

A fagocita receptorok szerepének vizsgálata a neutrofil granulocitákból aktiváció hatására képződő extracelluláris vezikulák termelésében

Doktori értekezés

Dr. Bartos Balázs Ádám

Semmelweis Egyetem

Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ligeti Erzsébet, Ph.D., egyetemi tanár, az MTA tagja,
Dr. Lőrincz M. Ákos, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Cervenák László Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Józsi Mihály Ph.D., D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csala Miklós Ph.D., D.Sc. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármy Gabriella Ph.D., D.Sc. egyetemi tanár

Dr. Tóth Sára Ph.D., egyetemi docens

.....

Budapest

2020

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	1
2. Rövidítések jegyzéke	3
3. Bevezetés	6
3.1. Neutrofil granulociták általános bemutatása.....	6
3.2. A neutrofil granulociták intracelluláris effektor funkciói	8
3.2.1. Fagocitózis.....	8
3.2.1.1. Fc receptorok.....	10
3.2.1.2. Komplement receptorok	12
3.2.1.3. Src és Syk tirozin kinázok	15
3.2.1.4. Mintázat felismerő receptorok.....	17
3.3. A neutrofil granulociták extracelluláris effektor funkciói	18
3.3.1. NET képződés.....	18
3.3.2. Granulumok és degranuláció	19
3.3.3. Az extracelluláris vezikulák általános bemutatása	21
3.3.3.1. Neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulák.....	25
4. Célkitűzés	28
5. Módszerek.....	29
5.1. Humán neutrofil granulocita izolálás és EV termeltetés.....	29
5.2. Transzgénikus egértörzsek.....	29
5.3. Egér neutrofil granulocita izolálás és EV termeltetés	31
5.4. Opszonizáció.....	31
5.5. Neutrofil granulociták aktivációja felszíneken	31
5.6. EV-k vizsgálata áramlási citométerrel.....	31
5.7. Fagocitózis vizsgálata	32
5.8. Dinamikus fényszórásmérés	33
5.9. Elektronmikroszkópos felvételek készítése	33
5.10. Proteomika	34
5.11. Hashártyagyulladás modell.....	35
5.12. Western blot.....	35
5.13. Statisztikai analízis.....	36
76. Eredmények	37
6.1. Humán neutrofil fagocita receptorok aEV termelésben betöltött szerepének vizsgálata..	37
6.2. A fagocita receptorokat szelektíven ingerlő felszín hatása az aEV termelésre	39

6.3.	Humán neutrofilek fagocitózisának vizsgálata	41
6.4.	Egér neutrofilek EV termelésének vizsgálata	42
6.5.	Transzgénikus egér neutrofilek catzEV termelésének és fagocitózisának vizsgálata....	45
6.6.	Indukált peritonitis során keletkező EV-k vizsgálata CD11b hiányos egerekben	47
6.7.	A tirozin kinázok szerepének vizsgálata humán neutrofilek aEV termelésében	49
6.8.	Humán neutrofil eredetű EV-k fehérje összetételének vizsgálata.....	50
7.	Megbeszélés.....	53
8.	Következtetések	61
9.	Összefoglalás	62
10.	Summary	63
11.	Irodalomjegyzék	64
12.	Saját publikációk jegyzéke	79
13.	A társszerzők közötti munkamegosztás	80
14.	Köszönetnyilvánítás	81

2. Rövidítések jegyzéke

aEV	aktiváció hatására képződő extracelluláris vezikula
apoEV	apoptotikus extracelluláris vezikula
ARRDC	arresztin domént tartalmazó fehérje
atc opsz	teljes szérummal opszonizált részecske
ATP	adenozin-trifoszfát
atzEV	antitesteket tartalmazó szérummal opszonizált zimozánnal termeltetett -extracelluláris vezikulák
BCR	B-sejt receptor
BSA	borjú szérum-albumin
catzEV	teljes, komplementet, antitesteket tartalmazó szérummal opszonizált zimozánnal termeltetett egér extracelluláris vezikula
CR3	komplement receptor 3
DAG	diacilglicerol
DAMP	veszély asszociált molekuláris mintázat
DLS	dinamikus fényszórásmérés
DNS	deoxiribonukleinsav
ECL	fokozott lumineszcenciájú szubsztrát
EGF	epidermális növekedési faktor
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK-1	extracelluláris szignál szabályozott kináz 1
EV	extracelluláris vezikula
FAK	fokális adhézios kináz
FBS	magzati borjú szérum
Fgr	Gardner-Rasheed feline szarkoma virális onkogén homológ kináz
fMLP	N-formil-metionin-leucin-fenilalanin
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GM-CSF	granulocita/monocita kolónia-stimuláló faktor
Hck	hemopoetikus sejt kináz
ICAM1	intercelluláris adhézios molekula 1
IL	interleukin
IP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát

IPTG	izopropil- β -D-tiogalactozid
IRAK	IL-1 receptor asszociált kináz
ITAM	immunoreceptorok tirozin-alapú aktivációs motívuma
ITIM	immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum
LAD	leukocita adhézions deficiencia
LFA-1	limfocita funkció asszociált antigén 1
LPA	lizofoszfatisav
LPS	lipopoliszacharid
LTB4	leukotrién B4
LTF	laktoferrin
MAC-1	makrofág-1 antigén
MAP kináz	mitogén aktivált protein kináz
miRNS	mikroRNS
MLC	miozin könnyű lánc
MMP	mátrix metalloproteáz
MPO	mieloperoxidáz
mRNS	messengerRNS
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NDTR	neutrofil-derived trails
NET	neutrofil extracelluláris csapda
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOX	NADPH-oxidáz
PAD	protein arginin deimináz
PAMP	patogén asszociált molekuláris mintázat
PBS	foszfát pufferes sóoldat
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PE	foszfatidil-etanolamin
Pi	anorganikus foszfát
PI	foszfatidilinozitol
PI3K	foszfoinozitol-3-kináz
PIP ₂	foszfatidil-inozitol-difoszfát
PKC	protein kináz C

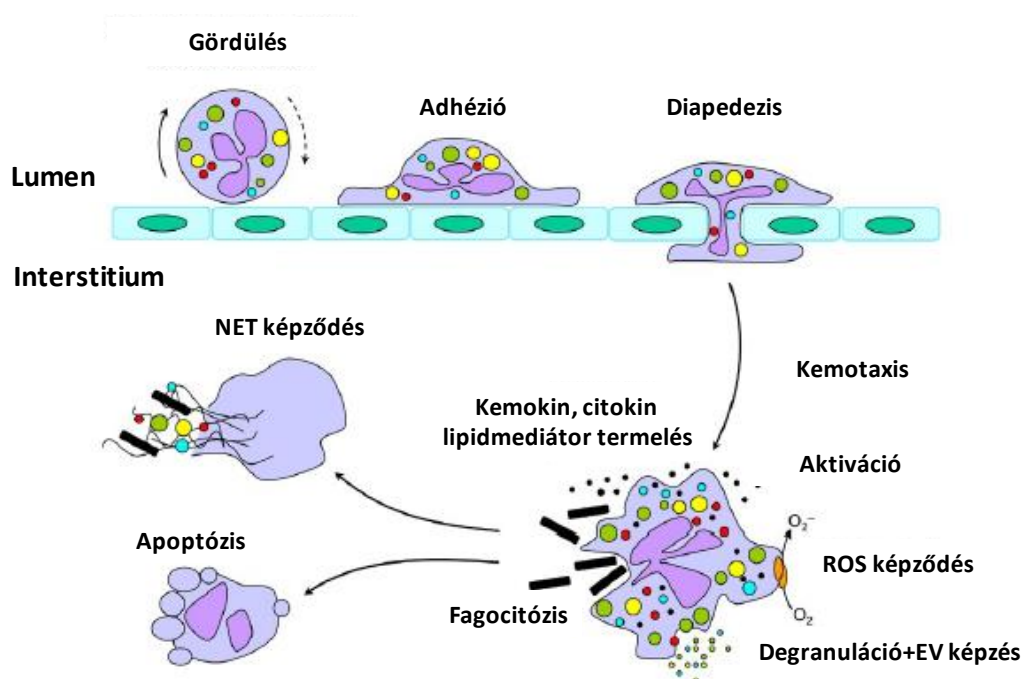
PLC	foszfolipáz C
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PMN	polimorfonukleáris sejt
PRR	mintázat felismerő receptor
PS	foszfatidilszerin
RA	rheumatoid arthritisz
Rho	Ras homológ fehérje
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén származék
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
sEV	spontán termelődő extracelluláris vezikulák
SH2	Src homológ 2
SH3	Src homológ 3
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SLP-76	SH2 dománt tartalmazó leukocita fehérje 76
SNARE	SNAP receptor
SPF	speciális patogén mentes
Src	Rous sarcoma virus proto-oncogene
Src-kináz	szarkóma-kináz
Syk	lép tirozin kináz
TCR	T sejt receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF α	tumor nekrosis faktor α
tRNS	transzferRNS
USA300	meticillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> törzs
Vav	Vav GEF fehérje
VT	vad típus
zEV	opszonizálatlan zimozánnal termeltetett extracelluláris vezikula

3. Bevezetés

1. Neutrofil granulociták általános bemutatása

A neutrofil granulociták (neutrofilek), vagy polimorfonukleáris sejtek (PMN) a perifériás vér legnagyobb fehérvérsejt populációja. Átlagosan a fehérvérsejtek 60-65%-át teszik ki [1]. A PMN-ek a természetes, vagy veleszületett immunitás, egyik legfontosabb és legkorábban aktiválódó sejtípusa, de kimutatták szerepüket a lép marginális zóna B-limfocitáinak érésében. Képesek antigént prezentálni a T-sejtek részére, valamint direkt aktiválni az NK sejteket. Tehát a mai nézeteink szerint nem tekinthetők pusztán a természetes immunitás sejtjeinek [2]. A csontvelőben a granulocita-monocita progenitor sejtekből képződnek. Átlagosan 10-14 órát töltenek a keringésben, ahonnan többlépcsős folyamaton keresztül lépnek ki a gyulladás helyére, ahol élettartamuk jelentősen megnövekedhet [3]. A nyugvó neutrofilek apoptózissal elpusztulnak, majd a létrejövő apoptotikus testeket a monocita-makrofág rendszer távolítja el a keringésből. A kilépő sejtek számára az aktiváció első lépését az jelenti, hogy a fertőzés helyén az ereket borító endotél receptorösszetétele megváltozik. A neutrofilek eleinte gyenge kölcsönhatást alakítanak ki az endotéllel, és gördülnek a felszínén (rolling). Ezt követően a neutrofilek kitapadnak az érfalhoz (adhézió), majd kilépnek a szövetközi térbe (diapedezis). A gördülésben a szelektinek, a kitapadásban és az érből való kilépésben az integrinek szerepe a döntő [4, 5]. Az érből való kilépés végbemehet para-, illetve transzcelluláris módon. A szövetközi térbe kilépett neutrofilek a különböző immunsejtekből felszabaduló kemokinek, kemoattraktánsok, valamint bakteriális termékek hatására irányított sejtmozgást, kemotaxist végeznek (1. ábra) [6]. A gyulladásos környezet és számos sejt felszíni receptor stimulációjának a hatására aktiválódnak, majd az aktiválódott neutrofilek felveszik a küzdelmet a különböző patogének ellen [5]. A neutrofilek professzionális fagocita sejtek, melyek a felszínükön található opszonin receptorokkal (Fc receptorok, komplement receptorok) előbb megkötik, majd a receptorokból kiinduló komplex jelátvitel hatására bekebelezik az opszonizált mikrobákat. Az elindított jelátvitel hatására a sejtmembránból lefűződik a fagoszóma [7]. A bekebelezett patogént tartalmazó fagoszóma különböző granulumokkal egyesül. A granulumfehérjék között találhatóak különböző hasító enzimek (pl.: elasztáz, metalloproteáz), vagy a patogének túléléséhez, osztódásához szükséges esszenciális faktorok megkötését végző fehérjék (pl.: laktoferrin). A neutrofilek másik fontos fegyvere

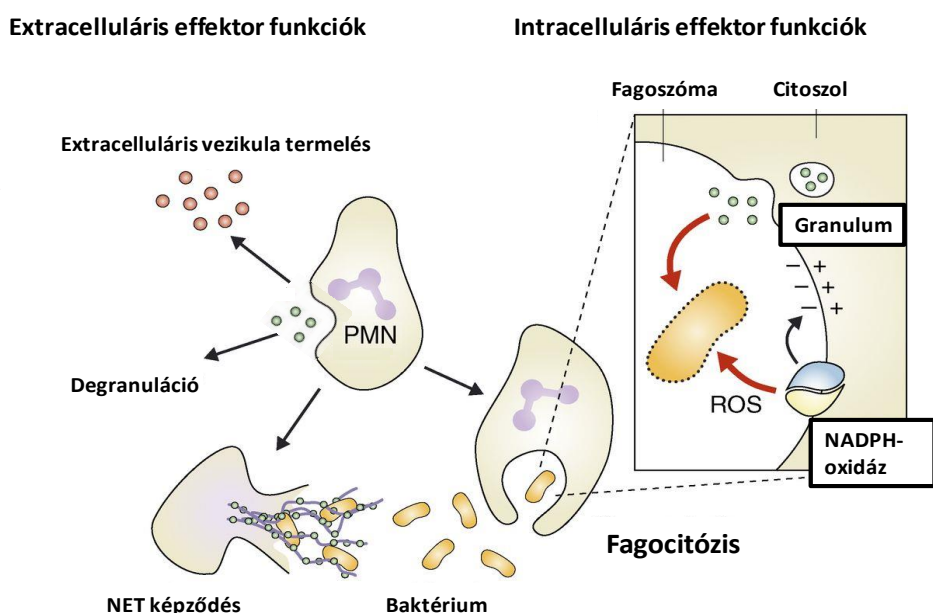
a mikroorganizmusokkal szemben a reaktív oxigén származékok (ROS) képzése [8]. A fagoszóma falában kialakuló több alegységből felépülő NADPH-oxidáz enzimkomplex által képzett reaktív oxigén származékok közvetlen károsító hatása mellett a fagoszóma két oldala között kialakuló töltés különbséget kompenzáló K^+ és H^+ áramoknak is lehet szerepe a granulum fehérjék aktiválásában és a kórokozók elpusztításában [9].



1. ábra: A neutrofil granulociták kilépése az érpályából, valamint az aktiválódó neutrofilek effektor funkciói (forrás: [1] a szerző által módosítva).

A ROS termelés jelentőségét a baktériumölésben jól mutatja, hogy a ROS származékok kiinduló molekuláját, a szuperoxidot szintetizáló NADPH-oxidáz egyes alegységeinek a mutációja visszatérő súlyos bakteriális fertőzéseket eredményez. Ezt a tünetegyüttest krónikus granulomatózis betegségnek nevezünk. A neutrofilek a fagocitózis és a ROS termelés mellett egyéb folyamatokkal is képesek a patogéneket elpusztítani [8]. A neutrofil patogénelimináló funkcióit úgy is csoportosíthatjuk, hogy az intracelluláris, vagy az extracelluláris térben történik-e a patogének elpusztítása (2. ábra). Intracelluláris effektor funkcióra a lefűződött fagoszóma belsejében történő granulum fehérje és NADPH-oxidáz függő folyamat a legjellemzőbb. Az extracelluláris effektor funkciók közé tartozik a NET képződés, a degranuláció, illetve az extracelluláris vezikula képzés. A NETózis vagy NET képződés az elmúlt időben intenzíven kutatott szabályozott sejthalál forma, mely során a neutrofil az extracelluláris térbe bocsájtja a DNS-ét. A

hálószerűen szétterülő DNS-be granulumfehérjék ragadnak, amik elpusztítják a csapdába ragadó patogéneket [10]. A degranuláció során a sejtek az extracelluláris térbe ürítik egyes granulumaikat. Ez a mechanizmus a fagocitózistól független, receptor simulusra létrejövő effektor funkció, ami akkor is létre jöhet, ha egy nagyméretű patogént a sejt nem tudja fagocitálni [11]. Az extracelluláris térben történő baktérium elimináló hatással rendelkezhetnek az extracelluláris vezikulák (aEV) is, mely hatást a munkacsoportunk fedezett fel [12].



2. ábra: A neutrofil granulociták intracelluláris és extracelluláris effektor funkciói (forrás: [2] szerző által módosítva).

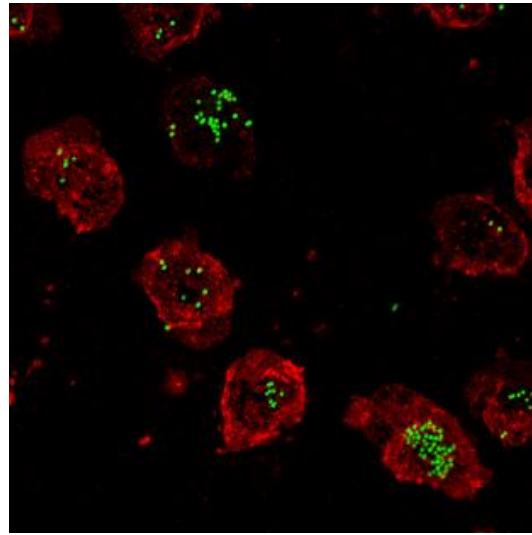
A bevezetés további részében az intracelluláris és az extracelluláris neutrofil effektor funkciókat fogom részletesen tárgyalni, különös tekintettel a szabályozásukat végző jelátviteli utakra.

3.2. A neutrofil granulociták intracelluláris effektor funkciói

3.2.1. Fagocitózis

A fagocitózis (sejtevés) az endocitózis egy sajátos formája, mely során egy sejt nagyméretű részecskét kebelez be. A fagocitózis folyamatát Eli Metchnikoff fedezte fel a 19. század végén. A fagocitózis számos élettani folyamatban játszik fontos szerepet, úgymint az apoptotikus testek eltávolításában, a vörösvértestek érésében vagy a spermatogenezisben [13]. A legismertebb szerepe azonban a természetes és veleszületett

immunitásban van. Számos sejt képes fagocitózisa. A fagocita sejteket két csoportra oszthatjuk; a professzionális és a nem-professzionális fagocita sejtekre. A professzionális fagocita sejtek közé tartoznak a neutrofil granulociták és a monocita-makrofág rendszer sejtjei, valamint a dendritikus sejtek. A professzionális fagocitáknak két fontos feladata van, egyik a sejt szerveződésű mikrobák gyors és hatékony intracelluláris eliminációja, másik az antigén prezentáció. Az antigén prezentáló sejtek (B-limfociták, makrofágok, dendritikus sejtek) a fagocitózist követően intracellulárisan feldolgozzák a patogént, majd az egyes antigénjeit MHC-II molekulákhoz kapcsoltn bemutatják a T helper sejteknek a felszínükön [14].



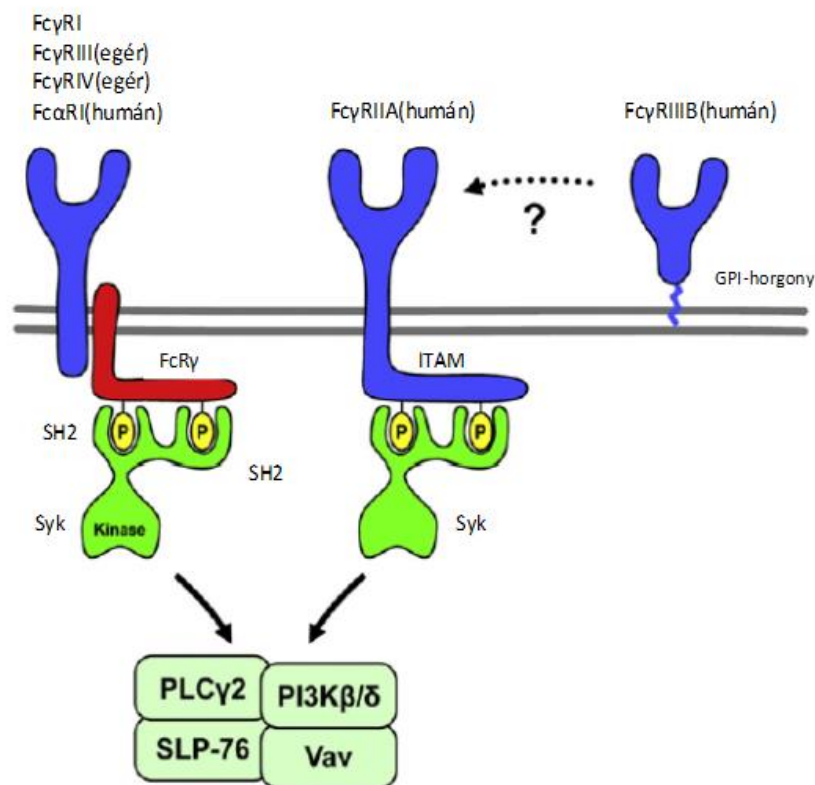
3. ábra: GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus*-t (zöld) fagocitált CD11b-PE jelölt neutrofilek (piros) (saját konfokális mikroszkópos felvétel).

A neutrofil granulociták professzionális fagociták, amelyek akár 50-60 baktérium fagocitózisára is képesek (3. ábra). A neutrofilek fagocitózisa egy receptor-ligand interakcióból kiinduló rendkívül gyors folyamat [15]. A neutrofilek felszínén számos fagocita receptor fejeződik ki. Fagocita receptoroknak azokat a receptorokat nevezzük konszenzus szerint, amelyek nem fagocita sejtekben heterológ expressziós rendszerrel kifejezve képesek önállóan bizonyos részecskék bekebelezését elindítani [16]. A neutrofilek fagocita receptorainak három nagy csoportja ismert, a mintázat felismerő receptorok, a komplement receptorok és az Fc receptorok. A mintázatfelismerő receptorok röviden PRR-ek evolúciósan konzervált bakteriális és fungális motívumokat, úgynevezett PAMP-okat, valamint a szövetkárosodást jelző DAMP-okat ismernek fel. A PRR-ek jelentős része nem képes önállóan fagocitózist indítani, viszont a belőlük kiinduló jelátviteli utak szükségesek ahhoz, hogy a fagocitózis folyamata sikeresen végbe menjen [7]. Bizonyos PRR-ek, mint a gombák falában lévő β -glukánt felismerő C-típusú lektin, a Dectin1 egy önálló fagocita receptor [16]. A neutrofilek fagocitózist jelentősen gyorsítja, ha a bekebelezendő mikroba opszonizálódott. Az opszonizáció során a szérumból immunglobulinok, vagy komplement fragmentumok kerülnek a mikroba felszínére, amiket az Fc receptorok és

komplement receptorok felismernek, majd elindítják a fagocitózishoz vezető jelátvitelt. Az Fc receptorokon és a komplement receptorokon keresztüli fagocitózis jelentősen meghaladja a PRR-eken keresztüli fagocitózis mértékét [15]. A továbbiakban a fagocitózisban résztvevő receptorokat ismertetem.

3.2.1.1. Fc receptorok

Az Fc receptorok számos immunsejt felszínén megtalálhatóak, mint a B-limfociták, NK sejtek, dendritikus sejtek, eozinofil granulociták, bazofil granulociták és nem utolsósorban a neutrofil granulociták [16]. A neutrofil granulociták fagocita receptorai, amelyek az immunglobulinok Fc részének a megkötésén keresztül képesek fokozni a fagocitózist. A fagocitózison kívül érintettek számos neutrofil sejtfunkcióban, mint az immunkomplex mediált aktiváció, a NET képződés és az immunkomplexek eltávolítása [17].



4. ábra: Az egér és a humán neutrofil granulocitákon kifejeződő Fc γ és Fc α receptorok, valamint a belőlük kiinduló jelátvitel (forrás: [7] a szerző által módosítva).

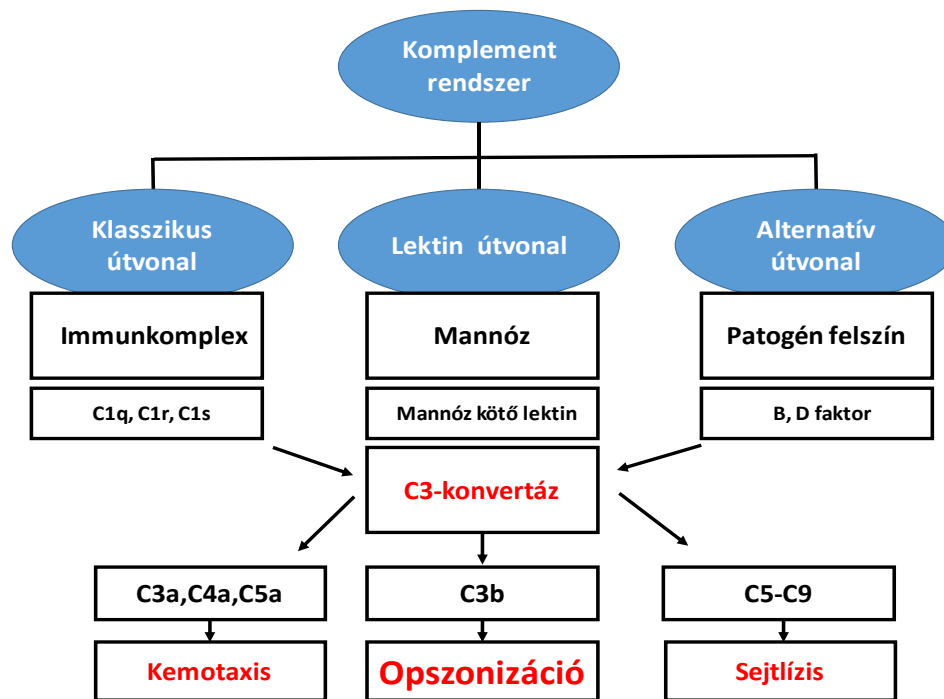
Szerepük bizonyítást nyert számtalan immunológiai betegség patogenezisében, mint például az arthritisz, a dermatitisz, és a glomerulonefritisz [17]. Az eltérő izotípusú immunglobulinok kötése szerint megkülönböztetünk többféle Fc receptor típust. Az IgG-

t az Fc γ , az IgA-t az Fc α , az IgE-t az Fc ϵ receptorok kötik meg [17]. A neutrofileken döntően Fc γ és Fc α receptorok expresszálódnak. Egérben és emberben is az alacsony affinitású Fc γ receptorok szerepéről van a legtöbb kísérletes adat [6, 18]. Ezek a receptorok eltérő módon expresszálódnak a két fajban (4. ábra). A humán neutrofileken három fajta alacsony affinitású Fc γ receptor fejeződik ki: az Fc γ RIIA, az Fc γ RIIB és az Fc γ RIIIB (4. ábra). Mindhárom receptor egy ligand kötő transzmembrán fehérjeláncból áll. A humán neutrofilek az Fc γ receptorok mellett Fc α RI-t is expresszálnak. Egér neutrofilek két aktiváló alacsony affinitású Fc γ receptort expresszálnak az Fc γ RIII-t és az Fc γ RIV-t. Az egér neutrofileken Fc α receptorok nem fordulnak elő. A humán FcRIIA, valamint az egér Fc γ R-ok aktiváló jelátvitelt indítanak. A humán Fc γ RII önmagában hordozza az aktiváló ITAM motívumot, míg az egér Fc receptorok aktiváló ITAM motívuma az úgynevezett FcR γ láncban találhatóak (4. ábra). Az FcR γ lánc hiányában az Fc γ receptorok nem fejeződnek ki az egér neutrofilek felszínén [5, 7]. Így az FcR γ lánc hiányos egér neutrofilek jó kísérletes modellt biztosítanak az Fc receptor indukálta sejtfunciók vizsgálatára [7, 19]. Egyes Fc γ R-ok, mint az egér neutrofileken kifejeződő Fc γ RIIB gátló jelátvitelt indítanak. A gátló Fc γ R-ok ITAM motívum helyett úgynevezett ITIM motívumokat aktiválnak. Az immunkomplex felszíneken végzett kísérletek sokat segítettek az Fc receptor indukálta sejtfunciók, mint szuperoxid termelés, szétterülés, degranuláció, LTB₄ termelés jelátvitelének megismerésében [5]. Az aktiváló Fc receptorok és az immunglobulinok Fc részének a kötődését a receptorok keresztükötése és az ITAM motívumok foszforilációja követi. Az ITAM egy fontos konzervált aktiváló aminosav szekvencia az immunreceptorokon (YxxL/Ix(6–12)YxxL/I), amihez tirozin kinázok foszforilációját követően SH2 doménnel rendelkező fehérjék kapcsolódnak [5]. Neutrofilek esetében az ITAM motívumok foszforilációjában fontos szerepet töltenek be az Src tirozin kinázok. Az ITAM foszfortirozin oldalláncaihoz Syk tirozin kináz kapcsolódik, ami a PLC γ , Vav, SLP-76, PI3K útvonalat aktiválja. A PLC γ az IP3-DAG jelátviteli utakon keresztül képes fokozni az intracelluláris Ca²⁺ szintet. A Vav fehérjék úgynevezett GEF-ek, melyek az aktin-citoszkeleton átrendeződését szabályozó Rho kis G-fehérje család tagjait tudják aktiválni [7]. Egerek esetében a két aktiváló Fc γ receptornak átfedő szerepe van, egyikük hiánya sem befolyásolja önmagában a neutrofil funciókat [20]. A neutrofileken ezeken felül expresszálódnak FcR ϵ és nagy affinitású Fc γ RI receptorok. Ezeknek a receptoroknak a szerepe és jelátvitelük még nem teljesen

ismert. Az ebben a fejezetben részletezett jelátviteli út az alacsony affinitású Fc γ és a Fc α receptorokra jellemző.

3.2.1.2. Komplement receptorok

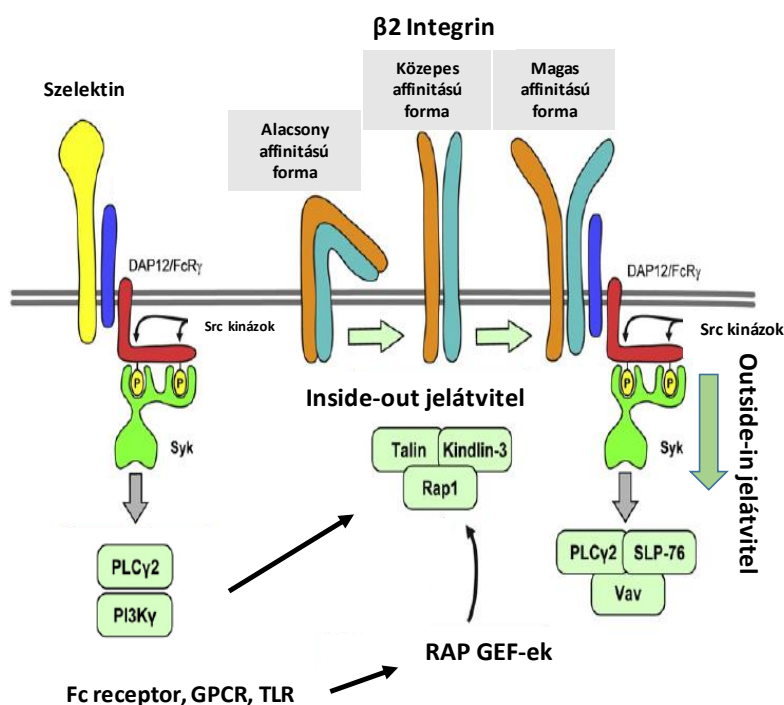
A komplement rendszer a vérben nyugalomban inaktív állapotban lévő faktorok, aktiváció hatására egymást láncreakciószerűen hasító, aktiváló proteázok, valamint a létrejövő aktivációs fragmentumokat megkötő receptorok összessége. A komplement rendszernek három fő feladata van, a direkt sejtlyízis, a kemotaxis indukálása, valamint az opszonizáció (5. ábra). A C3b, valamint az C3bi a fő opszonin fragmentumok, melyek bármelyik úton történt komplement aktiváció során létrejönnek. Ezeket a fragmentumokat a sejtek felszínén lévő komplement receptorok ismerik fel [21].



5. ábra: A komplement rendszer aktiválásához vezető három útvonal. Mindhárom útvonal a C3-konvertáz aktiválásához vezet. A C3-konvertáz aktiválását követően közös útvonalon halad a kaszkád a sejtlyízist okozó membránkárosító komplex kialakulásáig. A kaszkádszerű proteolitikus aktiváció során létrejövő komplement fragmentek az immunsejtek irányított sejtmozgásában, valamint a patogének opszonizációjában látnak el fontos szerepet.

A neutrofilek felszínén három fontos komplement receptor fejeződik ki: a CR1, CR3 és a CR4. A CR1 egy polipeptid láncból álló transzmembrán receptor, aminek a legfontosabb ligandja a C3b. A CR1 a neutrofileken kívül jelen van a legtöbb immunsejt

felszínén, valamint a vörösvértesteken is. A vvt-k felszínén lévő CR1 receptoroknak fontos szerepe van az immunkomplexek lépbe és májba szállításában, ahol a Kupffer sejtek által lebontásra kerülnek. A nyirokcsomók csíráközpontjában lévő folliculáris dendritikus sejteken lévő CR1-nek az immunológiai memória kialakulásában van fontos szerepe. A neutrofileken lévő CR1 az opsonikus fagocitózis egyik receptora [22], azonban az Fc receptorokhoz vagy az integrin típusú komplement receptorokhoz képest sokkal kisebb mértékben fejeződik ki [7].



6. ábra: A $\beta 2$ integrinek szerkezete és az affinitásukat fokozó „Inside-out”, valamint az aktív integrinból kiinduló „Outside-in” jelátviteli utak (forrás: [7] a szerző által módosítva).

A neutrofilek másik két komplement receptora a CR3 és CR4 szerkezetük szerint $\beta 2$ integrin (6. ábra). Az integrinek ubiquiter adhéziós fehérjék, amik fontos szerepet töltenek be a fagocitózis mellett a sejt-sejt és a sejt extracelluláris mátrix kapcsolatokban is. Az integrinek α és β láncból álló transzmembrán heterodimerek. A $\beta 2$ integrinek nevüket az állandó $\beta 2$ (CD18) láncukról kapták, míg specificitásukat az egyedi α lánc adja. Három fajta $\beta 2$ integrin található a neutrofilek felszínén: az LFA-1 (α_L, β_2 ; CD11a/CD18), a CR3 másnéven MAC-1 (α_M, β_2 ; CD11b/CD18), valamint a CR4 másnéven gp150/95 (α_X, β_2 ; CD11c/CD18) [23, 24]. Míg az LFA-1 és a gp150/95 állandó

mennyiségben van jelen a sejt felszínén, addig a MAC-1 sejt felszíni expresszióját különböző aktiváló hatások, mint például a TNF α képesek fokozni [25]. Az LFA-1 és a MAC-1 adhéziós molekulák, amik az ICAM-1-hez való kötődésükön keresztül a neutrofilek késői adhézióját és az endotélen keresztüli vándorlását irányítják. A közös $\beta 2$ (CD18) lánc genetikai zavara az I-es típusú leukocita adhéziós deficiencia (LAD I) nevű betegséget okozza, ami jól mutatja a $\beta 2$ intergrinek nélkülözhetetlen szerepét a bakteriális és gomba infekciókkal szemben [26]. A MAC-1 és a gp150/95 fő liganduma a iC3b komplement fragmentum. Az C3bi kötődéséhez Ca²⁺ és Mg²⁺ ionok jelenléte szükséges. A MAC-1-nek több száz liganduma ismert, de biológiai jelentőségük szerint a C3b, ICAM-1, fibrinogén, LPS emelhetőek ki [27]. A MAC-1 neutrofileken kívül a monociták makrofág rendszer sejtjein, valamint NK sejteken expresszálódik [5].

Az integrinek kétirányú jelátvitellel rendelkeznek, van egy az extracelluláris ligand kötését követően az integrinből kiinduló „outside-in”, valamint egy másik receptorból a citoplazmán keresztül az integrinhez futó „inside-out” jelátvitelük is (6. ábra) [7]. Az „inside-out” jelátvitel képes szabályozni az integrinek affinitását [7]. Az integrineknek 3 különböző konformációs állapota ismert: az alacsony affinitású inaktív behajtott forma, a közepes affinitású kiegyenesedett zárt fejrészű forma, valamint az ICAM-1-hez nagy affinitással kötődő kiegyenesedett nyílt fejrészű forma (6. ábra). A szelektinekből és a sejt felszíni szelektin ligandokból kiinduló „inside-out” jelátvitel elengedhetetlen a neutrofilek integrineken keresztüli adhéziójához és diapedeziséhez [7]. Keringő neutrofilek alapesetben kis affinitású reverzibilis kapcsolatot alakítanak ki az endotél felszínével. Az endotélen lévő P-szelektinek és a neutrofilek felszínén lévő PSGL-1-en keresztül jön létre ez a gyenge kapcsolat, melyen keresztül a neutrofilek gyorsan gördülnek az endotél felszínén. Gyulladásos környezetben a neutrofilek gördülése jelentősen lelassul. Ilyenkor az endotél felszínén a különböző gyulladásos mediátorok és kemokinek hatására megnő az E-szelektinek expressziója. Az E-szelektinek és a PSGL-1 kötődése indítja el neutrofilekben az „inside-out” jelátviteli utat, ami az LFA-1 affinitását fokozza. Az intermedier affinitású LFA-1 és a szelektinek hatására jön létre az úgynevezett lassú gördülés. A lassan mozgó neutrofilet egyre több stimulus éri, egyrészt az endotél szelektinein és membrán kapcsolt citokinein, kemokinein keresztül, másrészt a különböző szolúbilis mediátorokon keresztül, ami az LFA-1 és a többi integrin affinitását tovább növeli. A neutrofilek integrin mediált módon megállnak,

majd kitapadnak az endotél felszínén [28]. Ezt nevezzük adhézióknak. A neutrofilek érpályából való kilépése előtt irányítottan kúsznak (crawling) az endotél felszínén. A neutrofilek nyúlványokat bocsájtanak az endotél sejtek közötti résekbe és a kontrahálódott, lekerekedett endotél sejtek között kilépnek az érpályából. A crawling és a diapedesis során a MAC-1 ICAM-1 interakció játszik döntő szerepet egyéb adhéziós fehérjék mellett [6]. Az „inside-out” jelátvitel jelentőségét mutatja, hogy a jelátvitelben szerepet játszó Kindlin3 molekula genetikai hibája a III-típusú leukocita adhéziós deficienciához vezet [29]. Az „inside-out” jelátvitel a komplement mediált fagocitózis esetében is döntő jelentőségű, mivel LAD-III-ban szenvedő betegekben csökkent a komplement mediált fagocitózis [30].

A $\beta 2$ integrinek az extracelluláris ligandjuk kötődését követően csoportosulnak, majd elindítják az „outside-in” jelátvitelüket, ami elengedhetetlen a kitapadáshoz, adhézióhoz (LFA-1, MAC-1), valamint szuperoxid termeléshez (MAC-1) [7]. A $\beta 2$ integrinek „outside-in” jelátvitelének során a receptor intracelluláris részéhez az ITAM motívumokat tartalmazó DAP12, vagy FcR γ adapter fehérjék kötődnek [31]. Az ITAM szekvencia tirozin oldalláncait az Src tirozin kinázok képesek foszforilálni. Mindhárom Src génre (Hck^{-/-}, Fgr^{-/-}, Lyn^{-/-}) hiányos egértörzsekben az integrin mediált sejtfunciók és jelátviteli utak gátlódnak [32]. Az ITAM foszfortirozin oldalláncaikhoz kötődik a Syk tirozin kináz a SH2 doméneken keresztül [33]. A jelátvitel további szereplői a SLP-76 adapter fehérje, a PLC γ , valamint a Vav GEF család [34]. Az integrinekből kiinduló „outside-in” jelátviteli út nagyban hasonlít az Fc receptorokból, BCR-ből és TCR-ből kiinduló jelátvitelhez [35]. A jelátvitel során bizonyítottan aktiválódik a PI3K is [36]. Az Src-ITAM adapter-Syk-PLC γ -Vav-SLP-76 útvonalon keresztül szabályozódik az integrin mediált fagocitózis, szétterülés, oxidatív szabadgyök termelés, valamint a degranuláció [1]. Azonban ez a jelátviteli út nem szükséges a migrációhoz. Több *in vitro* és *in vivo* végzett migrációs kísérletsorozat azt az eredményt hozta, hogy a Src-ITAM adapter-Syk-PLC γ -Vav-SLP-76 jelátviteliút nem befolyásolja a migrációt [1, 5]. Egyedül a CD18 hiánya csökkentette szignifikáns mértékben a neutrofilek migrációját kísérletes körülmények között [37, 38]. Ennek az oka valószínűleg, hogy a MAC-1 funkciókhoz szükség van a Src-ITAM adapter-Syk-PLC γ -Vav-SLP-76 útvonalra, viszont az LFA-1 képes tirozin kináz független jelátvitelt elindítani, ami a migrációt szabályozza [38].

3.2.1.3. Src és Syk tirozin kinázok

Az Src nem receptor tirozin kinázok legismertebb szerepe a potens protoonkogén, valamint a sejtfelszíni integrinek jelátvitelében betöltött funkció [39]. A daganatos betegségek patogenezisében betöltött szerepe miatt kitüntetett célpontja a daganat ellenes terápiáknak [40]. Az Src kinázok az immunsejtekben is kifejeződnek [41]. Az Src tirozin kinázoknak kilenc tagja ismert, ezek közül neutrofil granulocitákban három fejeződik ki a Hck, a Fgr és a Lyn kinázok [42]. Az Src tirozin kinázok az integrin jelátvitel mellett a TCR, BCR és az FcR jelátvitelt is közvetítik [42], ennek ellenére a $Hck^{-/-}$, $Fgr^{-/-}$ neutrofilekben nem változott az IgG immunkomplex aktiváció mértéke [32]. A $Hck^{-/-}$, $Fgr^{-/-}$, $Lyn^{-/-}$ egér makrofágokban az Fc receptor mediált IgG-vel fedett vvt-k fagocitózisa időben elnyújtottabb volt, de nem csökkent a vad típushoz képest [43]. Az autoantitest indukált gyulladással modellekben mindhárom a neutrofilekben kifejeződő Src kináz hiánya megszüntette a gyulladással választ, valamint a betegség kialakulását [44]. Ez a hatás nem a neutrofilek migrációjának gátlása miatt történt, mert a Src kinázok hiányában nem változott a sejtek mennyisége a gyulladt ízületben, valamint a különböző három dimenziós *in vitro* modellekben sem csökkent a Src hiányos neutrofilek migrációja [1]. Az autoantitest indukált gyulladással modellekben az Src kinázok hiányában nem alakul ki a gyulladással környezet. Ennek az oka, hogy a $Hck^{-/-}$, $Fgr^{-/-}$, $Lyn^{-/-}$ egér neutrofilekben szignifikánsan csökkennek az Fc receptor közvetített sejtfunkciók: a szuperoxid termelés, a kemokin, illetve a citokin felszabadulás, valamint a degranuláció [44]. A potens, nem specifikus kis molekulású tirozin kináz inhibitor dasatinib kezelés is hasonló eredményt okozott humán neutrofilek esetében [45]. Humán neutrofilekben drasztikusan csökkentette a dasatinib az Fc receptor és a komplement receptor indukált sejtfunkciókat. Azonban a neutrofilek baktérium ölését, migrációját, valamint a fagocitózist nem befolyásolta az Src kinázok dasatinibbel történt gátlása [45]. Az autoantitest indukált gyulladással modell kísérletek azt is bemutatták, hogy az Src kinázok képesek helyettesíteni egymást, illetve átfedő a hatásuk. Az egy, vagy kettő Src kináz hiánya nem védte ki a betegség kialakulását [42]. Az integrin és Fc receptorok aktivációja során a membránhoz horgonyzott Src kinázok foszforiálják az ITAM tirozin oldalláncait. Az ITAM motívumok foszfortirozin oldalláncaihoz kötődik a SH2 doménnel rendelkező Syk tirozin kináz [1]. A Syk tirozin kináz is kifejeződik a neutrofilekben. A Syk vizsgálatát megnehezíti, hogy a gén hiányos egerek embrionális korban elhalnak

súlyos nyirokér fejlődési rendellenességben. Az Syk^{-/-} embrionális májsejt szuszpenzióval transzplantált terminálisan besugarazott vad típusú egerekből létre hozott kimérákon tudták a Syk hiányát vizsgálni [46]. A hemopoetikus sejtvonal tekintetében a Syk hiányos neutrofilekben jelentősen csökkentek az integrin és Fc receptor indukált sejtfunkciók, azonban az Src hiányos neutrofilekhez hasonlóan a Syk hiányában sem csökken a sejtek migrációja [1].

3.2.1.4. Mintázat felismerő receptorok

A neutrofileken számos PRR fejeződik ki. A neutrofileken kifejeződő PRR-ek közül a Toll-like receptorok, valamint a C-típusú lektinek emelhetők ki. A Toll-like receptorok röviden TLR-ek a legjobban ismert PRR család. A neutrofileken a TLR3 kivételével az összes TLR megtalálható [7]. A neutrofil TLR-ek olyan evolúciósan konzervált ligandokat ismernek fel, mint a peptidoglikán (TLR2), a LPS (TLR4) vagy a flagellin (TLR5). Közvetlenül a TLR-eken keresztül nem történik fagocitózis [15], de fokozzák a neutrofilek előaktiváltságát, élettartamát, valamint a citokin és kemokin termelését [47]. A TLR-ek az IL-1/Toll-like receptorok családjába tartozó egy transzmembrán fehérjeszállból álló receptorok. A ligand kötődését követően a receptor intracelluláris TIR doménjéhez kötődik a MyD88 adapter fehérje, ami az IRAK kinázok aktiválását, autofoszforylációját okozza. A foszforylált IRAK-on keresztül beindul egy többlépcsős jelátvitel, ami végül az NF- κ B és a MAP kináz kaszkád aktiválásához vezet [48].

A TLR-ekkel ellentétben a C-típusú lektinek közvetlenül részt vesznek a fagocitózisban [15]. A neutrofilek a Dectin1, Mincle, MDL-1, Mcl nevű C-típusú lektineket expresszállják [7]. A Dectin1 a gombák sejtfalának fő alkotó elemét a β -glukánt ismeri fel [49]. A Mincle ligandjai a Malassezia gomba különböző PAMP-jai, mikobakteriális struktúrák, valamint több DAMP [50]. A C-típusú lektinek jelátvitelére az Fc receptorok jelátviteléhez hasonló Src-ITAM-Syk útvonalat követi [7].

A neutrofilek fagocitózisa még a nem PRR családba tartozó scavenger receptorokon keresztül is végbe mehet. A scavenger receptorok bakteriális sejtfa komponenseket, valamint különböző lipoproteineket ismernek fel [51]. A makrofágokon expresszállódó scavenger receptoroknak az oxidáltLDL felvételén keresztül bizonyított szerepe van az atherosclerotikus plakkokban lévő habos sejtek keletkezésében [52]. A neutrofilekben a scavenger receptorok aktivációja NET képződéshez is vezethet [53].

Mivel a fagocitózis egy összetett több receptorból kiinduló, több ponton szabályozott jelátviteli folyamat eredménye, ezért a neutrofilekben a fagocita receptorokon kívül számos nem fagocita receptor is részt vesz a szabályozásban: TNF α receptorok, citokin receptorok, mint a GM-CSF receptor, valamint a GPCR kemokin receptorok [5, 7, 16].

3.3. A neutrofil granulociták extracelluláris effektor funkciói

3.3.1. NET képződés

A NET képződés másfél évtizede ismert és azóta intenzíven kutatott neutrofil funkció, illetve sejthalál forma. A tanulmányok számos jellemzőt, fiziológias funkciót és betegségekben betöltött szerepet tulajdonítottak a NET-nek. Az irodalomban azonban még mindig nem jött létre egyértelmű konszenzus számos kérdésben a NET-tel kapcsolatban. A NET képződésről biztosan elmondhatjuk, hogy egy extracelluláris mikroba ellenes védekező folyamat, mely a mikrobák megkötésével jár. A NET vázát neutrofilekből származó DNS alkotja, amihez különböző antimikrobás granulumfehérjék kapcsolódnak. Számos ligand különböző jelátviteli utakon tudja kiváltani a NET felszabadulást [10, 54].

Számos tanulmány úgy hivatkozik a NET képződésre, mint a nekrozis egy formájára, azonban a NET képződést egy szabályozott folyamatnak tekinthető, ami sokszor nem is jár együtt a sejt elpusztulásával. Az se egyértelműen eldöntött kérdés, hogy a felszabaduló DNS a sejtmagból, vagy a mitokondriumból származik. Az irodalmi adatok a DNS mitokondriális eredetét valószínűsítik, azonban azt is kiemelik, hogy a magmembrán felbomlása a NET képződés állandó velejárója [10].

Az extracelluláris DNS-sel történő mikrobaölő mechanizmusok, mint a NET képződés evolúciósan konzervált folyamatok. Macskákban, zebraalakban, gerinctelenekben és még növényekben is kimutattak hasonló mechanizmust [55-57]. Egyes baktériumok változatos stratégiákat (nukleáz termelés, DNS felhasználása a biofilmjükhöz) dolgoztak ki, hogy védekezzenek a NET-tel szemben [23, 58]. A NET-képződést számos stimulus indukálhatja, mint az immunkomplexek, bakteriális vagy fungális PAMP-ok (fMLP), biokémiai stimulusok (PMA), komplement fragmentumok, vagy különböző extracelluláris kristályok [10]. Alapvetően a NET többféle jelátviteli úton jöhet létre és nem nagyon található olyan faktor, melynek hiánya, vagy farmakológiai

gátlása NET képződést kivédené [59]. A NET képződés során egyes fehérjéket esszenciálisnak gondolták (PAD4, PKC, NOX2). A PAD4 enzim az arginin citrullin átalakulást katalizálja, ami a hisztonokban a pozitív töltések csökkenéséhez, végül a DNS dekonzenzációhoz vezet. A PAD4 egyes cikkek szerint szükséges [60], egyes cikkek szerint szintén szükséges, de az arginin-citrullin átalakulás nélkül [61], egyes cikkek szerint pedig nem szükséges a NET képződéshez [62]. Ugyanúgy a PKC-ról és a NOX2-ről sem mondhatjuk el, hogy esszenciálisak lennének a NET képződésben [63].

A NET képződésnek attól függően, hogy együtt jár sejthalállal, vagy nem, lehet úgynevezett öngyilkos formája, vagy nem öngyilkos formája. Az öngyilkos formának a legegyszerűbb példája a PMA indukálta NOX2 és ROS függő NET képződés. Ide tartozik még a kristály indukálta NET képződés is [10]. A nem öngyilkos forma során a plazmamembrán intakt marad a neutrofil képes például kemotaxissal mozogni, valamint képes fagocitálni. Sokkal gyorsabban kialakul, mint a klasszikus öngyilkos forma. Ezt a NET képződési formát is számos faktor indukálhatja: Gram pozitív kórokozók [64], GM-CSF, komplement fragmentumok, LPS [59].

A NET szerepe a cisztás fibrózis, SLE, RA és több vasculitis patogenezisében is igazolást nyert [54, 65, 66]. Kísérletes adatok bizonyították, hogy a szérum DNáz I aktivitása negatívan korrelál a lupus lefolyásával [67]. Biztató eredményeket értek el cisztás fibrózisos betegek DNáz-zal történt inhalációjával is [68]. A jövőben a rekombináns Dnáz kezelés fontos terápiás lépés lehet e betegségekből.

3.3.2. Granulomok és degranuláció

A fagocita receptorokból kiinduló jelátvitel hatására aktiválódnak az úgynevezett Rho kis G-fehérje család tagjai, amik végül olyan aktin-citoszkeleton átrendezést indukálnak, ami a fagoszóma sejt membránról való lefűződéséhez vezet. A neutrofilek intracelluláris vezikula vándorlásáról a sejtek nehezebb vizsgálhatósága miatt lényegesen kevesebb adatunk van, mint az egyéb immunsejtek hasonló folyamatairól. Az biztos, hogy a neutrofilekben fagocitózis nem a klasszikus korai endoszóma, endoszóma lizoszóma összeolvadás, endolizoszóma, késői endoszóma, útvonalon történik. A neutrofilekben nem ezek a klasszikus intracelluláris vezikulák, hanem granulomok találhatóak [16]. A neutrofilekben négy fajta granulom található (1. táblázat): az azurofil, a specifikus és a zselatináz granulomok, valamint a szekretoros vezikulák. Ezek a granulomok eltérő összetételűek, és a granulopoezis különböző szakaszaiban

alakulnak ki [11]. Az azurofil granulomok a legnagyobb számban előforduló granulomok, amik a neutrofilek fejlődése során elsőként alakulnak ki. Feladatuk a patogénölés, antimikróbás peptidek széles tárházát tartalmazzák. Található bennük az oxidatív szabadgyökök képződésében fontos mieloperoxidáz (MPO), proteázok (katepszin, elasztáz), membrán permeabilizáló lizozim, vagy defenzin [69]. Az azurofil granulomok Rab5-szabályozott módon egyesülnek a fagoszómával, ahol kifejtik antimikróbás hatásukat.

1. táblázat: A neutrofil granulociták granulumainak összetétele.

Azurofil granulum	Specifikus granulum	Zselatináz granulum	Szekretoros vezikula
Elasztáz, Szialidáz, Proteináz3	Zselatináz, Kollagenáz	Zselatináz	CXCR2
Defenzinek	Alfa-1-antitripszin	β2-mikroglobulin	fPR1
Lizozim	Lizozim, Laktoferrin	Lizozim, Laktoferrin	MMP25
Mieloperoxidáz	NOX2	NOX2	NOX2
Katepszin G	CR3,TNFR	CR3,TNFR	CR3, CR1

Az azurofil granulomokat sokszor lizoszómákhoz hasonlítják a hasonló összetételük miatt, azonban az azurofil granulomok nem tartalmaznak lizoszómális membrán markereket (LAMP). Egy kisebb populációjuk Rab27-szabályozott módon plazmamembránt támadják és degranulációra kerülnek [70].

A specifikus és a zselatináz granulomok összetételükben hasonlítanak (1. táblázat). A specifikus granulomok jellemző markere a laktoferrin, amíg a zselatináz granulomok jellemző markere a zselatináz, azonban van egy olyan granulom populáció, ami mindkét markerre pozitív [71, 72]. Ezek a granulomok a neutrofil fejlődésének egy későbbi stádiumában keletkeznek. Az azurofil granulomokkal ellentétben a specifikus és a zselatináz granulomok döntően Rab27 útvonalon a sejt felszínére szekretálódnak [73]. Szerepük a neutrofilek érből való kilépésének és migrációjának segítése. A szekretoros vezikulák a többi granulumtól eltérő módon az érett, perifériás vérben lévő neutrofilekben is keletkezhetnek. Számos membrán receptort (CR1, CR3, CXCR2) tartalmaznak.

Alapvetően endocitózis során keletkeznek, és Rab3, Rab11 útvonalon exocitózissal ürülnek az extracelluláris térbe. A hordozott integrin, kemokin és fagocita receptorok segítségével fokozzák a neutrofilek extravazációját, migrációját és fagocitózist [74].

A szekretoros vezikulák, a zselatináz, valamint a specifikus granulumok kerülnek elsősorban degranulációra. A degranuláció első lépése, hogy kemokin receptorokon, integrin receptorokon és Fc receptorokon keresztül aktiválódnak a tirozin kináz és intracelluláris Ca^{2+} emelkedéséért felelős jelátviteli utak. Második lépés a Rac2 kis G-fehérje által mediált aktin-citoszkeleton átrendeződés, és a granulumok Rab kis G-fehérjék által mediált célba juttatása. Majd a célba jutott granulum a SNARE molekulák segítségével fuzionál a fagoszómával vagy a plazmamembránnal [11].

A Chédiak–Higashi szindróma egy autoszómális recesszív módon öröklődő betegség, amit a CHS1 gén mutációja okoz. A CHS1 gén által kódolt nagyméretű fehérje szerepe még nem tisztázott, de az biztos, hogy a mutációjának hatására károsodnak a lizoszómális funkciók. A neutrofilekben ez úgy manifesztálódik, hogy azurofil és specifikus granulum tartalmú óriás granulumok képződnek, melyeket a neutrofil nem képes az extracelluláris térbe, illetve a fagoszómába üríteni [75]. Ezek a betegek ismétlődő bakteriális infekcióktól szenvednek.

3.3.3. Az extracelluláris vezikulák általános bemutatása

A neutrofil granulociták a NET képződés és a degranuláció mellett, a belőlük képződött extracelluláris vezikulákkal is fel tudják venni a harcot a különböző patogénekkal. Az extracelluláris vezikulák sejtekből származó lipid kettős réteggel határolt struktúrák. Az extracelluláris vezikulákról először a 1960-as években írtak az irodalomban, akkor még, mint trombocitákból származó extracelluláris törmelék (platelet-dust) emlegették [76]. Az extracelluláris vezikulákkal foglalkozó kutatások a 1990-es évek végétől kezdődően egy rendkívül felkapott és forrongó tudomány területté vált. Szinte mindegyik eukarióta sejtről kimutatták, hogy képesek extracelluláris vezikulák termelésére. Sőt számtalan tanulmány szól arról, hogy prokariótákból is keletkeznek vezikulák [77]. Az irodalomban nem egységes az extracelluláris vezikulák terminológiája, származásuk, méretük, vagy egyéb tulajdonságaiknak megfelelően számos névvel illetik őket, úgymint exoszóma, mikrovezikula, mikropartikula, onkoszóma, szubcelluláris vezikula stb. [78]. Azonban egységesen extracelluláris vezikuláknak nevezhetjük őket, röviden EV, én is így hivatkozok rájuk a továbbiakban.

Ahogy említettem szinte minden sejt képes EV-ket termelni. Az EV-k a donor sejttől függetlenül alapvetően két fő útvonalon keresztül keletkezhetnek: a citoplazmában lévő multivezikuláris testekben lévő intraluminális vezikulákból, valamint közvetlenül a sejtmembránból. A multivezikuláris testekben lévő intraluminális vezikulák a sejtmembránnal történt fúziójukat követően szabadulnak fel. Ezen az útvonalon keletkezett EV-ket exoszómáknak nevezzük [79]. A sejtmembránból közvetlenül lefűződő EV-ket mikrovezikuláknak nevezzük [79]. Ezen két fő EV populáció keletkezéséhez és jellemzéséhez használt membrán markerekről kimutatták, hogy nem specifikusak az exoszómákra, vagy a mikrovezikulákra. A számos tanulmányban mikrovezikula specifikusnak gondolt ARRDC fehérjékről, vagy az exoszóma specifikusnak gondolt tetraspanin fehérjékről is kimutatták, hogy mind a két útvonalon keletkezett vezikula populációban is kimutathatóak [79-81]. Korábban az EV-k méretszerinti csoportosítását használták a szakirodalomban, miszerint az exoszómák a kicsi 30-100 nm közötti, a mikrovezikulák pedig a nagy 100-1000 nm közötti EV-k. Jelenlegi elgondolásunk szerint a két eltérő útvonalon keletkezett EV populációt nem lehet méretük, fehérje- és lipidtartalmuk szerint egyértelműen megkülönböztetni, azonban az elfogadott, hogy a mikrovezikulák általában nagyobbak [79]. Az eukarióta sejtekből származó EV-k átlagos méretét tekintve nincs egységes álláspont, az EV kutatók egy része szerint az EV-k mérete jellemzően 100 nm alatti, a másik vélemény pedig, hogy átlagosan 100-150 nm között van. Annak ellenére, hogy számtalan tanulmány születik napjainkban az EV-kről számos kérdés még mindig megválaszolatlan.

Az EV-k keletkezésében résztvevő jelátviteli utak, fehérjék és lipidek vizsgálatáról szinten számtalan tanulmány született. Számos extracelluláris szignálról kimutatták már, hogy képes fokozni a sejtek EV termelését. Szerotonin stimulusra fokozódik a microgliák EV termelése [82], vagy hisztamin hatására a cervicális carcinoma sejtek fokozott EV termeléssel válaszolnak [83]. Hízósejtek IgE hatására hisztamin tartalmú EV-ket választanak el [84], vagy az alacsony konstitutív EV termelésű B sejtek CD40 vagy IL4 stimulusra MHCI, MHCII és felszíni antitesteket tartalmazó EV-ket kezdenek el termelni [85]. Az intracelluláris jelátviteli fehérjék közül a Rab27, Rab35 és a Rab11-ről kimutatták, hogy szerepet játszik az EV keletkezésében [86]. Az ARRDC fehérjék pedig mind az mikrovezikula mind az exoszóma keletkezésben fontos szerepet töltenek be [86]. Számos tanulmány vizsgálta, hogy van-e olyan mester regulátor fehérje,

aminek a genetikai hiánya megszünteti a sejtek EV termelését. Az extracelluláris vezikulákkal foglalkozó kutatók között megegyezés van abban, hogy a sejtek extracelluláris vezikula termelése elengedhetetlen az élethez [79]. Például az extracelluláris vezikula termelésben elengedhetetlen tetraspanin TSG101 fehérje hiánya embrionális letalitáshoz vezet egerekben [87]. Vannak olyan fehérjék, mint az ARRDC1, aminek hiányában az egér életképes marad, de közel 50 százalékkal csökken a plazma EV tartalma [79]. Abban is egységes az álláspont, hogy nem lehet olyan sejtet, vagy állatot létre hozni, amely nem képes extracelluláris vezikula termelésre. Az EV-k keletkezéséhez számos, független, szerteágazó, valamint sok komponensből álló jelátviteli utak vezetnek [79]. A különböző lipidek közül a PE-ről, a PS-ől, az IP3-ról, valamint a DAG-ról is kimutatták, hogy fontos szerepet játszanak az EV-k keletkezésében [88, 89]. Az EV kutatók jelentős része úgy gondolja, hogy az EV-k keletkezésében a membrán mikrodomének szerepe is kitüntetett. A membrán mikrodomének képzésében, valamint a membrán fluiditásának szabályozását végző szingomielináz fehérje gátlása jelentősen csökkentette a kisméretű EV-k felszabadulását [90].

A különböző sejtekből keletkezett EV-k általában biológiailag aktívak. Számptalan egymástól független fiziológiás és patológiás folyamatban mutatták ki szerepüket, mint a természetes immunitás [91], a neurodegeneratív betegségek [92], a véralvadás [93], az antigén prezentáció [94], a daganatos betegségek [95], az autoimmun betegségek [96], stb. Az EV-k a biológiai hatásukat a felszínükön lévő fehérjéken keresztül, vagy a sejtekkel történt fúziójukon keresztül fejtik ki. Kísérletes körülmények között a sejtek jelentős része felvesz jelölt EV-eket [79]. A sejtek EV felvételének pontos mechanizmusa még nem tisztázott, de a legtöbb tanulmány az endoszómális útvonal szerepét valószínűsíti [97, 98]. Az EV-ekkel a sejtek képesek kommunikálni egymással. A sejtek EV-ekkel képesek ligandokat, receptorokat, adhéziós fehérjéket, antigén prezentáló MHC molekulákat, másodlagos hírvivőket, mRNS-eket, miRNS-eket vagy tRNS-eket egy másik sejthez juttatni [99-101]. Az EV-eket diagnosztikus markereknek is használják. A vezikuláris miRNS-ek vizsgálatának egyes tumorok korai diagnosztikájában és későbbi terápiás stratégia megtervezésében is fontos szerepe van [102]. Intenzíven kutatott téma számos diszciplínában, hogy a vérből, vagy egyéb testnedvből könnyen izolálható vezikulákból olyan markereket, jellegzetes proteomikai mintázatot, RNS összetételt találjanak, mely egyes betegségek korai diagnózisához vezethet.

Az extracelluláris vezikulák terápiás felhasználása is egy rendkívül érdekes téma. A mesterséges vezikulába csomagolt gyógyszerek szelektív célba juttatására jó példa a már humán gyógyászatban súlyos szisztémás gomba infekciókban használt liposzomális Amfotericin B, mely így sokkal alacsonyabb dózisban használható csökkentve a súlyos mellékhatások előfordulását [103]. Az extracelluláris vezikulákkal képesek lehetünk szelektíven bizonyos sejtekhez eljuttatni, olyan mRNS-eket, vagy transzgéneket, melyek pótolni tudják az egyes betegségekben károsodott, mutálódott géneket. Például hallásvesztett monogénes Usher szindrómában szenvedő egerek reagáltak hangingerekre, miután szelektíven a szőrsejtekbe juttatták a mutálódott fehérjét helyettesítő speciális transzgént [104].

Az EV minták izolálása, előkészítése, tárolása rendkívül kényes feladat. Az EV-k izolálására alapvetően két fő metodikát használnak: egyik a differenciáló centrifugáláson alapuló izolálási protokollok, a másik pedig a méret kirekesztésen alapuló kromatográfiás módszerek. A differenciáló centrifugálás általában egy nagyobb mennyiségű, de kisebb tisztaságú EV mintát tudunk létrehozni. Olyan mérésekhez, ahol sok EV-ra van szükség egy biológiai válasz létrehozására érdemes differenciáló centrifugálást alkalmazni izolálási módszerként [105]. A differenciáló centrifugálás hátránya, hogy az EV mintákat nem képes teljesen megtisztítani a nem EV természetű fehérjéktől, immunkomplexektől, ribonukleoproteinektől, lipoproteinektől, valamint a centrifugálás károsíthatja a vezikulákat. Ha, nagy tisztaságú EV mintával szeretnénk dolgozni, akkor az izoláláshoz a méret kirekesztésen alapuló kromatográfiás módszereket kell választanunk [105]. Természetesen ezeket a módszereket kombinálhatjuk is, de minden egyes lépéssel vezikulákat veszíthetünk. Az EV kutatásban még mindig nincs standard vezikula tárolási protokoll. Munkacsoportunk is foglalkozott ezzel a témakörrel és számos körülményt vizsgálva arra jutott, hogy a tárolás során a neutrofil eredetű EV-k károsodnak és elvesztik jellemző funkcióikat [106].

Az EV-ok kutatása egy dinamikusan fejlődő tudomány terület, mely nem jöhetett volna létre vizsgálómódszerek fejlődése nélkül. Olyan új vizsgálómódszerek, mint a nagyfelbontású áramlási citometria, a nanoparticle tracking analysis és a tunable resistive pulse sensing új távlatokat nyitottak az egyedi EV kutatásban. Ezekkel a módszerekkel 100 nm körüli, vagy akár az alatti mérettartomány is vizsgálható [105, 107, 108]. Az EV kutatás leggyakoribb vizsgáló módszere az áramlási citometria. Azonban a Nemzetközi

Extracelluláris Vezikula Társaság ajánlása szerint az 500 nm-es mérettartomány alatti EV-k vizsgálatához speciális EV kutatásra alkalmas citométerre és reagensekre van szükség [79]. Az ajánlás továbbá azt is megfogalmazza, hogy az egyedi EV-k vizsgálatában a fluoreszcens jelöléssel nagyobb felbontást lehet elérni, mint a csak fényszórásmérésen alapuló módszerekkel [79]. A fluoreszcens jelölés során nem EV természetű műtermékek jöhetnek létre, melyek az EV-ktől való elkülönítésére detergens kontrol, valamint differenciáló centrifugálás alkalmazását ajánl az irányelv. Az EV minták áramlási citometriás kvantifikálása során mindig kellően híg mintával kell dolgoznunk, hogy kivédjük a tömegdetektálás jelenségét [109].

Összességében az EV kutatására a vizsgáló módszerek széles tárháza áll rendelkezésünkre, de egyik se tekinthető tökéletes, standard módszernek. A vezikula kutatásban az a jelenleg elfogadott irányelv, hogy az eredményeinket a lehető legtöbb vizsgáló módszerrel próbáljuk alátámasztani [105, 110].

3.3.3.1. Neutrofil granulocita eredetű extracelluláris vezikulák

Az első közlemények neutrofil-eredetű EV-kről a 90-es évek végén születtek, melyek a neutrofil-eredetű EV-k endotélre kifejtett hatását vizsgálták [111, 112]. A neutrofilek spontán és stimulusra is képesek EV-eket termelni. Az fMLP, vagy PMA stimulusra keletkező neutrofil-eredetű EV-k fizikai jellemzését nagy alaposággal végezte el Jürg Schifferli munkacsoportja 2003-ban [113]. A neutrofil-eredetű EV-k stimulustól függetlenül általában a közepes vezikula mérettartományba esnek, átlagosan 200-500 nm az átmérőjük. Neutrofil sejtfelszíni képletek találhatóak rajtuk, mint a szelektinek, az integrinek, a komplement receptorok, az Fc receptorok vagy az érett neutrofilek specifikus markere a CD66b. Jellegzetes membránkomponensük a foszfatidilszerin és az Annexin A1. Jellemzően granulumfehérjéket tartalmaznak, mint a mieloperoxidáz, laktoferrin, elasztáz, MMP9, stb.

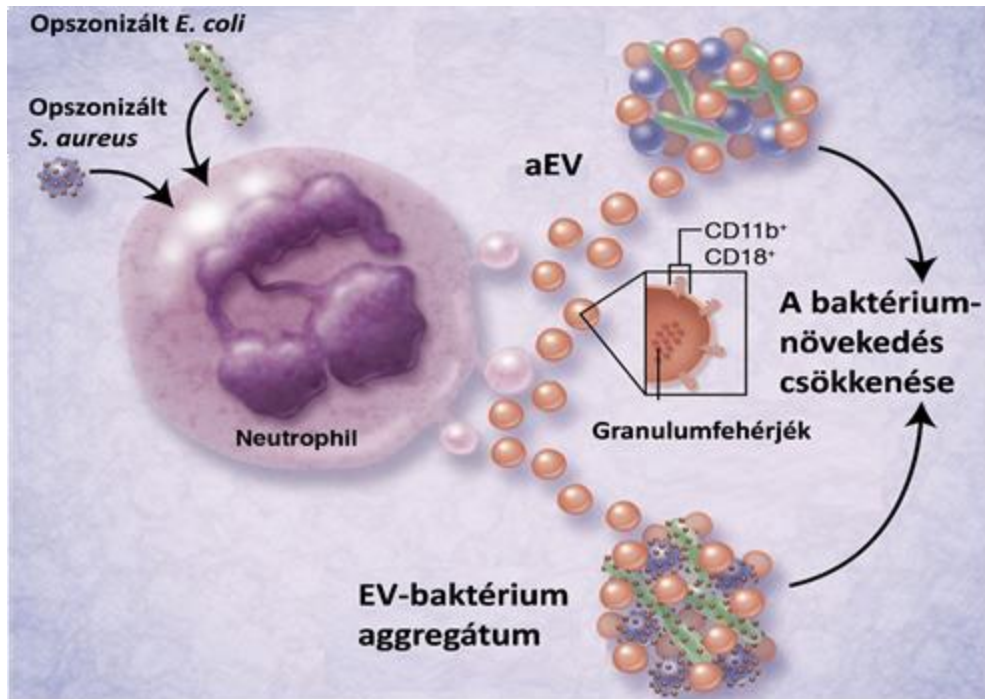
A neutrofilek spontán mértékét meghaladó EV termelését számos stimulus kiválthatja. Többek között kimutattak neutrofil EV termelést baktériumok (*S. aureus*, *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*), bakteriális termékek (fMLP, LPS), citokinek (IL-8, IL-1), TNF α , kemokinek (C5a), autoantitestek (ANCA), PMA, vagy zimosán hatására [114]. A neutrofil EV-k a stimulustól és a célsejttől függő módon képesek pro-, illetve antiinflammatorikus hatásokat közvetíteni. Az neutrofil EV-k képesek aggregálni a vvt-eket a felszínükön lévő CR1-en keresztül [115]. Szállíthatnak granulumfehérjéket a

hámsejtekhez ezzel gátolva a sebgyógyulást [116]. Fokozzák az endotél sejtekből proinflammatorikus citokinek (IL1) és kemokinek (IL8), szöveti faktor és ROS felszabadulását [112]. Másrészt gyulladáshoz arthritisz modellben csökkentették a porckárosodás mértékét [117]. Monocita eredetű dendritikus sejtekben csökkent a fagocitózis, valamint a proinflammatorikus citokinek termelése neutrofil EV-vel való előkezelést követően [118]. Számos tanulmány szól a neutrofil EV-k makrofág funkciókat befolyásoló hatásairól. A makrofágok csökkent proinflammatorikus citokin termelést, valamint fokozott TGF β termelést mutattak neutrofil EV-k hatására. A mai elképzelésünk szerint a gyulladáshoz környezetben, gyulladáshoz stimulusra keletkezett neutrofil EV-k összességében egy antiinflammatorikus, gyulladáshoz folyamatot fékező funkciót töltenek be [114].

A neutrofil eredetű EV-k az irodalomban NDTR-nek (Neutrofil-derived trails) nevezett másik típusa a migráló neutrofilekből keletkezik. Az intersticiumba kilépő neutrofilek hátsó nyúlványaiból (uropod) jönnek létre, mint egyfajta kemokinek tartalmazó „csomagocskák”. Fizikailag semmiben sem térnek el a többi neutrofil EV-től. Tartalmukat tekintve főként kemokinek tartalmaznak: IL-16, CCL2, CCL5, CCL6, CCL12, CCL22, CCL27, CXCL1, CXCL12. Funkciójuk a többi immunsejt kilépésének segítése, egyfajta „idegvezetőként” [114, 119].

Munkacsoportunk korábban ezektől a funkcióktól eltérő felfedezést tett. Munkatársaim kimutatták, hogy az opsonizált baktériummal, vagy gombával való inkubáció hatására a neutrofilek a spontán termelődött EV-khez (sEV) képest egy mennyiségben és összetételében eltérő vezikula populációt termelnek. Ezt a vezikula populációt aEV-nek (aktiváció hatására keletkezett EV) nevezték el. Az sEV-khez képest több granulomfehérjét és sejt felszíni receptort tartalmazó aEV-k képesek voltak a *S. aureus* és az *E. coli* növekedését gátolni egy opsonizációtól független aggregáció képzésen keresztül (7. ábra) [12, 120]. Kimutatták, hogy ehhez az aggregáció képzéshez glukóza, ép vezikulaszervezetre és aktinváza, valamint PI3K-ra van szükség [12]. Munkacsoportunk azt is kimutatta, hogy az antibakteriális hatásban nem játszik szerepet a vezikuláris ROS képződés [121]. A másik felfedezésük, hogy a neutrofil apoptózis során keletkezett apoEV-k, bár hasonló összetételűek, mint az aEV-k nem rendelkeznek antibakteriális hatással [121]. Mivel az aEV termelést opsonizált részecske váltja ki, ami végül fagocita receptorokon keresztül fagocitózisra kerülhet, felvetődik a kérdés, hogy az

egyres fagocita receptorokon keresztüli aktiváció és maga a fagocitózis folyamata miként befolyásolja az aEV termelést.



7. ábra: Az opsonizált baktérium stimulusra keletkezett neutrofil eredetű aEV-k antibakteriális hatása (forrás: [119] a szerző által módosítva).

4. Célkitűzés

Értekezésem alapjául szolgáló munkám során alapvetően az opszonizált részecske hatására képződő neutrofil eredetű aktiváció hatására keletkező antibakteriális EV-k (aEV) termelése és az opszonizált részecske fagocitózisa közötti kapcsolatot vizsgáltam. Kísérleteimet humán neutrofil granulocita eredetű EV-k mellett a nemzetközi szakirodalomban még nem vizsgált egér neutrofil eredetű EV-kkel végeztem. Munkám újdonságának az egér neutrofil eredetű EV-k részletes jellemzése mellett, a különböző receptor aktivációkra keletkezett humán neutrofil eredetű EV-k és az egyes fagocita receptorokra génhiányos egér neutrofil eredetű EV-k termelésének összehasonlítása tekinthető. A következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Mely fagocita receptorok játszanak szerepet az opszonizált részecske kiváltotta neutrofil granulocita eredetű aEV termelésben és ezen részecskék fagocitózisában?
2. Miként befolyásolják a különböző receptorokból kiinduló stimulusok a neutrofil eredetű EV-k mennyiségi és minőségi összetételét.
3. Szükségesek-e a tirozin kinázok az opszonizált részecske kiváltotta neutrofil granulocita eredetű EV-k biogeneziséhez?

5. Módszerek

5.1. Humán neutrofil granulocita izolálás és EV termeltetés

Méréseinkhez egészséges felnőtt véradók perifériás véréből izoláltuk a neutrofil granulocitákat a Budapest Főváros Kormányhivatal Népegészségügyi Szakigazgatási Szervezete által kibocsájtott engedély szerint (BPR/021/01563-2/2015). A neutrofileket a vérből dextránon történt ülepítés után Ficoll-grádiens alapú centrifugálással izoláltuk (1000g, 20 perc, 22°C). Az egész izolálási folyamatot steril fülkében, steril, pirogénmentes oldatokkal és pipettahegyekkel végeztük. A készítményekben a neutrofilek aránya általában több mint 95% (May-Grünwald festés utáni mikroszkópos vizsgálat alapján). A szennyező sejtek közül az eozonofilek aránya jellemzően 1% alatt volt. A neutrofileket az EV termeltetés során (10^7 sejt/ml HBSS) 30 percig 37°C-on inkubáltuk az aktivátorral lineáris rázóban 80 rpm/perc mellett. Az aktivációt követően a sejtes elemeket leüleptítettük (500g, 5 percig, 4°C, Hermle Z216MK 45° fix állású rotor). Az 1 ml centrifugált szuszpenzió felső 500 µl-ét leszívtuk és átszűrtük egy 5 µm pórus méretű steril szűrőn (Sterile Millex Filter Unit, Millipore, Billerica, MA, USA). A filtrátumot leüleptítettük (15 700g, 10 perc, 4 °C, Hermle Z216MK 45° fix állású rotor), majd az üledéket az eredeti térfogatának megfelelő HBSS-ben óvatosan felszuszpendáltuk. A jelzett esetekben a neutrofileket 200 nM-os végkoncentrációban előkezeltük dasatinibbel 10 percig szobahőmérsékleten. A dasatinibbel kezelt mintákban a végső DMSO tartalom 0,002%-nál kisebb volt, akár csak a kontroll gátlószert nem tartalmazó minták esetében. A desztillált vízben felvett EV minták fehérjetartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg ismert koncentrációjú BSA (Sigma) oldatokat használva kontrollként.

5.2. Transzgénikus egértörzsek

Az általunk használt transzgénikus egértörzseket Prof. Mócsai Attila bocsájtotta a rendelkezésünkre. Az FcR γ génhiányos egerek (Fcer1g^{tm1Rav/tm1Rav}, továbbiakban csak FcR γ ^{-/-}) a Taconic-tól származnak. A teljes CD18 fehérjére génhiányos egértörzs (Itgb2^{tm2Bay/tm2Bay}, továbbiakban csak CD18^{-/-}) A. Beaudat-tól származik (Baylor College of Medicine, Houston, TX) [122]. A CD11b hiányos egértörzset a (Itgam^{tm1Myd/tm1Myd}, továbbiakban csak CD11b^{-/-}) a Jackson Laboratory-tól vásároltuk. Az összes általunk használt egértörzset legalább 6 generáción keresztül kereszteztük háttér C57BL/6

egerekkel. A transzgénikus állatokat 11-20 hetes koruk között használtuk fel a kísérleteinkhez korban és nemben megfelelő vad típusú kontroll mellett. Az állatok genotípusát allél-specifikus PCR-ral ellenőrizte a Mócsai labor munkatársa Simon Edina. A vad típusú kontrol C57BL/6 egerek Charles River-től, vagy az Országos Onkológiai Intézetből származnak. Az egereket steril szellőző rendszerrel ellátott ketrecekben (Tecniplast, Buguggiate, Italy) tartottuk SPF körülmények között. Az összes általunk elvégzett állatkísérlet megfelel a Nemzeti Állatvédelmi Hatóság Etikai engedélyében lefektetett kívánalmaknak.

5.3. Eger neutrofil granulocita izolálás és EV termeltetés

Cervikális diszlokációval leölt egerek tibiáit, femurjait és humerusait kiproparáltuk. A csontok megnyitása után a csontvelőt kimostuk. A csontvelőből hipotóniás lízist követően Percoll-grádiens alapú centrifugálással (62.5% v/v, 700 g, 40 min, 22°C) izoláltuk a neutrofileket steril, endotoxin mentes oldatok használata mellett [36]. A sejteket szobahőmérsékleten Ca^{2+} és Mg^{2+} -mentes médiumban tartottuk a kísérlet kezdetéig (kevesebb, mint 30 perc). Az eger neutrofileket az EV termeltetés során (általában 10^7 sejt/ml HBSS pH:7,4, HEPES 20mM) 30 percig 37°C-on inkubáltuk az aktivátorral lineáris rázóban (80 rpm/perc). Az inkubációt követően a sejteket leüleptítettük (1000g, 5 perc, 4°C) és a felső 800 μl -nyi felülúszót leszívtuk és átszűrtük egy 5 μm pórus méretű steril szűrőn. Az átszűrt felülúszót leüleptítettük (30 000g, Beckmann JA-17 fixed 25° angle rotor, 30 min, 4°C) majd HBSS-sel az eredeti térfogatában óvatosan felszuspendáltuk.

5.4. Opszonizáció

Az 1 ml zimozán oldatot (5 mg/1mL HBSS) 500 μl kevert humán, vagy eger szérummal opszonizáltuk 30 percig 37°C-on. A komplement-hiányos opszonizációnál az 500 μl humán szérumot 20 mM végkoncentrációban EDTA-val kezeltük elő. Az opszonizációt követően a zimozánt leüleptítettük (5000g, 5 perc, 4°C) és kétszer mostuk HBSS-ben, hogy minimalizáljuk a szérumszennyezést. A 800 μl GFP-t stabilan expresszáló USA300 baktérium szuszpenziót ($\text{OD}_{600}=1.0$) 200 μl szérummal, vagy EDTA-val előkezelt humán szérummal opszonizáltuk 30 percig 37°C. Az opszonizációt követően a baktériumokat leüleptítettük (5000g, 5 perc, 4°C) majd HBSS-ben kétszer mostuk.

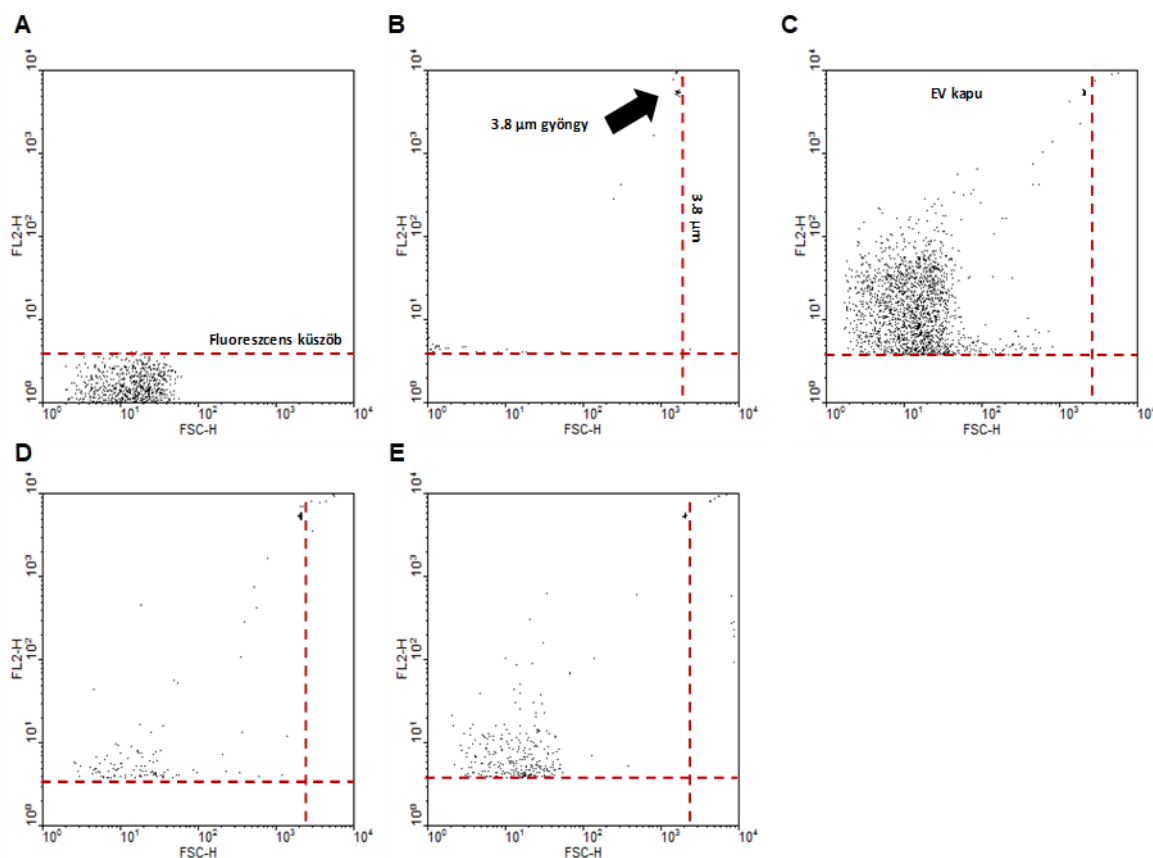
5.5. Neutrofil granulociták aktivációja felszíneken

A humán neutrofileket hatlyukú, korábban 150 µg/mL humán fibrinogénnel (EMD Biosciences), vagy 10% FBS-sel (BiowestBiocenter) előkezelt szövettenyésztő petricsészéken 60 percig 37°C-on inkubáltuk. A jelzett esetekben a neutrofileket 20 ng/ml végkoncentrációban előkezeltük TNFα-val (PeproTech) [45]. Az immunkomplex felszín készítése során a hatlyukú petricsészéket poli-l-lizinnel kezeltük elő egy éjszakán keresztül. A poli-l-lizinnel előkezelt felszíneket laktoferinnel (20µg/mL; Sigma-Aldrich), majd poliklonális anti-laktoferrin IgG-vel kezeltük (1:400 hígításban; Sigma-Aldrich)[24]. Az immobilizált immunkomplex felszínén a humán neutrofileket 60 percen keresztül inkubáltuk 37°C-on. A felszínnek, valamint a sejtek előkezelésének hatékonyságát az EV termeléssel párhuzamosan végzett citokóm-C redukción alapuló ROS termeléssel ellenőriztük.

5.6. EV-k vizsgálata áramlási citométerrel

A humán EV mintákat RPE-kapcsolt monoklonális anti-CD11b (2µg/mL, Dako, Glostrup), FITC-kapcsolt monoklonális anti-CD18 antitestekkel (1µg/mL, Dako), vagy FITC-kapcsolt AnnexinV-tel (BD Biosciences) jelöltük 20 percig 37°C-on, majd HBSS-ben mostuk. Az egér EV mintákat RPE-kapcsolt monoklonális anti-CD11b (1µg/ml, BD Biosciences), RPE-kapcsolt monoklonális anti-CD18 (1µg/ml, BD Biosciences biosciences), PerCP-CY-5.5-kapcsolt monoklonális anti-Ly6g antitestekkel (1µg/mL, BD biosciences), vagy FITC-kapcsolt AnnexinV-tel (BD Biosciences) festettük 20 percig 37°C-on, majd többször mostuk HBSS-ben. Az izotípus kontroll antitesteknek mindig az adott gyártó kontroll antitestjeit használtuk. Az AnnexinV festés ellenőrzése 20 mM EDTA-t tartalmazó háttér oldatban történt. A kísérleteink során Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométert használtunk. A mérés menetét és a beállított kapuzást a 8. ábrán foglaltam össze. A háttér zaj kiszűréséhez HBSS oldatot használtunk, így határoztuk meg a detektálási tartományunk alsó szintjét (10/A ábra). Következő lépésben ismert méretű fluoreszcens gyöngyök (3.8 µm SPHERO Rainbow Alignment Particles, Spherotech Inc., USA) segítségével meghatároztuk a detektálási tartományunk felső mérethatárát (8/B ábra). Az általunk használt citométer detektálási küszöbe a kisméretű fluoreszcens események esetében kb. 300 nm [109]. Az EV minta lemérése (8/C ábra) után kapott eseményszámból levonva az izotípus kontroll események (8/D ábra) és a 0,1%

TritonX 100 inszenzitív (8/E ábra) események számát kaptuk meg a végső EV számot.



8. ábra: Áramlási citométeres méréseink kapuzása.

A tömegdetektálás elkerülése érdekében ügyeltünk arra, hogy a mintáinkban mért eseményszám ne lépje túl 1000 esemény/s értéket. A mintáinkból detektált események linearitását úgy ellenőriztük, hogy minden mintából legalább két hígítást mértünk le [121]. A kapott adatokat a Flowing 2.5 szoftverrel (Turku Centre for Biotechnology, Finland) értékeltük ki.

5.7. Fagocitózis vizsgálata

Neutrofileket (10^6 PMN/1 ml HBSS) 30 percen keresztül 37°C inkubáltuk a GFT-t stabilan expresszáló USA300 baktériumokkal lineáris rázás mellett. A neutrofil/baktérium arány általában 1:10, vagy 1:100 volt. A kinetikai mérések során 5 percenként vettünk mintát a neutrofil baktérium keverékből. Jég hideg médiumban történt (PBS+20mM EDTA) hígítást követően áramlási citométerrel vizsgáltuk a neutrofil granulociták fluoreszcenciájának a változását. Az áramlási citométeres méréseink linearitásának ellenőrzése érdekében legalább két hígítást mértünk le. A méréseink során

a GFP pozitív, illetve negatív neutrofilek számolásával fagocitózis százalékot határoztunk meg. Annak igazolására, hogy valóban fagocitózis és nem csak sejtfelszíni tapadás történt a kísérleti elrendezésünkben mélységi Z-irányú mikroszkópos kontroll felvételeket készítettünk. A mintákat 5x-ös hígítást követően (PBS+20mM EDTA) tárgylemezre csöppentettük, majd 20 percig ülepítettük. A sejteket 4% paraformaldehiddel történt fixálás és anti-CD11b-vel történt festést követően Zeiss LSM710 konfokális lézer mikroszkóppal (40×/1.3 és 63 ×/1.3 olaj immerziós objektív) vizsgáltuk. A képeket az LSM Image Browser (Zeiss, Németország) programmal értékeltük ki.

5.8. Dinamikus fényszórásmérés

A dinamikus fényszórásmérések szobahőmérsékleten ALV goniométer és MellesGriot diódalézer (hullámhossz: 457,5 nm, teljesítmény:150mW) segítségével készültek nagy tisztaságú HBSS-ben. A kiértékelő program a szórtfény intenzitásának autokorrelációs kiértékelésén keresztül következtet a detektált események sugarára. A dinamikus fényszórási tesztek a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében végeztük Dr. Veres S. Dániel segítségével. Ő végezte a mérőkészülék beállítását és a tényleges adatgyűjtést. Munkacsoportunk a minták előkészítését és a kapott méretmegoszlási adatok kiértékelését végezte.

5.9. Elektronmikroszkópos felvételek készítése

Az EV preparálást a korábbiakban leírtak szerint végeztük. Az EV-eket tartalmazó üledéket 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk szobahőmérsékleten 60 percen keresztül, majd PBS-sel történt öblítés után 1%-os ozmium-tetroxiddal (OsO_4) 20 percen keresztül utófixáltuk. Desztillált vízzel történt öblítés után az üledéket növekvő koncentrációjú etanol oldatokkal dehidratáltuk, és festettük (50 % etanolban oldott 1% uranyl-acetáttal) 30 percig, majd végül beágyasztuk Taab 812-be (Taab; Aldermaston, UK). A polimerizációt követően (60°C, 12 óra), 50-60 nm vastagságú ultravékony szeleteket vágunk Leica UCT ultramikrotom segítségével (Leica Microsystems, UK). A kapott szeleteket Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi Ltd., Japan) vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópos képek Veleta 2k x 2k MegaPixel TEM CCD kamerával készültek (Olympus). A képek kontraszt/fényesség beállításai az Adobe Photoshop CS4 (Adobe Photoshop Incorporation, CA, USA) programmal történt. A képek kiértékelését két ember végezte egymástól függetlenül az ImageJ program

segítségével [123]. Az adatok mintánként 400 EV átlagából származtak, az átlag átmérőt a mért területből számoltuk ki. A vizsgálatot az utófixálástól Dr. Kittel Ágnes és munkatársai végezték a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében. Laborunkban a minták előkészítése, fixálása és a kapott ábrák utólagos értékelése zajlott.

5.10. Proteomika

A tömegspektroszkópia alapú proteomikai kísérleteinkhez a minták 3 különböző donor EV üledékének a keverékéből származtak. A minták fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg. A fehérjéket többször ismételt fagyasztás/olvasztás ciklust követően nyertük ki [124], ezt követően emésztettük Trypsin/LysC proteáz keverékkel (Promega, Madison, WI) 1:100 arányban 60 percig, majd tripszin hozzáadását követően 1:10 arányban tovább emésztettük 2 órán keresztül 37 °C-on. A keletkező peptideket Pierce™ C18 forgó oszlopokkal dehidráltuk, majd CaptiveSprayNanoBooster ionizáló forrással felszerelt, Dionex ultimate 3000 RSLCnano rendszerhez kapcsolt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) VBruker Maxis II Q-TOF tömegspektrométerrel vizsgáltuk. A fehérjék megkötésére PepMap100 C18 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) anyagot tartalmazó 100 µm belső átmérőjű Nano Trap oszlopokat alkalmaztunk. A peptidek elkülönítését Acquity M-Class BEH130 C18 analitikai oszlopok (1,7 µm, 75 µm x 250 mm Waters, Milford, MA) használatával értük el elúciós gradiens alkalmazása mellett (4–50% eluent B, 120 perc). Az adatokat Compass Data Analysis programmal újra számoltuk (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), majd ProteinScape 3.0 programmal (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) feldolgoztuk. A fehérjék azonosítására a Mascot search engine version 2.5 programot használtuk (Matrix Science, London, UK) a Swissprot adatbázison az alábbi keresőpaneleket használva: „trypsin enzyme, 7ppm peptide mass tolerance, 0.05Da fragment mass tolerance, max. 2 missed cleavages”. A karbamidometilációt fix, a deamidációt és az oxidációt variábilis módosulásként vettük figyelembe. Csak azokat a fehérjéket válogattuk be, aminek legalább két ismert, egyedi peptidjét meghatároztuk. A detektált fehérjék azonosítása a FunRich program vesiculopédia által alátámasztott adatbázisa segítségével történt. Az adatok számszerűsítéséhez a MaxQuant program 1.5.3.30 verzióját használtuk. A vizsgálatokat a fehérjék emésztésétől Dr. Turiak Lilla és munkatársai végezték a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományos

Kutatóközpontjában. Laborunkban a minták elkészítése és a kapott eredmények kiértékelése történt.

5.11. Hashártyagyulladás modell

Vad típusú és CD11^{-/-} egerek hasüregét PBS-ben hígított zimozán oldattal (0,2 µg/mL) injektáltuk. Két óra elteltével leöltük az állatokat és a hasüregüket óvatos megnyitást követően 5 ml jég hideg, EDTA-t (2 mM) tartalmazó PBS oldattal átmostuk. A hasüregi EV-eket a korábbiakban leírt protokoll szerint izoláltuk. A hasüregi sejteket FSC-SSC szerinti eloszlásuk, valamint anti-Ly6g jelölődésük alapján számszerűsítettük áramlási citométerben. Az EV-eket a korábbiakban leírt protokoll szerint számszerűsítettük áramlási citométerben.

5.12. Western blot

A különböző EV mintáinkat 4x-es Laemmli-puffer (252 mM Tris-HCl, 40 % glicerol, 8 % nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0,04 % brómfenolkék, 4% merkaptotanol, pH 6,8) hozzáadásával 8 percig 100 °C-on inkubáltuk. A fehérjéket 10, valamint 12%-os SDS-poliakrilamid gélen (150 V) választottuk szét. A gélen lévő fehérjéinket nitrocellulóz membránra blottoltuk (100 V, 90 perc). Ezt követően a membránt 1 órán keresztül 5% tejport, vagy 5% humán albumint és 0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk. A blokkolt membránokat anti-β-aktin monoklonális ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) (1:10000 hígításban), anti-laktoferrin poliklonális ellenanyaggal (Sigma) (1:1000 hígításban), vagy anti-mieloperoxidáz monoklonális antitesttel (Cell Signaling Technologies, Leiden, The Netherlands) (1:500 hígításban) inkubáltuk. A használt antitesteket 5% tejport, vagy 5% albumint és 0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS oldatban hígítottuk. Az első antitesttel történt inkubációt követően a membránokat 3-szor 10 percig mostuk 0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS-sel, majd 40 percig inkubáltuk a második antitesttel. Második antitestnek tormaperoxidázzal konjugált anti-egér IgG-t (GE Healthcare), vagy anti-nyúl IgG-t (GE Healthcare) használtunk 5000-szeres hígításban. Az újabb háromszori mosást követően a membránt az ECL (enhanced chemiluminescence) metódus szerint FUJI medical Super RX filmen hívtuk elő. Az enzim reakció során keletkezett kemolumineszcens jeleket a röntgen filmen detektáltuk. A detektált jelek denzitometriás kiértékelését ImageJ (1.4 verzió, National Institutes of Health, F) programmal végeztük.

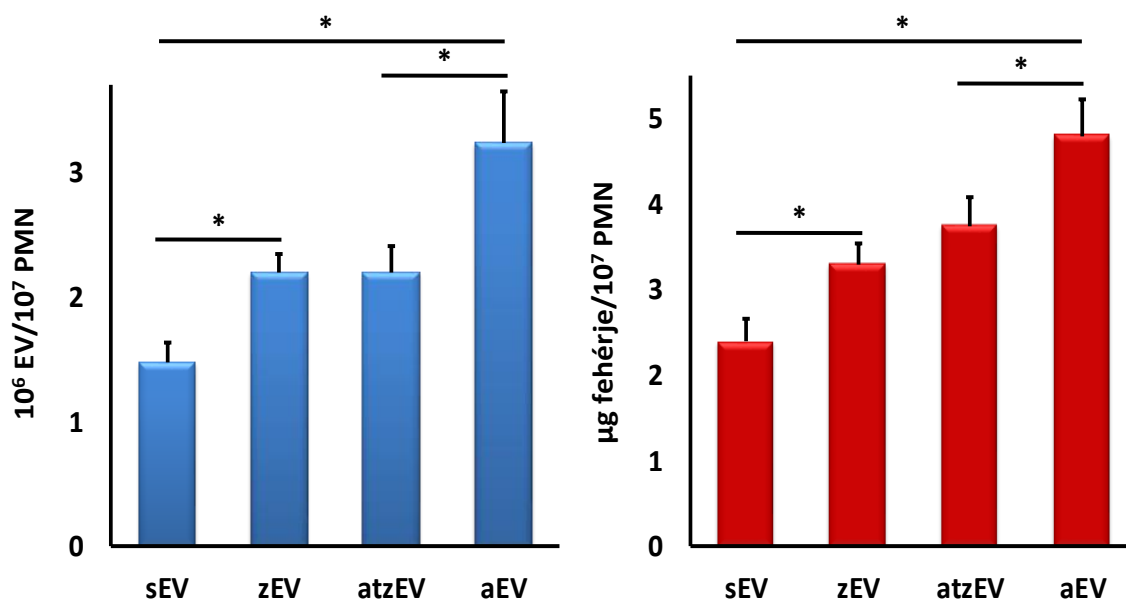
5.13. Statisztikai analízis

A kísérletek elemszámát az ábra aláírásokban tüntettem fel. Az adatok statisztikai elemzéséhez egymintás t-próbát, kétmintás t-próbát vagy Anova próbát használtunk. A szignifikancia határát minden esetben a $p < 0,05$ értéknél húztuk meg. A statisztikai analíziseket a GraphPadPrism programmal végeztük (GraphPad, USA, San Diego).

6. Eredmények

6.1. Humán neutrofil fagocita receptorok aEV termelésben betöltött szerepének vizsgálata

A humán neutrofilekből keletkező EV-okat két különböző módszerrel vizsgáltuk. Áramlási citométerrel a vezikulaszámot, Bradford módszerrel a vezikula populációk fehérjetartalmát határoztuk meg. Munkacsoportunk korábbi kísérleteivel összhangban a teljes humán szérummal opsonizált részecskékkel történt stimuláció hatására jelentősen emelkedett a humán neutrofilek által leadott EV-k (aEV) mennyisége és fehérjetartalma a stimulálatlan neutrofilekből származó spontán képződő EV-khez képest (sEV) (9. ábra) [12]. Jelen kísérleteink során zimoszánt használtunk aktiváló ágensként. A zimoszán-A a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő gomba sejtfalából származó fehérje-szénhidrát komplex, amire azért esett a választásunk a baktérium ellenében, mert a jellemzően 1 μm -nél nagyobb zimoszán részecskéket méretük alapján könnyen el tudtuk különíteni az EV-ktől.



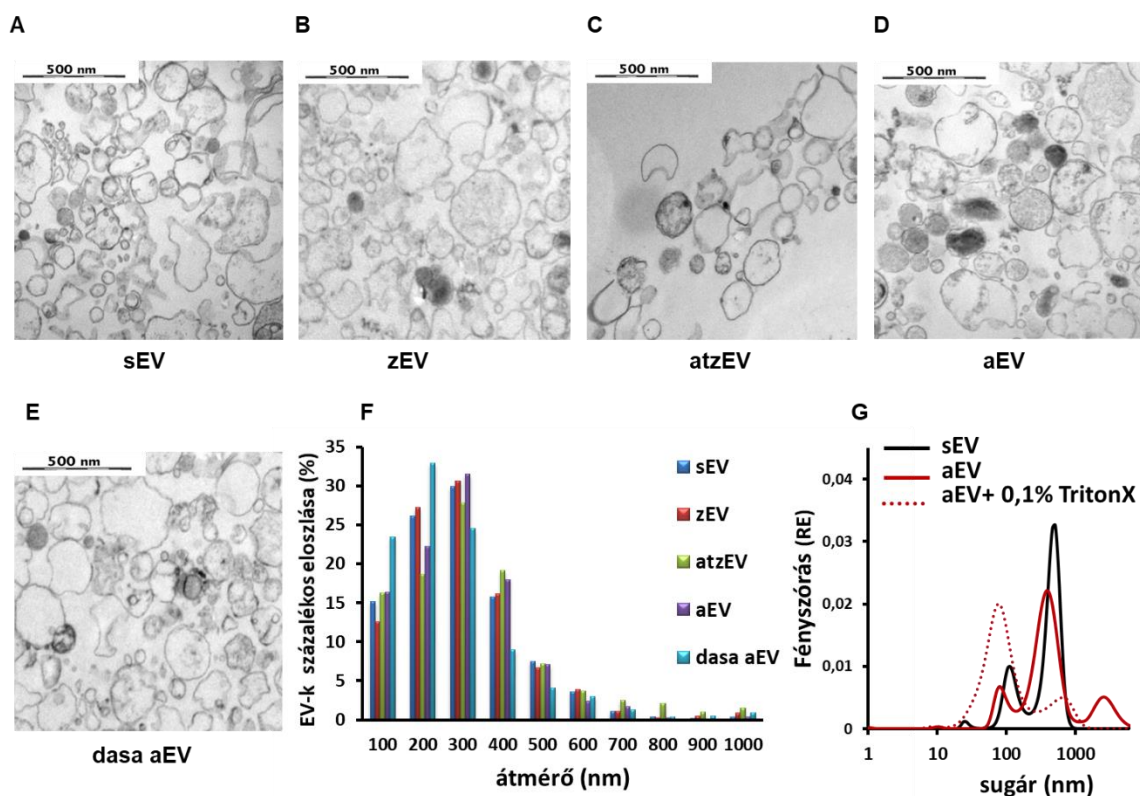
9. ábra: A komplement receptor aktiváció fokozza a humán neutrofilek aEV termelését. A neutrofilek EV termelését áramlási citométerrel (A), valamint Bradford fehérjemennyiség meghatározással vizsgáltuk (B) nem opsonizált (zEV), komplementhiányos szérummal opsonizált (atzEV), valamint teljes szérummal opsonizált zimoszánnal történt aktivációt követően. A diagramokon huszonkettő (A), illetve huszonhat (B) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*: $p < 0,05$; ANOVA próba).

Mivel elsődleges kérdésünk a neutrofilek fagocitózisa és a teljes szérummal opsonizált részecske által kiváltott aEV-k termelődésének kapcsolata volt, ezért a

neutrofilek fagocita funkciójában döntő jelentőségű receptorok (Fc receptorok, komplement receptorok, PRR-ek) szerepét feltételeztük és vizsgáltuk az aEV-k termelésében is. A komplement receptorok szerepét komplementmentes opsonizált zimoszánnal vizsgáltuk. Ha a zimoszánt Ca^{2+} és Mg^{2+} jelenléte nélkül opsonizáljuk, akkor a különböző opsonizációért felelős komplement fragmentek nem tudnak a zimoszán felszínére kötődni, így csak antitesteken keresztül opsonizálódik a zimoszán [125]. Az EDTA-val kezelt szérummal opsonizált zimoszán csak az Fc receptorokon, valamint a PRR-eken keresztül képes aktiválni a neutrofileket. A PRR-ek szerepét az EV képződésben úgy vizsgáltuk, hogy a neutrofileket opsonizálatlan zimoszánnal stimuláltuk. A stimulálatlan neutrofilekből képződő sEV-khez képest az opsonizálatlan zimoszánnal történt aktiválás szignifikánsan megnövelte a képződő EV-k (zEV) mennyiségét és fehérjetartalmát (9. ábra). A komplementmentes, antitesttel opsonizált zimoszánnal történt aktiválás nem emelte az EV (atzEV) számot és csak kismértékben emelte a vezikulák fehérjetartalmát a zEV-khez és az sEV-khez képest (9. ábra). A teljes szérummal opsonizált zimoszán hatására képződő aEV-k száma és fehérjetartalma a zEV-khez és az atzEV-khez képest is szignifikáns mértékben növekedett.

A kísérleteink során keletkezett EV minták morfológiáját elektronmikroszkóppal, a méreetszerinti eloszlását az elektronmikroszkópos képek kiértékelésével, valamint dinamikus fényszórásméréssel (DLS) vizsgáltuk (10. ábra). Az elektronmikroszkópos képeinken membránnal határolt ép struktúrákat találtunk. A különböző stimulusra keletkező EV mintákban lévő vezikulák heterogén morfológiai és elektrondenzitásbeli eloszlást mutattak (10/A-E ábra). A 10/E ábrán a széles spektrumú tirozin kináz gátló dasatinibbel kezelt neutrofilek által termelt aEV-k elektronmikroszkópos képe látszódik. A dasatinib aEV termelésben betöltött szerepét 6.7. fejezetben részletezem. Az elektronmikroszkópos mintáinkban, 400 darab intakt vezikula ImageJ-vel mért területéből számolt átlagos átmérőjük alapján döntően közepes mérettartományú vezikulákat találtunk. Az egyes vezikula populációk mérete között nem volt jelentős különbség (10/ F ábra). A DLS-sel két fő populációt detektáltunk: egy 100 nm-est és egy 200-700 nm közötti átmérővel rendelkezőt. Ez utóbbi populáció esik bele az általunk használt áramlási citométer detektálási tartományába, így csak ezen populáció kerülhetett számszerűsítésre a citométeres mérésekben (a Bradford fehérjemennyiség meghatározással a teljes populáció kvantifikálásra kerül, azonban ott a mintákban lévő

nem-vezikuláris struktúrák is befolyásolják az eredményt). A mintáinkban a DLS-sel detektált közepes mérettartományba eső vezikula populációt a 0,1 %-os Triton detergens kontroll alkalmazása jelentősen csökkentette és a kisebb mérettartomány felé tolta, ami ezen populáció vezikula természetének egyértelmű bizonyítéka (10/ G ábra). Minden mintánkban megfigyelhető volt a 100 nm-es és a 200-700 nm-es populáció detergens érzékenysége. A 10/G ábrán csak az aEV minta detergens érzékenységét tüntettem fel.

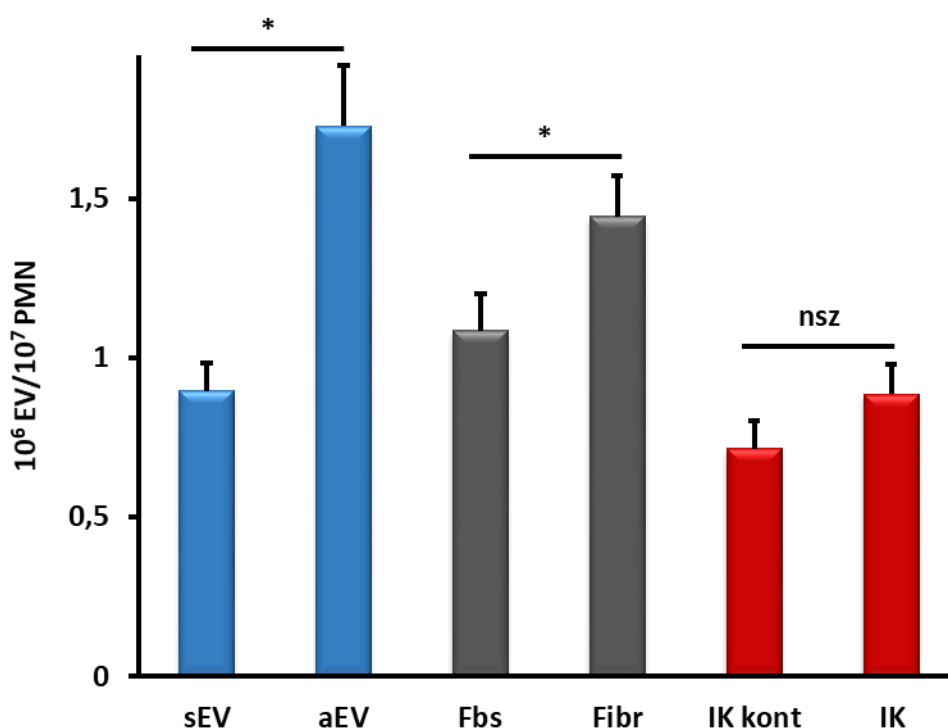


10. ábra: Humán neutrofil EV-k jellemzése elektronmikroszkópiával és dinamikus fényszórásméréssel. Reprezentatív elektronmikroszkópos képek a különböző EV populációkról (A-E), három független kísérletből. Reprezentatív elektronmikroszkópos kísérletünkéből származó EV populációk méretszerinti eloszlása. A feltüntetett értékek 400 db EV átmérőjének átlagát jelentik (F). Az sEV és az aEV mintáink méretszerinti eloszlása DLS-sel. A pontozott vonallal a 0,1% Tritonnal kezelt aEV populációt tüntettem fel. Az 1000 nm-nél nagyobb eseményeket a zimozán szennyezés okozta (G).

6.2. A fagocita receptorokat szelektíven ingerlő felszínek hatása az aEV termelésre

A komplement receptorok közül az integrin szerkezetű komplement receptorok, különös tekintettel a neutrofileken nagy mennyiségben kifejeződő CR3 (MAC-1) szerepét valószínűsítettük az EV termelés fokozásában. A bevezetésben említettem, hogy az integrin szerkezetű komplement receptoroknak számos ligandja ismert, többek között a fibrinogén is ide tartozik [5, 7]. Az integrin szerkezetű komplement receptoroknak a

neutrofil funkciókban betöltött szerepének vizsgálatára alkalmas a fibrinogén felszínen keresztüli aktiválás [45]. Az integrin szerkezetű komplement receptorok neutrofil EV termelést fokozó hatásának megerősítése miatt fibrinogén felszínen aktiváltuk a neutrofileket egy órán keresztül. Fibrinogén felszínen jelentős vezikula termelés növekedést akkor értünk el, ha a neutrofileket $TNF\alpha$ -val előkezeltük. A $TNF\alpha$ hatására a bevezetésben részletezett módon fokozódik a CR3 kifejeződése a neutrofil felszínén és fokozódik a $\beta 2$ integrinek affinitása is [24]. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a $TNF\alpha$ -val előkezelt neutrofilek fibrinogén felszínen szignifikánsan több EV-t termelnek, mint a kontroll FBS felszínen (11. ábra).



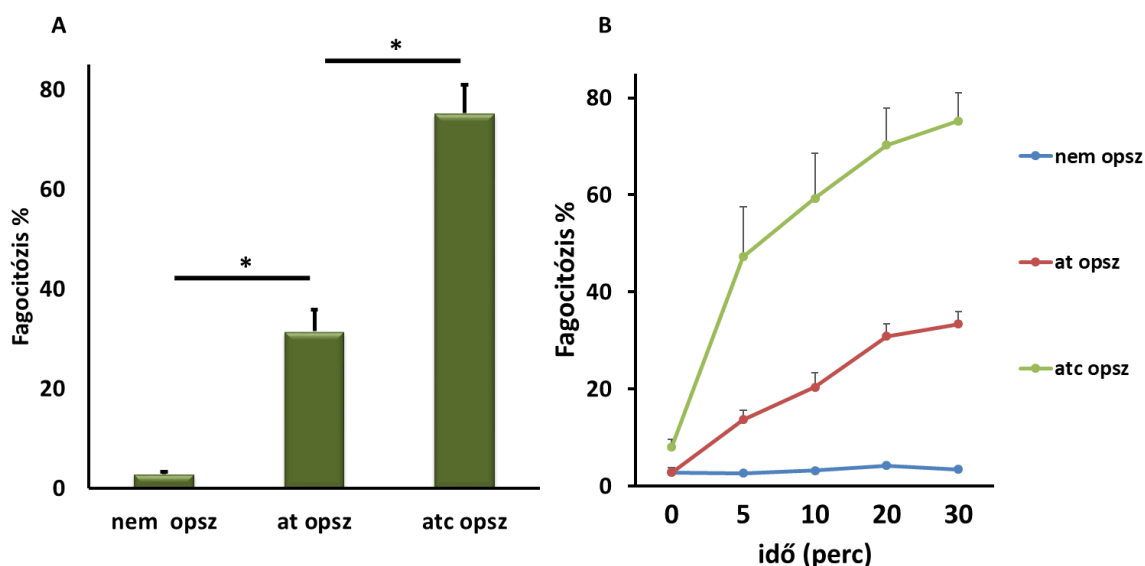
11. ábra: Letapadt neutrofilek EV termelésének vizsgálata áramlási citométerrel. A fibrinogén felszínen történt aktiválás előtt a neutrofileket $TNF\alpha$ -val kezeltük elő. A felszíneken termelődött EV-k mennyiségét a szuszpenzióban termelődött EV populációhoz hasonlítottuk. Az integrin szerkezetű komplement receptorok szerepét fibrinogén felszínen vizsgáltuk FBS kontroll felszínhez képest. Az Fc receptorok szerepét laktoferrin immunkomplex felszínen vizsgáltuk antitestet nem tartalmazó kontroll felszínhez képest. A diagramon nyolc független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*: $p < 0,05$; kétmintás t-próba).

Az Fc receptorok EV termelésben betöltött szerepét laktoferrin immunkomplex felszíni aktiválással vizsgáltuk. Az antitestet tartalmazó immunkomplex felszín nem okozott szignifikáns EV emelkedést a kontroll, antitestet nem tartalmazó laktoferrin

felszínhez képest (11. ábra). A felszíneken végzett kísérleteink során a felszínt borító fehérjék szennyezése miatt a vezikulák fehérjetartalmát nem vizsgáltuk. A fibrinogén és az immunkomplex felszín hatékonyságát citokróm C redukció alapuló szuperoxid termelés vizsgálatával kontrolláltuk. A feltüntetett események, olyan méréseket tartamaznak, amelyek során a vizsgált felszín jelentős szuperoxid termelést váltott ki

6.3. Humán neutrofilek fagocitózisának vizsgálata

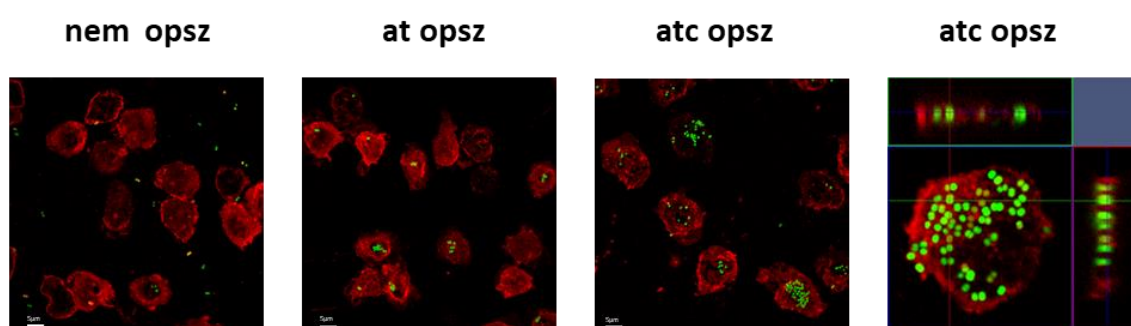
Az EV termeléssel párhuzamosan a neutrofilek fagocitózisát vizsgáltuk a bemutatott 3 különböző módon opsonizált GFP-t folyamatosan expresszáló USA300 baktériummal (12. ábra). Harminc perces baktérium-neutrofil koinkubációt követően a nem opsonizált baktériumokat a neutrofilek minimális mértékben fagocitálták (nem opsz), a komplement hiányosan, csak antitestekkel opsonizált baktériumokat a sejtek 30%-a fagocitálta (at opsz), míg a teljes szérummal opsonizált baktériumokat a sejtek közel 80%-a kebelezte be (atc opsz) (12/A ábra).



12. ábra: Humán neutrofilek áramlási citométeres vizsgálata eltérő módon opsonizált USA300 baktérium fagocitózisát követően. A fluoreszcens *S. aureus* fagocitált neutrofilek százalékos aránya 30 perc inkubációt követően (A). Az neutrofilek fagocitózis kinetikája (B). A diagramokon nyolc független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; ANOVA próba).

A 12. ábra B része kinetikai mérést mutat, ahol látható, hogy már öt perc inkubációt követően a neutrofilek közel 50%-a fagocitálta a teljes szérummal opsonizált baktériumokat. A csak antitesttel opsonizált baktériumokat viszont a neutrofilek lényegesen lassabban fagocitálták (12/B ábra). Az áramlási citometriás mérésekkel

párhuzamosan konfokális mikroszkópos méréseket is végeztünk. A Z-irányú, mélységi felvételek egyértelműen igazolták, hogy az áramlási citométerben kapott eredmények valóban fagocitózisból származnak, nem csak sejtfelszíni tapadásból (13. ábra). A konfokális mikroszkópos képeinken látszódik, hogy a nem opsonizált baktériumokat egy-két neutrofil minimálisan fagocitálta, az antitesttel opsonizált baktériumokat a neutrofilek 30-40 %-a jóval nagyobb mértékben, míg a teljes szérummal opsonizált baktériumokat a neutrofilek 80-90% nagy mennyiségben fagocitálta (13. ábra). Így a konfokális mikroszkóppal készült felvételek összhangban vannak az áramlási citometriás eredményeinkkel.

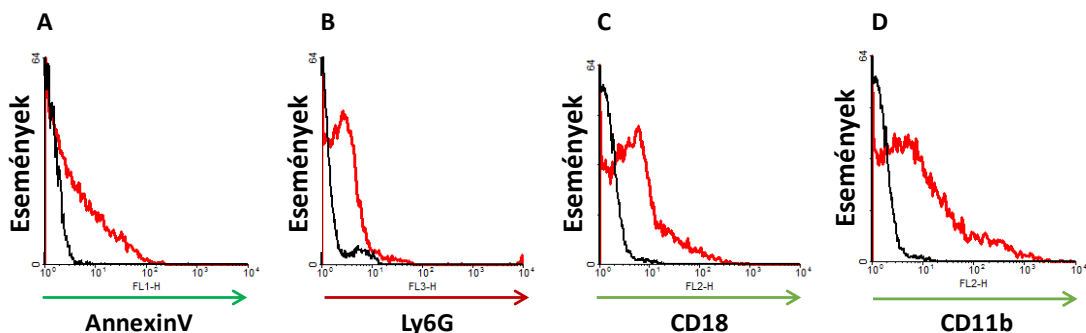


13. ábra: Humán neutrofilek konfokális mikroszkópos vizsgálata eltérő módon opsonizált USA300 baktérium fagocitózisát követően. Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek az eltérő módon opsonizált *S. aureus* (zöld) fagocitált fluoreszcensen jelölt neutrofilekről (piros).

6.4. Egér neutrofilek EV termelésének vizsgálata

A humán adatok kiértékelése után az EV képződésében résztvevő fagocita receptorok szerepét egér modellben vizsgáltuk tovább. A nemzetközi irodalomban nem találtunk adatokat az egér neutrofilekből származó EV képződésre, ezért törekedtünk ezen új EV populáció részletes jellemzésére. Az egér neutrofil EV-k vizsgálata azért volt fontos számunkra, mert a transzgénikus egér neutrofilek EV termelését később szeretnénk volna összehasonlítani az egyes receptor aktivációkból származó humán neutrofilek EV termelésével. Az egér neutrofilek izolálását csontvelőből végeztük a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően, mivel a kísérleteinkhez kellő mennyiségű perifériás vér eredetű neutrofil nyeréséhez indokolatlanul sok állatot kellett volna leölnünk. Az egér neutrofilekből származó EV-k mennyiségét csak áramlási citometriával tudtuk vizsgálni, mivel a csontvelői neutrofilekből származó EV-k fehérjetartalma sokkal kisebb volt, mint a humán mintáinké. Ahhoz, hogy az egér EV mintáink fehérjetartalma

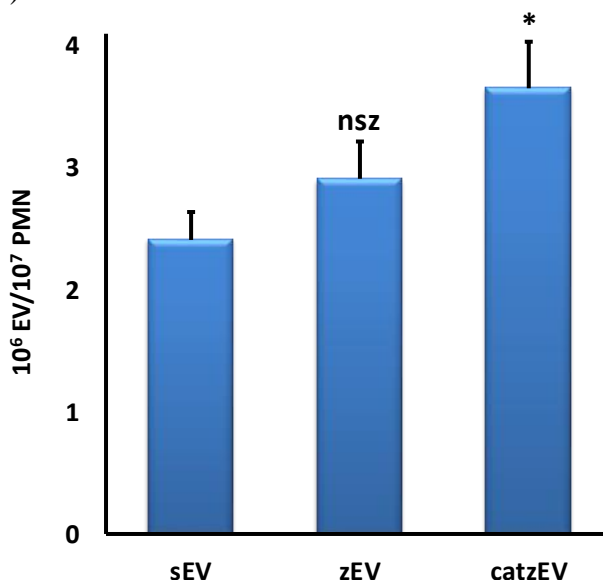
Bradford módszer mérési tartományába essen egy minta nyéréséhez 3-4 állatot is le kellett volna ölnünk. Az áramlási citométerrel detektált egér EV-k a humán EV-khez hasonlóan úgynevezett „külső oldal kívül” típusú vezikulák, tehát neutrofil sejtfelszíni markereket hordoznak a felszínükön.



14. ábra: Az egér neutrofil eredetű EV-k áramlási citometriás vizsgálata (A-D). Fluoreszcensen jelölt (AnnexinV-FITC (A), Ly6G-Cy5.5 (B), CD18-PE (C), CD11b-PE (D)) EV-kről készült reprezentatív hisztogramok (piros vonal), három független mérésünkből. A jelölést izotípusú antitestekkel, az annexinV esetében 20mM EDTA használatával kontrolláltuk (fekete vonal).

A neutrofil egér EV-k a foszfatidil-szerinhez kapcsolódó AnnexinV mellett a MAC-1 β láncára (CD18), vagy α láncára (CD11b), valamint szelektív neutrofil felszíni marker Ly6G-re specifikus antitestekkel is jól jelölődnek (14. ábra). Ly6G esetében a jelölődés intenzitása elmaradt az integrin jelölés intenzitásától ezért további méréseink során CD11b és AnnexinV jelölést használtunk a megbízható számszerűsítés céljából.

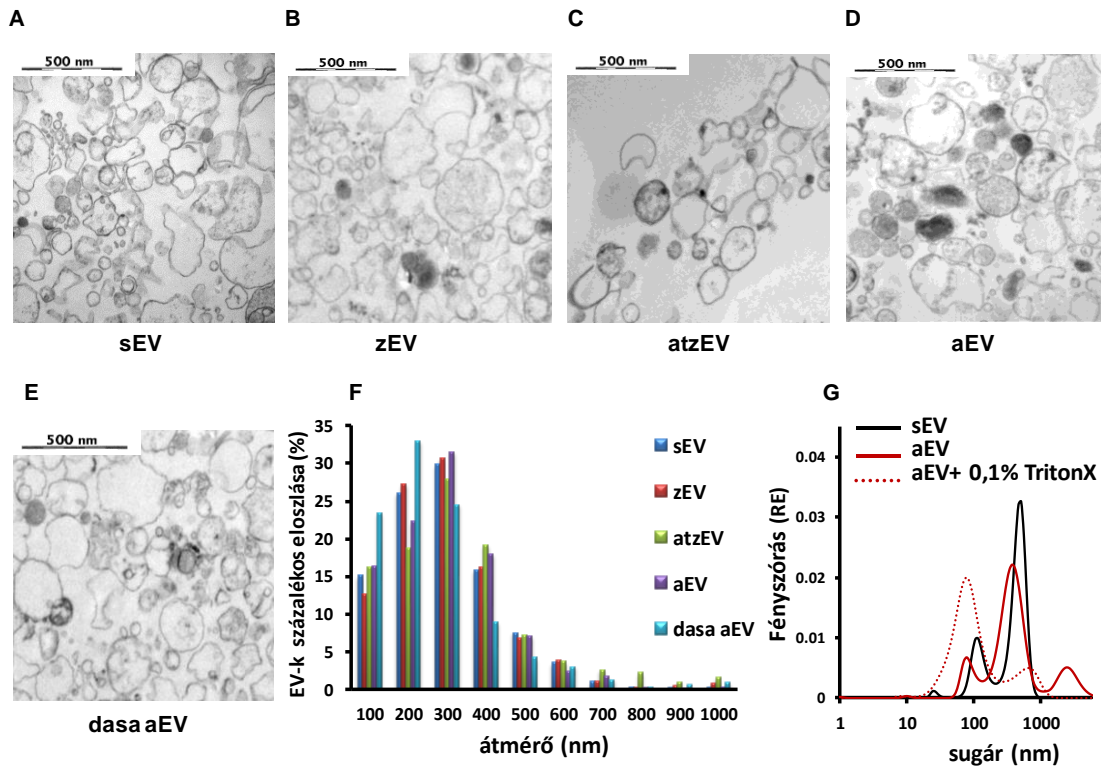
A nyugvó egér neutrofilek a humán neutrofilekhez hasonlóan spontán is termelnek EV-eket (sEV) A csontvelőből izolált egér neutrofileken



15. ábra: Egér neutrofil granulociták EV termelésének áramlási citométeres vizsgálata opsonizálatlan zimozánnal (zEV), valamint opsonizált zimozánnal (catzEV) történt aktivációt követően. A diagramon CD11b pozitív, detergens érzékeny eseményeket ábrázoltam. A diagramon huszonkét független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; ANOVA próba).

a humán kísérleteinkhez hasonlóan kiváltottuk a teljes, komplementet, antitesteket tartalmazó szérummal opsonizált zimozánnal indukált EV (catzEV), valamint az opsonizálatlan zimozánnal indukált EV termelést (zEV) és áramlási citométerrel vizsgáltuk ezek mértékét az sEV-hez képest. Az opsonizálatlan zimozán hatására képződő zEV-k mennyisége nem szignifikáns mértékben, azonban a teljes szérummal opsonizált zimozánnal történt aktiváció hatására képződő catzEV-k mennyisége szignifikánsan emelkedett a stimulálatlan neutrofilekből képződő sEV mintához képest (15. ábra).

Az egér EV-k morfológiáját elektronmikroszkóppal, méretét pedig az elektron mikroszkópos képek kiértékelésével, valamint a dinamikus fényszórásméréssel vizsgáltuk. Mind az sEV és a catzEV mintákról készült elektronmikroszkópos felvételeken az egyértelműen membránnal határolt intakt képletek mellett nem vezikula természetű lipofil képletek is látszódnak, amik feltételezésünk szerint a csontvelői eredetű extracelluláris, vagy sejtes szennyeződésből származnak (16/A, B ábra). Az sEV és a catzEV mintáink között jelentős méretbeli különbség nem látszódott. Az egér csontvelő eredetű EV-k hasonló szerkezetűek, azonban kisebbek, mint a humán társaik (16/C ábra). Az elektronmikroszkópos mintáinkban, 400 darab intakt vezikula ImageJ-vel mért területéből számolt átlagos átmérőjük alapján 100-700 nm közé eső vezikula populációt találtunk (16/C ábra). A DLS egy 10-15 nm-es az elektronmikroszkópos felvételeken is látott nem vezikula természetű és egy 100-400 nm-es sugarú populációt mutatott a mintáinkban (16/D ábra). A közepes mérettartományba eső, 100-400 nm-es sugarú DLS-ben detektált populáció esett bele az áramlási citométerünk mérési tartományába, tehát citométeren ezt a populációt detektáltunk és kvantifikáltuk. Ezen populáció 0,1%-os Triton-X-100 detergens hatására teljesen eltűnt és a kisebb mérettartomány felé tolódott, ami egyértelműen bizonyítja a vezikula természetét (16/D ábra). A DLS mérések során nem találtunk az egér EV populációk között méret különbséget. Tehát az egér EV-k döntően a közepes mérettartományba esnek, hasonló szerkezetűek, mint a humán társaik. A humán EV-khez hasonlóan döntően neutrofil membrán komponensek (CD11b, CD18), valamint foszfatidilszerin találhatóak a felszínükön. Valamint a humán EV-khez hasonlóan a neutrofil aktiváció nem változtatja meg a morfológiájukat (16/A, B ábra).

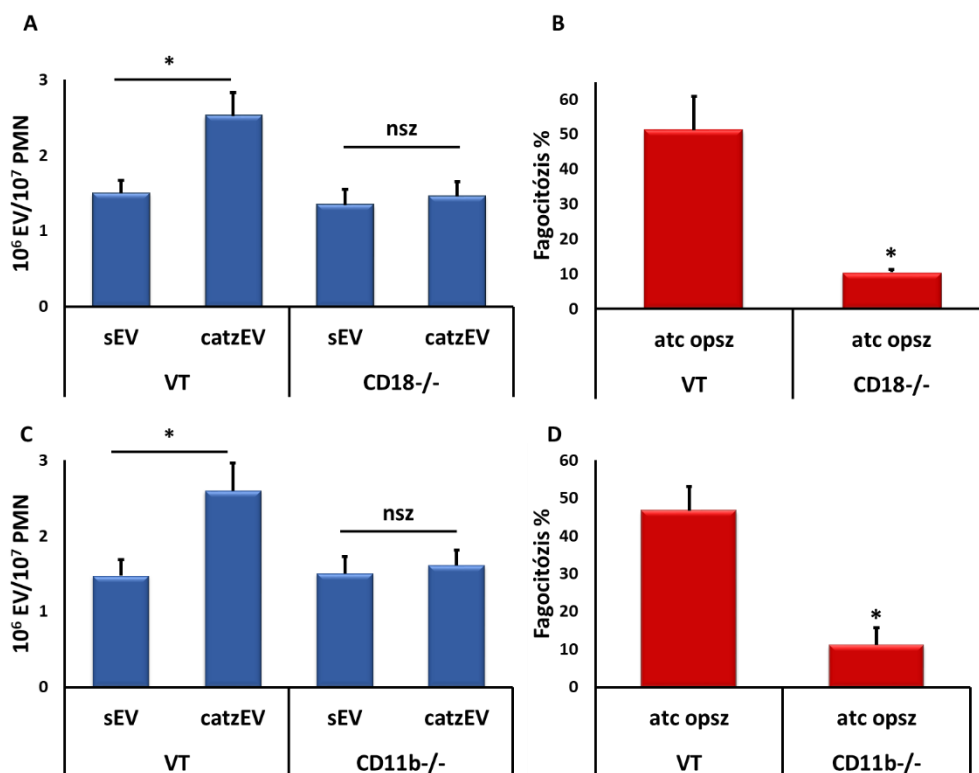


16. ábra: Egér neutrofil EV-k jellemzése elektronmikroszkóppal és dinamikus fényszórásméréssel. Reprezentatív elektronmikroszkópos képek a különböző EV populációkról (A-B). Neutrofil EV populációk méretszerinti eloszlása három független elektronmikroszkópos kísérletünkből (C). Az sEV és az atzEV mintáink méretszerinti eloszlása DLS-sel. A pontozott vonallal a 0,1% Tritonnal kezelt aEV populációt tüntettem fel. Az 1000 nm-nél nagyobb eseményeket a zimoján szennyezés okozta (G). Reprezentatív görbe három független kísérletből.

6.5. Transzgénikus egér neutrofilek catzEV termelésének és fagocitózisának vizsgálata

A vad típusú egér neutrofilek jellemzését követően az opszonin receptorokra hiányos egértörzsek teljes szérummal opszonizált zimoján indukálta catzEV termelését hasonlítottuk össze a teljes szérummal opszonizált baktériumokkal szembeni fagocita aktivitásával. Elsőként a MAC-1 integrin szerepét vizsgáltuk a β -lánc hiányos ($CD18^{-/-}$) és az α -lánc hiányos egerekben ($CD11b^{-/-}$). A vad típusú, a $CD18^{-/-}$ és a $CD11b^{-/-}$ neutrofileket 30 percen keresztül aktiváltuk opszonizált zimozánnal. Az aktiváció után izolált catzEV számot az sEV-khez hasonlítottuk. A vad típusú neutrofilekben 30 perc inkubációt követő catzEV termelés az sEV termelés kétszeresére nőtt (17/A,C ábra). A $CD18$ és a $CD11b$ hiányában az egér neutrofilek catzEV termelése nem mutatott növekedést az sEV szintjéhez képest (17/A,C ábra). Az eredményeinkből az is látszódott,

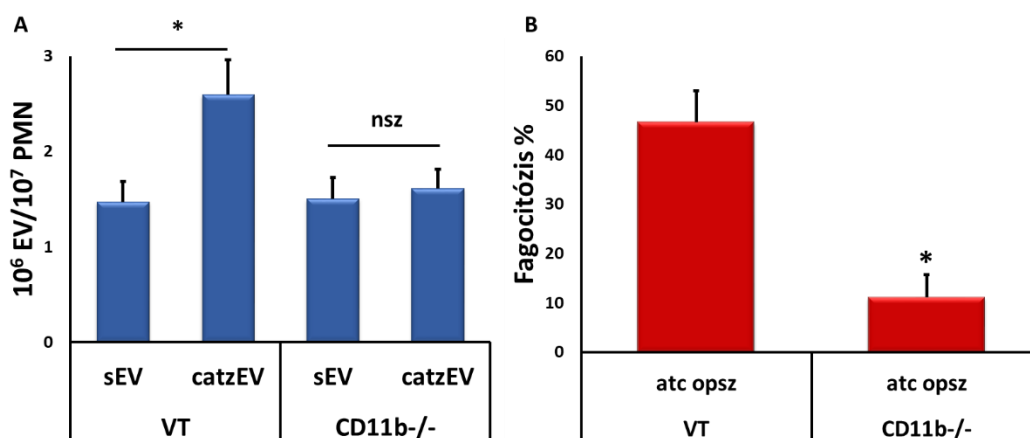
hogy a CD18^{-/-} és a CD11b^{-/-} neutrofilek sEV termelése megegyezett a vad típusú neutrofilek sEV termelésével (17/A,C ábra). A teljes szérummal opsonizált baktériumokat a CD18^{-/-} és a CD11b^{-/-} neutrofilek közel 80 százalékkal kisebb arányban fagocitálták (17/B,D ábra).



17. ábra: A MAC-1 szerepének vizsgálata egér génhíányos neutrofilek catzEV termelésében, valamint fagocitózisában. A CD18- és CD11b-hiányos egér neutrofilek catzEV termelésének áramlási citometriás vizsgálata teljes szérummal opsonizált zimozánnal történt aktivációt követően (A-C-E). Kontrollként a vad típusú neutrofilek catzEV termelését tüntettem fel. A CD18- és CD11b-hiányos egér neutrofilek USA baktériumok fagocitózisának áramlási citométeres vizsgálata (B-D-F). A diagramokon huszonkettő (A), húsz (B), valamint hét (C-D) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; ANOVA próba, kétmintás t-próba).

A MAC-1 mindkét láncára hiányos egér neutrofilek catzEV termelésének a vizsgálata után az Fc γ R-ok szerepét vizsgáltuk Fc receptor gamma lánc hiányos (Fc γ R^{-/-}) transzgenikus egértörzsben. Az Fc γ R^{-/-} neutrofilek Fc receptor hiányosnak tekinthetők egyben, mert az ITAM tartalmazó adapter Fc γ lánc hiányában az Fc γ R-ok nem tudnak kifejeződni az egér neutrofilek felszínén [5]. Az Fc γ R^{-/-} neutrofilekben se a sEV, se az catzEV termelés nem változott a vad típusú neutrofilekhez képest (18/A ábra). Fc γ R^{-/-}

neutrofilek fagocitózis százaléka harmadával csökkent a vad típusú neutrofilekhez képest (18/B ábra).



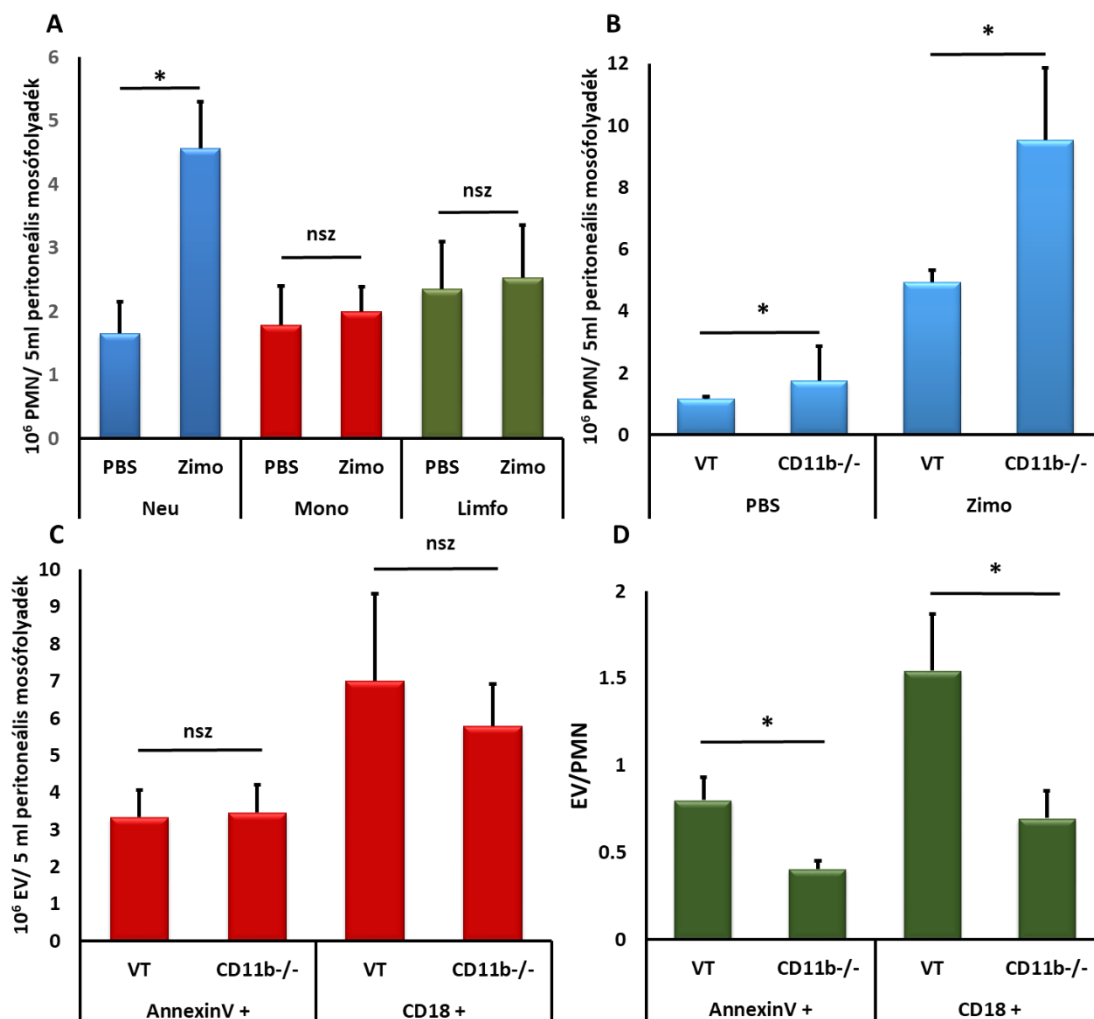
18. ábra: Az Fc receptorok szerepének vizsgálata egér génhiányos neutrofilek catzEV termelésében, valamint fagocitózisában. Az FcR γ -hiányos egér neutrofilek catzEV termelésének áramlási citometriás vizsgálata teljes szérummal opszonizált zimoszánnal történt aktivációt követően (A). Kontrollként a vad típusú neutrofilek catzEV termelését tüntettem fel. A FcR γ -hiányos egér neutrofilek USA baktériumok fagocitózisának áramlási citométeres vizsgálata (B). A diagramokon huszonhat (A), valamint hét (B) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; ANOVA próba, kétmintás t-próba).

6.6. Indukált peritonitis során keletkező EV-k vizsgálata CD11b hiányos egerekben

Egér peritonitis modellben in vivo körülmények között vizsgáltuk a MAC-1 catzEV termelésben betöltött szerepét. Ezen kísérleteink során opszonizálatlan zimoszánt használtunk, mert az opszonizált zimoszán túl nagy immunválaszt váltott ki, ami gyakran az egerek halálához vezetett, valamint olyan mértékű volt a sejt kiáramlás a hasüregben, ami az áramlási citometriás mérésünket nagyon megnehezítette. Feltételezésünk szerint a zimoszán a hasüregben természetes úton opszonizálódik ezért az irodalomban fellelhető kísérletes gyakorlatnak megfelelően opszonizálatlan zimoszánt injektáltunk a vad típusú és a CD11b^{-/-} egerek hasüregébe [126], majd két óra inkubáció után a hasüregi mosófolyadékban lévő sejteket és EV-eket fluoreszcens jelölést követően citométerben vizsgáltuk.

Vad típusú egerek hasüregében 2 óra inkubációt követően a neutrofilek száma közel megháromszorozódott, míg a monociták és limfociták száma nem változott (19/A ábra). Az irodalmi adatokkal megegyező módon a CD11b^{-/-} neutrofilek migrációja fokozott volt a vad típusú sejtekhez képest [41]. A vad típusú mintáinkban a kilépett neutrofil szám közel

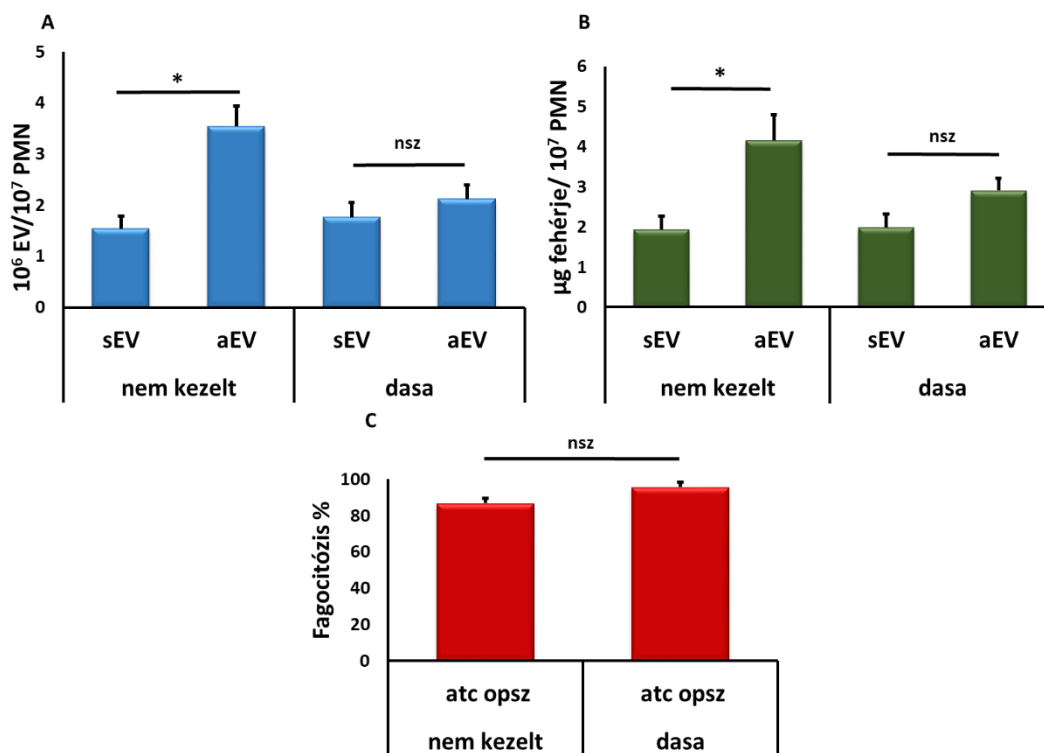
50%-kal kisebb volt, mint a CD11b^{-/-} mintákban (19/B ábra). Az intakt neutrofilekkel ellentétben az AnnexinV és a CD18 pozitív catzEV-k száma nem növekedett a CD11b^{-/-} állatokból származó mintákban, hanem megegyezett a vad típusban mért értékekkel (19/C ábra). Tehát hasüregben detektált EV/neutrofil arány opszonizálatlan zimozán stimulusra szignifikánsan kevesebb volt a CD11b^{-/-} mintákban (19/D ábra).



19. ábra: Opszonizálatlan zimozánnal indukált peritonitis CD11b-hiányos egerekben. Két órás opszonizálatlan zimozán stimulusra a hasüregbe kilépő egyes immunsejt populációk (A). Ly6G pozitív neutrofil kapuban lévő sejtszám változása a hasüregben PBS, vagy opszonizálatlan zimozán oldat beinjektálását követő két órával (B). A hasüregben képződött AnnexinV és CD18 pozitív vezikulák vizsgálata áramlási citométerrel (C). A hasüregben termelődött AnnexinV, vagy CD18 pozitív EV-k és a hasüregbe kilépett neutrofilek aránya (D). A diagramokon öt független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; kétmintás t-próba).

6.7. A tirozin kinázok szerepének vizsgálata humán neutrofilek aEV termelésében

Az Fc receptorokból kiinduló jelátvitelnek, valamint a MAC-1-ből kiinduló „Outside-in” jelátviteli útnak is fontos szereplői a tirozin kinázok. A tirozin kinázok szerepének vizsgálatához humán neutrofil granulocitákat kezeltünk nem specifikus, kis molekulású tirozin kináz gátló dasatinibbel. Futosi és munkatársai a dasatinib hatását a különböző neutrofil sejtfunkciókra már részletesen vizsgálták [45].



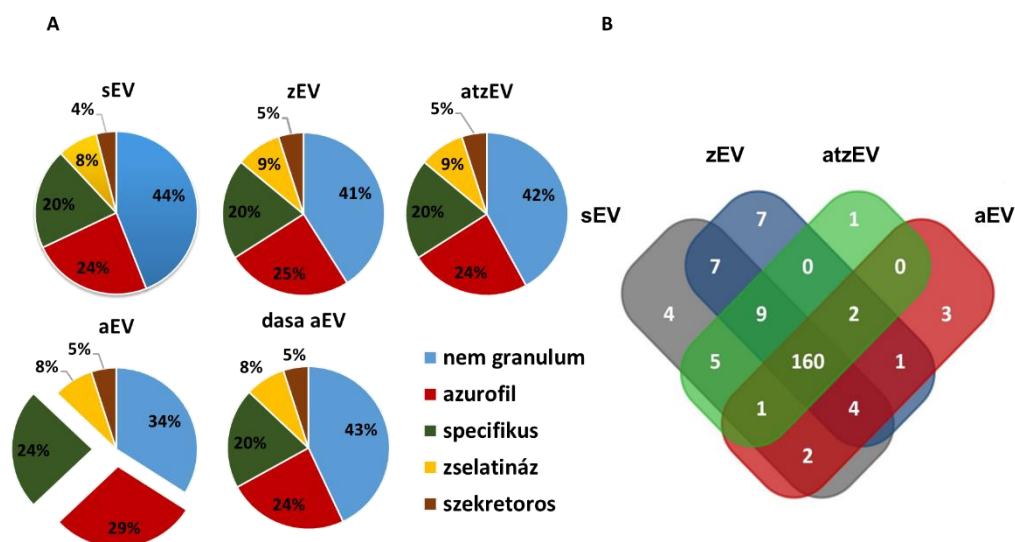
20. ábra: Humán neutrofilek aEV termelésének és fagocitózisának vizsgálata dasatinib előkezelést követően. Dasatinibbel előkezelte neutrofilek aEV termelésének áramlási citometriás vizsgálata teljes szérummal opsonizált zimozánnal történt aktivációt követően (A). A dasatinibbel előkezelte neutrofilek által termelt aEV-k fehérje tartalmának meghatározása Bradford módszerrel (B). Dasatinibbel előkezelte neutrofilek fagocitózisának vizsgálata teljes szérummal opsonizált USA baktérium fagocitózisát követően (C). A diagramokon hét (A), tizenegy (B), valamint négy (C) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; ANOVA próba).

Humán neutrofileket előkezelte 10 percig 200 nM-os végkoncentrációban alkalmazott dasatinibbel. A dasatinib előkezelés a sEV termelődést nem befolyásolta, viszont az aEV-k számát és fehérjetartalmát is jelentősen csökkentette (20/A,B ábra). Az irodalmi adatokkal megegyező módon a dasatinib a fagocitózist nem befolyásolta (20/C ábra) [45]. A tirozin kinázok az Fc receptorok után egy újabb jelátviteli pont, ahol az

opszonizált zimozán okozta aEV termelés és a fagocitózis elválik egymástól. A dasatinib előkezelés nem befolyásolta a vezikulák morfológiáját és méretét (10/E,F ábra).

6.8. Humán neutrofil eredetű EV-k fehérje összetételének vizsgálata

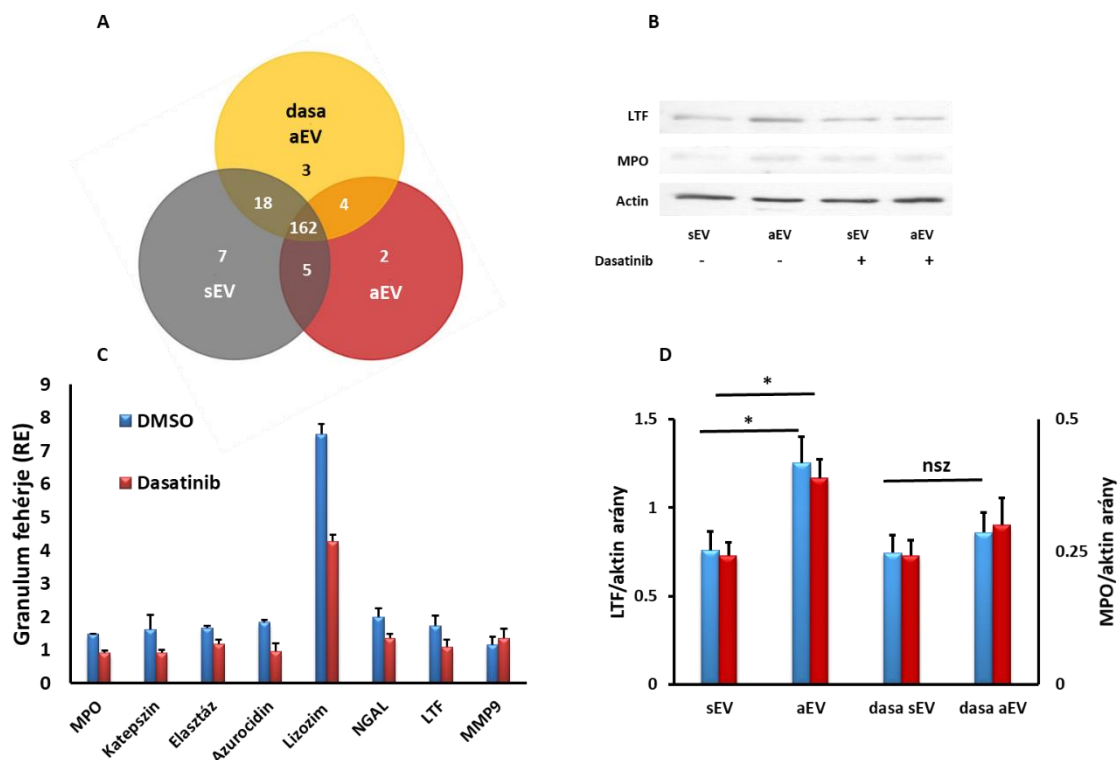
A különböző EV populációk fehérje összetételét proteomikai méréssel vizsgáltuk. A mintáinkban 206 fehérjét azonosítottunk. Az azonosított fehérjék kb. 75%-a az összes vizsgált vezikula populációban jelen volt (21/ B ábra).



21. ábra: Humán neutrofilek EV populációinak proteomikai vizsgálata. A különböző granulumokból származó granulumfehérjéknek az aránya az egyes EV populációkban (A). A proteomikai mintáinkban kimutatott fehérjék átfedése a különböző EV populációkban (B).

Csak egy-két fehérje volt, ami elszórta csak egyik, vagy másik vezikula populációban fordult elő. A kvantitatív mérések eredményei szerint a fehérjék több mint 50%-a a neutrofilek 4 fajta granulumából származó fehérje (21/A ábra). A granulumfehérjék a legnagyobb arányban az azurofil és a specifikus granulumokból, kisebb részben zselatináz granulumokból és szekretoros vezikulákból származnak (21/ A ábra). A nem granulum eredetű fehérjék döntő többsége a citoplazmából, citoskeletonból és a mitokondriumból származik. A nem granulum eredetű fehérjék aránya az sEV mintákban 44% volt. Az atzEV és a zEV mintákban minimálisan, azonban az aEV mintában jelentősen csökkent a nem granulumfehérjék aránya. A különböző EV típusokban a három fő granulum típusból származó fehérjék aránya nagyjából 50%, az aEV mintákban csak az azurofil és a specifikus granulum eredetű fehérjék aránya több mint az összfehérjetartalom 50%-a (21/A ábra). Az aEV mintákban az azurofil és a specifikus

granulum eredetű fehérjék aránya jelentősen megemelkedett a többi vezikula típushoz képest. A zselatináz granulum, és a szekretoros vezikula eredetű granulum fehérjék aránya nem változott az aEV mintáinkban sem (21/A ábra).



22. ábra: Dasatinib hatása humán neutrofilek által termelt aEV-k fehérje összetételére. A különböző fehérjék átfedése az sEV, aEV, valamint dasa aEV mintáinkban (A). A dasatinibbel előkezelt neutrofilek által termelt sEV és aEV mintáink LTF és MPO tartalmának vizsgálata western blottal (B). A proteomikai kísérleteink során mért granulumfehérjék sEV-re normalizált relatív mennyisége a dasatinibbel kezelt és kezeletlen neutrofilek által termelt aEV-kben. A diagramon három független kísérlet átlagát tüntettem fel (C). A western blot kísérleteink denzitometriás kiértékelése. Az egyes EV mintáink LTF és MPO tartalmát a mintáinkban lévő aktinra normáltam (D). A diagramon tizenegy és hat független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; kétmintás t-próba)

A széles spektrumú tirozin kináz gátló dasatinib előkezelés a granulum fehérje dúsulást az aEV mintákban megszüntette (22. ábra) ezért a dasatinib hatását részletesebben is megvizsgáltuk. Kíváncsiak voltunk, hogy a mintáink mennyiségi és minőségi fehérje összetételét megváltoztatja-e a dasatinib előkezelés. Az sEV, aEV és dasa aEV minták fehérjetartalma jelentős része átfedett (22/A ábra). A dasatinib előkezelés az összes általunk vizsgált azurofil és specifikus granulumfehérje mennyiségét csökkentette, míg a döntően zselatináz granulum eredetű MMP9 mennyiségét nem

változtatta meg (22/C ábra). A laktoferrin és a mieloperoxidáz két fontos granulum fehérje dúsulását Western blot-tal is vizsgáltuk. A Western blot-okból látszik, hogy önmagában a dasatinib nem befolyásolja az sEV-ben a granulum fehérjék arányát, csak az aktiváción átesett mintákban fejt ki a hatását (22/B-D ábra). Proteomikával a különböző vezikula mintáinkban kimutatott fehérjék tulajdonságait (sejten belüli előfordulását, funkcióját) a FunRich 3.0 programmal vizsgáltuk [115]. A detektált fehérjék több mint 95%-a ismerten előfordul EV-kban.

A proteomikai méréseink nyers adatait az első szerzős publikációm mellékletében elérhetőek.

7. Megbeszélés

Az irodalmi áttekintés során részletesen bemutattam a neutrofilek fagocita receptorait, valamint az azokból kiinduló fő jelátviteli utakat (4, 6 ábra). Ismertettem a neutrofilek intracelluláris és extracelluláris patogén ölési repertoárját, különös tekintettel a munkacsoportunk által felfedezett antibakteriális aEV-kre (2. ábra) [12]. A doktori munkám során elvégzett kísérletekkel azt kívántuk megvizsgálni, hogy a humán neutrofilek aEV termelését milyen membrán receptorok váltják ki, valamint, hogy a neutrofilek aEV termelése miként korrelál a fagocitózissal. Ezért különböző fagocita receptorokon keresztüli stimulusra képződő humán és egér neutrofil eredetű vezikula populációk tulajdonságait hasonlítottuk össze a teljes szérummal opszonizált zimoszán stimulusra keletkező humán aEV-kkel és egér eredetű catzEV-kel. A humán neutrofil EV-k fizikai jellemzése során döntően egy kisebb 100 nm-es és egy 200-700 nm-es átmérőjű EV populációt találtunk (10/F,G ábra). Az általunk elektronmikroszkóppal és DLS-sel kimért humán neutrofil EV-k mérete megfelel a neutrofil EV-kkel foglalkozó szakirodalomban, valamint a munkacsoportunk által korábban bemutatott humán neutrofil eredetű EV-k mérettartományának [12, 113]. Kísérleteim során kimutattam, hogy az eltérő stimulusra képződő humán neutrofil EV populációk méretszerinti eloszlása között nincs jelentős különbség (10/A-E ábra). Tehát az eltérő fagocita receptorokon keresztüli aktiváció nem változtatja meg a humán neutrofil eredetű EV-k méretét és morfológiáját az sEV-khez képest. A különböző fagocita receptorokon keresztüli aktiváció nem változtatta meg az EV-k elektrondenzitását sem. Az eltérő stimulusra képződő humán neutrofil EV populációk fizikai jellemzését követően, az egyes humán izolátumokból származó neutrofilek fagocita aktivitását hasonlítottuk össze az általunk különböző stimulusra termelt vezikula populációk számával és fehérjetartalmával. A szuszpenziós körülmények között az opszonizálatlan zimoszánal, valamint a teljes szérummal opszonizált zimoszánal történt neutrofil aktiváció szignifikáns mértékben fokozta a zEV, illetve az aEV termelést az sEV-hez képest. Míg a komplement hiányosan, antitesttel opszonizált zimoszán stimulus nem növelte szignifikáns mértékben a vezikula számot és a vezikulák fehérjetartalmát (9. ábra). A fagocitózis vizsgálata során az opszonizálatlan baktériumot alig fagocitálták a neutrofilek, azonban mind az antitesten keresztüli opszonizáció, mind a komplement rendszeren keresztüli opszonizáció szignifikáns mértékben fokozta a neutrofilek fagocitózist (12. ábra). Ezek az

eredmények arra engedtek minket következtetni, hogy a humán neutrofilek fagocitózisa és az antibakteriális EV-k termelése részben eltérő membrán receptorokból indul ki: Míg az EV termelésben a komplement receptorok mellett a PRR-ek, addig a fagocitózisban a komplement receptorok mellett az Fc receptorok szerepe a meghatározó. Tehát az Fc receptorok nem váltanak ki EV termelést, de fagocitózist igen, míg az általunk használt rendszerben a mintázatfelismerő receptorok nem váltanak ki érdemi fagocitózist, azonban EV termelést igen. Ezen megfigyeléseinket receptorokat szelektíven ingerlő felszíneken is ellenőriztük. Az immunkomplex felszín nem fokozta jelentősen a vezikula termelést, míg az integrin szerkezetű komplement receptorokat szelektíven ingerlő fibrinogén felszín szignifikáns mértékben fokozta az EV termelést a kontroll szérummal fedett felszínhez képest (11. ábra). A felszíneken végzett kísérleteink a szuszpenziós elrendezéshez hasonló eredményt hoztak: az integrin szerkezetű komplement receptorok fontos szerepet játszanak az EV termelésben, míg az Fc receptorok szerepe elhanyagolható. Mivel a felszíni aktivációs rendszerben nem képződik fagoszóma ezért e kísérletek eredményeiből azt a következtetést is levonhatjuk, hogy a neutrofilek EV termelése egy a fagocitózistól független folyamat eredménye. Ez azon kezdeti megfigyelések tükrében meglepő, hogy mindkét folyamat opszonin, fagocita receptorokról indul és gátolható citoszkeleton gátlószerekkel (citokalazin B, iatrunkulin) [12].

A humán neutrofil eredetű EV-kkel végzett méréseinket egér neutrofil eredetű EV-kkel végzett mérésekkel egészítettük ki. A nemzetközi irodalomban egér neutrofil eredetű EV-kről nem találtunk adatokat, ezért ennek az EV populációnak a vizsgálata újdonságnak tekinthető. Az egér neutrofil EV-k részletes jellemzése során azt találtuk, hogy alapvetően a humán EV-khez hasonlóan ezek is a sejtfelszínről lefűződéssel keletkező „külső oldal kívül” típusú vezikulák, mivel sejtfelszíni markerekre, mint a MAC-1 két láncára (CD11b, CD18), valamint a szelektív sejtfelszíni neutrofil markerre az Ly6G-re specifikus antitestekkel jól jelölődnek (14. ábra). Dinamikus fényszórás-méréssel egy átlagosan 10-15 nm-es sugarú lipofil, de nem vezikula természetű és egy 100-400 nm-es sugarú membránnal határolt intakt detergens érzékeny populációt találtunk. A 10-15 nm-es képletek nagy valószínűséggel csontvelői stróma sejtek széteséséből származnak. A spontán képződő EV-k elektronmikroszkóppal, valamint dinamikus fényszórással kimért mérete és a teljes szérummal opszonizált zimozán

stimulusra keletkező catzEV-k mérete között nem volt jelentős különbség. Az elektronmikroszkópos felvételeken az sEV-k és a catzEV-k között nem volt jelentős morfológiai különbség (16/A, B ábra). Mindkét vezikula populációról készült felvételeken intakt, a granulumoknál hypodenzzebb, közepes mérettartományú vezikulákat találtunk (16. ábra). A vad típusú egér neutrofilekben nem szignifikáns EV termelés növekedést okozott az opszonizálatlan zimozánnal történt stimuláció (zEV). A teljes szérummal opszonizált zimozán stimuláció szignifikáns EV termelés növekedést okozott az egér neutrofilek esetében is (catzEV) (15. ábra). A MAC-1 és a Fc γ R-ok teljes szérummal opszonizált egér neutrofil eredetű catzEV-k termelésében betöltött szerepét transzgénikus egértörzseken vizsgáltuk tovább. A MAC-1 integrin α -láncára (CD11b^{-/-}), valamint β -láncára (CD18^{-/-}) hiányos egér neutrofilekben az catzEV képződés opszonizált zimozán hatására jelentősen csökkent a vad típusú neutrofilekhez képest (17/A, C ábra). A MAC-1 mindkét láncának a hiánya a catzEV termeléssel párhuzamosan szignifikáns mértékben csökkentette az egér neutrofilek fagocitózisát is (17/B, D ábra). A MAC-1 szerepét *in vivo* is vizsgáltuk indukált peritonitis kísérletekkel CD11b^{-/-} egerekben. Méréseink során az egerek hasüregébe kilépő neutrofil és vezikula számot vizsgáltunk két órás opszonizálatlan zimozán stimulust követően, amikor a hasüregbe kilépő immunsejtek döntő része neutrofil (19/A ábra). A CD11b^{-/-} egerekben a közel kétszer nagyobb számban léptek ki a hasüregbe neutrofilek a vad típusúhoz képest (19/B ábra). Ez a megfigyelésünk az irodalmi adatokkal megegyezik. A CD11b hiányában a MAC-1 állandó β lánc (CD18) a másik β 2 integrin, az LFA-1 specifikus α láncához (CD11b) kapcsolódik, és fejeződik ki a neutrofilek felszínén LFA-1-ként (CD11a/CD18). A CD11b^{-/-} neutrofileken közel azonos mértékben fejeződik ki a CD18, mint a vad típusú sejteken [41]. Az ezen állatok esetében a megnövekedett LFA-1 kifejeződés okozza a CD11b^{-/-} neutrofilek fokozott migrációját [37]. A CD11b^{-/-} és a vad típusú egerek hasüregi mosófolyadékában közel azonos mennyiségű vezikulát detektáltunk (19/C ábra). Tehát méréseink során a vezikula/neutrofil arány jelentősen csökkent a CD11b^{-/-} egerek hasüregi mosófolyadékában a vad típusúhoz képest (19/D ábra). Az egér peritonitis kísérleteink eredménye tovább erősítette az elképzelésünket a MAC-1 szerepéről az opszonizált részecske indukálta EV termelésben.

Az Fc receptor γ -lánc hiányos (FcR γ ^{-/-}) egereken végzett kísérleteink során a humán kísérleteinkkel megegyező eredményeket kaptunk. Az FcR γ ^{-/-} egér neutrofilek

catzEV termelése megegyezett, míg a fagocitózisuk csökkent a vad típusú sejtekhez képest (18. ábra). A bevezetésben bemutattam, hogy az $FcR\gamma^{-/-}$ neutrofilek Fc receptor hiányosnak tekinthetők, mivel az Fc receptor γ -lánc adapter fehérje hiányában az Fc γ receptorok nem fejeződnek ki a neutrofilek felszínén [7]. Az $FcR\gamma$ egy ITAM-et tartalmazó adapter fehérje, aminek fontos szerepe van az Fc γ receptorok és a MAC-1 jelátvitelében. Az $FcR\gamma$ mellett a DAP12 a másik fontos ITAM-et tartalmazó adapter fehérje szerepét Dr. Szombath Dávid munkatársam vizsgálta az egér neutrofilek catzEV termelésében és fagocitózisában. A DAP12 hiánya az $FcR\gamma$ hiányához hasonlóan nem befolyásolta az egér neutrofilek catzEV termelését, valamint csökkentette a neutrofilek fagocitózisát. Más integrin funkciókhoz hasonlóan feltételezésünk szerint a catzEV termelésben és a fagocitózisban is átfedő szerepe van ennek a két ITAM tartalmú fehérjének. Az egér neutrofilek catzEV termelésének és fagocitózisának ITAM függését $FcR\gamma$ és a DAP12 kettős gén-hiányos egereken is meg szeretnénk vizsgálni. Azonban az $FcR\gamma$ és a DAP12 kettős gén hiányos egerek a súlyos oszteoclaszt diszfunkció miatt oszteopetrotózisban szenvednek, így indokolatlanul sok egeret kellett volna leölnünk ahhoz, hogy elég csontvelői neutrofilet tudjunk nyerni a vizsgálatainkhoz [127].

A továbbiakban az immunreceptorok jelátvitelében fontos szerepet játszó tirozin kinázok szerepét vizsgáltam. A humán neutrofileket nem szelektív kis molekulású tirozin kináz gátló dasatinibbel kezeltük olyan koncentrációban, ami az irodalmi adatok alapján gátolja a komplement és Fc receptor mediált neutrofil funkciókat [45]. Az általunk használt koncentrációjú dasatinib nem csak Src/Abl gátló, hanem számos egyéb tirozin kináz is gátol, mint a FAK, vagy Syk kinázok [128]. A nagy koncentrációban adott dasatinib hatására szignifikáns mértékben csökkent a teljes szérummal indukált aEV-k áramlási citométerben detektált száma, valamint fehérjetartalma (20/A,B ábra). A dasatinib hatására az irodalmi adatoknak megfelelő módon a fagocitózis nem változott (20. ábra) [45]. A dasatinib nem befolyásolta a neutrofilek sEV termelését (20. ábra), valamint a vezikulák méretét és morfológiáját (10/D ábra). A különböző tirozin kinázok szerepét gén hiányos egér modellben is vizsgáltuk. Eddigi következtetéseimet a humán és az egér kísérletek során kapott eredmények összegzéséből vontam le. Kísérletes eredményeink átfedtek a két fajban, azonban a mind három a neutrofilekben kifejeződő Src hiányos állatok esetében egyértelműen bizonyítást nyert, hogy az teljes szérummal opszonizált részecske indukált zimozán stimulusra termelődő catzEV-k képződését nem

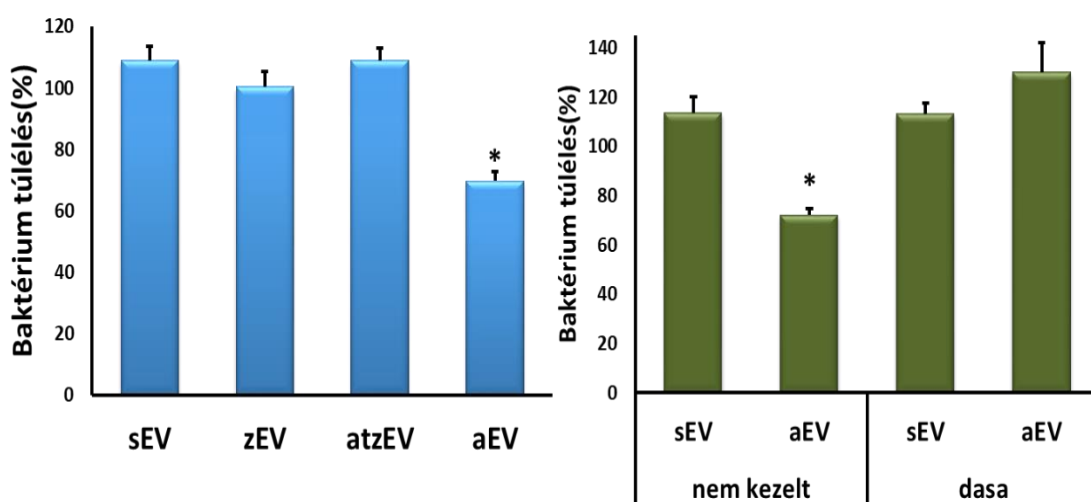
befolyásolja az Src tirozin kinázok hiánya. Ezekben az egerekben az opszonizált részecskék fagocitózisa is szignifikánsan csökkent. Ezek az eredmények az első pillanatban ellentmondanak a dolgozatomban bemutatott a humán adataimnak. Ennek háttéréről sokat gondolkoztunk. A dasatinib az általunk használt magas koncentrációban az Src mellett egyéb tirozin kinázokat is gátol, ami viszont szükséges lehet a vezikulák képzéséhez. A különböző tirozin kinázok változatos módon képesek egymást szabályozni, illetve helyettesíteni. A fagocitózis vizsgálata során kapott egymásnak ellentmondónak tűnő humán és eger adatok háttérében az állhat, hogy a dasatinib az Src tirozin kinázok mellett, amik a fagocitózishoz szükségesek, olyan tirozin kinázt is gátol, ami a fagocitózist fiziológias körülmények között gátolná, így egy gátló tirozin kináz és egy aktiváló tirozin kináz gátlása révén összességében a dasatinib nem befolyásolja a fagocitózist. A ellentmondásos adatoknak úgy lehetne utána járni, hogy Src hiányos egereket kezelünk dasatinibbel, vagy különböző koncentrációjú és így eltérő gátló spektrumú dasatinibbel kezelünk humán neutrofileket. De mindezek mellett felmerül a két faj közötti különbség is lehetséges magyarázatként.

A neutrofil granulociták aEV termelésének Ca^{2+} függését Dr. Szeifert Viktória munkatársaim vizsgálták. Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy a neutrofil granulocitákban a MAC-1 és az Fc receptorok aktiválják a PLC γ 2, ami az IP3-DAG jeláviteli utakon keresztül képes fokozni az intracelluláris Ca^{2+} szintet. Eger neutrofilekben kimutatták, hogy a PLC γ hiányában gátlódnak az Fc receptor és az integrin mediált sejtfunkciók [5]. A kísérleteik során azt az eredményt kapták, hogy a PLC γ 2^{-/-} eger neutrofilek catzEV termelése szignifikánsan csökkent. Humán neutrofilekben az extracelluláris Ca^{2+} hiánya szignifikánsan csökkentette a teljes szérummal opszonizált zimozánnal indukált aEV termelést. Valamint az extracelluláris Ca^{2+} hiányában a neutrofil eredetű aEV-k elveszítették az antibakteriális hatásukat [129].

A humán mintáink fehérjetartalmának részletes vizsgálatát proteomikai módszerrel végeztük. Az egyes vezikula mintákban 1-2 eltérést eltekintve ugyanazok a fehérjék fordultak elő. Legnagyobb arányban granulumfehérjéket tartalmaztak a vezikula mintáink. Egyedül az aEV mintákban növekedett jelentős mértékben a granulum fehérjék aránya az egyéb nem granulum fehérjékhez képest (21/A ábra). A komplement receptorokon keresztüli aktiváció a vezikulaszám, valamint a vezikulák fehérjetartalmának növelése mellett fokozta az azurofil és a specifikus granulum fehérjék

dúsulását is. Azonban a granulum fehérjék dúsulását a dasatinib előkezelés csökkentette az aEV mintákban (22/A ábra). A dasatinib előkezelés hatására az összes általunk vizsgált azurofil és specifikus granulum eredetű fehérje mennyisége csökkent, míg a zselatináz granulum eredetű MMP9 mennyisége nem változott (22/C ábra).

Az általam jellemzett humán EV mintákkal Dr. Szeifert Viktória kollégám végezte az optikai denzitás változásán alapuló baktérium túlélési tesztek. Ezen kísérleteik során azt az eredményt kapta, hogy egyedül csak a teljes szérummal opszonizált zimozán stimulusra képződő aEV minták hatására csökkent jelentősen a baktériumok túlélése (23/A ábra). Ezt a hatást a sejtek dasatinibbel történt előkezelése felfüggesztette (23/B ábra) [130].



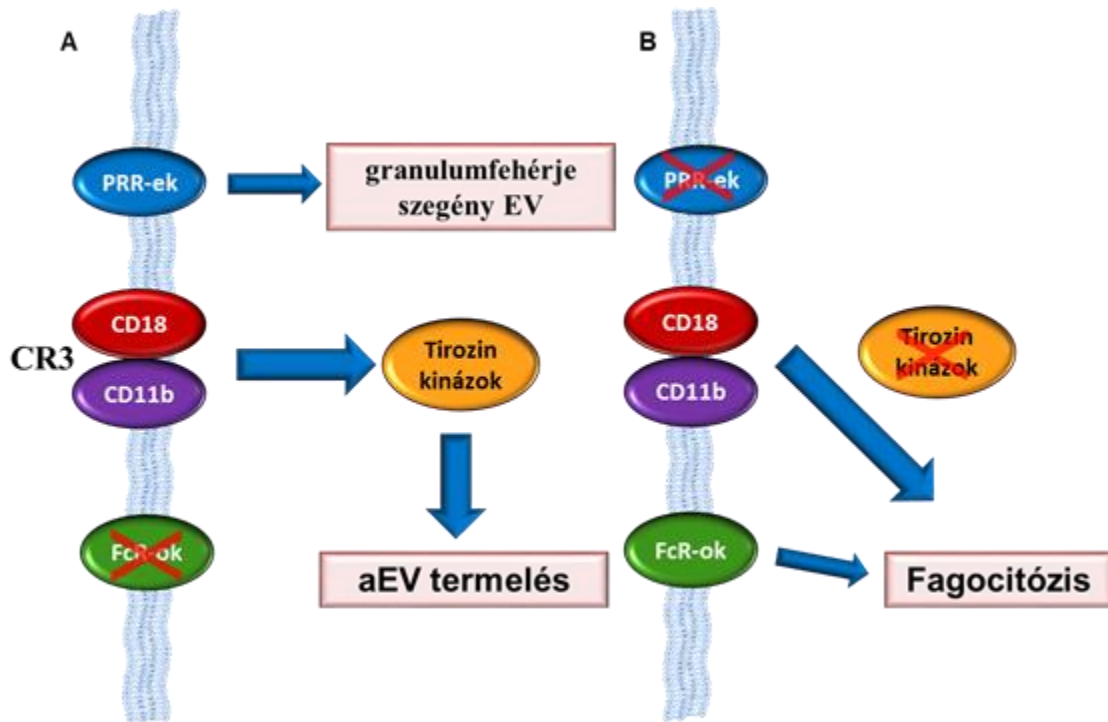
23. ábra: A doktori munkám során jellemzett neutrofil eredetű EV populációk hatása az USA300 baktériumok túlélésére [130]. Az opszonizálatlan zimozán stimulusra keletkező zEV-k, valamint az antitest opszonizációra keletkező atzEV-k nem befolyásolták a baktériumok túlélését optikai denzitás változásán alapuló baktérium túlélési teszteken. Az aEV minták mintegy 30%-kal csökkentette a baktériumok túlélését (A). A sejtek dasatinibbel történt előkezelése megszüntette az aEV minták baktérium növekedés gátló hatását (B). A diagramokon tizenegy (A), valamint négy (B) független kísérlet átlagát és hibáját (+S.E.M.) tüntettem fel (*:p<0,05; ANOVA próba).

Mindezek alapján egy olyan modellt állítottunk fel, miszerint a neutrofil granulociták antibakteriális EV termelése egy aktív, receptor stimulusra kiváltott direkt sejtfunkció. Ellentétben a spontán képződő, konstitutív EV termeléssel, amit nem befolyásol egér modellben az egyes fagocita receptorok hiánya, humán modellben pedig gátlószerek alkalmazása. Elképzelésünk szerint a MAC-1 az első példája annak, hogy

sejtek egy specifikus receptor stimuluson keresztül a környezeti tényezők megváltozását követően karakteresen megváltozott tulajdonságokkal rendelkező EV populációt választanak el, reagálva a környezeti hatásokra.

A 24. ábrán összefoglaltam a megfigyeléseinket az általunk vizsgált két biológiai válaszban az opszonizált részecske indukált antibakteriális hatású EV termelésben, valamint a fagocitózisban. A PRR-eken keresztül az irodalmi adatoknak megfelelően minimális a fagocitózis, azonban a PRR-eken keresztüli aktiváció fokozza a humán neutrofilek eredetű EV-k számát és fehérjetartalmát. Az általunk pontosabban nem azonosított számos PRR receptoron keresztüli aktiváció növeli egér és humán modellben is a vezikulaszámot. Azonban a PRR-ek aktivációja nem növeli az EV-k granulum fehérjetartalmát és a humán zEV-k nem rendelkeztek antibakteriális hatással. Tehát a PRR-eken keresztüli aktiváció a munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban bemutatott szolúbilis mediátorokhoz, mint a TNF α , fMLP, CXCL12 és az LPS hasonlóan nem vezetett antibakteriális EV termeléshez [12].

A humán és az egér kísérleteink is azt mutatták, hogy az Fc receptorokon keresztül jelentős mértékű a fagocitózis. Viszont az Fc receptorok aktiválása antitest opszonizált zimoszánnal humán neutrofileken nem növelte az EV-k számát, fehérjetartalmát és a granulumfehérjék arányát. Az FcR γ hiányos egér neutrofilekben nem változott az EV-k száma a vad típusú sejtekhez képest. A MAC-1 a neutrofil granulociták egyik β 2 integrinje, ami fontos szerepet tölt be a neutrofilek kitapadásában és lassú gördülésében. A MAC-1 szelektív aktiválásával olyan neutrofil funkciók, mint a szuperoxid termelés, valamint a degranuláció is kiváltható [7]. Eredményeink azt mutatják, hogy a MAC-1-en keresztüli aktiváció vezet a neutrofil granulocita eredetű antibakteriális aEV-k termeléséhez. Humán neutrofilekben csak a komplement receptorok stimulációjával tudtunk baktériumok növekedését gátló EV populációt termeltetni. A komplement receptorok hatására megnövekszik a vezikulaszám, fehérjetartalom, valamint az azurofil és a specifikus granulum eredetű granulum fehérjék dúsulása. A humán neutrofilekhez hasonlóan a teljes szérummal opszonizált zimoszán stimulus szignifikáns mértékben okozta a catzEV termelést egerekben. A catzEV termelés teljesen megszűnt a MAC-1 mindkét láncára hiányos neutrofilekben.



24. ábra: Humán neutrofilek aEV termelésében és fagocitózisában eltérő membrán receptorok vesznek részt.

Eredményeim során azt is bemutattam, hogy humán mintákban a MAC-1 receptoron keresztüli aEV termelés az egyéb $\beta 2$ integrin funkciókban is esszenciális tirozin kinázoktól függő folyamat (24. ábra). A dasatinib előkezelés hatására az opsonizált részecske okozta vezikulaszám, és vezikula fehérjetartalom emelkedést, valamint granulum fehérje dúsulást megszüntette. Ez azért izgalmas megfigyelés számunkra, mert, ha az aEV-khez proinflammatorikus funkciókat is tudunk társítani, ahogy ezt Dr. Kolonics Ferenc kollégám kísérletei előrevetítik, akkor egyes autoimmun betegségekben terápiás lehetőségként manapság elérhető számtalan tirozin-kináz gátló kezelés célpontja lehet. A dasatinib előkezelés hatására nem változott a humán neutrofil granulociták fagocita aktivitása. Ami, azt mutatja, hogy az érett neutrofilekben a széles spektrumú tirozin kináz gátlás nem befolyásolja a fagocitózist. A felszíneken végzett kísérleteink során tett másik fontos megfigyelésünk, hogy a MAC-1 stimulusra képződő neutrofil EV-k termelődése független a fagocitózistól, nem a fagocitózishoz vezető aktincitoszkeleton átrendeződéshez kötött folyamat.

8. Következtetések

Értekezésem alapjául szolgáló munkám során a neutrofil granulociták fagocita receptorainak az antibakteriális EV termelésben és a fagocitózisban betöltött szerepével kapcsolatos eredményeimet ismertettem. Ezek alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

1. A komplement receptorokon keresztüli aktiváció okozza a humán neutrofil granulociták antibakteriális hatású EV termelését. Az Fc receptorok és a PRR-ek nem vesznek részt a humán neutrofil granulociták aEV termelésében.
2. Egér neutrofil granulociták opsonizált részecske indukált EV termelése fokozódása megszűnik a MAC-1 integrin hiányában. Az Fc receptorok hiányában nem változik a neutrofil granulociták catzEV termelése.
3. A neutrofil granulociták aEV termelése egy fagocitózistól független folyamat.
4. A komplement receptorokon keresztüli aktiváció fokozza a humán neutrofil granulociták által termelt aEV-kben a granulum fehérjék dúsulását.
5. A nagy dózisu dasatinib hatására megszűnik a humán neutrofil granulociták aEV termelése, valamint az aEV-kben a granulumfehérjék dúsulása.

9. Összefoglalás

A normál laboratóriumi körülmények között kezelt és aktivált érett humán és csontvelői egér neutrofil granulocitákkal végzett kísérleteink során kapott eredményeinket összefoglalva, elmondhatjuk, hogy a humán neutrofil granulocita eredetű antibakteriális EV-k és az általunk először izolált egér neutrofil eredetű teljes szérummal opsonizált zimosán stimulusra keletkező EV-k a komplement receptorok, azokon belül is a MAC-1 integrin receptorok aktivációjára jönnek létre. A komplement receptorok mellett a PRR-ek is képesek voltak fokozni a humán neutrofilek által termelt vezikulák számát és fehérjetartalmát, de ez a vezikula populáció nem rendelkezett antibakteriális hatással. Az Fc receptorokon keresztüli aktiváció nem fokozta sem a humán sem az egér neutrofilek vezikula termelését. Kísérleteink során azt is bemutattuk, hogy a neutrofil EV-k, egy a fagocitózistól független folyamat során keletkeznek. Humán érett neutrofilekben a tirozin kinázok szükségesek az antibakteriális EV-k keletkezéséhez. Dasatinib megszüntette a komplement receptorokon keresztüli vezikula termelést, viszont a fagocitózist nem befolyásolta. A komplement receptorokon keresztüli aktiváció az azurofil és a specifikus granulum fehérjék dúsulását okozta a vezikula mintáinkban, amit a tirozin kinázok gátlása kivédett. Úgy gondoljuk, hogy a munkacsoportunk által kimutatott antibakteriális aEV-k keletkezése egy MAC-1 és tirozin kináz függő jelátviteli úton történik. A MAC-1 és tirozin kináz függő jelátviteli úton megnövekszik a neutrofil eredetű antibakteriális EV-k száma, fehérjetartalma, valamint a granulum fehérjék aránya, ami összefügg az antibakteriális hatással. A patogének által kiváltott gyulladásos környezet a MAC-1-en keresztül képes a neutrofil granulociták spontán antibakteriális hatással nem rendelkező EV termelését egy antibakteriális EV termelés irányába változtatni. A MAC-1 tehát a kitapadás, vándorlás, fagocitózis, degranuláció mellett egy további neutrofil effektor funkció, az antibakteriális aEV termelés szabályozásában is döntő szerepet játszik. Az eredményeinkből kirajzolódó folyamat azt az elképzelésünket modellezi, hogy a sejtek képesek specifikus környezeti ingerre specifikus EV termeléssel válaszolni. Ez tovább erősíti azt az elképzelést, hogy az EV termelés általában az intercelluláris kommunikáció egy önálló formája.

10. Summary

In our experiments we treated and activated mature human and bone marrow derived murine neutrophils in normal laboratory conditions. Based on our results we assume that antibacterial EV-s of human neutrophil granulocyte origin and EV-s first isolated by our team from murine neutrophils stimulated by zymosan, which is opsonized by full blood serum, are produced by the activation of complement receptors mainly by MAC-1 integrin receptors. Beside complement receptors PRR were able to increase the amount of vesicles produced by human and murine neutrophils but this vesicle population did not have any antibacterial effect. The activation through Fc receptors did not enhance the vesicle production in humans and mice. We demonstrated experimentally that neutrophil derived aEV-s are produced in a phagocytosis independent way. In mature human neutrophils tyrosine kinases are needed for the production of antibacterial EV-s. Dasatinib prevented the vesicle production initiated by complement receptors but did not have any effect on phagocytosis. Activation through complement receptors caused the enrichment of granular proteins in our vesicle samples which was fend off by the inhibition of tyrosine kinases. We propose that antibacterial aEV-s, detected by our team, are produced via MAC-1 and tyrosine kinase dependent pathway, which control both the increased amount of EV-s and their protein content and the increased ratio of granular proteins. Through MAC-1 inflammatory environment can change the spontaneous production of neutrophil EV-s with no antibacterial effect to the production of EV-s with antibacterial effect. We thus show that besides adhesion, migration and phagocytosis MAC-1 also plays an important role in another neutrophil effector function, controlling the antibacterial EV production. The process outlined from our results is modelling that cells can answer with EV production to specific environmental stimuli. It strengthens the notion that EV production in general is an independent form of intercellular communication.

11. Irodalomjegyzék

1. Futosi K, Mocsai A. (2016) Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol Rev*, 273: 121-39.
2. Mocsai A. (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 210: 1283-99.
3. Hind LE, Huttenlocher A. (2018) Neutrophil Reverse Migration and a Chemokinetic Resolution. *Dev Cell*, 47: 404-5.
4. Nathan C. (2015) IMMUNOLOGY. From transient infection to chronic disease. *Science*, 350: 161.
5. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. (2013) Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, 17: 1185-97.
6. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7: 678-89.
7. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, 17: 638-50.
8. Segal AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23: 197-223.
9. Rada B, Leto TL. (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol*, 15: 164-87.
10. Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, Cichon I, Clancy DM, Desai J, Dumych T, Dwivedi N, Gordon RA, Hahn J, Hidalgo A, Hoffmann MH, Kaplan MJ, Knight JS, Kolaczowska E, Kubes P, Leppkes M, Manfredi AA, Martin SJ, Maueroeder C, Maugeri N, Mitroulis I, Munoz LE, Nakazawa D, Neeli I, Nizet V, Pieterse E, Radic MZ, Reinwald C, Ritis K, Rovere-Querini P, Santocki M, Schauer C, Schett G, Shlomchik MJ, Simon HU, Skendros P, Stojkov D, Vandenabeele P, Berghe TV, van der Vlag J, Vitkov L, von Kockritz-Blickwede M, Yousefi S, Zarbock A, Herrmann M. (2019) To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*, 26: 395-408.
11. Yin C, Heit B. (2018) Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. *Cell Tissue Res*, 371: 455-71.

12. Timar CI, Lorincz AM, Csepányi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-8.
13. Lim JJ, Grinstein S, Roth Z. (2017) Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 191.
14. Erdei A, Sarmay G, Prechl J. (2012) *Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest*, 299-317.
15. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*, 5: 1299-306.
16. Freeman SA, Grinstein S. (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev*, 262: 193-215.
17. Bruhns P, Jonsson F. (2015) Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*, 268: 25-51.
18. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. (1990) Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med*, 171: 597-613.
19. Nemeth T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovacs M, Kertesz Z, Walzog B, Settleman J, Mocsai A. (2010) Neutrophil Functions and Autoimmune Arthritis in the Absence of p190RhoGAP: Generation and Analysis of a Novel Null Mutation in Mice. *Journal of Immunology*, 185: 3064-75.
20. Jakus Z, Nemeth T, Verbeek JS, Mocsai A. (2008) Critical but overlapping role of FcgammaRIII and FcgammaRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol*, 180: 618-29.
21. Holers VM. (2014) Complement and Its Receptors: New Insights into Human Disease. *Annual Review of Immunology*, Vol 32, 32: 433-59.
22. Erdei A, SG, Prechl J. (2012) *Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest*, 203-210.
23. Azzouz L, Cherry A, Riedl M, Khan M, Pluthero FG, Kahr WHA, Palaniyar N, Licht C. (2018) Relative antibacterial functions of complement and NETs: NETs trap and complement effectively kills bacteria. *Molecular Immunology*, 97: 71-81.

24. Schymeinsky J, Mocsai A, Walzog B. (2007) Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost*, 98: 262-73.
25. Mocsai A, Walzog B, Lowell CA. (2015) Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc Res*, 107: 373-85.
26. Hanna S, Etzioni A. (2012) Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci*, 1250: 50-5.
27. Simon DI. (2011) Opening the Field of Integrin Biology to "Biased Agonism". *Circulation Research*, 109: 1199-201.
28. Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ, Ley K. (2006) Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation*, 13: 99-109.
29. Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, Moser M, Metin A, Fried M, Tomlinson I, Hogg N. (2009) Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nature Medicine*, 15: 306-12.
30. Langereis JD. (2013) Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adhesion & Migration*, 7: 476-81.
31. Mocsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu YM, Lanier LL, Lowell CA. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature Immunology*, 7: 1326-33.
32. Lowell CA, Fumagalli L, Berton G. (1996) Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol*, 133: 895-910.
33. Mocsai A, Zhou MJ, Meng FY, Tybulewicz VL, Lowell CA. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*, 16: 547-58.
34. Graham DB, Robertson CM, Bautista J, Mascarenhas F, Diacovo MJ, Montgrain V, Lam SK, Cremasco V, Dunne WM, Faccio R, Coopersmith CM, Swat W. (2007) Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC gamma 2 signaling axis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117: 3445-52.

35. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. (2009) The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunological Reviews*, 228: 41-57.
36. Schymeinsky J, Gerstl R, Mannigel I, Niedung K, Frommhold D, Panthel K, Heesemann J, Sixt M, Quast T, Kolanus W, Mocsai A, Wienands J, Sperandio M, Walzog B. (2009) A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood*, 114: 4209-20.
37. Lu H, Smith CW, Hughs BJ, Bullard DC, Perrard JL, Ballantyne C. (1996) LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil transmigration in Mac-1 knockout mice. *Faseb Journal*, 10: 1621-.
38. Lu HF, Smith CW, Perrard J, Bullard D, Tang LP, Shappell SB, Entman ML, Beaudet AL, Ballantyne CM. (1997) LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 99: 1340-50.
39. Parsons SJ, Parsons JT. (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23: 7906-9.
40. Kim LC, Song LX, Haura EB. (2009) Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6: 587-95.
41. Lowell CA. (2004) Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Molecular Immunology*, 41: 631-43.
42. Kovacs M, Nemeth T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Z, Lowell CA, Mocsai A. (2014) The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *Journal of Experimental Medicine*, 211: 1993-2011.
43. Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng FY, DeFranco AL, Lowell CA. (2000) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *Journal of Experimental Medicine*, 191: 669-81.
44. Kovacs M, Nemeth T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Z, Lowell CA, Mocsai A. (2014) The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med*, 211: 1993-2011.

45. Futosi K, Nemeth T, Pick R, Vantus T, Walzog B, Mocsai A. (2012) Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood*, 119: 4981-91.
46. Jakus Z, Simon E, Balazs B, Mocsai A. (2010) Genetic Deficiency of Syk Protects Mice From Autoantibody-Induced Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 62: 1899-910.
47. Hayashi F, Means TK, Luster AD. (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102: 2660-9.
48. O'Neill LAJ, Bowie AG. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7: 353-64.
49. Brown GD. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology*, 6: 33-43.
50. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, Tateno H, Uno J, Hirabayashi J, Mikami Y, Takeda K, Akira S, Saito T. (2009) C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 1897-902.
51. Yu XF, Guo CQ, Fisher PB, Subjeck JR, Wang XY. (2015) Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. *Immunotherapy of Cancer*, 128: 309-64.
52. Canton J, Neculai D, Grinstein S. (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13: 621-34.
53. Zhu YF, Yang YJ, Li FF, Fan SJ, Chen XL, Lu YL, Wei Y, Chen Q, Xia L, Tang J, Huang QY, Zhu Q, Zheng J, Liu X. (2019) Stimulation of the class-A scavenger receptor induces neutrophil extracellular traps (NETs) by ERK dependent NOX2 and ROMO1 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 511: 847-54.
54. Boeltz S, Herrmann M. (2018) Editorial - NETs in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 51: 265-6.
55. Robb CT, Dyrinda EA, Gray RD, Rossi AG, Smith VJ. (2014) Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nature Communications*, 5.
56. Zhang XZ, Soldati T. (2016) Of Amoebae and Men: Extracellular DNA Traps as an Ancient Cell-Intrinsic Defense Mechanism. *Frontiers in Immunology*, 7.

57. Hawes MC, Curlango-Rivera G, Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong ZG. (2011) Extracellular DNA: The tip of root defenses? *Plant Science*, 180: 741-5.
58. Menegazzi R, Decleva E, Dri P. (2012) Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*, 119: 1214-6.
59. Yousefi S, Stojkov D, Germic N, Simon D, Wang XL, Benarafa C, Simon HU. (2019) Untangling "NETosis" from NETs. *European Journal of Immunology*, 49: 221-7.
60. Wang YM, Li M, Stadler S, Correll S, Li PX, Wang DC, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184: 205-13.
61. Tatsiy O, McDonald PP. (2018) Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 9.
62. Hosseinzadeh A, Thompson PR, Segal BH, Urban CF. (2016) Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology*, 100: 1105-12.
63. Kenny EF, Herzig A, Kruger R, Muthu A, Mondal S, Thompson PR, Brinkman V, von Bernuth H, Zychlinsky A. (2017) Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*, 6.
64. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu KY, Meijndert HC, Malawista SE, Chevance AD, Zhang KY, Conly J, Kubes P. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18: 1386-+.
65. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao WP, Olsen SH, Klinker M, Shealy D, Denny MF, Plumas J, Chaperot L, Kretzler M, Bruce AT, Kaplan MJ. (2011) Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Immunology*, 187: 538-52.
66. Gupta S, Kaplan MJ. (2016) The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 12: 402-13.
67. Skiljevic D, Jeremic I, Nikolic M, Andrejevic S, Sefik-Bukilica M, Stojimirovic B, Bonaci-Nikolic B. (2013) Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus:

correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51: 1083-91.

68. Aitken ML. (1993) Clinical trials of recombinant human DNase in cystic fibrosis patients. *Monaldi Arch Chest Dis*, 48: 653-6.

69. Feuk-Lagerstedt E, Movitz C, Pellme S, Dahlgren C, Karlsson A. (2007) Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule. *Proteomics*, 7: 194-205.

70. Elstak ED, Neeft M, Nehme NT, Voortman J, Cheung M, Goodarzifard M, Gerritsen HC, Henegouwen PMPVE, Callebaut I, de Saint Basile G, van der Sluijs P. (2011) The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood*, 118: 1570-8.

71. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. (1994) Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Matrix Protein of Specific Granules in Human Neutrophils. *Blood*, 83: 799-807.

72. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, Nielsen MH, Borregaard N. (1994) Isolation and Characterization of Gelatinase Granules from Human Neutrophils. *Blood*, 83: 1640-9.

73. Bainton DF. (1973) Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol*, 58: 249-64.

74. Rorvig S, Ostergaard O, Heegaard NHH, Borregaard N. (2013) Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *Journal of Leukocyte Biology*, 94: 711-21.

75. Dinauer MC. (2014) Disorders of Neutrophil Function: An Overview. *Neutrophil Methods and Protocols*, 2nd Edition, 1124: 501-15.

76. Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13: 269-88.

77. Olofsson A, Skalman LN, Obi I, Lundmark R, Arnqvist A. (2014) Uptake of *Helicobacter pylori* Vesicles Is Facilitated by Clathrin-Dependent and Clathrin-Independent Endocytic Pathways. *Mbio*, 5.

78. Gould SJ, Raposo G. (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2.

79. Russell AE, Sneider A, Witwer KW, Bergese P, Bhattacharyya SN, Cocks A, Cocucci E, Erdbrugger U, Falcon-Perez JM, Freeman DW, Gallagher TM, Hu SS, Huang YY, Jay SM, Kano S, Lavieu G, Leszczynska A, Llorente AM, Lu Q, Mahairaki V, Muth DC, Noren Hooten N, Ostrowski M, Prada I, Sahoo S, Schoyen TH, Sheng LF, Tesch D, Van Niel G, Vandenbroucke RE, Verweij FJ, Villar AV, Wauben M, Wehman AM, Yin H, Carter DRF, Vader P. (2019) Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8.
80. Anand S, Foot N, Ang CS, Gembus KM, Keerthikumar S, Adda CG, Mathivanan S, Kumar S. (2018) Arrestin-Domain Containing Protein 1 (Arrdc1) Regulates the Protein Cargo and Release of Extracellular Vesicles. *Proteomics*, 18.
81. Bebelman MP, Bun P, Huveneers S, van Niel G, Pegtel DM, Verweij FJ. (2020) Real-time imaging of multivesicular body-plasma membrane fusion to quantify exosome release from single cells. *Nature Protocols*, 15: 102-21.
82. Glebov K, Lochner M, Jabs R, Lau T, Merkel O, Schloss P, Steinhauser C, Walter J. (2015) Serotonin Stimulates Secretion of Exosomes from Microglia Cells. *Glia*, 63: 626-34.
83. They C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9: 581-93.
84. Kormelink TG, Arkesteijn GJA, van de Lest CHA, Geerts WJC, Goerdal SS, Altelaar MAF, Redegeld FA, Nolte-'t Hoen ENM, Wauben MHM. (2016) Mast Cell Degranulation Is Accompanied by the Release of a Selective Subset of Extracellular Vesicles That Contain Mast Cell-Specific Proteases. *Journal of Immunology*, 197: 3382-92.
85. Saunderson SC, Schubert PC, Dunn AC, Miller L, Hock BD, MacKay PA, Koch N, Jack RW, McLellan AD. (2008) Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *Journal of Immunology*, 180: 8146-52.
86. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohe N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, They C. (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12: 19-U61.

87. Krempler A, Henry MD, Triplett AA, Wagner KU. (2002) Targeted deletion of the Tsg101 gene results in cell cycle arrest at G(1)/S and p53-independent cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 43216-23.
88. Beer KB, Rivas-Castillo J, Kuhn K, Fazeli G, Karmann B, Nance JF, Stigloher C, Wehman AM. (2018) Extracellular vesicle budding is inhibited by redundant regulators of TAT-5 flippase localization and phospholipid asymmetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115: E1127-E36.
89. Alonso R, Mazzeo C, Rodriguez MC, Marsh M, Fraile-Ramos A, Calvo V, Avila-Flores A, Merida I, Izquierdo M. (2011) Diacylglycerol kinase alpha regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes. *Cell Death and Differentiation*, 18: 1161-73.
90. Trajkovic K. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes (vol 319, pg 1244, 2008). *Science*, 320: 179-.
91. Chen ZZ, Larregina AT, Morelli AE. (2019) Impact of extracellular vesicles on innate immunity. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 24: 670-8.
92. Gamez-Valero A, Campdelacreu J, Vilas D, Ispierto L, Rene R, Alvarez R, Armengol MP, Borrás FE, Beyer K. (2019) Exploratory study on microRNA profiles from plasma-derived extracellular vesicles in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Translational Neurodegeneration*, 8.
93. Aharon A, Tamari T, Brenner B. (2008) Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 100: 878-85.
94. Lindenbergh MFS, Stoorvogel W. (2018) Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annual Review of Immunology*, Vol 36, 36: 435-59.
95. Borzi C, Calzolari L, Ferretti AM, Caleca L, Pastorino U, Sozzi G, Fortunato O. (2019) c-Myc shuttled by tumour-derived extracellular vesicles promotes lung bronchial cell proliferation through miR-19b and miR-92a. *Cell Death & Disease*, 10.
96. Kato Y, Park J, Takamatsu H, Konaka H, Aoki W, Aburaya S, Ueda M, Nishide M, Koyama S, Hayama Y, Kinehara Y, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kumanogoh A. (2018) Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS-STING pathway and

enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77: 1507-15.

97. Verdera HC, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. (2017) Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 266: 100-8.

98. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, Morgelin M, Belting M. (2013) Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 17713-24.

99. Lotvall J, Valadi H. (2007) Cell to Cell Signalling via Exosomes Through esRNA. *Cell Adhesion & Migration*, 1: 156-8.

100. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9: 654-U72.

101. Nawaz M, Fatima F, Vallabhaneni KC, Penfornis P, Valadi H, Ekstrom K, Kholia S, Whitt JD, Fernandes JD, Pochampally R, Squire JA, Camussi G. (2016) Extracellular Vesicles: Evolving Factors in Stem Cell Biology. *Stem Cells International*, 2016.

102. Ingenito F, Roscigno G, Affinito A, Nuzzo S, Scognamiglio I, Quintavalle C, Condorelli G. (2019) The Role of Exo-miRNAs in Cancer: A Focus on Therapeutic and Diagnostic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20.

103. Hamill R. (2013) Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*, 73: 919-34.

104. Gyorgy B, Meijer EJ, Ivanchenko MV, Tenneson K, Emond F, Hanlon KS, Indzhukulian AA, Volak A, Karavitaki KD, Tamvakologos PI, Vezina M, Berezovskii VK, Born RT, O'Brien M, Lafond JF, Arsenijevic Y, Kenna MA, Maguire CA, Corey DP. (2019) Gene Transfer with AAV9-PHP.B Rescues Hearing in a Mouse Model of Usher Syndrome 3A and Transduces Hair Cells in a Non-human Primate. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 13: 1-13.

105. They C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Zavec AB, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-

Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borrás FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MA, Brigstock DR, Brisson A, Broekman MLD, Bromberg JF, Bryl-Gorecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzas EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DRF, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen CC, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FAW, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Chaudhuri AD, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Rubio APD, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TAP, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekstrom K, Andaloussi SEL, Elie-Caille C, Erdbrugger U, Falcon-Perez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Forsonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gamez-Valero A, Gardiner C, Gartner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DCI, Gorgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu GK, Huang YY, Huber V, Hunt S, Ibrahim AGE, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang LZ, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ, Kornek M, Kosanovic MM, Kovacs AF, Kramer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lasser C, Laurent LC, Lavieu G, Lazaro-Ibanez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li ITS, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Line A, Linnemannstons K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lorincz AM, Lotvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SLN, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Moller A, Jorgensen MM, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen ENM, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady

T, O'Loughlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Ostegaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BCH, Pink RC, Pisetsky DS, von Strandmann EP, Polakovicova I, Poon IKH, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KMA, Rughetti A, Russell AE, Saa P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sanchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schoyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PRM, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sodar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BWM, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJC, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot E, Verweij FJ, Vestad B, Vinas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MHM, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan XM, Yanez-Mo M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Zekas V, Zhang JY, Zhao ZZ, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7.

106. Lorincz AM, Timar CI, Marosvari KA, Veres DS, Otrókocsi L, Kittel A, Ligeti E. (2014) Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*, 3: 25465.

107. Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, Glebel B. (2011) Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 87: 146-50.

108. van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R. (2014) Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry,

nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12: 1182-92.

109. Van der Pol E, Van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, Van Leeuwen TG. (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10: 919-30.

110. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2.

111. Mesri M, Altieri DC. (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, 161: 4382-7.

112. Mesri M, Altieri DC. (1999) Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 274: 23111-8.

113. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. (2003) Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*, 285: 243-57.

114. Hong CW. (2018) Extracellular Vesicles of Neutrophils. *Immune Network*, 18.

115. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. (2005) Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Seminars in Immunopathology*, 27: 375-87.

116. Sumagin R, Finkielsztejn A, Slater T, Mascarenhas LL, Mehl L, Butin-Israeli V. (2017) Neutrophil microparticles deliver active myeloperoxidase to injured mucosa to inhibit epithelial wound healing. *Faseb Journal*, 31.

117. Headland SE, Jones HR, Norling LV, Kim A, Souza PR, Corsiero E, Gil CD, Nerviani A, Dell'Accio F, Pitzalis C, Oliani SM, Jan LY, Perretti M. (2015) Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*, 7: 315ra190.

118. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. (2008) Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 180: 817-24.

119. Lim K, Hyun YM, Lambert-Emo K, Capece T, Bae S, Miller R, Topham DJ, Kim M. (2015) Neutrophil trails guide influenza-specific CD8(+) T cells in the airways. *Science*, 349: aaa4352.
120. Lacy P. (2013) A new way of trapping bugs: neutrophil microvesicles. *Blood*, 121: 420-1.
121. Lorincz AM, Schutte M, Timar CI, Veres DS, Kittel A, McLeish KR, Merchant ML, Ligeti E. (2015) Functionally and morphologically distinct populations of extracellular vesicles produced by human neutrophilic granulocytes. *J Leukoc Biol*, 98: 583-9.
122. Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL. (1998) Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med*, 188: 119-31.
123. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9: 671-5.
124. Turiak L, Misjak P, Szabo TG, Aradi B, Paloczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzas EI, Vekey K. (2011) Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics*, 74: 2025-33.
125. Fine DP. (1977) Comparison of ethyleneglycoltetraacetic acid and its magnesium salt as reagents for studying alternative complement pathway function. *Infect Immun*, 16: 124-8.
126. Cash JL, White GE, Greaves DR. (2009) Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the Study of Inflammation. *Methods in Enzymology*, Vol 461: Chemokines, Part B, 461: 379-96.
127. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. (2004) The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 6158-63.
128. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP. (2011) Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, 29: 1046-51.

129. Lorincz AM, Szeifert V, Bartos B, Szombath D, Mocsai A, Ligeti E. (2019) Different Calcium and Src Family Kinase Signaling in Mac-1 Dependent Phagocytosis and Extracellular Vesicle Generation. *Front Immunol*, 10: 2942.
130. Lorincz AM, Bartos B, Szombath D, Szeifert V, Timar CI, Turiak L, Drahos L, Kittel A, Veres DS, Kolonics F, Mocsai A, Ligeti E. (2020) Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*, 9: 1698889.

12. Saját publikációk jegyzéke

Értekezésem alapjául szolgáló közlemények:

1. Lorincz AM*, Bartos B*, Szombath D, Szeifert V, Timar CI, Turiak L, Drahos L, Kittel A, Veres DS, Kolonics F, Mocsai A, Ligeti E. (2020) Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*, 9: 1698889 (**megosztott elsőszerezős közlemény*) IF: 14,976
2. Lorincz AM, Szeifert V, Bartos B, Szombath D, Mocsai A, Ligeti E. (2019) Different Calcium and Src Family Kinase Signaling in Mac-1 Dependent Phagocytosis and Extracellular Vesicle Generation. *Front Immunol*, 10: 2942 IF: 5,085

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemény:

1. Lorincz AM, Szeifert V, Bartos B, Ligeti E. (2018) New flow cytometry-based method for the assessment of the antibacterial effect of immune cells and subcellular particles. *J Leukoc Biol*, 103: 955-63 IF: 4,012
2. Csepanyi-Komi R, Pasztor M, Bartos B, Ligeti E. (2018) The neglected terminators: Rho family GAPs in neutrophils. *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2: e12993. IF: 2,784
3. Csepanyi-Komi R, Wisniewski E, Bartos B, Levai P, Nemeth T, Balazs B, Kurz AR, Bierschenk S, Sperandio M, Ligeti E. (2016) Rac GTPase Activating Protein ARHGAP25 Regulates Leukocyte Transendothelial Migration in Mice. *J Immunol*, 197: 2807-15 IF: 4,856
4. Levay M, Bartos B, Ligeti E. (2013) p190RhoGAP has cellular RacGAP activity regulated by a polybasic region. *Cellular Signalling*, 25: 1388-94 IF: 4,471

13. Társszerzők közötti munkamegosztás

A doktori értekezésemben bemutatott kutatási eredmények létrejöttében több kutatótársam is segítségemre volt. „Eredmények” fejezetben bemutatott kísérletek társtémavezetőm Dr. Lőrincz M. Ákossal és a felügyeletünk mellett dolgozó TDK hallgatókkal végzett közös munka során születtek és nem szerepelnek más PhD értekezés eredményei között. A génhiányos egér neutrofilekkel végzett kísérletekben Dr. Szombath Dávid volt segítségemre, mint TDK hallgató. Az aEV-kkel végzett baktérium túlélési tesztek Dr. Szeifert Viktória munkatársam végezte.

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

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Ligeti Erzsébetnek, aki TDK-hallgató korom óta irányítja és figyelemmel kíséri munkámat. Köszönettel tartozok eleinte munkatársamnak, barátomnak majd társtémavezetőmnek Dr. Lőrincz M. Ákosnak, aki letette értekezésem alapjául szolgáló téma alapjait, akihez bármikor, bármilyen problémámmal fordulhattam bizalommal. Hálával tartozom Dr. Lévay Magdolnának a segítő szándékért és fáradhatatlan türelméért, amellyel bevezettek a pipettaforgatás alapjaiba. Hálával tartozok Prof. Mócsai Attilának aki rendelkezésünkre bocsájtotta az általunk vizsgált transzgenikus egértörzseket. Köszönöm a Mócsai labor minden munkatársának, hogy megosztották velem az egér neutrofilekkel kapcsolatos tapasztalataikat. Simon Edina precíz és körültekintő munkája nélkül nem álltak volna az én rendelkezésemre se megfelelő számú és genotípusú egerek. Külön köszönöm Dr. Hunyady László professzor úrnak, hogy a magas szintű tudományos műhely biztosításával lehetővé tette munkámat. Köszönet illeti az Élettani Intézet minden munkatársát egy olyan inspiráló szakmai és mindennapi légkör megteremtéséért, amelyben öröm volt dolgozni.

Külön köszönet Dr. Csépanyi-Kömi Rolandnak, akivel együtt dolgoztunk a GAP munkacsoportban, aki számos módszer helyesebb használatára hívta fel a figyelmemet, állandó partner volt a kísérleti eredmények értékelésében.

Hálával tartozom továbbá laborunk korábbi TDK hallgatóinknak Dr. Szombath Dávidnak és Dr. Szeifert Viktóriának kitartó lelkesedésükért, kritikus hozzáállásukért és szorgalmas munkájukért. Köszönöm a munkánkat lehetővé tevő fáradozását laborunk állandó asszisztensének Tóth-Kun Reginának. Köszönöm továbbá a laborban kutató valamennyi munkatársamnak a munkámhoz nyújtott segítséget.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a határtalan türelmet, megértést, támogatást és szeretetet feleségemnek, Vikinek. Köszönöm a szerető támogatást, türelmet és irányítást Szüleimnek, családom minden tagjának és barátaimnak.