF hatására. Ennek érdekében konfokális mikroszkópia felvételeket készítettünk. Várakozásainknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy míg a kezetlen mintában a SLAP és a  $\zeta$ -lánc a sejt különböző szegmenseiben foglal helyet, addig a TNF-fel kezelt mintában kolokalizáció figyelhető meg (19A ábra). Ennek számszerűsítése szintén alátámasztja a felvételeken láthatóakat (19B ábra). Érdekes továbbá, hogy az eddigi megfigyelésekkel összhangban a TNF kezelés hatására mindkét molekula sejten belüli elhelyezkedése megváltozik: a  $\zeta$ -láncok diffúz eloszlása helyett egy ún. sapka formálódást láthatunk, míg a SLAP-ot a citoplazmatikus megjelenéssel ellentétben, sokkal inkább a membrán belső felén figyelhetjük meg (19A ábra).



**19. ábra: A TNF indukálja SLAP-CD3 $\zeta$  kolokalizációját.** (A) Jurkat sejtek SLAP-GFP (zöld) cDNS vektorral történő transzfekciója után a sejteket 40 ng/ml TNF-fel kezeltük 4 órán át, majd a következőket festettük: CD3 $\zeta$  (piros), sejtmag (kék). A sejteket konfokális mikroszkópiával vizualizáltuk, eredeti nagyítás:  $\times 4560$ , reprezentatív ábra. (B) Három független kísérletből származó >100 sejtet/kísérlet elemeztünk ImageJ CDA plugin segítségével, és a  $\zeta$ -SLAP kolokalizációjának mértékét Pearson-féle korrelációs koefficiens formájában adtuk meg (\*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.1.6.3 A SLAP csendesítése siRNS-sel

Korábbi kísérleti eredményeink alapján feltételeztük, hogy a SLAP szerepe fontos lehet a TNF okozta  $\zeta$ -lánc csökkentésben. Ennek további vizsgálatára siRNS-ek segítségével csendesítettük a SLAP expresszióját és vizsgáltuk, hogy ilyen kondíciók mellett érvényesül-e a TNF hatása. A 20. ábrán látható, hogy azokban a sejtekben ahol nem expresszálódik a SLAP, nem jut érvényre a TNF  $\zeta$ -lánc csökkentő hatása, ez pedig a SLAP kulcsszerepét igazolja a TNF által kiváltott  $\zeta$ -lánc csökkenésben. Az irodalmi adatokkal összhangban (62), a SLAP-ot nem expresszáló sejtekben a CD3 $\zeta$  szintje enyhe emelkedést mutat.



**20. ábra:** A SLAP csendesítése kivédi TNF-indukált  $\zeta$ -lánc csökkenést. Jurkat sejteket transzfektáltunk két különböző random szekvenciájú vagy a SLAP-ra specifikus siRNS-el, majd 24 órán keresztül TNF-el (40 ng/ml) kezeltük őket. A fehérje izolálást követően

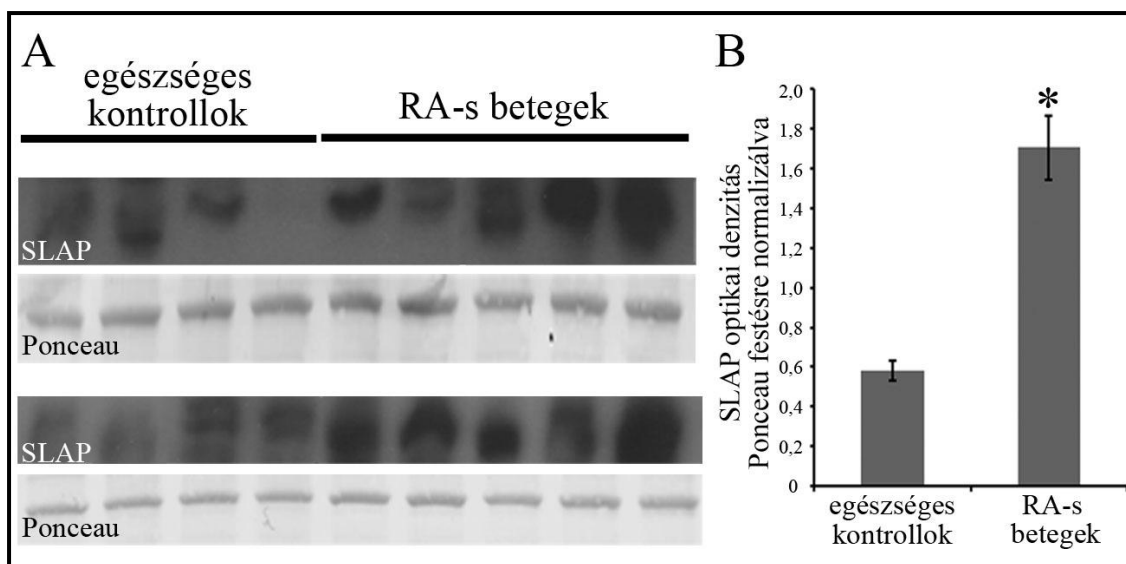
*Western blot-ot futtattunk a mintákból, amelyből egy reprezentatív ábra látható. Négy független kísérletből származó adatokból a CD3 $\zeta$  optikai denzitás értékeit tubulinra történő normalizálást követően ábrázoltuk (\*\* $p < 0,01$ ).*

#### **4.1.7 A SLAP mennyisége emelkedett RA-s betegekben.**

Mind kísérletes, mind klinikai adatok alapján a T-limfociták központi szerepet játszanak az RA patogenezisében. A közleműltben publikált közlemény alapján az RA-ra hajlamosító ZAP-70 mutációt hordozó egerekben zymosan indukált artritis esetén a SLAP kiütése mind a betegség kifejlődésének gyakoriságát csökkenti, mind annak lefolyását enyhíti (66). Így RA-s betegek T-limfocitáiban vizsgáltuk a SLAP kifejeződését. Kísérleteinkhez DMARD vagy anti-TNF terápiában részesülő betegek mintáit vizsgáltunk egészséges kontrollokhoz viszonyítva.

##### *4.1.7.1 A SLAP expressziója emelkedett RA-s betegek T-limfocitáiban*

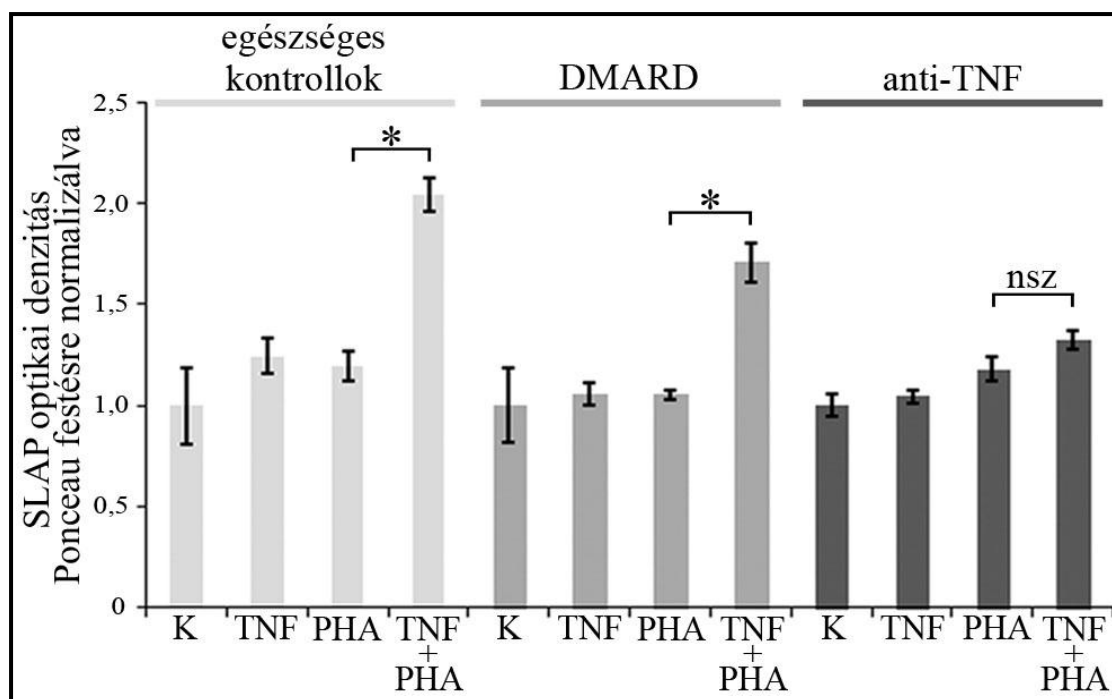
Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy találunk-e eltérést a betegek és egészségesek között a SLAP expressziójában. Ehhez terápiától függetlenül, a betegek és kontrollok frissen izolált T-limfocitáit azonnal lizáltuk, majd Western blotot készítettünk belőle. Az ábrán (21A ábra) látható, hogy a kontrollok ( $n=7$ ), illetve a betegek ( $n=10$ ) SLAP expresszióját összehasonlítva (habár nagy az egyedi variancia) jelentősen emelkedett szintet találunk RA-ban (21B ábra).



**21. ábra:** A *SLAP* szintje emelkedett RA-sok *T*-sejtjeiben. RA-val diagnosztizált betegek, valamint egészséges kontrollok frissen izolált primer *CD4*<sup>+</sup> *T*-limfocitáit fehérje lízispufferben vettük fel és Western blot rendszerben vizsgáltuk a *SLAP* expresszióját. (A) A Western blot felvétel eredménye. (B) A Ponceau festésre normalizált *SLAP* értékek átlaga ( $\pm$ SEM) statisztikai analízise (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.7.2 A *TNF* hatásának vizsgálata RA-s betegekben

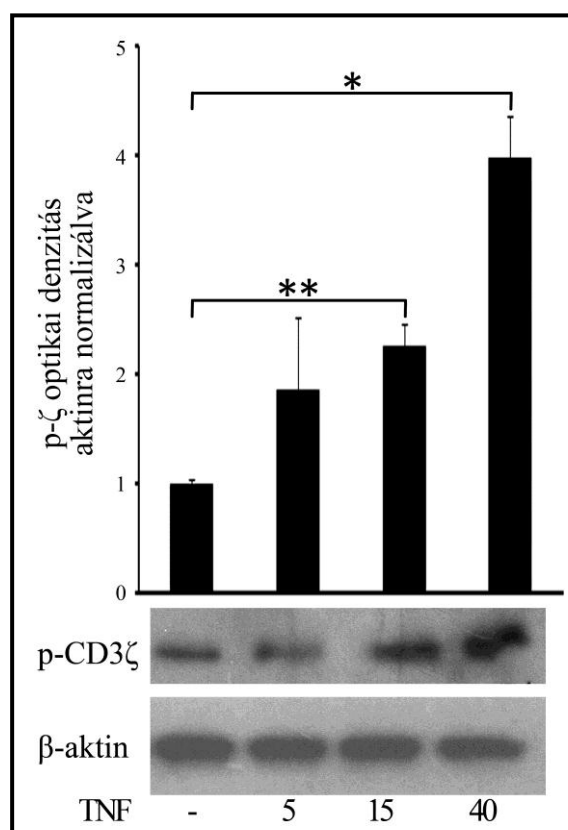
Korábbi eredményeink szerint a *SLAP* expressziója fokozódik *TNF* hatására, illetve RA-ban magasabb *SLAP* expresszió figyelhető meg, ezért megvizsgáltuk, hogy a betegben is tovább fokozható-e a *SLAP* expressziója *TNF* kezelés hatására. Az eddigieknek megfelelően a kontroll mintákban a *SLAP* emelkedett expressziója volt megfigyelhető, azonban különbséget találtunk az eltérő terápiában részesülő betegek *T*-limfocitáinak reakciójában. DMARD kezeltek esetében az egészségesekhez hasonlóan emelkedik a *SLAP* szintje, azonban *TNF*-blokkoló biológiai terápia mellett ez a jelenség elmarad (22. ábra).



**22. ábra:** A TNF eltérően indukálja a SLAP expresszióját a terápiától függően. Egészséges kontrollok ( $n=5$ ), DMARD terápiában ( $n=5$ ), illetve TNF-blokkoló kezelésben ( $n=5$ ) részesülő betegek frissen izolált T-limfocitáit 2 órát PHA-val előaktiváltuk, majd a megfelelő csoporthoz TNF-et is adtunk további 24 óráig. Ezt követően fehérjét izoláltunk és Western blottal vizsgáltuk a SLAP kifejeződését. Az ábrán a betegcsoportok Ponceau-ra normalizált SLAP expressziós átlaga ( $\pm SD$ ) látható (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.8 A TNF elősegíti a $\zeta$ -láncok foszforilációját

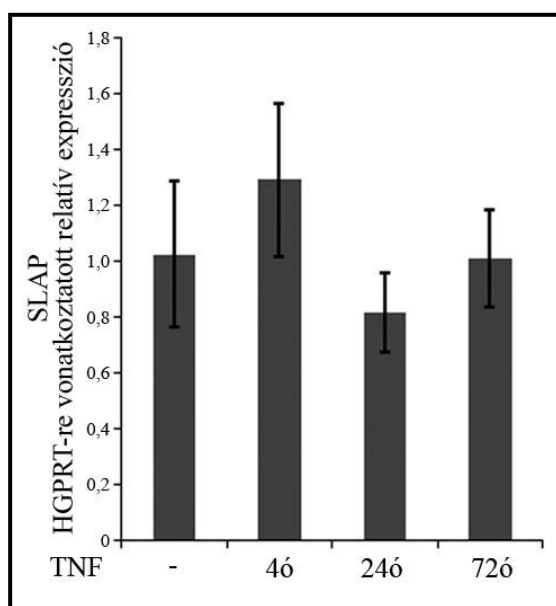
A CD3 $\zeta$ -láncok egy része a sejtekben 21 kDa (p21) formában konstitutívan foszforiláltan található meg, amelynek a sejtek túlélésében és a patogének azonosításában feltételeznek szerepet (47, 52). A SLAP *in vivo* T-sejt aktiváció során SH2 doménen keresztül a foszforilált  $\zeta$ -láncokhoz kötődik, így vizsgáltuk, hogy a mi rendszerünkben milyen arányban van jelen a p21 forma. Érdekes módon azt találtuk, hogy a TNF kezelés hatására növekszik p21 láncok aránya (23. ábra).



**23. ábra:** A *TNF* indukálja a *CD3ζ* foszforilációját. Jurkat sejtek különböző koncentrációjú (5-40 ng/ml) 24 órás kezelése után Western blot rendszerben vizsgáltuk 21 kDa pCD3ζ mennyiségét. Reprezentatív Western blot, illetve két független kísérletből származó eredmény összesítése (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.1.9 A SLAP szabályozásának vizsgálata

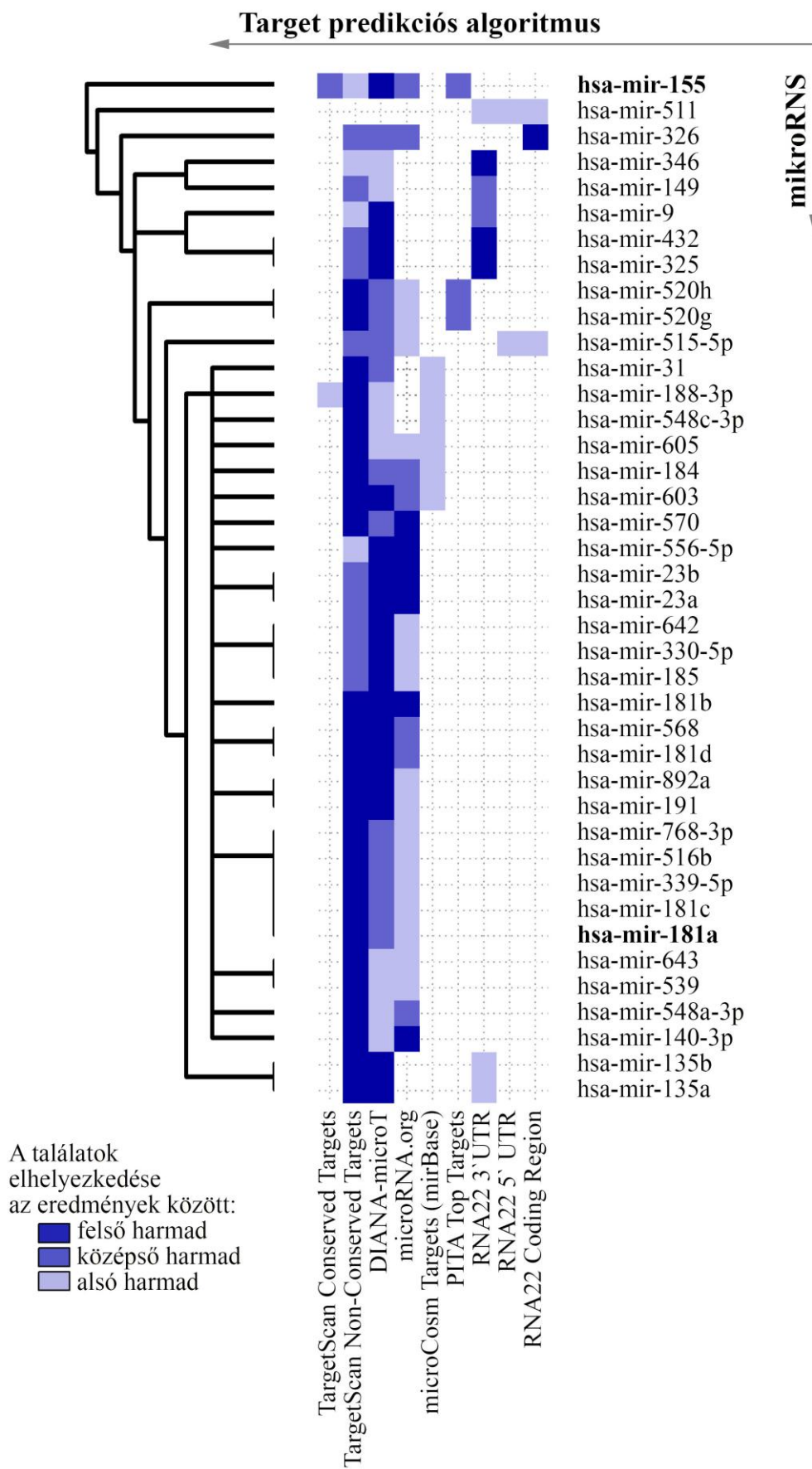
Annak vizsgálatára, hogy milyen mechanizmus áll a SLAP fehérje expresszió növekedés (18A, B, C, D ábra) háttérében TNF kezelés hatására, valós-idejű RT PCR-rel vizsgáltuk, hogy a TNF az mRNS szintézis fokozásával növeli-e a SLAP mennyiségét. Meglepő módon, nem kaptunk szignifikáns különbséget a kezelés hatására a SLAP mRNS mennyiségében (24. ábra).



**24. ábra:** A TNF nem befolyásolja SLAP mRNS mennyiségét. Jurkat sejtek különböző idejű TNF (40 ng/ml) kezelését követően mRNS-t izoláltunk, majd valós idejű RT PCR-rel vizsgáltuk a SLAP expresszióját. A diagramon három független kísérlet eredménye látható (átlag±SD).

Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy feltehetően a SLAP bomlása érintett ebben a folyamatban. Ennek egyik lehetséges mechanizmusa a miRNS-ek által szabályozott posztranszkripcionális módosítás, ezért megvizsgáltuk, hogy mely miRNS-ek játszhatnak szerepet SLAP szabályozásában. Tizenkét target predikciós adatbázis által rangsorolt miRNS-ek figyelembevételével, a saját összehasonlítási módszerünk alapján állítottuk fel a 25. ábrán látható rangsort, amely a legmagasabb pontokat kapott miRNS-eket tartalmazza. Érdekes módon, a táblázatban két, a további vizsgálatokra más szempontok alapján is kiválasztott miRNS is található.





**25. ábra: A SLAP-ot szabályozó lehetséges mikroRNS-ek listája.** Az ábrán a 12 adatbázis segítségével gyűjtött, legalább négy target predikációs algoritmus által valószínűsített, a SLAP 3'UTR-jében kötőhellyel rendelkező miRNS-ek vannak feltüntetve. A színek (világostól a sötétig, a kevésbé valószínűtől a leginkább valószínűig) a prediktált listákban való viszonylagos helyzetre utalnak.

## **4.2 MikroRNS-ek szerepének vizsgálata sejtaktivációs mechanizmusokban**

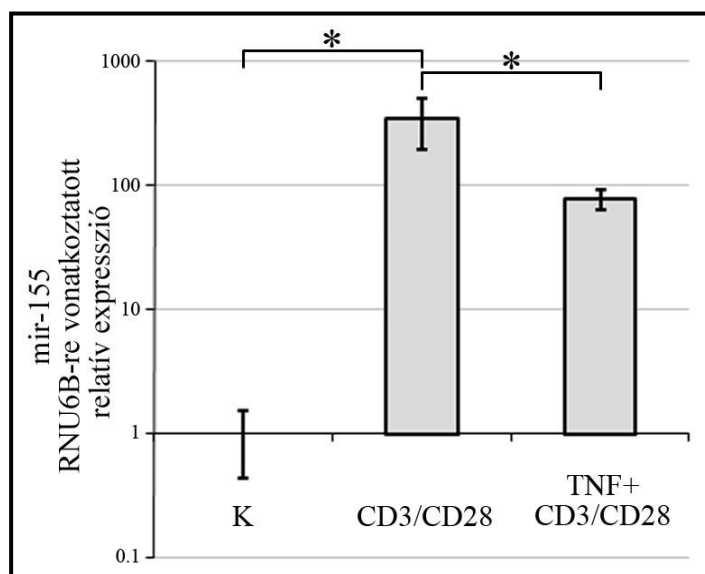
A mikroRNS-ek számos jelátviteli folyamat finomszabályozójaként működnek, és számos betegségben megfigyelhető expressziójuk megváltozása. Korábbi eredmények szerint több képviselőjük jelentős szerepet tölt be RA patomechanizmusában, továbbá felvetődött diagnosztikus markerként való használatuk is. Ebből kiindulva megvizsgáltuk a legfőbb RA-val asszociált, valamint aktivációban kulcsszerepet játszó mikroRNS viselkedését sejtaktivációban, illetve TNF jelenlétében.

### **4.2.1 A TNF hatása a mikroRNS expresszióra T-limfocitákban**

#### *4.2.1.1 A mir-155 vizsgálata*

A mir-155 előző eredményeink alapján potenciálisan részt vesz a SLAP szabályozásában, továbbá plazma, szinoviális folyadék szintje (240) és PBMC-kben mért expressziója emelkedett RA-ban (236). Ezeknek megfelelően arra voltunk kíváncsiak, hogy gyulladáshoz közeli környezetben, TNF jelenlétében, hogyan alakul expressziója. A 26. ábrán látható, hogy a korábbi publikációknak megfelelően, aktiváció hatására a mir-155 expressziója emelkedik. Abban az esetben, ha sejtek környezetében TNF is jelen van, ez a növekedés közel egy nagyságrenddel kisebb, mint a TNF hiányában. Fontos megjegyezni, hogy a SLAP-ot TNF jelenlétében csendesítő miRNS

változásában ehhez hasonló csökkenést várnánk, és a mir-155 első helyen jelenik meg a predikciós listában (25. ábra).



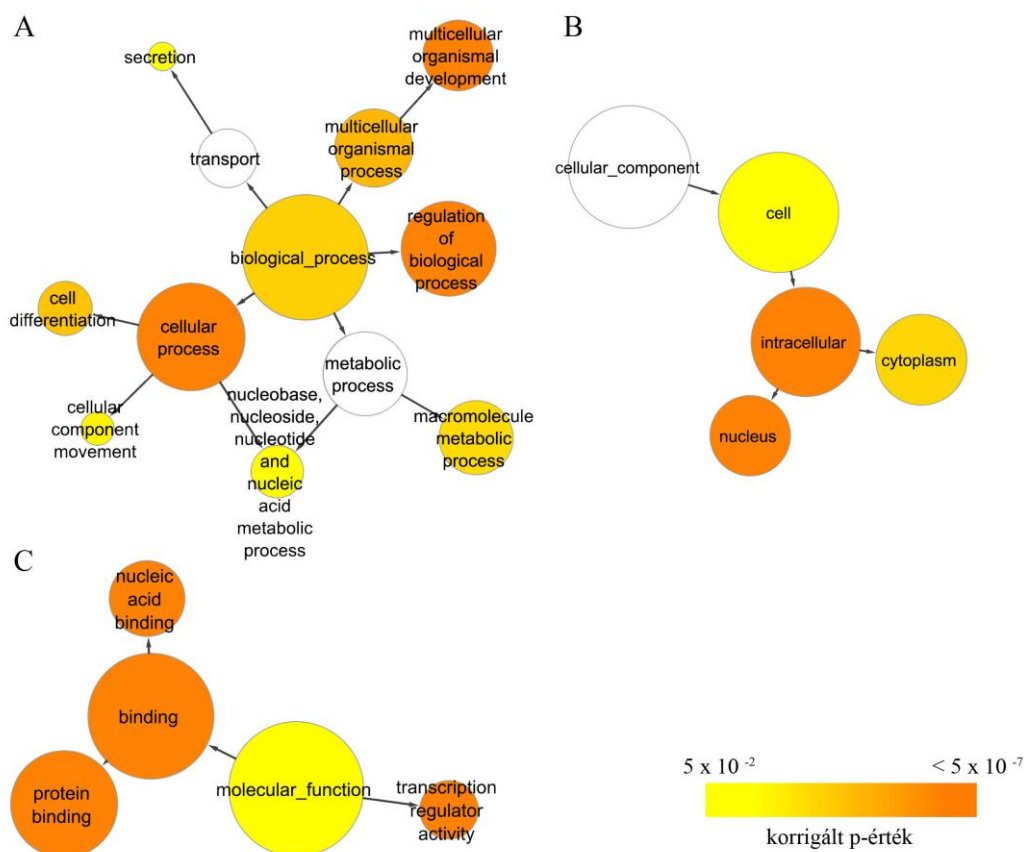
**26. ábra:** A TNF csökkenti a mir-155 aktiváció indukált emelkedését. Humán CD4+ T-limfocitákat 2 óra TNF (40 ng/ml) előkezelés után, anti-CD3/CD28-al aktiváltuk 24 órán át. A mintákból totál RNS-t izoláltunk és valós-idejű RT PCR-rel vizsgáltuk a mir-155 expresszióját. A diagramon négy különböző donortól származó mintákból futtatott eredmény átlaga ( $\pm$ SEM) látható (\* $p$ <0,05).

Ezen kísérletből kiindulva kíváncsiak voltunk arra, hogy aktiváció során melyek lehetnek azok a fehérjék amik az expresszió emelkedés elmaradása miatt esetleg eltérően szabályozódnak, ezért a mirDIP fúziós adatbázis segítségével megkerestük mir-155 lehetséges célpontjait (27. ábra). A SLAP körülbelül a génlista közepén szerepel, így ez az elemzés is megerősíti, hogy a SLAP a mir-155 szabályozása alatt áll.

	DIANA-microT	PITA Top Targets	microRNA.org	TargetScan Conserved	TargetScan Non-Conserved	microCosm Targets	RNA22 3' UTR predictions	picTar 5-way	RNA22 Coding Region	RNA22 5' UTR predictions
1 JARID1B	3	3		3		2	3		3	
2 RNF123	3	1	3	3		3		3		
3 ELMOD1	3	3	2		3	2	2			
4 TSHZ3	3	3	2	3	2			2		
5 CARHSP1	3	2	2	3		3	2			
6 SP1	3	1	3	3	2		3			
7 ACTA1	3	3	2	3		2		2		
8 ZNF652	3	3	4	2	3					
9 RREB1	3	2	2	2	2		3			
10 BACH1	4	3	3	2	1			1		
11 CLCN5	3	3	2	3		3				
12 TP53INP1	3	3	3	3		2				
13 RBMS3	3	3	2	3	3					
14 PIK3CA	3	3	2		3	3				
15 DET1	3		2	3	3	2				
16 KIAA1715	3		2	2	3	1	2			
17 SOCS1	3	2	2	2		2		2		
18 LSM14A	3	2	2	3		3				
19 RAC1	3	2	3		3	2				
20 CDC73	3	3	3		3	1				
....										
89 SLA	3	2	2	2	1					

**27. ábra:** A mir-155 első 20 helyen található lehetséges célpontjainak listája. 12 target predikciós algoritmus fúziójával létrehozott, a mir-155 első 20 célpontját, valamint a SLAP elhelyezkedését (89.) feltüntető génlista. Az elemzés során azokat a célpontokat vettük csak figyelembe, amelyek legalább öt adatbázisban szerepelnek (összes gén:225). A számértékek az adott algoritmus eredménylistájában való relatív elhelyezkedésre utalnak: 1-alsó harmad, 2-középső harmad, 3-felső harmad, 4-legvalószínűbb 1%.

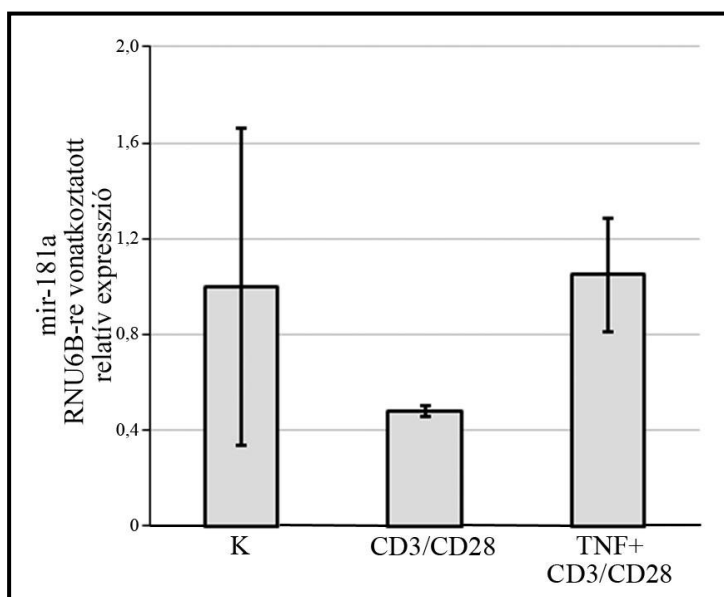
Az összeállított célpontok listáját génontológiai elemzésnek vetettük alá, és a szignifikánsan felülreprezentált GO-kategóriákat a Cytoscape szoftvercsomag BiNGO plugin-jével ábrázoltuk (28. ábra). Ebből kitűnik, hogy a mir-155 szerepe rendkívül sokrétű, mivel a sejtfunkciókban résztvevő gének széles skáláját szabályozza.



**28. ábra:** A *mir-155* célpontjainak génontológiai reprezentációja. A *miR-155* célpontjai között a véletlennél statisztikailag szignifikánsan nagyobb eséllyel fordulnak elő olyan gének, amelyek az ábrán látható (A) biológiai folyamat, (B) celluláris komponens, (C) molekuláris funkció kategóriák közé sorolhatóak be. A gráfok csomópontjainak mérete a benne található annotált elemek számával, a szín sötét tónusa a szignifikanciával arányos, ugyanakkor élei az ontológiák hierarchiában elfoglalt relációkra utalnak.

#### 4.2.1.2 A *mir-181a* vizsgálata

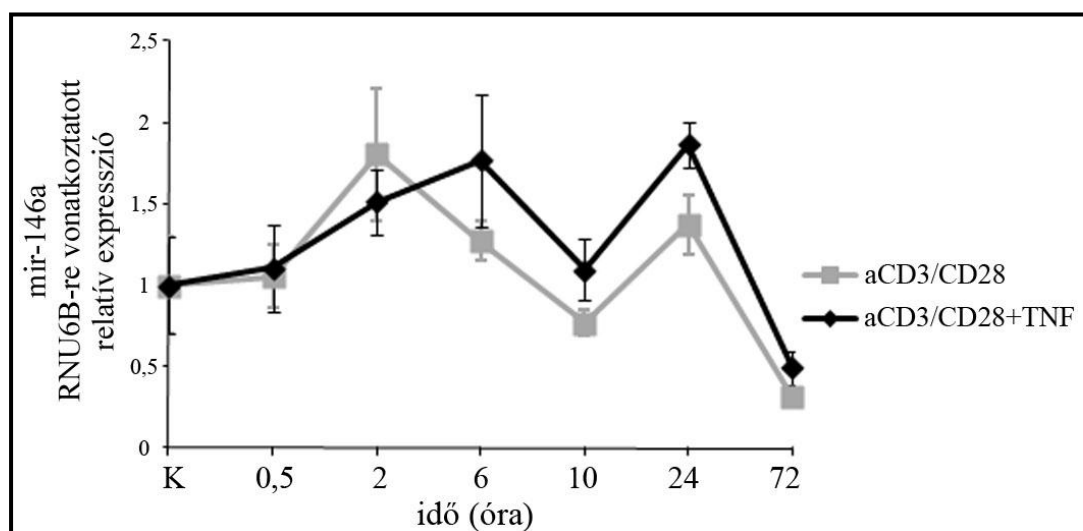
A *mir-181a* szintén szerepel a SLAP-ot csendesítő lehetséges miRNS-ek listáján (25. ábra), valamint rendkívül fontos szerepet tölt be a T-sejt aktiváció szabályozásában lévén, hogy olyan célpontokat csendesít, mint a PTPN22, SHP-2 és DUSP5, amelyek mindegyike az aktiváció indukálta foszforilációs kaszkád defoszforilációjában játszik szerepet (118). Ezekből kiindulva megvizsgáltuk, hogy expresszióját befolyásolja-e a TNF jelenléte. A 29. ábrán látható, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően (247) a *mir-181a* expressziója csökken az aktiváció során, azonban TNF mellett ez a csökkenés nem következik be.



**29. ábra:** A TNF meggátolja a *mir-181a* expresszió csökkenését aktiváció során. Primer humán CD4<sup>+</sup> T-limfociták 2 órás TNF előkezelését követően 24 órán át aktiváltuk a sejteket CD3/CD28-al konjugált gyöngyökkel, majd totál RNS-t izoláltunk. A valós-idejű RT PCR-ből származó, négy mintából kalkulált értékek átlagát (±SD) ábrázoltuk.

#### 4.2.1.3 A mir-146a vizsgálata

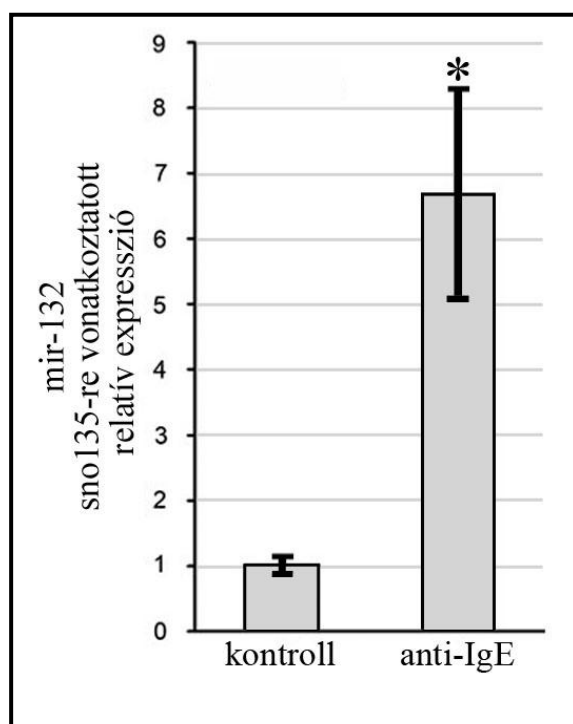
A mir-146a szintje emelkedett RA-s betegek T-limfocitáiban (248) és plazmájában, amely a disease activity score (DAS) 28 értékekkel jól korrelál (240), továbbá terápiás jelentősége is lehet a betegség kezelésében (249). Primer humán T-limfocitákat aktiváltunk a T-sejt receptor keresztkötésével TNF jelenlétében, illetve hiányában, majd valós-idejű RT PCR-rel vizsgáltuk a mikroRNS-ek expresszióját. A mir-146a esetében talán a legfontosabb különbség, hogy aktiváció során a legmagasabb expressziós érték két órával a kezelés után következik be, viszont TNF jelenlétében ugyanez hat óránál jelentkezik (30. ábra). További különbség, hogy a TNF hatására a mir-146a tendenciózusan magasabban expresszálódik, mint TNF hiányában, amit más sejttípusokban, például monocitákban végzett kísérletek is alátámasztanak (250).



**30. ábra: A TNF befolyásolja a mir-146a expresszióját.** Frissen izolált humán CD4<sup>+</sup> T-limfocitákat 2 órás TNF előkezelést követően különböző időtartamig (0,5-72 óra), TNF jelenlétében aktiváltunk anti-CD3/CD28-al konjugált gyöngyökkel, majd totál RNS-t izoláltunk belőlük. A mir-146a expresszióját valós-idejű RT PCR-rel vizsgáltuk, és a négy különböző donortól származó eredmények átlagait ( $\pm$ SD) ábrázoltuk.

#### 4.2.2 A mir-132 expressziója megnövekszik humán hízósejt aktivációban

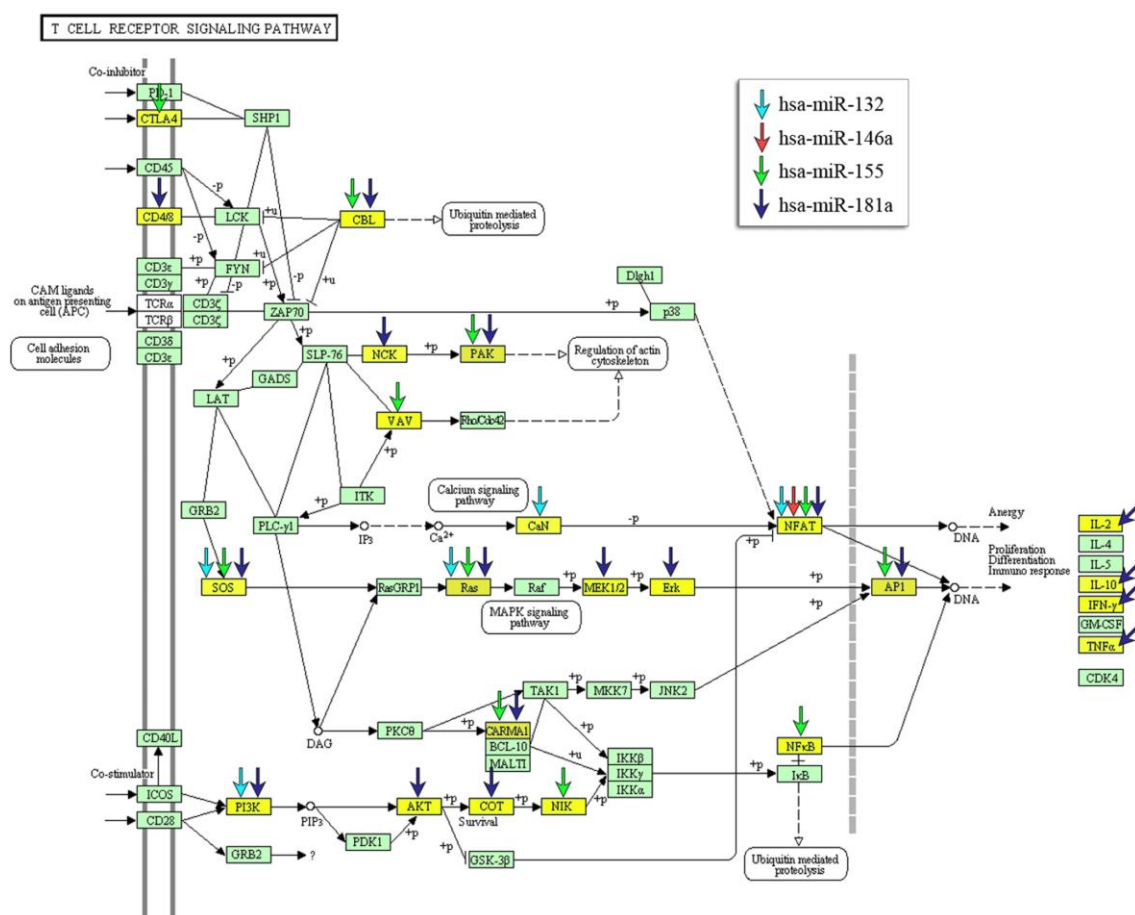
A mir-132 szintje emelkedett RA-s betegek PBMC sejtjeiben (236) és szinoviális szöveti felülúszójában (240), míg szintje csökkent RA-ban és arthrosisban szenvedő betegek plazmájában, amely korrelációt mutat a betegség aktivitásával (240). További adatok szerint a mir-132 bizonyos polimorfizmusai hajlamosító tényezők lehetnek az RA kialakulásában (232). Az irodalomban található adatok alapján, a mir-132 szintje nem változik RA-s betegek T-sejtjeiben (248) a kontrollhoz viszonyítva. Sem T-limfocitákban (251), sem B-limfocitákban (252) nem változik szintje aktiváció hatására. A fent leírtakból kiindulva, primer humán differenciált hízósejtjeiben vizsgáltuk mir-132 expresszióját. Eredményeink szerint a mir-132 expressziója több mint hatszorosára növekszik IgE-mediált az aktiváció során (31. ábra). Hat órával az IgE keresztkötése után mérhető a legnagyobb változás, azonban már három órával az aktiváció után is emelkedés tapasztalható.



**31. ábra:** A mir-132 szintje emelkedik hízósejt aktiváció során. A hízósejtek IgE-vel történő 2 órás szenzitizációja után anti-humán IgE-vel kötöttük keresztbe a molekulákat és 6 órán át aktiváltuk őket. A sejtekből ezután totál RNS-t izoláltunk és valós-idejű RT-PCR-rel határoztuk meg a mir-132 szintjét (átlag±SD) (\* $p < 0,05$ ).



A kísérleteink során a vizsgált miRNS-ek különböző jelpályákban játszott szerepét is vizsgáltuk KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) analízissel. A négy miRNS által befolyásolt útvonalak között ötödik helyen szerepel a T-sejt receptor jelátvitel és a 32. ábrán megfigyelhető, hogy a véletlenszerű eloszláshoz képest ezen miRNS-ek célpontjai meglehetősen felülreprezentáltak ebben az útvonalban.



32. ábra: A vizsgált miRNS-ek célpontjainak eloszlása a T-sejt receptor jelátviteli útvonalban. A vizsgált mikroRNS-ek DIANA-microT (v.4.0) target predikciós program által valószínűsített célpontok a KEGG „T-sejt receptor jelátviteli útvonal” kategóriájára (hsa04660) vetítve (mirPath, DIANA Lab).

## 5. Megbeszélés

Az immunsejtek aktivációs útvonalait, fiziológias és patológias körülmények között egyaránt széles körben tanulmányozták az elmúlt évtizedekben, ugyanakkor napról napra újabb jelentős felfedezések születnek. A génexpresszió szabályozásában mára kétségtelenül kulcsszerepet betöltő mikroRNS-ek mellett, a ma már klasszikusnak nevezhető jelpályák, mint amilyen az T-sejtek antigén receptora által közvetített szignalizáció, együttesen alakítják a sejt sorsát. Munkánk során az aktiváció szabályozását tanulmányoztuk, amelyben a mikroRNS-ek szerepét is vizsgáltuk.

Munkánk egyik fő kérdése, hogy milyen mechanizmus állhat a különböző autoimmun kórképekben, mint például RA-ban (253) és SLE-ben (254) megfigyelhető alacsonyabb T-limfocita válaszkészség mögött. Az irodalomban számos publikáció olvasható, amelyek szerint az alacsony válaszkészség elsősorban az alacsonyabb IL-2 termelésben (200, 255), valamint a csökkent  $Ca^{2+}$  válaszban (199, 256) nyilvánul meg, ugyanakkor a kóros T-sejt válasz csökkent CD3 $\zeta$ -lánc expresszióval (257, 258) is társul. A kérdés megválaszolására irányuló közlemények p56<sup>Lck</sup> szerepét hangsúlyozzák, amelynek megváltozott konformációs változásait hozzák összefüggésbe elsősorban RA patomechanizmusával (259). Mindezek mellett, jelentős szerepet kapnak bizonyos mikroRNS-ek, mint például a mir-155 (238), a mir146a (236) és a mir-132 (240), amelyek szintén megváltozott expressziót mutatnak RA-ban. Az itt felsoroltak közül proximális helyen áll a CD3 $\zeta$  csökkent kifejeződése, mivel ez közvetlenül befolyásolja a TCR-en keresztül indított jelátvitelt, ami az mRNS-szintű változások induktora, illetve a citokin termelés meghatározója is. Elsődleges céljaink között szerepelt, hogy feltárjuk a csökkent  $\zeta$ -lánc expresszió okait, és feltételeztük, hogy ehhez a sejtek környezete nagyban hozzájárulhat.

A citokinek központi szerepet töltenek be a gyulladásos betegségek kialakulásában, és olyan folyamatokat szabályoznak mint az autoimmunitás, a krónikus gyulladás és a szöveti destrukció (260). Ezek között is az egyik legjelentősebb a TNF $\alpha$ , amelynek szerepe széles körben vizsgált autoimmun és fertőző betegségekben, valamint tumorokban (261), továbbá emelkedett szintet mutat RA-s betegek szinoviális folyadékban (262). Napjainkban a TNF-blokkolók alkalmazása az egyik leghatékonyabb terápiás eljárás autoimmun betegségekben (263), köztük RA-ban (264).

## 5.1 A TNF T-sejt aktivációra kifejtett hatása

Az irodalomban eddig nem került sor annak vizsgálatára humán rendszerben, hogy a gyulladással autoimmun betegségekben megfigyelhető kóros T-limfocita fenotípus és működés milyen összefüggésben áll a megnövekedett TNF jelenlétével a gyulladás helyszínén. Egér T-limfocitákból származó adatok szerint, krónikus TNF kezelés hatására csökken a CD3 $\zeta$  expressziója (214), és az így bekövetkező kóros működés nem állítható helyre a láncok mesterséges pótlásával (265). Ezek alapján megvizsgáltuk, hogy humán T-limfocitákban milyen hatással van a TNF a  $\zeta$ -lánc expressziójára. Eredményeink szerint a TNF dózisfüggően és reverzibilisen csökkentette a láncok expresszióját, amit képző eljárással is megerősítettünk. A CD3 $\epsilon$  és  $\gamma$ -láncát vizsgálva, arra a következtetésre jutottunk, hogy a TNF-indukált  $\zeta$ -lánc csökkenés szelektív, mivel sem az  $\epsilon$ -, sem a  $\gamma$ -lánc esetében nem tapasztaltuk TNF kezelésre mérhető csökkenést. Ezek a megfigyelések korábbi irodalmi adatokhoz hasonlóan azt igazolják, hogy a  $\zeta$ -lánc a többi TCR lánctól függetlenül is képes internalizálódni (9). A jelenség tekintetében a vélemények megoszlanak, mivel a komplextől való disszociációra eddig nem születtek minden kétséget kizáró kísérleti eredmények. A TCR komplex összeszerelődésével kapcsolatos eddigi vizsgálatok ugyanakkor igazolják, hogy bizonyos komponensek, például  $\zeta$ -lánc, egyedi szabályozás alatt állnak. Eredményeink, habár a disszociációt konkrétan nem, de a TNF jelenlétében bekövetkező szelektív  $\zeta$ -lánc hiányt igazolják.

A  $\zeta$ -lánc szerepe az aktiváció továbbításán kívül bizonyítottan látszik az agonista peptidekre adott válasz mértékében, illetve az antigén agonista és antagonisták (például saját-peptid) mivoltának megkülönböztetésében (266, 267), így hiánya hozzájárulhat az antigénfelismerés kóros lefolyásához is.

Több publikációban, amelyekben  $\zeta$ - és  $\epsilon$ -lánc deficiens sejteket alkalmaztak, eltérő foszforilációs mintázat kialakulását és az aktiváció eltérő lefolyását figyelték meg, attól függően, hogy mely láncok hiányoztak (268, 269). Az CD3 láncokhoz kapcsolódó jelátviteli molekulák, és azok foszforilációja különböző a két láncon közvetített jel során. A CD3 $\epsilon$  prolinban gazdag régiójához SH3 doménen keresztül kapcsolódik az Nck adaptor fehérje, amelynek elmaradása,  $\epsilon$ -lánc mutánsokon vizsgálva, defektív T-sejt aktivációhoz és alacsonyabb IL-2 termeléshez vezet (270).

Más publikációk szerint, bármely CD3 lánc mutációja megnöveli a  $Ca^{2+}$  szignál elindításához szükséges szignál erősségét (269), továbbá felvetik annak lehetőségét, hogy a rendelkezésre álló ITAM-ok száma határozza meg az aktivációhoz szükséges jel erősségét (271). A CD3 $\gamma$ -lánc szerepe elsősorban az aktivációs szignál fenntartásában fontos, hiányában alacsonyabb mértékű ICAM-1 mediált kitapadás figyelhető meg humán modellben, amelynek lehetséges oka a defektív aktin-polimerizáció (272). Egérbenmodellben hiánya elsősorban megkésett IL-2 termeléshez vezet (273). Ezek alapján, az egyik lánc szelektív hiánya befolyásolja a sejtekben közvetített jelátvitelt. Eredményeink szerint, a TNF által szabályozott szelektív  $\zeta$ -lánc hiány csökkenti a sejtek válaszkészségét, amely alacsonyabb IL-2 termelésben, illetve csökkent  $Ca^{2+}$  mobilizációban nyilvánul meg, ugyanakkor nem figyelhető meg változás a proliferációs kapacitásban, ami arra utal, hogy a jelátvitel bizonyos részei érintettek, azonban vannak, amelyek kevesebb  $\zeta$ -lánc esetében is lezajlanak. Ez összhangban van a fentebb említett CD3-láncok funkcionális megoszlásával.

A szelektív  $\zeta$ -lánc hiányt jól magyarázná transzkripciójának csökkenése, azonban vizsgálataink során nem találtunk különbséget az mRNS-szintű expresszióban sem a TNF koncentrációjának, sem a kezelés idejének függvényében, így figyelmünk a degradációs folyamatokra irányult. Kísérleti rendszerünkben lizoszómális inhibitorral nem védhető ki a tapasztalt  $\zeta$ -lánc csökkenés, továbbá nem tapasztalható kolokalizáció sem a lizoszóma és a  $\zeta$ -lánc között. Ugyanakkor, a proteaszómális lebontás szelektív inhibitora meggátolja a TNF által indukált  $\zeta$ -lánc csökkenést, így ez esetben a proteaszóma a lebontás színtere. Mindezek alátámasztják azon publikációk eredményeit, amelyek szerint a CD3 $\zeta$  mind lizoszómális úton (55, 56), mind proteaszómális úton lebontásra kerülhet (8, 57). Ez a két nézőpont több publikáció alapján látszólag szemben áll egymással. A sejtfelszíni receptorok mivel membránnal körülvett vezikulákban fűződnek le, az endo-lizoszómális rendszerrel fuzionálva kerülnek lebontásra klasszikus nézet szerint. Ez az útvonal bizonyosan megfigyelhető a TCR komplex/ $\zeta$ -lánc esetében is. Ha azonban a  $\zeta$ -lánc külön szabályozási egységet alkot mind a szintézis, mind az internalizáció során (9, 10), akkor a lebomlási útvonal eltérő mechanizmusában is jelentkezhethet. Eredményeinket is figyelembe véve, mindkét degradációs útvonal érintett  $\zeta$ -lánc szabályozásában, a sejtek környezetének függvényében. Munkánk során elsősorban a sejtfelszíni  $\zeta$ -lánc mennyiségében találtunk különbséget, de a  $\zeta$ -láncok egy

jelentős része a szintézis után visszatartva marad a Golgi-apparátusban és az ER rendszerében (4, 7), ahonnan a sejtfelszínre kerülés helyett lebomlásra is kerülhetnek (274, 275). A Golgi apparátusban raktározott  $\zeta$ -lánc mennyiségét vizsgálva nem találtunk különbséget TNF jelenlétében, ennek ellenére nem zárható annak lehetősége, hogy a sejtfelszíni mennyiség csökkenése mellett az ER-ben található  $\zeta$ -láncok is degradálódnak.

A sejtfelszíni CD3 $\zeta$  szabályozásában számos fehérje vesz részt, amelyek között kulcsfontosságú a SLAP (276). Eredményeink szerint a SLAP expressziója szignifikánsan megnövekszik TNF kezelés hatására. Kimutattuk, hogy a SLAP kolokalizálódik a CD3 $\zeta$ -láncal TNF hatására, és a TNF által okozott  $\zeta$ -lánc csökkenés kivédhető a SLAP siRNS-sel történő csendesítésével, ami bizonyítja, hogy szabályozó szerepet játszik a folyamatban. A SLAP  $\zeta$ -láncal történő asszociációja további fontos fehérjék közvetlen kapcsolódását idézi elő a CD3 $\zeta$ -val, mint például a Cbl családba tartozó E3 ubiquitin ligázokét (c-Cbl, Cbl-b), amelyek a degradációs folyamatok irányítói. A c-Cbl elsősorban éretlen, míg a Cbl-b perifériális T-sejtekben fejeződik ki (277). Kísérletes bizonyíték eddig csak a SLAP–c-Cbl asszociációjáról született dupla pozitív timocitákban (60), azonban mind a szerkezeti, mind a funkcionális homológia miatt (277), feltehetően az érett T-sejtekben a Cbl-b a SLAP asszociációs partnere. Az E3-típusú ubiquitin ligázoknak rendkívül fontos szerepe van nemcsak a T-sejt fejlődésben (278) és aktivációban (279, 280), hanem a regulatórikus T-sejtek által közvetített szabályozásban is (281) azáltal, hogy kovalensen ubiquitin molekulákat kapcsolnak számos szubsztráthoz, ezzel elősegítve proteaszómális bomlásukat (282). T-limfocita fejlődés során a c-Cbl a SLAP-pal közreműködve csökkenti a sejtfelszíni  $\zeta$ -lánc expresszióját, ahol utóbbi ubiquitinizációja is megfigyelhető (60). Több publikációban is vizsgálták a CD3 $\zeta$  ubiquitinizációját érett T-limfocitákban is: egyrészt Hou és mtsai, aktiváció hatására (283), másrészt Huang és mtsai, akik az ubiquitinizáció mellett a CD3 $\zeta$  fokozott foszforilációját is megfigyelték Cbl-b KO állatokban (284). Érett T-sejtekben, KO egerekben végzett tanulmányokban leírtak szerint, a Cbl-b hiánya hiperproliferációt és megnövekedett IL-2 termelést okoz kostimulációs szignálok hiányában is (285). Mivel a TNF hatására a SLAP-pal együtt a Cbl is  $\zeta$ -lánc közelébe kerül, ubiquitin szignál kerülhet rá, ami alátámasztja a proteaszómális lebontásra vonatkozó megfigyeléseinket.

Korábbi megfigyelések szerint a membránkötött  $\zeta$ -láncok egy része konstitutívan foszforiláltan van jelen (p21) (47), és stabil komplexet alkot az inaktív formában található ZAP70-nel (46, 48). Eredményeink szerint a TNF hatására megnő a foszforilált  $\zeta$ -láncok mennyisége, elsősorban a 21 kDa molekulásúlynál. A megnövekedett foszforilált láncok aránya potenciálisan több kötődési felszint biztosít a SLAP számára, így több  $\zeta$ -lánc kerülhet internalizációra. Ezen eredményünkkel összhangban irodalmi adatok szerint a TNF serkenti p56<sup>Lck</sup> foszforilációját (286), aminek következménye lehet az általunk tapasztalt p21  $\zeta$ -lánc arány növekedése. A p21- $\zeta$ -lánc jelenléte a 23 kDa-os forma nélkül autoreaktív T-sejtek perifériára kerülését teszi lehetővé (53). A kísérleteink során kapott eredmények alapján, TNF hatására szelektív p21 növekedés következik be, amely hozzájárulhat az autoreaktív sejtek túléléséhez *in vivo*.

A SLAP KO állatok kevésbé fogékonyak az experimentális arthritis kialakulására és a betegség enyhébb lefolyást mutat (66). Humán RA-s betegekben magasabbnak találtuk SLAP alap-expresszióját egészségesekhez viszonyítva. A jelenség terápiától függetlenül jelen volt, habár a biológiai terápiában részesülők között nem minden betegben nyilvánult meg. Ebből következhet, hogy a SLAP *in vivo* is hozzájárulhat az RA-ban megfigyelhető kóros T-sejt aktiváció szabályozáshoz. Különbséget találtunk a terápia szempontjából akkor, ha a TNF-re adott választ vizsgáltuk: a DMARD-dal kezelt betegekben az egészségesekhez hasonlóan emelkedett SLAP mennyisége a TNF kezelés hatására, azonban a TNF-blokkolóban részesülőknél ez a hatás elmaradt. Az anti-TNF terápiában részesülők egy része etanercept-et kapott, amely egy TNFRII-IgG1 Fc-régiót tartalmazó fúziós protein, míg a betegek másik csoportjánál certolizumab pegol kezelést alkalmaznak, amely egy humanizált monoklonális anti-TNF antitest. Mindkét hatóanyag instabil komplexet képez a TNF $\alpha$ -val (287, 288). Elképzelhető, hogy az általunk szeparált T-sejtek felszínén lévő TNF-hez kötve maradtak ezek a hatóanyagok és így megakadályozták annak sejtekhez való kötődését. Terveink közt szerepel nagyobb beteganyag vizsgálata, valamint ezen érdekes mechanizmus pontosabb feltárása.

A vizsgált folyamatok egyik kulcskérdése, hogy miként, illetve milyen útvonalon keresztül fejt ki a TNF hatását. Egyrészt kérdés, hogy dominál-e valamelyik receptoron közvetített jel, vagy mindkét receptor érintett a folyamatban. Ennek

eldöntése további vizsgálatok tárgyát képezi, azonban azon megfigyeléseink, miszerint a TNFRII blokkolásán alapuló antitest terápiában részesülőknél nem tapasztaltunk SLAP expresszió emelkedést, a TNFRII szerepét hangsúlyozzák. A szabályozás pontosabb mechanizmusára egy kézenfekvő magyarázat, hogy mind az aktiváció során, mind a TNF hatására aktiválódó NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal, olyan molekulák aktiválódását illetve gátlását indukálja, amely az általunk megfigyelt jelenségekben nyilvánul meg. Vizsgálataink során ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az NF- $\kappa$ B szelektív gátlása nem küszöböli ki a TNF által közvetített  $\zeta$ -lánc csökkenést, sőt, inkább még jobban felerősítette azt. Ezen eredményünk felveti egy eddig kevésbé tisztázott, TNF jelátvitelben releváns szabályozási útvonal jelenlétét.

További vizsgálataink során meglepő módon azt találtuk, hogy a SLAP fehérje-szintű emelkedése nem az mRNS expresszió növekedésének eredménye, mivel a TNF kezelés hatására nem változott szignifikánsan a transzkripció mértéke. Ennek egyik lehetséges magyarázata a degradáció csökkenése. Ez bekövetkezhet valamely a SLAP lebontásához esszenciális fehérje szintjének változásával, valamint a translációs inhibíció gátlásán keresztül, amiben mikroRNS-eknek lehet szerepe. Ez utóbbi feltevés vizsgálatára megkerestük, hogy mely miRNS-ek befolyásolhatják a SLAP expresszióját, és érdekes módon, több a T-sejt jelátvitelben fontos reguláló miRNS előkelő helyet foglal el. Ilyen például az első helyen található mir-155, vagy a mir-181a.

## 5.2 MikroRNS-ek szerepe sejtek aktivációjában

Adataink szerint a mir-155 aktiváció során bekövetkező expresszió növekedése gátolható TNF előkezeléssel. További vizsgálataink tárgyát képezi az a megfigyelés, hogy a SLAP expresszió emelkedése összhangban van a mir-155 TNF határára bekövetkező csökkenésével, ami ezáltal egy lehetséges kiindulási pontja és magyarázata lehet a TNF által kiváltott  $\zeta$ -lánc csökkenésnek, illetve SLAP expresszió emelkedésnek. Ennek esélyét tovább növeli az *in silico* megvizsgált mir-155 lehetséges célpontjainak listája, amelyen SLAP is megtalálható. Mivel a mir-155 célpontjai, - az irodalmi adatok és az elvégzett GO ontológiai elemzés adatai alapján -, legfőképpen a jelátvitelben

résztevő fehérjék, megváltozott viselkedése éppen e folyamatok befolyásolását eredményezheti, ami TNF jelenlétében más jelátviteli utak túlsúlyát hozhatja létre.

Méréseink során humán T-limfocitákban kimutattuk, hogy a mir-181a aktiváció-indukált csökkenése nem következik be TNF jelenlétében. Az expresszióban bekövetkező csökkenésnek a jeltovábbítás lefolyásában van elsősorban szerepe. Az aktivációs lépések befejezésében és a sejtek válaszreakcióinak szabályozásában legfontosabb szerepet a foszfatázok játsszák, amelyek az aktivációs kaszkád elemeinek defoszforilálása révén járulnak hozzá a folyamathoz. Az, hogy ezek a foszfatázok milyen mennyiségben vannak jelen eldönthetik egy folyamat sorsát, illetve a reakciók időbeli lefutását. A mir-181a csökkenése elősegíti e molekulák nagyobb számban történő megjelenését, az aktiváció befejeződését elősegítve ezzel. Ilyen molekula például a Lyp-et kódoló PTPN22 (118), amelynek több polimorfizmusa is hajlamosít RA-ra (183). TNF jelenlétében mir-181a fiziológias csökkenése nem következik be, ami többek között a Lyp alacsonyabb expressziójához vezethet, amely elnyújtottabb sejtválasz kialakulását eredményezheti. Ezt alátámasztja, hogy mir-181a megnövekedett expressziója fokozza a T-limfociták szenzitivitását (289), ami gyulladásos környezetben akár a saját peptidekre adott válaszadásban is megnyilvánulhat. A CD3 $\zeta$ -lánc defoszforilálása is érintett lehet a mir-181a egy további célpontján, a  $\zeta$ -lánc defoszforilációban közreműködő SHP-1 csökkenésén keresztül (290), amit alátámaszt a vizsgálataink során tapasztalt magasabb arányú foszforilált  $\zeta$ -láncok jelenléte.

RA-s T-sejtekben emelkedett a mir-146a szintje, amely egy fontos irányítója a T-sejt differenciálódásnak és aktiválódásnak. Egyik célpontja a TRAF6, a TNF receptor szupercsalád molekuláin érkező jelek hatására az NF- $\kappa$ B sejt-mag-lokalizációját segíti elő, szabályozva ezzel bizonyos proinflammatorikus citokinek, például az IFN $\gamma$  és az IL-2 termelődését (291). Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a mir-146a expressziója megváltozik TNF jelenlétében: az aktivációhoz viszonyítva expressziójának csúcsa négy órával később következik be. Mivel a mir-146a hiányában fokozott IFN $\gamma$  termelés figyelhető meg, lehetséges, hogy a késleltetett expresszió növekedés elnyújtottabb IFN $\gamma$  választ indukál. A mir-146a a TRAF6 csendesítésén keresztül negatív visszacsatolást hoz létre az aktiváció processzájában. Eredményeink alapján, az aktiváció későbbi fázisaiban (>6h) a mir-146a expressziója fokozódik TNF jelenlétében az aktivációhoz viszonyítva. Mivel magas szintje a Th1 típusú differenciálódásnak kedvez (292), az



aktiváció e szakaszaiban számolni kell azzal a lehetőséggel, hogy a primer válasz lecsengése után az emelkedett mir-146a expresszió fokozott Th1-típusú válasz kialakításában játszik szerepet.

Mivel a hízósejtek bizonyítottan hozzájárulnak RA patomechanizmusához (293, 294), így a mir-132 vizsgálatára humán hízósejtekben került sor. Igazoltuk, hogy a mir-132 expressziója megnő az IgE-vel történő keresztökötés hatására. Ez a megfigyelés felveti a mir-132 szerepét a hízósejt aktiváció szabályozásában, továbbá az RA-ban megfigyelhető hízósejt aktiváció (295) következménye lehet a fentebb említett mir-132 expresszió növekedés a szinoviális szövetekben.

A SLAP a hízósejt aktiváció szabályozásában is fontos szerepet játszik FcεRI-el, Syk-vel és LAT-tal való asszociációjának következtében; csendesítése megnöveli az említett molekulák expresszióját (68). A megfigyelt mir-132 expresszió változásának időbeli lefutása követi a hízósejtekben megfigyelhető SLAP mRNS expresszió változást, amely az aktivációt követően három órával mutat csökkenést (68). Így felvetettük annak lehetőségét, hogy a SLAP-ot befolyásolja a mir-132 expresszió emelkedése. Több target predikciós adatbázis használatával megvizsgáltuk, hogy szerepel-e a SLAP a mir-132 potenciális célpontjai között. Várakozásainkkal ellentétben egyik program sem határozta meg SLAP-ot, mint várható célpontot. Ennek ellenére további vizsgálatokat végeztünk, amelyek során a szekvencia-komplementaritást és a kötés erősséget vettük figyelembe. A szekvencia összehasonlításra alapuló program alapján a SLAP tartalmaz magas komplementaritású (8mer) mir-132 kötőhelyet, amelynek kötéserőssége lehetővé teszi az interakciót, azonban feltehetően a szakasz konzerváltságának hiányában nem eredményez pozitív predikciót.

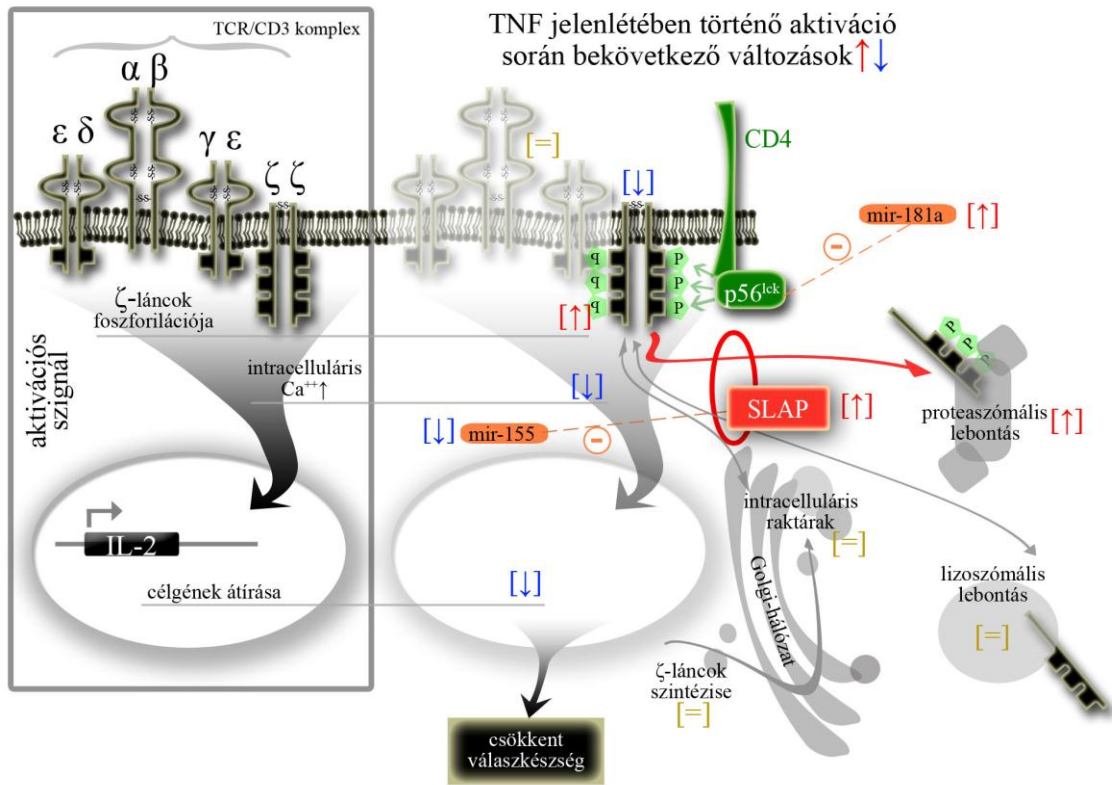
Munkacsoportunk a mir-132 egyik célpontjaként validálta a HB-EGF-et (Heparin-binding EGF-like Growth Factor), amely a fibroblasztok működésének egyik szabályozója, továbbá szerepet játszik a foszfolipáz A<sub>2</sub>, mint RA-ban fontos regulátor, IL-1β-án keresztüli indukciójában (296).

Hipotézisünk szerint, a T-sejtek környezetében megnövekedett TNF mennyisége potenciálisan mir-155-függő folyamat révén gátolja a SLAP lebontását, aminek következtében több ζ-lánc kerül proteaszómális lebontásra. Az aktiváció hatására csökkenő mir-181a TNF jelenlétében magasabb expressziós szinten marad, így a

jelátvitel befejeződésében szerepet játszó foszfatázok működése csökkent mértékű lehet. Ez emelkedett p21 CD3 $\zeta$  foszforilációhoz vezethet, ami elősegítheti a SLAP kötődését. A csökkent  $\zeta$ -lánc expresszió, amely nem társul a többi CD3-lánc csökkenésével, módosult aktivációt eredményez, csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  válasszal és IL-2 termeléssel, de változatlan sejt proliferációval. Mindez kedvezhet egy gyulladással összefüggő T-limfocita fenotípus kialakításának.

Munkánk során elsőként írtuk le a TNF jelenlétében bekövetkező  $\zeta$ -lánc csökkenés mechanizmusát, és elsőként szolgáltatunk kísérletes bizonyítékot az RA-ban megfigyelhető megváltozott T-limfocita viselkedés és a megnövekedett TNF termelés összefüggése között. RA-s betegekben elsőként írtuk le SLAP megnövekedett expresszióját, utalva ezzel lehetséges szerepére, amely későbbi kutatások során potenciális terápiás célpontként való felhasználására is lehetőséget adhat. A T-sejt aktiváció hatására bekövetkező miRNS mintázat TNF által szabályozott megváltozásáról szintén elsőként számolunk be, amely komplex hatásmechanizmusok megismerését teszi lehetővé.

Munkánkat a 33. ábra foglalja össze.



33. ábra: Eredményeinket bemutató összefoglaló ábra.

## 6. Következtetések

Munkánk során a TNF, mint központi szerepet betöltő gyulladási citokin T-sejt receptor jelátvitelt módosító hatását vizsgáltuk. A TNF receptorához való kötődése szelektíven csökkenti a sejtfelszínen található CD3 $\zeta$ -láncok mennyiségét, amely közvetlenül hozzájárul a sejtek alacsonyabb aktiválhatósági állapotához. Lévén, hogy a TNF számos jelpálya aktiválásával hozza létre elsősorban proinflammatorikus hatásait, a vizsgált jelenség mögött álló mechanizmus feltárása is nagyon szerteágazó. Egyrészt, megfigyeléseink szerint a TNF megnöveli a  $\zeta$ -lánc szabályozásában kulcsszerepet játszó SLAP fehérje mennyiségét, ami további eredményeink szerint megfigyelhető RA-s betegek T-limfocitáiban is. Mindez arra enged következtetni, hogy a SLAP-nak szerepe lehet a betegség patomechanizmusában. A CD3 $\zeta$ -lánc lebomlási folyamatainak vizsgálatai rámutatnak, hogy míg a TCR-en keresztül érkező jelek hatására a lizoszómális degradáció túlsúlya jellemző, addig TNF jelenlétében a proteaszómák szerepe hangsúlyos. Mindezt elősegítheti a SLAP-pal asszociált ubiquitin szignált generáló molekulák  $\zeta$ -lánchoz történő asszociációja. Bár a TNF  $\zeta$ -láncra kifejtett hatásának pontos mechanizmusa továbbra sem teljesen tisztázott, eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az NF- $\kappa$ B-től független módon érvényesül, és valószínűnek látszik, hogy a transláció miRNS-ek által szabályozott gátlása is szerepet játszik benne.

A miRNS-ek, amelyek az aktivációs folyamatok rendkívül hatékony szabályozói, eredményeink szerint fontos szerepet játszhatnak a jelpályák szabályozásában. Az RA-ban megváltozott expressziót mutató miRNS-ek, rendre eltérő kifejeződést mutatnak *in vitro* TNF jelenlétében. A mir-155 és a mir-181a TNF hatására bekövetkező eltérő szabályozása, a TNF T-limfocita aktivációt szabályozó szerepe mellett szól.

Összességében, eredményeink szerint a TNF emelkedett szintje a T-limfociták környezetében megváltoztatja azok működését, és így befolyásolhatja az immunválasz kimenetelét.

## 7. Összefoglalás

Munkánk során a gyulladással járó folyamatokban jelentkező kóros T-limfocita válaszhoz vezető mechanizmusok és mikroRNS-ek vizsgálatát tűztük ki célul. Kimutattuk, hogy a TNF $\alpha$  dóziszfüggően és reverzibilisen csökkenti a CD3 $\zeta$ -lánc mennyiségét humán T-limfocitákon. Igazoltuk, hogy a többi CD3-lánc érintetlen marad a folyamat során, ami a  $\zeta$ -lánc szelektív szabályozását igazolja. A sejtfelszínen jelen lévő  $\zeta$ -lánc csökkenése funkcionális következményekkel jár, amely eredményeink alapján az IL-2 termelés és a Ca<sup>2+</sup>-válasz csökkenésében nyilvánul meg. Eredményeink szerint TNF hatására nem változik a  $\zeta$ -lánc mRNS expressziója, ami így nem magyarázhatja a fehérje szintű csökkenést sem. A degradációs folyamatok tanulmányozása során több módszert alkalmazva kimutattuk, hogy TNF hatására a  $\zeta$ -láncok lebomlása a proteaszómális útvonalára terelődik. Ebben a folyamatban központi szerepet játszik a SLAP, amelynek expressziója emelkedik a TNF hatására és siRNS-sel történő gátlása kivédi a TNF által kiváltott  $\zeta$ -lánc csökkenést. A p21 $\zeta$  foszforilált formáját magasabbnak találtuk TNF jelenlétében, amely a SLAP kötődését elősegítve tovább fokozhatja a  $\zeta$ -lánc csökkentő hatást. Kimutattuk, hogy a SLAP expressziója magasabb RA-s betegek perifériás T-limfocitáiban, valamint a különböző terápiában részesülők között eltérően viselkedik TNF hatására. A SLAP TNF hatására bekövetkező emelkedése nem magyarázható a transzkripció fokozódásával, így feltehetően a bomlása gátolt a vizsgált folyamatokban. Igazoltuk, hogy a TNF csökkenti a mir-155 aktiváció indukált expresszió növekedését, és felvetettük annak lehetőségét, hogy szerepet játszik a SLAP szabályozásában, amit a target predikciós elemzéseink is alátámasztanak. Kimutattuk, hogy a mir-181a expressziójának csökkenése elmarad TNF jelenlétében, ami további vizsgálatok tárgyát képezheti a T-sejt aktiváció gátlásának tanulmányozása során. Eredményeink szerint a regulatórikus T-sejt homeosztázisban és a TNF jelátviteli útvonal szabályozásában fontos mir-146a expressziója megváltozott lefutást mutat a TNF hatására T-limfocitákban, valamint, hogy az RA asszociált mir-132 expressziója fokozódik hízósejt aktivációban. Mindezek tükrében munkánk hozzájárulhat a kóros T-limfocita aktivációval társult gyulladós folyamatok patomechanizmusának jobb megismeréséhez.

## 8. Summary

In the present study we investigated the mechanism underlies the altered T-lymphocyte function associated with the inflammatory disorders and the possible role of microRNAs in these processes. We confirmed that TNF downregulates CD3 $\zeta$ -chain on human T-lymphocyte reversibly and dose-dependently. Other TCR-chains are not affected under these conditions, which support the idea that  $\zeta$ -chain is regulated in a distinct manner and may dissociate from other TCR subunits. The selective absence of CD3 $\zeta$  leads to an altered T-cell activation, which can be characterized with decreased IL-2 production and Ca<sup>2+</sup>-response. According to our findings this observation cannot be explained by the altered gene expression, hence TNF does not affect the mRNA level. According to our observations the degradation mechanisms involved in the control of  $\zeta$ -chain. A shift was obtained in the degradation process with the predominance of the proteasomal pathway, which was proved by two different methods. SLAP plays a key role in this mechanism since its expression is increased after TNF treatment and colocalization can also be observed between CD3 $\zeta$  and SLAP. Furthermore, the downregulation of  $\zeta$ -chain is inhibited by silencing of SLAP with siRNAs. We found that p21 phosphorylated form of  $\zeta$  is elevated in the presence of TNF, which may contribute to the downregulation by ensuring more docking site for SLAP. An enhanced SLAP expression was identified in patients with rheumatoid arthritis, while TNF induced SLAP upregulation was altered among the different types of the disease treatment. Because the gene expression of SLAP was unaffected by TNF, we suggest that the degradation process is responsible for the upregulation. We measured a decreased mir-155 transcription in the presence TNF in case of activation of T-cells, and we propose that this may contribute to the elevated SLAP expression, which was confirmed by the target prediction analysis as well. The activation-induced downregulation of mir-181a is attenuated by TNF, which might modify the termination of signaling events. We detected an altered kinetics in the expression of the Treg function and TNF signaling regulator mir-146a upon TNF treatment, while the RA associated mir-132 shows an elevation due to mast cell activation. Taken together, our data may provide a better insight in the exploration of pathological T-lymphocyte activation associated with inflammatory disorders.

## 9. Irodalomjegyzék

- 1 Zhu J, Yamane H, Paul WE. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 28: 445-489.
- 2 Hirahara K, Vahedi G, Ghoreschi K, Yang XP, Nakayamada S, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A. (2011) Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology*, 134: 235-245.
- 3 Rutledge T, Cosson P, Manolios N, Bonifacino JS, Klausner RD. (1992) Transmembrane helical interactions: zeta chain dimerization and functional association with the T cell antigen receptor. *EMBO J*, 11: 3245-3254.
- 4 Call ME, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. (2004) Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 23: 2348-2357.
- 5 Minami Y, Weissman AM, Samelson LE, Klausner RD. (1987) Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 2688-2692.
- 6 Sussman JJ, Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM, Saito T, Klausner RD, Ashwell JD. (1988) Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*, 52: 85-95.
- 7 Dietrich J, Kastrup J, Lauritsen JP, Menne C, von Bulow F, Geisler C. (1999) TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur J Immunol*, 29: 1719-1728.
- 8 Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. (2000) On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*, 13: 665-675.
- 9 Ono S, Ohno H, Saito T. (1995) Rapid turnover of the CD3 zeta chain independent of the TCR-CD3 complex in normal T cells. *Immunity*, 2: 639-644.
- 10 Grassi F, Barbier E, Porcellini S, von Boehmer H, Cazenave PA. (1999) Surface expression and functional competence of CD3-independent TCR zeta-chains in immature thymocytes. *J Immunol*, 162: 2589-2596.
- 11 Krogsgaard M, Li QJ, Sumen C, Huppa JB, Huse M, Davis MM. (2005) Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature*, 434: 238-243.
- 12 Schamel WW, Risueno RM, Minguet S, Ortiz AR, Alarcon B. (2006) A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex. *Trends Immunol*, 27: 176-182.

- 13 Bunnell SC, Kapoor V, Tribble RP, Zhang W, Samelson LE. (2001) Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*, 14: 315-329.
- 14 Campi G, Varma R, Dustin ML. (2005) Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med*, 202: 1031-1036.
- 15 Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. (2002) T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*, 295: 1539-1542.
- 16 Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. (1994) Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*, 263: 1136-1139.
- 17 Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. (1988) The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell*, 55: 301-308.
- 18 Yamaguchi H, Hendrickson WA. (1996) Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature*, 384: 484-489.
- 19 Veillette A, Fournel M. (1990) The CD4 associated tyrosine protein kinase p56lck is positively regulated through its site of autophosphorylation. *Oncogene*, 5: 1455-1462.
- 20 Nika K, Soldani C, Salek M, Paster W, Gray A, Etzensperger R, Fugger L, Polzella P, Cerundolo V, Dushek O, Hofer T, Viola A, Acuto O. (2010) Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, 32: 766-777.
- 21 Davis SJ, van der Merwe PA. (2011) Lck and the nature of the T cell receptor trigger. *Trends Immunol*, 32: 1-5.
- 22 Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, Chakraborty AK. (2010) CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 16916-16921.
- 23 Straus DB, Weiss A. (1992) Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell*, 70: 585-593.
- 24 Love PE, Hayes SM. (2010) ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2: a002485.
- 25 Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. (1992) ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, 71: 649-662.



- 26 Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, 92: 83-92.
- 27 Sommers CL, Samelson LE, Love PE. (2004) LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays*, 26: 61-67.
- 28 Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. (2006) SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol*, 6: 67-78.
- 29 Liu KQ, Bunnell SC, Gurniak CB, Berg LJ. (1998) T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells. *J Exp Med*, 187: 1721-1727.
- 30 Rhee SG. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, 70: 281-312.
- 31 Melowic HR, Stahelin RV, Blatner NR, Tian W, Hayashi K, Altman A, Cho W. (2007) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C $\theta$ . *J Biol Chem*, 282: 21467-21476.
- 32 Genot E, Cantrell DA. (2000) Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 12: 289-294.
- 33 D'Ambrosio D, Cantrell DA, Frati L, Santoni A, Testi R. (1994) Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur J Immunol*, 24: 616-620.
- 34 Oh-hora M, Rao A. (2008) Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 20: 250-258.
- 35 Busse R, Mulsch A. (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, 265: 133-136.
- 36 Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 52: 375-414.
- 37 Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzas E, Perl A. (2010) Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 12: 210.
- 38 Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. (2004) Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca<sup>2+</sup> signaling profile of lupus T cells. *J Immunol*, 173: 3676-3683.
- 39 Oh-hora M. (2009) Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev*, 231: 210-224.

- 40 Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A. (1996) An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272: 892-895.
- 41 Kiani A, Viola JP, Lichtman AH, Rao A. (1997) Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity*, 7: 849-860.
- 42 Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126: 375-387.
- 43 Liao W, Lin JX, Leonard WJ. (2011) IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 23: 598-604.
- 44 Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ. (2011) Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol*, 12: 551-559.
- 45 Schwartzberg PL, Finkelstein LD, Readinger JA. (2005) TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 5: 284-295.
- 46 van Oers NS, Tohlen B, Malissen B, Moomaw CR, Afendis S, Slaughter CA. (2000) The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat Immunol*, 1: 322-328.
- 47 van Oers NS, Tao W, Watts JD, Johnson P, Aebersold R, Teh HS. (1993) Constitutive tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor (TCR) zeta subunit: regulation of TCR-associated protein tyrosine kinase activity by TCR zeta. *Mol Cell Biol*, 13: 5771-5780.
- 48 van Oers NS, Killeen N, Weiss A. (1994) ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity*, 1: 675-685.
- 49 Stefanova I, Dorfman JR, Germain RN. (2002) Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature*, 420: 429-434.
- 50 Kersh EN, Kersh GJ, Allen PM. (1999) Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. *J Exp Med*, 190: 1627-1636.
- 51 Pitcher LA, van Oers NS. (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol*, 24: 554-560.
- 52 Witherden D, van Oers N, Waltzinger C, Weiss A, Benoist C, Mathis D. (2000) Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival

- signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*, 191: 355-364.
- 53 Pitcher LA, Mathis MA, Subramanian S, Young JA, Wakeland EK, Love PE, van Oers NS. (2005) Selective expression of the 21-kilodalton tyrosine-phosphorylated form of TCR zeta promotes the emergence of T cells with autoreactive potential. *J Immunol*, 174: 6071-6079.
- 54 Strous GJ, Govers R. (1999) The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 10): 1417-1423.
- 55 Valitutti S, Muller S, Salio M, Lanzavecchia A. (1997) Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med*, 185: 1859-1864.
- 56 Ouchida R, Yamasaki S, Hikida M, Masuda K, Kawamura K, Wada A, Mochizuki S, Tagawa M, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Koseki H, Saito T, Kurosaki T, Wang JY. (2008) A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Immunity*, 29: 33-43.
- 57 Wang HY, Altman Y, Fang D, Elly C, Dai Y, Shao Y, Liu YC. (2001) Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J Biol Chem*, 276: 26004-26011.
- 58 Pandey A, Duan H, Dixit VM. (1995) Characterization of a novel Src-like adapter protein that associates with the Eck receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 270: 19201-19204.
- 59 Tang J, Sawasdikosol S, Chang JH, Burakoff SJ. (1999) SLAP, a dimeric adapter protein, plays a functional role in T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 9775-9780.
- 60 Myers MD, Sosinowski T, Dragone LL, White C, Band H, Gu H, Weiss A. (2006) Src-like adaptor protein regulates TCR expression on thymocytes by linking the ubiquitin ligase c-Cbl to the TCR complex. *Nat Immunol*, 7: 57-66.
- 61 Sosinowski T, Killeen N, Weiss A. (2001) The Src-like adaptor protein downregulates the T cell receptor on CD4+CD8+ thymocytes and regulates positive selection. *Immunity*, 15: 457-466.
- 62 Myers MD, Dragone LL, Weiss A. (2005) Src-like adaptor protein down-regulates T cell receptor (TCR)-CD3 expression by targeting TCRzeta for degradation. *J Cell Biol*, 170: 285-294.
- 63 Sosinowski T, Pandey A, Dixit VM, Weiss A. (2000) Src-like adaptor protein (SLAP) is a negative regulator of T cell receptor signaling. *J Exp Med*, 191: 463-474.

- 64 Roche S, Alonso G, Kazlauskas A, Dixit VM, Courtneidge SA, Pandey A. (1998) Src-like adaptor protein (Slap) is a negative regulator of mitogenesis. *Curr Biol*, 8: 975-978.
- 65 Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. (2003) Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*, 426: 454-460.
- 66 Peterson LK, Shaw LA, Joetham A, Sakaguchi S, Gelfand EW, Dragone LL. (2011) SLAP deficiency enhances number and function of regulatory T cells preventing chronic autoimmune arthritis in SKG mice. *J Immunol*, 186: 2273-2281.
- 67 Friend SF, Peterson LK, Kedl RM, Dragone LL. (2012) SLAP deficiency increases TCR avidity leading to altered repertoire and negative selection of cognate antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunol Res*, 55: 116-24.
- 68 Park SK, Qiao H, Beaven MA. (2009) Src-like adaptor protein (SLAP) is upregulated in antigen-stimulated mast cells and acts as a negative regulator. *Mol Immunol*, 46: 2133-2139.
- 69 Dragone LL, Myers MD, White C, Sosinowski T, Weiss A. (2006) SRC-like adaptor protein regulates B cell development and function. *J Immunol*, 176: 335-345.
- 70 Lontos LM, Dissanayake D, Ohashi PS, Weiss A, Dragone LL, McGlade CJ. (2011) The Src-like adaptor protein regulates GM-CSFR signaling and monocytic dendritic cell maturation. *J Immunol*, 186: 1923-1933.
- 71 Kim HJ, Zou W, Ito Y, Kim SY, Chappel J, Ross FP, Teitelbaum SL. (2010) Src-like adaptor protein regulates osteoclast generation and survival. *J Cell Biochem*, 110: 201-209.
- 72 Pages F, Ragueneau M, Rottapel R, Truneh A, Nunes J, Imbert J, Olive D. (1994) Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature*, 369: 327-329.
- 73 Burr JS, Savage ND, Messah GE, Kimzey SL, Shaw AS, Arch RH, Green JM. (2001) Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol*, 166: 5331-5335.
- 74 Pei Y, Zhu P, Dang Y, Wu J, Yang X, Wan B, Liu JO, Yi Q, Yu L. (2008) Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation. *J Immunol*, 180: 222-229.
- 75 Acuto O, Michel F. (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*, 3: 939-951.

- 76 Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397: 263-266.
- 77 van Essen D, Kikutani H, Gray D. (1995) CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*, 378: 620-623.
- 78 So T, Croft M. (2012) Regulation of the PKC $\theta$ -NF- $\kappa$ B Axis in T Lymphocytes by the Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member OX40. *Front Immunol*, 3: 133.
- 79 Wingren AG, Parra E, Varga M, Kalland T, Sjogren HO, Hedlund G, Dohlsten M. (1995) T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol*, 15: 235-253.
- 80 Mor A, Campi G, Du G, Zheng Y, Foster DA, Dustin ML, Philips MR. (2007) The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nat Cell Biol*, 9: 713-719.
- 81 Yokosuka T, Saito T. (2009) Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev*, 229: 27-40.
- 82 Sharpe AH. (2009) Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*, 229: 5-11.
- 83 Cloutier JF, Veillette A. (1999) Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med*, 189: 111-121.
- 84 Wu J, Katrekar A, Honigberg LA, Smith AM, Conn MT, Tang J, Jeffery D, Mortara K, Sampang J, Williams SR, Buggy J, Clark JM. (2006) Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *J Biol Chem*, 281: 11002-11010.
- 85 Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. (1991) CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem*, 266: 24249-24252.
- 86 Lin H, Rathmell JC, Gray GS, Thompson CB, Leiden JM, Alegre ML. (1998) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J Exp Med*, 188: 199-204.
- 87 Grohmann U, Puccetti P. (2003) CTLA-4, T helper lymphocytes and dendritic cells: an internal perspective of T-cell homeostasis. *Trends Mol Med*, 9: 133-135.

- 88 Naramura M, Jang IK, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H. (2002) c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol*, 3: 1192-1199.
- 89 Balagopalan L, Barr VA, Sommers CL, Barda-Saad M, Goyal A, Isakowitz MS, Samelson LE. (2007) c-Cbl-mediated regulation of LAT-nucleated signaling complexes. *Mol Cell Biol*, 27: 8622-8636.
- 90 Gilfillan AM, Beaven MA. (2011) Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol*, 31: 475-529.
- 91 Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. (1999) Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*, 94: 2333-2342.
- 92 Kraft S, Kinet JP. (2007) New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol*, 7: 365-378.
- 93 Gilfillan AM, Tkaczyk C. (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, 6: 218-230.
- 94 Okayama Y, Hageman DD, Metcalfe DD. (2001) A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol*, 166: 4705-4712.
- 95 Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*, 109: 1351-1359.
- 96 Qiao H, Andrade MV, Lisboa FA, Morgan K, Beaven MA. (2006) FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood*, 107: 610-618.
- 97 Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. (1997) Mast cells. *Physiol Rev*, 77: 1033-1079.
- 98 Stevens RL, Adachi R. (2007) Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunol Rev*, 217: 155-167.
- 99 Okayama Y. (2005) Mast cell-derived cytokine expression induced via Fc receptors and Toll-like receptors. *Chem Immunol Allergy*, 87: 101-110.
- 100 Hershko AY, Rivera J. (2010) Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity. *Immunol Lett*, 128: 98-104.

- 101 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854.
- 102 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853-858.
- 103 Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14: 1902-1910.
- 104 Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10: 1957-1966.
- 105 Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432: 235-240.
- 106 Kim VN. (2004) MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, 14: 156-159.
- 107 Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*, 293: 834-838.
- 108 Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.
- 109 Bruno I, Wilkinson MF. (2006) P-bodies react to stress and nonsense. *Cell*, 125: 1036-1038.
- 110 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- 111 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22: 326-330.
- 112 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366.
- 113 Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455: 58-63.
- 114 Gaidatzis D, van Nimwegen E, Hausser J, Zavolan M. (2007) Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, 8: 69.

- 115 Mendell JT. (2008) miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, 133: 217-222.
- 116 Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N. (2007) miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*, 2: e1020.
- 117 Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303: 83-86.
- 118 Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ. (2007) miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 129: 147-161.
- 119 Ebert PJ, Jiang S, Xie J, Li QJ, Davis MM. (2009) An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. *Nat Immunol*, 10: 1162-1169.
- 120 Luo L, Li C, Wu W, Lu J, Zhou Y, Shan J, Li S, Long D, Guo Y, Li Y, Feng L. (2012) Functional analysis of alloreactive memory CD4+ T cells derived from skin transplantation recipient and naive CD4+ T cells derived from untreated mice. *J Surg Res*, 176: 649-656.
- 121 Zhu DX, Zhu W, Fang C, Fan L, Zou ZJ, Wang YH, Liu P, Hong M, Miao KR, Xu W, Li JY. (2012) miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*, 33: 1294-1301.
- 122 Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, Ramakrishnan P, Taganov KD, Zhao JL, Baltimore D. (2012) miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med*, 209: 1655-1670.
- 123 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12481-12486.
- 124 Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY. (2010) Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, 142: 914-929.
- 125 Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, Franceschini D, Meloni F, Barnaba V, Macino G. (2010) An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*, 115: 265-273.
- 126 Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Orjalo AV, Rodier F, Lithgow GJ, Campisi J. (2009) MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the



- senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging* (Albany NY), 1: 402-411.
- 127 Rusca N, Deho L, Montagner S, Zielinski CE, Sica A, Sallusto F, Monticelli S. (2012) MiR-146a and NF- $\kappa$ B1 regulate mast cell survival and T lymphocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 32: 4432-44.
- 128 Etzrodt M, Cortez-Retamozo V, Newton A, Zhao J, Ng A, Wildgruber M, Romero P, Wurdinger T, Xavier R, Geissmann F, Meylan E, Nahrendorf M, Swirski FK, Baltimore D, Weissleder R, Pittet MJ. (2012) Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Rep*, 1: 317-324.
- 129 Jurkin J, Schichl YM, Koefel R, Bauer T, Richter S, Konradi S, Gesslbauer B, Strobl H. (2010) miR-146a is differentially expressed by myeloid dendritic cell subsets and desensitizes cells to TLR2-dependent activation. *J Immunol*, 184: 4955-4965.
- 130 Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, Gotch F, Boshoff C. (2010) miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol*, 12: 513-519.
- 131 Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C. (2009) Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood*, 113: 4914-4917.
- 132 Formosa A, Lena AM, Markert EK, Cortelli S, Miano R, Mauriello A, Croce N, Vandesompele J, Mestdagh P, Finazzi-Agro E, Levine AJ, Melino G, Bernardini S, Candi E. (2012) DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene*, 32: 127-34.
- 133 Zhang S, Hao J, Xie F, Hu X, Liu C, Tong J, Zhou J, Wu J, Shao C. (2011) Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development. *Carcinogenesis*, 32: 1183-1189.
- 134 Anand S, Cheresch DA. (2011) Emerging Role of Micro-RNAs in the Regulation of Angiogenesis. *Genes Cancer*, 2: 1134-1138.
- 135 Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frendewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Supprian M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K. (2007) Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, 316: 604-608.
- 136 Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 316: 608-611.

- 137 Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, Vigorito E. (2009) Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol*, 182: 2578-2582.
- 138 Stahl HF, Fauti T, Ullrich N, Bopp T, Kubach J, Rust W, Labhart P, Alexiadis V, Becker C, Hafner M, Weith A, Lenter MC, Jonuleit H, Schmitt E, Mennerich D. (2009) miR-155 inhibition sensitizes CD4+ Th cells for TREG mediated suppression. *PLoS One*, 4: e7158.
- 139 Fassi Fehri L, Koch M, Belogolova E, Khalil H, Bolz C, Kalali B, Mollenkopf HJ, Beigier-Bompadre M, Karlas A, Schneider T, Churin Y, Gerhard M, Meyer TF. (2010) *Helicobacter pylori* induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS One*, 5: e9500.
- 140 Das LM, Torres-Castillo MD, Gill T, Levine AD. (2012) TGF-beta conditions intestinal T cells to express increased levels of miR-155, associated with down-regulation of IL-2 and itk mRNA. *Mucosal Immunol*, 6: 167-76.
- 141 O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. (2009) Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 7113-7118.
- 142 Trotta R, Chen L, Ciarlariello D, Josyula S, Mao C, Costinean S, Yu L, Butchar JP, Tridandapani S, Croce CM, Caligiuri MA. (2012) miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells. *Blood*, 119: 3478-3485.
- 143 Huang X, Shen Y, Liu M, Bi C, Jiang C, Iqbal J, McKeithan TW, Chan WC, Ding SJ, Fu K. (2012) Quantitative proteomics reveals that miR-155 Regulates the PI3K-AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 181: 26-33.
- 144 Willimott S, Wagner SD. (2012) miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells. *J Biol Chem*, 287: 2608-2617.
- 145 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 3666-3670.
- 146 Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312: 724-729.
- 147 Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. (2010) Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*, 49: 1215-1228.

- 148 Vilcek J, Lee TH. (1991) Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*, 266: 7313-7316.
- 149 Smith RA, Baglioni C. (1987) The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem*, 262: 6951-6954.
- 150 Pocsik E, Duda E, Wallach D. (1995) Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells. *J Inflamm*, 45: 152-160.
- 151 Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, 385: 729-733.
- 152 Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288: 2351-2354.
- 153 Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. (2004) Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Curr Med Chem*, 11: 2205-2212.
- 154 Lee TH, Shank J, Cusson N, Kelliher MA. (2004) The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J Biol Chem*, 279: 33185-33191.
- 155 Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. (2006) Activation of IKK by TNF $\alpha$  requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*, 22: 245-257.
- 156 Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. (1998) NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281: 1680-1683.
- 157 Gupta S. (2002) A decision between life and death during TNF- $\alpha$ -induced signaling. *J Clin Immunol*, 22: 185-194.
- 158 Baker SJ, Reddy EP. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12: 1-9.
- 159 Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83: 793-802.
- 160 Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG. (2008) Both cIAP1 and

- cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11778-11783.
- 161 Kim EY, Priatel JJ, Teh SJ, Teh HS. (2006) TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. *J Immunol*, 176: 1026-1035.
- 162 Kim EY, Teh HS. (2001) TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol*, 167: 6812-6820.
- 163 Hildebrandt GC, Olkiewicz KM, Corrion L, Clouthier SG, Pierce EM, Liu C, Cooke KR. (2008) A role for TNF receptor type II in leukocyte infiltration into the lung during experimental idiopathic pneumonia syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14: 385-396.
- 164 Corredor J, Yan F, Shen CC, Tong W, John SK, Wilson G, Whitehead R, Polk DB. (2003) Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C953-961.
- 165 Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K. (2007) Tumor necrosis factor- $\alpha$  is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H743-753.
- 166 Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UL. (2004) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- $\kappa$ B pathway. *J Biol Chem*, 279: 32869-32881.
- 167 Dieude P, Petit E, Cailleau-Moindrault S, Osorio J, Pierlot C, Martinez M, Faure S, Alibert O, Lasbleiz S, De Toma C, Bardin T, Prum B, Cornelis F. (2002) Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum*, 46: 2039-2044.
- 168 Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M, Hagiwara K, Tokunaga K. (1999) Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 53: 527-533.
- 169 Goto N, Tsurumi H, Takemura M, Hara T, Sawada M, Kasahara S, Kanemura N, Yamada T, Shimizu M, Takahashi T, Tomita E, Seishima M, Takami T, Moriwaki H. (2006) Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNF-R2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*, 77: 217-225.
- 170 Zekri AR, Hafez MM, Bahnassy AA, Hassan ZK, Mansour T, Kamal MM, Khaled HM. (2008) Genetic profile of Egyptian hepatocellular-carcinoma

associated with hepatitis C virus Genotype 4 by 15 K cDNA microarray: preliminary study. *BMC Res Notes*, 1: 106.

- 171 Chen X, Hamano R, Subleski JJ, Hurwitz AA, Howard OM, Oppenheim JJ. (2010) Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3-conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 185: 174-182.
- 172 Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard OM, Wiltout RH, Oppenheim JJ. (2010) Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol*, 40: 1099-1106.
- 173 van Mierlo GJ, Scherer HU, Hameetman M, Morgan ME, Flierman R, Huizinga TW, Toes RE. (2008) Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J Immunol*, 180: 2747-2751.
- 174 Chen X, Oppenheim JJ. (2010) TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun*, 11: 119-134.
- 175 Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. (2007) Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*, 179: 154-161.
- 176 Stoop JN, Woltman AM, Biesta PJ, Kusters JG, Kuipers EJ, Janssen HL, van der Molen RG. (2007) Tumor necrosis factor alpha inhibits the suppressive effect of regulatory T cells on the hepatitis B virus-specific immune response. *Hepatology*, 46: 699-705.
- 177 Cabal-Hierro L, Lazo PS. (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*, 24: 1297-1305.
- 178 Haider S, Knofler M. (2009) Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta*, 30: 111-123.
- 179 Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH. (2002) Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 31: 355-360.
- 180 Lee HS, Lee AT, Criswell LA, Seldin MF, Amos CI, Carulli JP, Navarrete C, Remmers EF, Kastner DL, Plenge RM, Li W, Gregersen PK. (2008) Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP-antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. *Mol Med*, 14: 293-300.
- 181 Vignat C, Bansal AT, Balding DJ, Binks MH, Dickson MC, Montgomery DS, Wilson AG. (2009) Genetic association of the major histocompatibility complex

- with rheumatoid arthritis implicates two non-DRB1 loci. *Arthritis Rheum*, 60: 53-62.
- 182 Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 34: 395-402.
- 183 Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, Donn R, Thomson W, Silman A, Worthington J. (2005) Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. *Arthritis Rheum*, 52: 1694-1699.
- 184 Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekbohm A, Eklund A, Hoglund CO, Askling J. (2010) Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 181: 1217-1222.
- 185 van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. (2009) Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 60: 2232-2241.
- 186 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 376: 1094-1108.
- 187 Brennan FM, Gibbons DL, Mitchell T, Cope AP, Maini RN, Feldmann M. (1992) Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur J Immunol*, 22: 1907-1912.
- 188 Brennan FM, McInnes IB. (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 118: 3537-3545.
- 189 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. (2000) Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191: 275-286.
- 190 Thalayasingam N, Isaacs JD. (2011) Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 25: 549-567.

- 191 Cope AP, Londei M, Chu NR, Cohen SB, Elliott MJ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. (1994) Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 94: 749-760.
- 192 Cope AP. (2002) Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3: S197-211.
- 193 Sivakumar B, Akhavan MA, Winlove CP, Taylor PC, Paleolog EM, Kang N. (2008) Synovial hypoxia as a cause of tendon rupture in rheumatoid arthritis. *J Hand Surg Am*, 33: 49-58.
- 194 Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. (1981) Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet*, 2: 839-842.
- 195 Simon AK, Seipelt E, Sieper J. (1994) Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 8562-8566.
- 196 Davis LS, Cush JJ, Schulze-Koops H, Lipsky PE. (2001) Rheumatoid synovial CD4+ T cells exhibit a reduced capacity to differentiate into IL-4-producing T-helper-2 effector cells. *Arthritis Res*, 3: 54-64.
- 197 Emery P, Panayi GS, Nouri AM. (1984) Interleukin-2 reverses deficient cell-mediated immune responses in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 57: 123-129.
- 198 Malone DG, Wahl SM, Tsokos M, Cattell H, Decker JL, Wilder RL. (1984) Immune function in severe, active rheumatoid arthritis. A relationship between peripheral blood mononuclear cell proliferation to soluble antigens and synovial tissue immunohistologic characteristics. *J Clin Invest*, 74: 1173-1185.
- 199 Maurice MM, Lankester AC, Bezemer AC, Geertsma MF, Tak PP, Breedveld FC, van Lier RA, Verweij CL. (1997) Defective TCR-mediated signaling in synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 159: 2973-2978.
- 200 Berg L, Ronnelid J, Klareskog L, Bucht A. (2000) Down-regulation of the T cell receptor CD3 zeta chain in rheumatoid arthritis (RA) and its influence on T cell responsiveness. *Clin Exp Immunol*, 120: 174-182.
- 201 Cush JJ, Lipsky PE. (1988) Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31: 1230-1238.
- 202 Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. (1996) CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest*, 97: 2027-2037.

- 203 Gringhuis SI, Leow A, Papendrecht-Van Der Voort EA, Remans PH, Breedveld FC, Verweij CL. (2000) Displacement of linker for activation of T cells from the plasma membrane due to redox balance alterations results in hyporesponsiveness of synovial fluid T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 164: 2170-2179.
- 204 Carruthers DM, Arrol HP, Bacon PA, Young SP. (2000) Dysregulated intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> signaling in synovial fluid T lymphocytes from patients with chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 1257-1265.
- 205 Collantes E, Valle Blazquez M, Mazon V, Macho A, Aranda E, Munoz E. (1998) Nuclear factor-kappa B activity in T cells from patients with rheumatic diseases: a preliminary report. *Ann Rheum Dis*, 57: 738-741.
- 206 Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G. (2000) Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 2501-2512.
- 207 Maurice MM, Nakamura H, van der Voort EA, van Vliet AI, Staal FJ, Tak PP, Breedveld FC, Verweij CL. (1997) Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 158: 1458-1465.
- 208 Yoshida S, Katoh T, Tetsuka T, Uno K, Matsui N, Okamoto T. (1999) Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: its costimulatory roles in the TNF-alpha-induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. *J Immunol*, 163: 351-358.
- 209 Nagy G, Clark JM, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, Koncz A, Falus A, Cope AP. (2008) Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*, 118: 55-58.
- 210 Moreland L, Bate G, Kirkpatrick P. (2006) Abatacept. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 185-186.
- 211 Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. (2005) The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther*, 7 Suppl 2: S4-14.
- 212 Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Mitchell T, Feldmann M, Maini RN. (1992) Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum*, 35: 1170-1178.



- 213 Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*, 10: 4025-4031.
- 214 Isomaki P, Panesar M, Annenkov A, Clark JM, Foxwell BM, Chernajovsky Y, Cope AP. (2001) Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *J Immunol*, 166: 5495-5507.
- 215 Nigrovic PA, Lee DM. (2007) Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev*, 217: 19-37.
- 216 Gotis-Graham I, McNeil HP. (1997) Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum*, 40: 479-489.
- 217 Godfrey HP, Ilardi C, Engber W, Graziano FM. (1984) Quantitation of human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 27: 852-856.
- 218 Pimentel TA, Sampaio AL, D'Acquisto F, Perretti M, Oliani SM. (2011) An essential role for mast cells as modulators of neutrophils influx in collagen-induced arthritis in the mouse. *Lab Invest*, 91: 33-42.
- 219 Ceponis A, Konttinen YT, Takagi M, Xu JW, Sorsa T, Matucci-Cerinic M, Santavirta S, Bankl HC, Valent P. (1998) Expression of stem cell factor (SCF) and SCF receptor (c-kit) in synovial membrane in arthritis: correlation with synovial mast cell hyperplasia and inflammation. *J Rheumatol*, 25: 2304-2314.
- 220 Ruschpler P, Lorenz P, Eichler W, Koczan D, Hanel C, Scholz R, Melzer C, Thiesen HJ, Stiehl P. (2003) High CXCR3 expression in synovial mast cells associated with CXCL9 and CXCL10 expression in inflammatory synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 5: R241-252.
- 221 Tetlow LC, Woolley DE. (1995) Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis*, 54: 896-903.
- 222 Tetlow LC, Woolley DE. (1995) Distribution, activation and tryptase/chymase phenotype of mast cells in the rheumatoid lesion. *Ann Rheum Dis*, 54: 549-555.
- 223 Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobezie R, Stevens RL, Lee DM. (2009) Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol*, 182: 647-656.
- 224 Frewin DB, Cleland LG, Jonsson JR, Robertson PW. (1986) Histamine levels in human synovial fluid. *J Rheumatol*, 13: 13-14.

- 225 Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M, Sillaber C, Graninger WB, Smolen JS, Valent P. (1998) Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41: 233-245.
- 226 Bartholomew JS, Evanson JM, Woolley DE. (1991) Serum IgE anti-cartilage collagen antibodies in rheumatoid patients. *Rheumatol Int*, 11: 37-40.
- 227 Zuraw BL, O'Hair CH, Vaughan JH, Mathison DA, Curd JG, Katz DH. (1981) Immunoglobulin E-rheumatoid factor in the serum of patients with rheumatoid arthritis, asthma, and other diseases. *J Clin Invest*, 68: 1610-1613.
- 228 Gruber B, Ballan D, Gorevic PD. (1988) IgE rheumatoid factors: quantification in synovial fluid and ability to induce synovial mast cell histamine release. *Clin Exp Immunol*, 71: 289-294.
- 229 Gruber B. (1989) Activation of rheumatoid synovial mast cells. Role of IgE-associated antiglobulins. *Monogr Allergy*, 26: 120-134.
- 230 Marcelletti JF, Ohara J, Katz DH. (1991) Collagen-induced arthritis in mice. Relationship of collagen-specific and total IgE synthesis to disease. *J Immunol*, 147: 4185-4191.
- 231 Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes IB. (2010) Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*, 184: 3336-3340.
- 232 Chatzikiyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. (2012) miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev*, 11: 636-641.
- 233 Filkova M, Jungel A, Gay RE, Gay S. (2012) MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*, 26: 131-141.
- 234 Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. (2008) Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 58: 1001-1009.
- 235 Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H. (2008) Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 58: 1284-1292.
- 236 Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. (2008) Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 10: R101.
- 237 Chatzikiyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. (2010) A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase

- (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine*, 77: 411-413.
- 238 Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, Reilly J, Ierna M, Fraser AR, Stolarski B, McSharry C, Hueber AJ, Baxter D, Hunter J, Gay S, Liew FY, McInnes IB. (2011) MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 11193-11198.
- 239 Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, Koenders MI, van den Berg WB, Smolen J, Redlich K. (2011) Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, 63: 1281-1288.
- 240 Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T. (2010) Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 12: R86.
- 241 Joyce JA, Pollard JW. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9: 239-252.
- 242 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 62: 2569-2581.
- 243 Pahlevan AA, Wright DJ, Andrews C, George KM, Small PL, Foxwell BM. (1999) The inhibitory action of Mycobacterium ulcerans soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J Immunol*, 163: 3928-3935.
- 244 Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, Herzenberg LA. (1990) The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J*, 9: 4425-4433.
- 245 May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, Ghosh S. (2000) Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science*, 289: 1550-1554.
- 246 Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401: 318-320.

- 247 Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, Campbell D, Head SR, Yates JR, 3rd, Salomon DR. (2011) MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol*, 187: 2233-2243.
- 248 Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, Fu X, Liu H, Lu L, Wu Y. (2010) Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12: R81.
- 249 Pauley KM, Cha S. (2011) miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy. *Immunotherapy*, 3: 829-831.
- 250 Xu WD, Lu MM, Pan HF, Ye DQ. (2012) Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation*, 35: 1525-1529.
- 251 Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, Bonnal RJ, Birolo RS, Moro M, Crosti MC, Guarini P, Maglie S, Marabita F, Mascheroni D, Parente V, Comelli M, Trabucchi E, De Francesco R, Geginat J, Abrignani S, Pagani M. (2011) Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol*, 12: 796-803.
- 252 Li S, Moffett HF, Lu J, Werner L, Zhang H, Ritz J, Neuberg D, Wucherpfennig KW, Brown JR, Novina CD. (2011) MicroRNA expression profiling identifies activated B cell status in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One*, 6: e16956.
- 253 Verwilghen J, Vertessen S, Stevens EA, Dequeker J, Ceuppens JL. (1990) Depressed T-cell reactivity to recall antigens in rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*, 10: 90-98.
- 254 Nambiar MP, Krishnan S, Tsokos GC. (2004) T-cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Med*, 102: 31-47.
- 255 Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. (1982) Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 69: 1388-1392.
- 256 Sierakowski S, Kucharz EJ, Lightfoot RW, Goodwin JS. (1989) Impaired T-cell activation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*, 9: 469-476.
- 257 Nambiar MP, Fisher CU, Warke VG, Krishnan S, Mitchell JP, Delaney N, Tsokos GC. (2003) Reconstitution of deficient T cell receptor zeta chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3-induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 48: 1948-1955.

- 258 Matsuda M, Ulfgren AK, Lenkei R, Petersson M, Ochoa AC, Lindblad S, Andersson P, Klareskog L, Kiessling R. (1998) Decreased expression of signal-transducing CD3 zeta chains in T cells from the joints and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol*, 47: 254-262.
- 259 Romagnoli P, Strahan D, Pelosi M, Cantagrel A, van Meerwijk JP. (2001) A potential role for protein tyrosine kinase p56(lck) in rheumatoid arthritis synovial fluid T lymphocyte hyporesponsiveness. *Int Immunol*, 13: 305-312.
- 260 McInnes IB, Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7: 429-442.
- 261 Croft M. (2009) The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*, 9: 271-285.
- 262 Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E. (2004) T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3: 35-42.
- 263 Chantzantoni K, Mouzaki A. (2006) Anti-TNF-alpha antibody therapies in autoimmune diseases. *Curr Top Med Chem*, 6: 1707-1714.
- 264 Geiler J, Buch M, McDermott MF. (2011) Anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*, 17: 3141-3154.
- 265 Clark JM, Annenkov AE, Panesar M, Isomaki P, Chernajovsky Y, Cope AP. (2004) T cell receptor zeta reconstitution fails to restore responses of T cells rendered hyporesponsive by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1696-1701.
- 266 Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. (1994) Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell*, 79: 913-922.
- 267 Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. (1995) Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science*, 267: 515-518.
- 268 Letourneur F, Klausner RD. (1992) Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science*, 255: 79-82.
- 269 Jensen WA, Pleiman CM, Beaufils P, Wegener AM, Malissen B, Cambier JC. (1997) Qualitatively distinct signaling through T cell antigen receptor subunits. *Eur J Immunol*, 27: 707-716.
- 270 Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. (2002) Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational

- change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, 109: 901-912.
- 271 Irving BA, Chan AC, Weiss A. (1993) Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med*, 177: 1093-1103.
- 272 Torres PS, Zapata DA, Pacheco-Castro A, Rodriguez-Fernandez JL, Cabanas C, Regueiro JR. (2002) Contribution of CD3 gamma to TCR regulation and signaling in human mature T lymphocytes. *Int Immunol*, 14: 1357-1367.
- 273 Haks MC, Cordaro TA, van den Brakel JH, Haanen JB, de Vries EF, Borst J, Krimpenfort P, Kruisbeek AM. (2001) A redundant role of the CD3 gamma-immunoreceptor tyrosine-based activation motif in mature T cell function. *J Immunol*, 166: 2576-2588.
- 274 Chen C, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD. (1988) Selective degradation of T cell antigen receptor chains retained in a pre-Golgi compartment. *J Cell Biol*, 107: 2149-2161.
- 275 Young J, Kane LP, Exley M, Wileman T. (1993) Regulation of selective protein degradation in the endoplasmic reticulum by redox potential. *J Biol Chem*, 268: 19810-19818.
- 276 Dragone LL, Shaw LA, Myers MD, Weiss A. (2009) SLAP, a regulator of immunoreceptor ubiquitination, signaling, and trafficking. *Immunol Rev*, 232: 218-228.
- 277 Lin AE, Mak TW. (2007) The role of E3 ligases in autoimmunity and the regulation of autoreactive T cells. *Curr Opin Immunol*, 19: 665-673.
- 278 Chiang J, Hodes RJ. (2011) Cbl enforces Vav1 dependence and a restricted pathway of T cell development. *PLoS One*, 6: e18542.
- 279 Paolino M, Penninger JM. (2010) Cbl-b in T-cell activation. *Semin Immunopathol*, 32: 137-148.
- 280 Duan L, Reddi AL, Ghosh A, Dimri M, Band H. (2004) The Cbl family and other ubiquitin ligases: destructive forces in control of antigen receptor signaling. *Immunity*, 21: 7-17.
- 281 Wohlfert EA, Callahan MK, Clark RB. (2004) Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol*, 173: 1059-1065.
- 282 Pickart CM. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70: 503-533.

- 283 Hou D, Cenciarelli C, Jensen JP, Nguyen HB, Weissman AM. (1994) Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines. *J Biol Chem*, 269: 14244-14247.
- 284 Huang H, Jeon MS, Liao L, Yang C, Elly C, Yates JR, 3rd, Liu YC. (2010) K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*, 33: 60-70.
- 285 Krawczyk CM, Jones RG, Atfield A, Bachmaier K, Arya S, Odermatt B, Ohashi PS, Penninger JM. (2005) Differential control of CD28-regulated in vivo immunity by the E3 ligase Cbl-b. *J Immunol*, 174: 1472-1478.
- 286 Manna SK, Aggarwal BB. (2000) Differential requirement for p56lck in HIV-tat versus TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*, 164: 5156-5166.
- 287 Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, Brown D, Robinson M, Bourne T. (2007) Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis*, 13: 1323-1332.
- 288 Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. (2002) Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 301: 418-426.
- 289 Schaffert S, Wang, S., Axtell, R., Newell, E., Steinman, L., Davis, M. and Chen, C. (2012) Regulation of selection and autoimmunity by miR-181 family miRNAs. *J Immunol*, meeting abstract, 188, 123.36.
- 290 Chen Z, Chen L, Qiao SW, Nagaishi T, Blumberg RS. (2008) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits proximal TCR signaling by targeting ZAP-70. *J Immunol*, 180: 6085-6093.
- 291 Thomas R. (2005) The TRAF6-NF kappa B signaling pathway in autoimmunity: not just inflammation. *Arthritis Res Ther*, 7: 170-173.
- 292 Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, Ramakrishnan P, Taganov KD, Zhao JL, Baltimore D. (2012) miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med*, 209: 1655-70.
- 293 Brown MA, Hatfield JK. (2012) Mast Cells are Important Modifiers of Autoimmune Disease: With so Much Evidence, Why is There Still Controversy? *Front Immunol*, 3: 147.
- 294 Valenta R, Mittermann I, Werfel T, Garn H, Renz H. (2009) Linking allergy to autoimmune disease. *Trends Immunol*, 30: 109-116.

- 295 Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. (2002) Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science*, 297: 1689-1692.
- 296 Chi PL, Luo SF, Hsieh HL, Lee IT, Hsiao LD, Chen YL, Yang CM. (2011) Cytosolic phospholipase A2 induction and prostaglandin E2 release by interleukin-1beta via the myeloid differentiation factor 88-dependent pathway and cooperation of p300, Akt, and NF-kappaB activity in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 63: 2905-2917.



## 10. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent közlemények:

#### Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Ersek B**, Molnar V, Balogh A, Matko J, Cope AP, Buzas EI, Falus A, and Nagy G. (2012) CD3zeta-chain expression of human T lymphocytes is regulated by TNF via Src-like adaptor protein-dependent proteasomal degradation. J Immunol, 189:1602-1610.

IF: 5,788

2. Molnar V, **Ersek B**, Wiener Z, Tombol Z, Szabo PM, Igaz P, and Falus A. (2012) MicroRNA-132 targets HB-EGF upon IgE-mediated activation in murine and human mast cells. Cell Mol Life Sci, 69:793-808.

IF: 6,570

Az értekezésben felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: 12,385

#### Az értekezésben fel nem használt közlemények:

3. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, **Ersek B**, Buzas E, and Perl A. (2010) Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther, 12:210.

IF: 4,689

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 17,074

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Falus András Professzor Úrnak, hogy TDK-, majd PhD hallgatóként lehetőséget adott, hogy az Intézetben dolgozhassak, és olyan légkört teremtett, amelyre mindig szeretettel gondolhatok.

Szeretném megköszönni Buzás Edit Professzor Asszonynak, hogy már első találkozásunk alkalmával bizalmat adott nekem, és befogadott a munkacsoportjába. Megmutatta számomra, hogy a munkában a kiváló szakmai tanácsok mellett milyen fontos szerepe van az emberi kapcsolatoknak is.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Györgynek, hogy TDK- és PhD hallgató éveim alatt mindig számíthattam rá, mind emberileg, mind kutatóként. A kutatás feltételeinek megteremtésén túl, nyitottsága és a saját ötleteim megvalósításának támogatásában mutatott hozzáállása példaértékű számomra. Nagyon szerencsésnek érzem magam, hogy irányítása alatt végezhettem a munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Sente-Pásztói Máriának, amiért a kezdetektől fogva számíthattam a segítségére. Számos fontos módszer mellett megtanította nekem a munkához szükséges kritikus szemléletet, és azt a precizitást, amely minden kutatómunka alapját képezi.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Matkó Jánosnak és Dr. Balogh Andreának, az ELTE Immunológiai Tanszékéről, hogy tudásukkal, ötleteikkel segítették a munkámat.

Köszönöm Dr. L. Éder Katalinnak, hogy kiváló ötleteivel és tanácsaival nagyon sokat tett hozzá ahhoz, hogy a munkám kerek egészzé váljon.

Férjem, Dr. Molnár Viktor, amellet, hogy mindvégig mellettem állt, rengeteg módszer elsajátításában segített, és tanácsaival, nagyszerű meglátásaival valamint a felém tanúsított türelmével nagyban hozzájárult ahhoz, hogy azzá váljak, aki most vagyok.

Szüleim és családom támogatása nélkül sosem sikerült volna idáig eljutnom. Szeretettel és lelkesedéssel ösztönöztek, hogy megvalósíthassam az elképzeléseimet.

Végül, de nem utolsó sorban köszönök minden segítséget a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet összes munkatársának, és azt is, hogy befogadtak maguk közé.