

Az *Mcl-1*^{ΔMyelo} neutropéniás egértörzs jellemzése és alkalmazása gyulladásos betegségmodellekben

Doktori értekezés

Csepregi Janka Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Wiener Zoltán egyetemi docens, PhD
Dr. Boldizsár Ferenc egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csala Miklós egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dénes Ádám tudományos főmunkatárs, PhD
Dr. Kardon Tamás egyetemi docens, PhD

Budapest
2020

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	9
1.1. A neutrofil granulociták jellemzése	9
1.1.1. A neutrofil granulociták érése és homeosztázisa	10
1.1.2. A neutrofil granulociták effektor működései	12
1.1.3. A neutrofil granulociták túlélése és apoptózisa	18
1.1.4. A neutrofil granulociták szerepe a reumatoid artritiszben	19
1.2. A neutrofil granulociták szerepének <i>in vivo</i> tanulmányozására alkalmazott modellek.....	20
1.2.1. Neutrofil granulociták indukált depléciója.....	21
1.2.2. Genetikailag módosított egértörzsek.....	24
1.2.3. Humán veleszületett neutropeniás állapotok.....	28
1.3. Allergiás kontakt dermatitisz	29
1.3.1. Szemizációs fázis	30
1.3.2. Elicitációs fázis	32
1.3.3. Kontakt hiperszenzitivitás.....	34
1.3.4. A neutrofil granulociták szerepe a kontakt hiperszenzitivitásban.....	36
2. CÉLKITŰZÉSEK	38
3. MÓDSZEREK	39
3.1. Kísérleti állatok.....	39
3.1.1. A felhasznált genetikailag módosított egértörzsek	39
3.1.2. Csontvelői kimérák	41
3.2. A sejtek előkészítése és az áramlási citometriás vizsgálatok	41
3.2.1. Perifériás vér	41
3.2.2. Tioglikolát-indukált peritonitisz modell	41
3.2.3. Áramlási citometriás mérés.....	42
3.3. Hematológiai paraméterek vizsgálata.....	43
3.4. Túlélés-, termékenység- és tömegvizsgálatok.....	44

3.5. K/B×N szérum transzfer artritisz.....	44
3.6. Kontakt hiperszenzitivitás modell (CHS).....	45
3.6.1. Klasszikus CHS modell	45
3.6.2. Passzív CHS modell.....	46
3.7. In vivo fertőzéses modellek.....	46
3.8. Az adatok ábrázolása és statisztikai elemzése.....	47
4. EREDMÉNYEK	48
4.1. A neutropéniás <i>MclI</i>^{ΔMyelo} egerek jellemzése	48
4.1.1. Az Mcl-1 mieloid-specifikus deléciója súlyos neutropéniához vezet.....	48
4.1.2. Egyéb leukocita-populációk vizsgálata <i>MclI</i> ^{ΔMyelo} egerekben	49
4.1.3. Egyéb hematológiai paraméterek vizsgálata	51
4.1.4. Neutrofil granulociták vizsgálata steril gyulladás során	52
4.1.5. Az <i>MclI</i> ^{ΔMyelo} egerek túlélése és megjelenése	53
4.1.6. <i>MclI</i> ^{ΔMyelo} egerek homozigóta formában való tenyésztése.....	55
4.1.7. Az <i>MclI</i> ^{ΔMyelo} egerek védettek az autoantitest-indukált artritisszel szemben	57
4.1.8. Fokozott érzékenység a bakteriális és gombás fertőzésekkel szemben	59
4.2. Az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése	61
4.2.1. Az Mcl-1 neutrofil-specifikus deléciója súlyos neutropéniát eredményez	61
4.2.2. Egyéb leukociták vizsgálata <i>MclI</i> ^{ΔPMN} egerekben.....	62
4.2.3. Az <i>MclI</i> ^{ΔPMN} egerek túlélése és szaporodása.....	64
4.2.4. Egyéb vizsgálatok <i>MclI</i> ^{ΔPMN} egerekben	66
4.3. A G-CSF-receptor-hiányos egerek jellemzése.....	66
4.3.1. Részleges neutropénia G-CSF-receptor-hiányos egerekben	66
4.3.2. Egyéb leukocita-populációk vizsgálata <i>Csf3r</i> ^{-/-} egerekben	67
4.3.3. A <i>Csf3r</i> ^{-/-} egerek védettek az autoantitest-indukált artritisszel szemben	68
4.4. A kontakt hiperszenzitivitás vizsgálata neutrofil-hiányos egértörzsekben	69
4.4.1. A <i>Lyz2</i> ^{Cre/Cre} mutáció nem befolyásolja a CHS létrejöttét.....	70
4.4.2. Kontakt hiperszenzitivitás a G-CSF-receptor hiányában.....	70
4.4.3. A neutrofil granulociták szerepe a CHS szenzitivációs fázisában	71
4.4.4. A neutrofil granulociták szerepe a CHS elicitációs fázisában	72
5. MEGBESZÉLÉS	74
5.1. Egy új neutrofil-hiányos egértörzs jellemzése.....	74

5.1.1. Problémafelvetés	74
5.1.2. Hatékonyság, validálás.....	75
5.1.3. Specificitás	75
5.1.4. Mechanizmus	76
5.1.5. A felhasználhatóság szempontjai	77
5.1.6. Egyéb közlemények ugyanezzel az egértörzzsel	78
5.1.7. Más modellek vizsgálata és összehasonlítása	78
5.2. A neutrofil granulociták szerepe a kontakt hiperszenzitivitás kialakulásában	80
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	82
7. ÖSSZEFOGLALÁS	83
8. SUMMARY	84
9. IRODALOMJEGYZÉK	85
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	108
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	110

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	Analysis of variance (Variancia-analízis)
ATP	Adenozin trifoszfát
Bcl-2	B-sejtes limfóma 2 fehérje
BHI	Brain-heart infusion (Agy-szív infúziós tápoldat)
C5a	Complement component 5a (Komplement komponens 5a)
C5aR	Complement component 5a receptor (Komplement komponens 5a receptor)
CD	Cluster of differentiation (Differenciációs klaszter)
CFU	Colony-forming unit (Kolónia-képző egység)
CHS	Contact hypersensitivity (Kontakt hiperszenzitivitás)
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen (Bőr limfocita-asszociált antigén)
CMP	Common myeloid progenitor (Közös mieloid progenitor)
CPR	C-reactive protein (C-reaktív fehérje)
CR	Complement receptor (Komplement receptor)
CXCL	CXC-chemokine ligand (CXC-kemokin ligand)
CXCR	CXC-chemokine receptor (CXC-kemokin receptor)
DC	Dendritic cell (Dendritikus sejt)
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DNCB	2,4-dinitroklorobenzén
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DT	Diphtheria toxin (Diftéria toxin)
DTR	Diphtheria toxin receptor (Diftéria toxin receptor)
EGF	Epidermal growth factor (Epidermális növekedési faktor)
ER	Endoplasmic reticulum (Endoplazmatikus retikulum)
EV	Extracelluláris vezikula
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszcencia alapú sejtszétválogatás)
FBS	Fetal bovine serum (Magzati bórjúsérum)

Fc γ R	Fc γ -receptor
FITC	Fluoreszcein izotiocianát
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanin (a formil-peptidek prototípusa)
Foxo3	Forkhead box O3
FPR	Formyl peptide receptor (Formil peptid receptor)
FSC	Forward Scatter (Előre irányuló szórás)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (Granulocita kolónia-stimuláló faktor)
Gfi-1	Growth factor independence-1
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulocita-monocita kolónia-stimuláló faktor)
GMP	Granulocyte-monocyte progenitor (Granulocita-monocita progenitor)
G6PC3	Glucose-6-phosphatase catalytic Subunit 3
G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase (Glükóz-6-foszfát izomeráz)
GPI	Glikozil-foszfatidilinozitol
Gr-1	Granulocyte antigen-1 (Granulocita antigén-1)
Gy	Gray
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Hank-féle normalizált sóoldat)
hMRP8	Human myeloid related protein 8
HSC	Hematopoietic stem cell (Hemopoetikus őssejt)
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule 1 (Intracelluláris sejtadhéziós molekula 1)
iDTR egér	Cre-inducible DTR transgenic mice (Cre-indukált DTR transzgenikus egér)
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
JAM-A	Junctional adhesion molecule-A
KO	Géntörléses (knockout) mutáns
LAD	Leukocyte adhesion deficiency (Leukocita adhéziós deficiencia)
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 (Limfocita funkció-asszociált antigén 1)

LPS	Lipopoliszacharid
LTB ₄	Leukotrién B ₄
LTB ₄ R	Leukotrién B ₄ receptor
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
Lyz2	Lizozim C-2
Mac-1	Macrophage-1 antigen (Makrofág-1 antigén, CD11b/CD18, α M β 2)
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 protein (Mieloid-sejt leukémia-1 fehérje)
M-CSF	Monocyte/macrophage colony-stimulating factor (makrofág kolónia-simuláló faktor)
MHC	Major histocompatibility complex (Fő hisztokompatibilitási komplex)
ML-1	Human myeloblastic leukemia cell line 1
MRP8	Myeloid-related protein 8
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát)
NET	Neutrophil extracellular trap (Neutrofil extracelluláris csapda)
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
NK-sejt	Natural killer cell (Természetes ölősejt)
NLR	NOD-like receptor (NOD-szerű receptor)
NOD	Non-obese diabetic mouse (I. típusú cukorbeteg egér)
Nox2	NADPH oxidase 2
PAF	Platelet-activator factor (Vérlemezke-aktiváló faktor)
PAFR	Platelet-activator factor receptor (Vérlemezke-aktiváló faktor receptor)
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Kórokozó-asszociált molekuláris mintázat)
PBS	Phosphate buffered saline (Foszfáttal pufferolt sóoldat)
PCR	Polimerase chain reaction (Polimeráz láncreakció)
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (Vérlemezke-endotél sejtadhéziós molekula)
PMA	Phorbol 12-miristate 13-acetate (Forbol-mirisztil acetát)
PMN	Polymorphonuclear leukocyte (Polimorfonukleáris sejt, a neutrofil granulocita szinonímája)

PRR	Pattern-recognition receptor (Mintázat-felismerő receptor)
PSGL-1	P-szelektin glikoprotein ligand 1
RA	Rheumatoid arthritis (Reumatoid artritisz)
RLR	RIG-like receptor (RIG-szerű receptor)
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reactive oxygen species (Reaktív oxigén származékok)
Rpm	Rounds per minute (Percenkénti fordulatszám)
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
Siglec-F	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-F (Sziálsavkötő immunoglobulin-szerű lektin F)
SPF	Specific pathogen-free (Specifikus patogén-mentes)
SSC	Side scatter (Oldalra irányuló szórás)
Tc	Cytotoxic T-cell (Citotoxikus T-sejt)
TGF β	Transforming growth factor β (Transzformáló növekedési faktor β)
Th	T helper cell (Segítő T-sejt)
TLR	Toll-like receptor (Toll-szerű receptor)
TNCB	2,4,6-trinitroklorobenzén
TNF	Tumor necrosis factor (Tumor nekrozis faktor)
Treg	Regulatory T cell (Regulációs T-sejt)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (Vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1)
VLA4	Very late antigen-4
VT	Vad típus
YPD	Yeast extract/peptone/dextrose (Élesztő/pepton/dextróz tápoldat)

1. BEVEZETÉS

Egy hemopoetikus sejtvonal genetikai hiányát hordozó egértörzs nagyban hozzájárul az immunológiai és gyulladásos folyamatok megértéséhez egészséges és beteg szervezetben. Az egyik legjobb példa erre a rekombinációt aktiváló *Rag1* vagy *Rag2* gének törlése, ami a B- és T-sejtek hiányát eredményezi¹. Ezt a modellt széles körben alkalmazzák az adaptív immunválasz vizsgálatára *in vivo* biológiai folyamatokban. Egy ilyen genetikai modell hasznosságát meghatározza az adott sejtvonal hiányának mértéke és specificitása, valamint olyan általános jellemzők, mint a mutáns egértörzs megjelenése, túlélése és tenyésztési sajátosságai.

A doktori munkám döntő részét a neutrofil granulociták működésének és gyulladásos betegségekben betöltött szerepének vizsgálata képezte. Ennek részeként részletesen jellemeztem egy egértörzset, melyben genetikailag kódolt módon a neutrofil granulociták súlyos és specifikus hiánya jön létre, majd validáltam a modellt egy ismert neutrofil-függő betegségmodellben. Eredményeim könnyebb megértése érdekében először részletesen bemutatom a neutrofil granulocitákat, valamint azokat a modelleket, melyeket a neutrofil granulociták *in vivo* tanulmányozására alkalmaztak.

Munkám második részében a kontakt hiperszenzitivitás egérmodelljét, az allergiás kontakt dermatitist vizsgáltam. Kevés információ érhető el a szakirodalomban arról, hogy a neutrofil granulociták milyen szerepet töltenek be a betegség kialakulásában. Kutatómunkám során arra kerestem a választ, az általam jellemzett neutropéniás egértörzs alkalmazásával, hogy a neutrofil granulociták a kontakt hiperszenzitivitás modell melyik fázisában játszanak fontos szerepet. A könnyebb megértés érdekében, a bevezetésben röviden összefoglalom az allergiás kontakt dermatitisz és a kontakt hiperszenzitivitás jellemzőit is.

1.1. A neutrofil granulociták jellemzése

A neutrofil granulociták, másnéven polimorfonukleáris (PMN) sejtek vagy neutrofilek, az emberben keringő leukociták legnagyobb (50-70%), egerekben egy kisebb (kb. 20%)², de számottevő populációját alkotják. A neutrofil granulociták a veleszületett

immunrendszer sejtes elemei, jellegzetes szegmentált sejtmaggal rendelkeznek, citoplazmájukban neutrofil festődést mutató granulumokat tartalmaznak³.

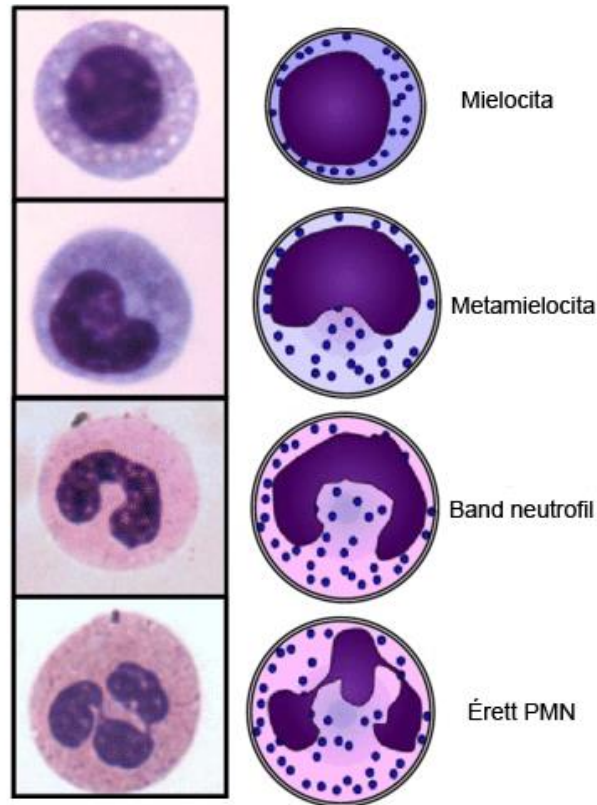
A neutrofil granulociták fontos szerepet töltenek be a gazdaszervezet kórokozókkal szembeni védelmében, de bizonyos esetekben hozzájárulnak a szöveti károsodásokhoz is, mint pl. autoimmun betegségek⁴⁻⁶, a kardiovaszkuláris rendszer betegségei (ateroszklerózis⁷, miokardiális infarktus⁸, stroke⁹, iszkémia/reperfúzió okozta károsodás¹⁰), anyagcsere betegségek¹¹, trombózis¹², allergia és anafilaxiás reakciók¹³, rákos megbetegedések¹⁴, neurodegeneratív betegségek^{15,16}. Emiatt kétélű kardként is emlegetik a neutrofil granulocitákat^{17,18}.

1.1.1. A neutrofil granulociták érése és homeosztázisa

A neutrofilek a csontvelői hemopoetikus őssejtből (HSC) fejlődnek ki. A közös mieloid progenitor (CMP), majd a granulocita-monocita progenitor (GMP) alak után a granulocitopoézis első azonosítható eleme a mieloblaszt. Ezt követi a nagyobb, kerek, kissé ovális alakú sejt, a promielocita, mely primer, ún. azurofil granulumokat tartalmaz és a csontvelői sejtek kb. 3%-át teszi ki. A promielociták osztódása után keletkeznek a mielociták, melyek kisebbek, citoplazmájuk színtelen és a csontvelői sejtek kb. 5%-át képezik. A neutrofil granulociták fejlődési rendszerében ez az utolsó osztódásra képes alak. A metamielocita vagy jugend forma 12-16 µm átmérőjű, a csontvelő egyik leggyakoribb sejtje (kb. 10-30%), vese vagy bab alakú mag jellemzi. Ez a forma már fiziológiás körülmények között is megjelenhet 0-2%-ban a perifériás vérben. A stab vagy band alak magja hosszú és vékony, kromatinja tömött, a perifériás vörsejtek kb. 0-4%-át alkotja. Ezekben az előalakokban már megtalálhatók a tercier vagy zselatináz granulumok is^{3,19}. Az érett neutrofil granulocita hasonlít a stab alakhoz, de a magja 2-4 helyen lefűződik, mely révén 3-5 szegmens képződik. A neutrofil granulociták csontvelői fejlődését és a különböző alakok morfológiai jellegzetességeit az 1. és a 2. ábra foglalja össze.

Egy újabb kutatás szerint a GMP sejtekből egy nagy mértékben proliferálódó, neutrofil granulocita irányba elköteleződő preneutrofilek alakulnak ki, melyekből a nem proliferálódó, éretlen neutrofilek, majd végezetül az érett alakok fejlődnek ki. A preneutrofilek nagy mértékű expanziót mutattak gyulladás (pl. szepszis) esetén a lépben és a csontvelőben. Az éretlen és érett neutrofil granulociták nagy migrációs készséggel

rendelkeznek és főként az effektor funkciókat látják el^{20,21}. A granulocitopoézis utolsó szakaszában, az érett neutrofil granulociták kialakulásához elengedhetetlenek a C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α), C/EBP ϵ , a Gfi-1 és a PU.1 transzkripciós faktorok²¹⁻²⁴.



1. ábra: A neutrofil granulocita előalakok morfológiai jellegzetességei.

Forrás: Pillay és munkatársai alapján (25).

A neutrofil granulociták életeideje a többi leukocitához képest meglehetősen rövid (lásd. 1.1.3. alfejezetben), ebből adódóan a neutrofil populáció folyamatosan újul, naponta normál állapotban $1-2 \times 10^{11}$ új sejt termelődik egy felnőtt emberben³.

A neutrofil granulociták képződését nagymértékben meghatározza a PMN sejtek szövetekben történő apoptózisa (programozott sejthalál). Az apoptotizáló sejteket a makrofágok és dendritikus sejtek fagocitálják, ezzel egy időben csökken a fagociták IL-23 termelése²⁶⁻²⁸. Az IL-23 szabályozza a $\gamma\delta$ T-sejtek és NK-szerű T-sejtek által termelt IL-17A kibocsájtást, mely egy fontos stimulus a granulocita-kolónia stimulató faktor (G-CSF) felszabadulásához^{3,21,26,29}. A G-CSF nélkülözhetetlen a fertőzések során fellépő

megnövekedett PMN-igény kielégítéséhez³⁰, hiányában a neutrofil granulociták száma normálértékben csökken a perifériás vérben és a szövetekben (ld. 1.2.2.3. fejezetben).

A periférián keringő neutrofil granulociták számát a csontvelőből történő felszabadulás is nagyban meghatározza (ld. 2. ábra) A PMN sejtek felszínén expresszálandó CXCR4 kemokin receptor kötődik a csontvelői stromasejteken levő CXCL12 (SDF-1) liganddal, ez a kapcsolat tartja a neutrofil granulocitákat a csontvelőben. Ez a csontvelői PMN készlet gyorsan mobilizálható egy fertőzés vagy stresszhelyzet esetén. A CXCR4 receptornak emellett elengedhetetlen szerepe van a csontvelőbe történő vándorlásban is³¹. A CXCR4 fehérjét kódoló gén törlésének következtében megnövekszik az érett neutrofil granulociták csontvelőből a perifériára történő felszabadulása³².

A CXCR2 citokin receptor a mieloid sejtek felszínén expresszálandó, ligandjai a CXCL1 és CXCL2 a csontvelői endotél sejteken fejeződnek ki³³. CXCR2 hiányában az érett neutrofil granulociták képtelenek a perifériára vándorolni és a csontvelőben maradnak, így neutropénia alakul ki (lásd. 1.2.2.7. alfejezetben). A csontvelői endotél sejtek CXCL12 expresszióját csökkenti, a CXCL1 és CXCL2 expresszióját viszont növeli a G-CSF, ez pedig az érett neutrofil granulociták felszabadulásához vezet^{33,34}.

1.1.2. A neutrofil granulociták effektor működései

A neutrofil granulociták legfontosabb szerepe a patogénekkal (baktériumokkal, gombákkal) szembeni védelem. Emellett szerepet játszanak az általános immun- és gyulladásos reakciók koordinálásában is a kemokinek, citokinek és lipidmediátorok kibocsátása révén^{35,36}. Képesek felismerni a patogéneket, illetve a gyulladásos környezetet, a keringésből kilépve pedig a gyulladás helyszínére vándorolnak, majd itt egyedülálló effektor funkcióik segítségével eliminálják a kórokozókat. Ebben a fejezetben ezt a gazdag tárházat ismertetem részletesebben, melyet a 2. ábrán sematikusán is szemléltetnek.

Az érett neutrofil granulociták az érpályában keringve érzékelik a fertőzésre, vagy gyulladásra utaló vészjeleket (pl. citokinek, a mikroorganizmus gazdaszervezetbe történő behatolását jelző molekulák, sejtkárosodás következtében felszabaduló anyagok) és az érfalon keresztül egy összetett folyamat révén a gyulladás helyszínére vándorolnak (extravazáció)^{37,38}. A keringő PMN-ek először lelassulnak, majd gördülni (rolling)

kezdenek az endotél felszínén. Ez a laza kapcsolat a neutrofil granulocitákon levő PSGL-1 és az érfalon levő P-szelektin molekulák összekapcsolódása révén jön létre. A gyulladás növeli az endotél sejtek E-szelektin expresszióját, mely a PMN-en levő szialil-Lewis-X (sLeX) tetraszachariddal kapcsolódva létrehozza a sejtek közötti szorosabb kapcsolatot (slow rolling). Az ún. kemokin szignalizáció révén (pl. IL-8 és CXCR1) a sejtek között még szorosabb kapcsolat jön létre³⁹, emellett pedig a PMN felszínén megjelennek az LFA-1 β_2 -integrinek, melyek ligandjaikkal (ICAM-1, VCAM-1) kapcsolódva leállítják a gördülést és a neutrofil granulociták letapadását eredményezik (firm adhesion)⁴⁰. Ebben a fázisban a PMN sejt, Mac-1 és ICAM-1 függő módon, képes felismerni az érfalon „kúszva” (crawling) azt a pontot, amelyik a legalkalmasabb az átlépésre, majd polarizálódik, és paracelluláris vagy transzcelluláris módon áthalad az endotélrétegen (diapedézis). A folyamatban a β_2 -integrinek, VLA-4, JAM-A, ICAM-1, PECAM-1 és CD99 molekulák vesznek részt^{21,41,42}. A β_2 -integrinek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a neutrofil granulociták működésében, melyre jó példa az adhézios molekula CD18 láncának hiányában kialakuló leukocita adhézios deficiencia 1 (LAD 1), amelyben a PMN sejtek érpálya-elhagyási képességének zavara áll fenn⁴³. Az ebben szenvedő emberekre jellemzőek a súlyos, visszatérő bakteriális gyulladások, illetve a sebgyógyulás folyamata is nagyon lassú.

Az áthaladást követően a neutrofil granulociták az intersticiális térben, a kemotaktikus grádiens követve találják meg a gyulladás helyszínét⁴⁰. A kemoattraktáns molekulákat (pl. CXC és CC kemokinek, lipidmediátor leukotrién B₄ (LTB₄), bakteriális fMLP, komplementrendszerhez tartozó C5a, vérlemezke aktiváló faktor (PAF)) a neutrofil granulociták G-fehérjéhez kapcsolt receptorokkal (pl. FPR, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2, C5aR, LTB₄R, PAFR) érzékelik⁴⁴⁻⁴⁷.

Az aktivált PMN sejtek pozitív visszacsatolás révén további neutrofil granulocitákat és egyéb immunsejteket is toboroznak és aktiválnak. Ez történhet proinflammatorikus molekulák (pl. CXC kemokinek, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 citokinek, LTB₄) felszabadításával, a komplement kaskád aktiválása révén, neutrofil extracelluláris csapda (NET) létrehozás, vagy vérlemezke aktiválás útján^{6,35,48}. Egy egyedülálló jelenség az ún. „swarming”, a neutrofil granulociták önszerveződő migrációja és felhalmozódása a gyulladás helyszínén, mely feltételezi a PMN-ek közti kommunikációt⁴⁹. A folyamat integrin-függő és LTB₄, valamint kemokinek által

mediált^{49,50}. A vándorló neutrofil granulociták az útvonaluk mentén CXCL12 kemokin „nyomot” hagyhatnak, mely segíti a további immunsejtek toborzását⁵¹.

A neutrofil granulociták képesek a „fordított migrációra” is, amikor az intersticiális térből visszatérnek az intravaszkuláris térbe^{52,53}. Ez szerepet játszhat a transzendenteliális migráció optimális helyének megtalálásában, a gyulladás csökkentésében, vagy akár kórokozó vírusok terjesztésében is⁵³.

A gyulladás helyszínén a neutrofil granulociták és a kórokozók közötti kapcsolat közvetlenül a mintázatfelismerő receptorokon vagy közvetett módon, Fc γ - és komplement-receptorokon (CR1 és CR3) keresztül történik meg. A mintázatfelismerő receptorok (PRR), pl. toll-like receptorok (TLR), NOD-like receptorok (NLR), RIG-like receptorok (RLR), C-típusú lektin receptorok, patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) (pl. egyes szénhidrátokat, peptidoglikánokat, lipoproteineket, dupla szálú RNS-t, flagellint) ismernek fel⁴⁷. Az Fc γ - és komplement-receptorokon keresztül a neutrofil granulociták a szervezet által termelt antitestekkel vagy komplement-fragmentumokkal opsonizált patogéneket ismerik fel. A kórokozó felismerését követően a neutrofil granulocitákban működésbe lépnek a patogént megsemmisítő funciók.

A neutrofil granulocitákban a fagocitózist a fagocitotikus receptorok (pl. Fc γ R) indukálják. A sejtekben a citoplazma egyes fehérjéi (pl. aktin) átrendeződnek és kialakul az ún. fagocitotikus serleg. A bekebelezendő részecskét a sejt állábakkal veszi körül, majd lefűződik és létrejön fagoszóma. A granulumok membránjával történő fúzió révén a granulumok tartalma a fagoszómába kerül és elindul a kórokozó megsemmisítése.

A neutrofil granulociták négy féle citoplazmatikus granulumot tartalmaznak, melyeknek eltérő az összetételük és ürítési (degranuláció) sorrendjük is meghatározott⁵⁴. A primer (azurofil) granulumok mieloperoxidázt, hidrolitikus és baktericid fehérjéket (pl. elasztáz, lizozim, defenzinek, katepszinek, mukopoliszacharidáz, azurocidin) tartalmaznak és a fagocitált mikroorganizmus fagoszómán belüli elpusztítására szolgálnak. A szekunder (specifikus) granulumok a fagoszómán kívül már az extracelluláris térbe is ürülnek, antimikrobiális hatású laktoferrint, lizozimet, B₁₂-t kötő fehérjét tartalmaznak, valamint proteolitikus zselatinázt, kollagenázt, melyek megkönnyítik a PMN mozgását a szövetközi térben. A terciér (zselatináz) granulumok lizozimet, zselatinázt és acetiltranszferázt tartalmaznak. A szekretoros vezikulák a

granulumok negyedik csoportja, plazmafehérjéket tartalmaznak (pl. albumin), ezek degranulációja történik meg elsőként⁵⁵.

A szekunder-, terciér granulumok és szekretoros vezikulák bizonyos receptorokat és adhéziós molekulákat is tartalmaznak, melyek a plazmamembránnal történő fúzió következtében kerülnek a sejt felszínére (pl. β_2 -integrinek, fMLP-receptor, TNF-receptor, Fc γ R, LPS-receptor)^{56,57}.

A neutrofil granulociták a Nox2 NADPH-oxidáz segítségével szabadgyökök képzésére is képesek, mely szintén egy hatékony fegyver a kórokozókkal szemben. Az aktív Nox2 enzimkomplex a következő alegységekből épül fel: gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} és Rac. A NADPH oxidációja során felszabadult elektront a molekuláris oxigénnek átadva oxigén-szabadgyök (O₂⁻) jön létre, mely spontán vagy szuperoxid diszmutáz által hidrogén peroxiddá (H₂O₂) alakul. Más molekulákkal kapcsolatba lépve egyéb reaktív oxigénszármazékok (ROS) keletkeznek, pl. hipoklorit-anion, hiroxilgyök, peroxil gyök, hipoklórossav, nitrogén-monoxid gyök, ózon⁵⁸. A PMN-sejtek oxigén fogyasztása nagymértékben fokozódik az oxigényökök termelése közben, melyet oxidatív robbanásnak (respiratory burst) nevez a szakirodalom. A fagoszóma terébe kerülő reaktív oxigénszármazékok úgy pusztítják el a mikroorganizmusokat, hogy ez egyáltalán nem, vagy csak igen kis mértékben károsítja a környező sejteket^{59,60}. A reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok nagy reakciókészséggel rendelkeznek, gyorsan kölcsönhatásba lépnek más molekulákkal (fehérjékkel, zsírokkal, nukleinsavakkal), ezáltal károsítják a fagocitált kórokozókat és kontrollálatlan, kóros esetben a szervezet saját sejtjeit is^{58,61}. A NADPH-oxidáz enzimkomplex működésképtelensége révén kialakul a krónikus granulomatózis (CGD), amelyet a visszatérő bakteriális és gombás fertőzések jellemeznek⁶².

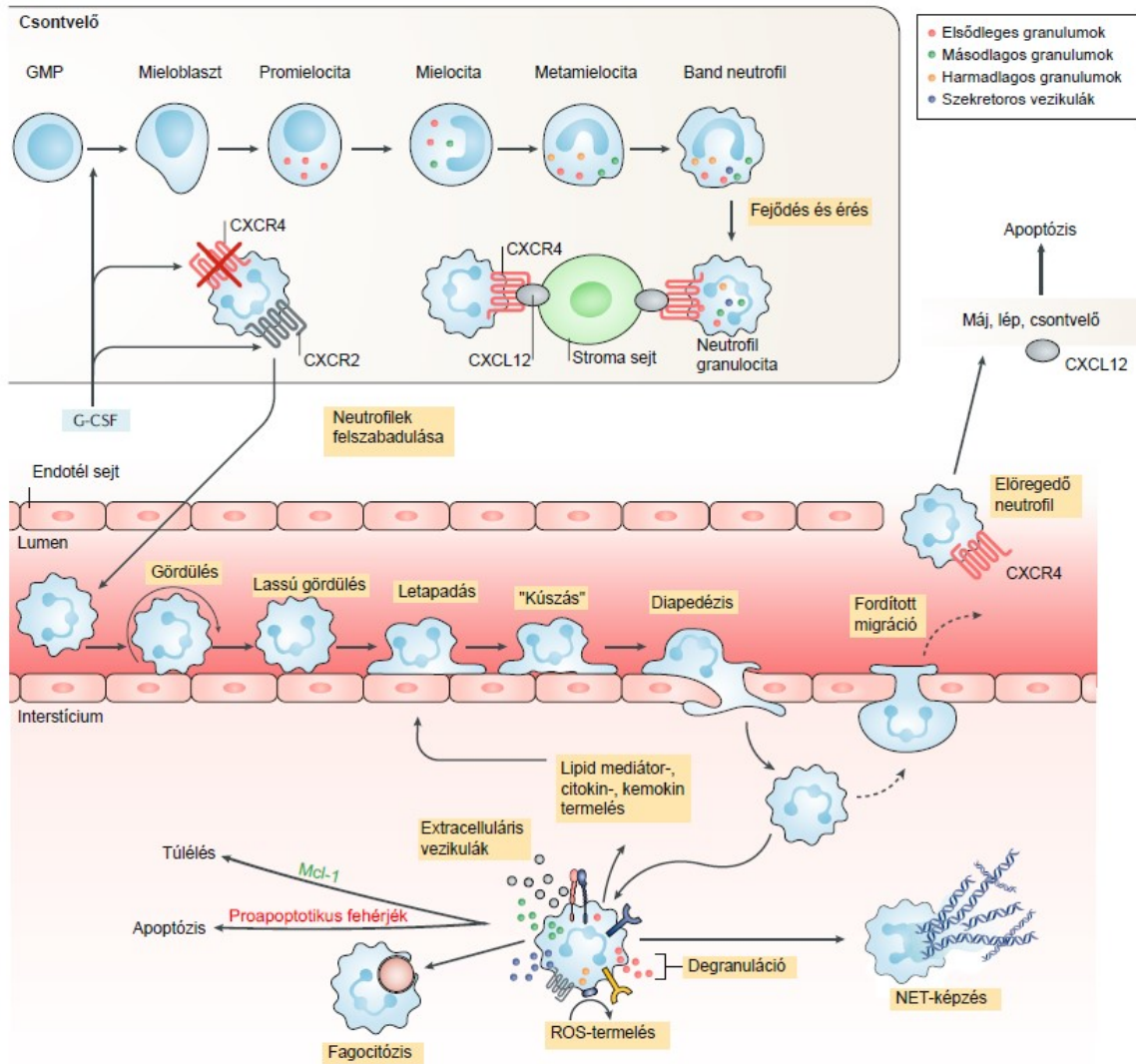
Gyulladásos környezetben a PMN sejtek létrehozhatják a neutrofil extracelluláris csapdát (neutrophil extracellular traps, NETs)⁶³, melynek következtében a sejt elpusztul, de képes csapdába ejteni a mikrobákat. A NETózis során a kondenzált kromatinállomány fellazul és a DNS kikerül az extracelluláris térbe, különböző antimikrobiális fehérjék és enzimek (pl. mieloperoxidáz, neutrofil elasztáz, katepszin G, proteinázok, defenzinek, proinflammatorikus fehérjék) kíséretében. Így a csapdába ejtett mikroorganizmusok elpusztítása hatékonyan megtörténhet a sejten kívül is⁶⁴. A NETózis, bár hatékony antimikrobiális védelmet biztosít a gazdaszervezet számára, bizonyos esetekben

hozzájárul a gyulladásos betegségek (pl. szisztémás lupus erythematosus, vaszkulitisz, reumatoid arthritisz, trombózis, diabétesz, szepszis) kialakulásához^{21,65,66}.

A NET-képzés mellett a neutrofil granulociták képesek extracelluláris vezikulák (EV) kiválasztására is, melyek antimikrobiális szerepet töltenek be⁶⁷, de a legújabb kutatások szerint hozzájárulnak a gyulladás és a rákos megbetegedések kialakulásához is^{68,69}. A PMN sejtek nyugvó és aktivált állapotban, valamint *in vitro* spontán apoptózis közben is termelnek EV-kat, melyek összetételükben, méretükben és elektron mikroszkópos megjelenésükben is nagymértékben különböznek. Az fMLP és PMA stimulusra a neutrofil granulociták 200-500 nm átmérjű extracelluláris vezikulákat választanak ki, melyek pl. szelektineket, integrineket, Fc γ RIII-t, komplementreceptort és foszfatidil-szerint hordoznak a felszínükön. Ezen extracelluláris vezikulák hatására a monocita/makrofág sejtek antiinflammatorikus citokineket választottak el^{70,71}.

Az aktivált neutrofil granulociták hatással vannak mind a veleszületett-, mind az adaptív immunválaszokra. A PMN sejtek közvetlen kapcsolatba kerülnek a dendritikus sejtekkel (DC) a DC-SIGN és Mac-1 molekulák kapcsolata révén, így a neutrofil granulociták képesek befolyásolni a DC-k érését és aktivációját egy mikrobiális fertőzés során⁷²⁻⁷⁴, illetve a DC-k által közvetített T-sejt proliferációt és a Th1 irányba történő polarizációt is szabályozzák⁷⁵. A neutrofil granulociták képesek a nyirokcsomókba vándorolva az antigén-prezentációra is, így fokozzák a Th1- és Th17-sejtválaszt⁷⁶, ezzel szemben egyes PMN sejtek a lépben negatívan szabályozzák a CD4⁺ T-sejtek és B-sejtek működését⁷⁷.

A gyulladás feloldása az apoptotizáló neutrofil granulociták makrofágok általi fagocitózisával indul meg. A felszabaduló lipid mediátorok korlátozzák az akut gyulladást és helyreállítják a szövet homeosztázisát⁷⁸.



2. ábra: A neutrofil granulociták homeosztázisának és működésének áttekintése.

A neutrofil granulociták fejlődése és érése a csontvelőben történik, melyeknek egyik fontos szabályozója a granulocita kolónia-stimuláló faktor (G-CSF), ami a neutrofilek keringésbe való felszabadulásához is hozzájárul. A neutrofilek citokinek hatására az érfalon keresztül a gyulladás területére vándorolnak, ahol fagocitálják a mikroorganizmusokat. A patogének elpusztítása a NADPH-oxidáz által termel ROS és a granulumokban lévő enzimek segítségével történik. Emellett képesek a kórokozók sejten kívüli elpusztítására is a NETózis és az extracelluláris vezikulák révén, valamint citokineket termelve további fehérvérsejteket aktiválni. A patogének eliminálása után a neutrofil granulociták túlélését vagy apoptózisát a pro- és antiapoptotikus fehérjék határozzák meg. Az előregedő neutrofilek a véráramból kilépve a májba, lépbe vagy csontvelőbe vándorolnak (homing), ahol apoptózis révén elpusztulnak. Forrás: Németh és mtsai. alapján ⁽²¹⁾ módosítva.

1.1.3. A neutrofil granulociták túlélése és apoptózisa

A legtöbb kutatás szerint, fiziológias körülmények között, az érett keringő neutrofil granulociták pár órától kevesebb, mint 1 napig maradnak életben⁷⁹⁻⁸¹. Az utóbbi időben azonban születtek olyan kutatási eredmények, melyek szerint akár több napig is életben maradnak a PMN-ek^{81,82}. Az előregedő (szeneszcens), keringésben levő neutrofil granulociták CXCR2 kifejeződése csökken, ellenben a CXCR4 expressziója fokozódik, mely elősegíti a PMN sejtek vándorlását a CXCL12-t nagymértékben kifejező szövetekbe (máj, lép, csontvelő)⁸³ (ld. 2. ábra). Ezt a folyamatot hazatalálásnak vagy homing-nak nevezzük. Ezt követően a neutrofil granulociták apoptózison mennek keresztül és a szövetekben levő makrofágok fagocitózis révén eliminálják őket⁸⁴. A PMN sejtek apoptózisa opszonizált patogének Mac-1-függő fagocitózisakor is bekövetkezik⁸⁵⁻⁸⁷.

A neutrofil granulociták életidejét több tényező is befolyásolja. A gyulladásos mediátorok, mint pl. az IL-8 és a GM-CSF, bakteriális alkotóelemek, mint pl. az LPS és a bakteriális DNS, valamint a C-reaktív protein (CRP) a PMN sejtek életidejét megnöveli, ezzel szemben a proapoptotikus stimulusok, mint pl. a TNF- α vagy a Fas ligand csökkentik a neutrofil granulociták élettartamát⁸⁶.

Az Mcl-1 (mieloid sejt leukémia 1) egy antiapoptotikus fehérje, mely a Bcl-2 család tagja, az ide tartozó fehérjéknek fontos szerepük van az immunsejtek apoptózisának szabályozásában^{88,89}. Először az ML-1 humán mieloid leukémia sejtvonalban azonosították, mint korai válasz gént, mely a leukémiás sejtek PMA-indukált differenciálódása során expresszáldott⁹⁰. Az Mcl-1 egy széles körben expresszáldó fehérje, mely sajátos szöveti eloszlást mutat. Több sejttypusról is kimutatták, hogy a fejlődésükhöz és a túlélésükhöz szükséges az Mcl-1⁹¹. A fehérje törlése korai (beágyazódás előtti) letalitással jár az egér-embriogenezis során.⁹² Emellett szükséges még a B- és T-sejtek fejlődéséhez⁹³, az idegi fejlődéshez⁹⁴, a hemopoetikus őssejtek⁹⁵, valamint a szinoviális fibroblasztok túléléséhez⁹⁶. Az Mcl-1 azáltal fejt ki antiapoptotikus hatását, hogy gátolja az apoptózist elősegítő Bim, Bak és Bid fehérjéket⁹⁷⁻⁹⁹. Kutatások kimutatták, hogy az Mcl-1 expressziója függ bizonyos növekedési faktoroktól, melyek fokozzák a fehérje transzkripcióját, mint pl. az IL-3¹⁰⁰, IL-5¹⁰¹, IL-6¹⁰² és a GM-CSF¹⁰³ citokinek, valamint az epidermális növekedési faktor (EGF)¹⁰⁴ és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)¹⁰⁵.

A PMN túlélését a Bad, Bid, Bim, Bak és Bax proapoptotikus, valamint az Mcl-1 és A1 antiapoptotikus fehérjék szabályozzák¹⁰⁶⁻¹¹¹ (ld. 2. ábra). Az A1 fehérje hiányában a neutrofil granulociták *in vitro* tenyészetekben elpusztultak, azonban *in vivo* megfelelően fejlődtek¹¹⁰. Az Mcl-1, egerekben történő, mieloid-specifikus törlése révén kiderült, hogy a fehérje elengedhetetlen a neutrofil granulociták túléléséhez, azonban a Mac-1⁺Gr-1⁻ monociták/makrofágok száma nem csökkent az egerek vizsgált szöveteiben (vér, lép, csontvelői, peritoneális lavage). A makrofágok esetében valószínűleg más antiapoptotikus molekulák játszanak kulcsfontosságú szerepet a sejtek túlélésében. A GM-CSF kezelés megmentette az Mcl-1 hiányos neutrofil granulocitákat az apoptózistól^{107,112}. Ezzel szemben a G-CSF kezelés nem bizonyult hatásosnak a neutropéniával szemben, mely annak tudható be, hogy Mcl-1 hiányában nem jönnek létre az érett neutrofil granulociták a csontvelőben. Amíg a csontvelői mieloid prekursor sejtek (metamielociták, band sejtek) túlélését elősegíti a GM-CSF, addig a szegmentált sejtmagvú, érett neutrofil granulociták kialakulásához elengedhetetlen az Mcl-1¹¹².

Az Mcl-1 hiánya a CMP és GMP sejtek esetében gyors sejtpusztulást okozott⁹⁵, ez pedig arra utal, hogy az Mcl-1 elengedhetetlen a mielopoézis korai szakaszában. A késői granulopoézis során az Mcl-1 szükséges az érett neutrofil granulociták differenciálódásához és a túlélés elősegítéséhez, azonban nélkülözhetőnek bizonyult a monociták/makrofágok differenciálódása szempontjából. Az Mcl-1 mieloid-specifikus törlésének következtében a granulocita prekursor sejtek Bax- és Bad-függő apoptózison mennek keresztül¹¹².

1.1.4. A neutrofil granulociták szerepe a reumatoid artritiszben

A reumatoid artritisz (RA) egy progresszív autoimmun gyulladással járó betegség, mely az emberi populáció kb. 1%-át érinti. Az RA során az ízületek krónikus gyulladása deformitáshoz és az ízületi funkciók elvesztéséhez vezethet, emellett jelentős fájdalommal jár, így komoly terhet jelent a betegeknek^{113,114}. A betegségre jellemző a szinoviális gyulladás és hiperplázia, valamint ennek következményeként a porc- és csontkárosodás, mely visszafordíthatatlan károkat okozhat az érintett végtag (főként kéz) funkcionális működésében¹¹⁵.

Az RA patogenezisében több sejtípus is szerepet játszik. Az immunizációs fázisban az antigénprezentáló sejtek, illetve a T- és B-sejtek játszanak szerepet, az

effektor fázisban azonban többféle sejttípus fontosságát is kimutatták: szinoviális fibroblasztok, oszteoblasztok, endotélsejtel, kondrociták, makrofágok, hízósejtek, vérlemezkék¹¹⁶⁻¹¹⁹. A felsoroltak mellett azonban a neutrofil granulociták is fontosnak bizonyulnak az RA kialakulásában, a betegek ízületeiben ugyanis nagy mennyiségben kimutathatók az aktivált fenotípust mutató PMN sejtek¹²⁰⁻¹²². Az RA patomechanizmusának vizsgálatára több állatmodellt is alkalmaznak. A kollagén indukált artritisz¹²³ modellben mind az immunizációs, mind az effektor fázis vizsgálható. A K/B×N szérumsztransfer artritisz¹²⁴ (ld. 3.5. fejezet), a kollagén-antitest indukált artritisz¹²⁵ és a humán TNF transzgen artritisz¹²⁶ az effektor fázis vizsgálatára alkalmas modellek.

A humán autoimmun artritisszel szemben az egérmodellekben könnyebben vizsgálható a neutrofil granulociták betegségben betöltött szerepe, mivel több olyan megközelítés is létezik, ahol neutropéniás állapot idézhető elő az egerekben (ld. 1.2. fejezet). A neutrofil granulociták éréséhez elengedhetetlen G-CSF hiányában nem alakult ki a kollagén-indukált artritisz¹²⁷. A PMN sejtek antitesttel történő depléciója gátolta a gyulladás kialakulását a K/B×N szérumsztransfer artritisz modellben¹²⁸. Ezeket az eredményeket megerősítették a neutrofil granulocita-hiányos Gfi-1^{-/-} és a Foxo3a^{-/-} egerekben végzett vizsgálatok is^{129,130}. Mindkét modellben védettek voltak az egerek a K/B×N szérumsztransfer artritisszel szemben.

1.2. A neutrofil granulociták szerepének *in vivo* tanulmányozására alkalmazott modellek

A neutrofil granulociták szerepének vizsgálatát megnehezíti a megfelelő depléciós antitestek, gyógyszerek és neutropéniás modellek hiánya. A különböző antitestekkel történő depléció hátrányai, hogy a neutrofilek hiánya csak kevés ideig áll fenn, ez pedig hosszabb távú kísérletek kivitelezését nehezíti, emellett pedig ezek az antitestek igen költségesek is. Bizonyos neutrofil deplécióra alkalmazott antitestek hatással vannak más leukocita populációkra is, mely szintén egy korlátozó tényező.

Korábban már számos olyan egértörzset leírtak, melyek csökkent neutrofil granulocita számot mutattak, azonban ezek mindegyikére jellemző valamilyen, az alkalmazhatóságot érintő korlát: csak részleges, vagy csak gyulladás során kialakuló PMN-hiányt eredményeznek, a neutrofilek mellett más sejtvonalat is érint a károsodás,

illetve a mutáns egerek általános egészségügyi problémákkal és korai letalitással rendelkeznek.

Az alábbiakban részletesen bemutatom a jelenleg elérhető lehetőségek előnyeit és hátrányait, melyek segítségével a neutrofil granulociták szerepe *in vivo* tanulmányozható.

1.2.1. Neutrofil granulociták indukált depléciója

A neutrofil granulociták indukált depléciója számos kutatásban alkalmazott módszer, mert lehetővé teszi a PMN-hiány létrehozását egy kísérlet bármelyik fázisában. Emellett egy másik előny, hogy a deplécióra alkalmazott farmakológiai gyógyszerek és antitestek bármelyik egértörzs esetében alkalmazhatók¹³¹.

1.2.1.1. Ciklofoszfamid

A ciklofoszfamid egy emberi gyógyászatban alkalmazott szer, különféle daganatos betegségek kezelésére használják¹³². A ciklofoszfamid egy gyógyszer-előanyag, az aktív formája a májban történő metabolizáció révén jön létre a citokróom P450 enzimrendszer segítségével. Alkilálószerként működik, a DNS guanin bázisához illeszt alkil csoportot, mely DNS keresztkötések kialakulásához vezet¹³³, ez pedig a sejtciklus leállítását és a sejtek halálát okozza.

Az egerek ciklofoszfamiddal történő kezelése során azt figyelték meg, hogy az állatok fogékonyabbá váltak a fertőző betegségekkel szemben¹³⁴, ami azzal magyarázható, hogy a szer intraperitoneális injekciója a hemopoetikus őssejtek halálát okozza, valamint meggátolja a fennmaradó leukociták szaporodását és differenciálódását¹³⁵. Mivel a neutrofil granulociták meglehetősen rövid életű sejtek, ezért a ciklofoszfamid alkalmazását követő 3-4 napon belül teljesen eltűnnek a vérből¹³⁶. A tartós neutrofil granulocita-hiány fenntartásához ismételt injekcióra van szükség¹³⁷.

A ciklofoszfamid alkalmazása olcsó, és bármely egértörzs esetén használható, viszont nem specifikus, mivel jelentős sejtszámcsökkenést okoz egyéb leukocita populációkban is, pl. monociták, B-sejtek és T-sejtek¹³⁶⁻¹³⁸.

1.2.1.2. Vinblasztin

A vinblasztin a rózsás meténg (*Catharanthus roseus*) alkaloidja, melyet citosztatikumként alkalmaznak a gyógyászatban¹³⁹. A mikrotubulusokhoz kötődve

gátolja a mitotikus orsó kialakulását¹⁴⁰, így a sejtciklus metafázisában leállítja a sejtosztódást¹⁴¹. Bár a vinblasztin jelentős neutropéniát okoz¹⁴², mégis ritkán alkalmazzák *in vivo* kísérletekben, mivel a neutrofil granulociták mellett hatással van a monociták és limfociták számára is¹⁴³, emellett citotoxikusnak bizonyult a hasnyálmirigy-sejtek¹⁴⁴ és a spermiumok esetén is¹⁴⁵.

1.2.1.3. Depléciós antitestek

A neutrofil granulociták depléciója specifikus antitestek alkalmazásával is elérhető. Ezek az antitestek használhatók vad típusú és a legtöbb genetikailag módosított egértörzs esetén is. A depléciós antitestek alkalmazásának hátrányai, hogy hosszabb távú kísérletek során repetitív injektálást igényel a neutropénia fenntartása, ez pedig lényegesen megnöveli a költségeket és a kísérletbe fektetett energiát.

Anti-Gr-1

Az RB6-8C5 monoklonális patkány antitest a strukturálisan rokon Ly6G és Ly6C GPI-horgonyzott fehérjékkel reagál, melyek a Gr-1 családba tartoznak¹⁴⁶. Korábban neutrofil granulocita-specifikus antitestként alkalmazták¹⁴⁶, mivel egy nagy mértékű neutropéniát eredményezett az injektálást követően^{147,148}, mely 3-5 napig tartott, annak függvényében, hogy mekkora dózist alkalmaztak¹⁴⁹. A későbbi kutatásokból azonban kiderült, hogy az RB6-8C5 antitest nem olyan specifikus a neutrofil granulocitákra nézve, mint azt korábban feltételezték. Hatására csökkennek a vérben és lépben lévő monociták, valamint a CD8⁺ memória T-sejtek^{149,150}. Emellett több olyan esetet is leírtak, amikor nem volt hatékony a neutrofil granulociták depléciója vagy egyéb mellékhatása volt a kezelésnek. Az FcγR KO egereken és az anti-FcγRII/III antitesttel kezelt állatokon nem eredményezett hatékony neutropéniát az RB6-8C5 alkalmazása¹⁴⁸. A TNF-α-val kezelt egerekben az RB6-8C5 injektálása a hajszálerek elzáródását és légzőrendszeri károsodást okozott, mely az állatok halálához vezetett^{148,151}.

Anti-Ly6G

Az Ly6G ellenes antitestek sokkal specifikusabbnak bizonyultak, mivel ez a sejtfelszíni molekula az egér neutrofil granulocitákon kívül más leukocitán nem jelenik meg¹⁴⁶.

Az 1A8 patkány IgG2a antitest specifikusan az Ly6G-t ismeri fel¹⁴⁶. Intraperitoneális alkalmazásával a vérben keringő és a lépben levő neutrofil granulociták szinte teljesen eltűntek¹⁵², míg a májban egy 80%-os csökkenés volt kimutatható¹⁴⁹. A monociták száma nem változott a kontroll csoporthoz képest^{149,152}. A kezelést követően 2 nappal már emelkedni kezd a neutrofil granulociták száma¹⁵², ezért hosszabb távú kísérletek esetén ismételt injektálásra van szükség. A megfelelő hatékonyság eléréséhez kétszer akkora dózisban szükséges adagolni, mint az RB6-8C5 antitestet^{152,153}. Az 1A8 antitest további limitációi, hogy a 24 hétnél idősebb C57BL/6J egerek esetében nem okozott neutrofil depléciót¹⁵³, valamint a BALB/C egerek esetében a csontvelői neutrofil granulociták nem tűntek el¹⁵⁴.

A NIMP-R14 monoklonális antitest szintén az Ly6G-t ismeri fel¹⁵⁵ és 95%-os hatékonysággal eltünteti a neutrofil granulocitákat a vérből és a lépből^{156,157}. Az eredeti PMN-szám viszonylag hamar (kb. 3 nap múlva) visszatér¹⁵⁷, ezért hosszabb távú kísérletek esetén fontos az injektálás ismétlése. Több kutatásban is leírták, hogy a NIMP-R14 hatására csökkent a vérben keringő monociták száma, illetve csökkent az Ly6C^{high} monociták száma a lépben^{156,158,159}, mely megkérdőjelezi az antitest specifikus hatását.

A depléció hatékonyságát általában áramlási citometriával ellenőrzik, ebben az esetben pedig érdemes figyelni az epitóp maszkírozás jelenségére. Anti-Gr-1 vagy anti-Ly6G antitestek alkalmazásakor előfordulhat, hogy a bizonyos neutrofil granulociták nem tűnnek el, csupán beborítják a felületüket az antitestek, így Ly6G negatívként eseményként jelennek meg¹³¹. Pl. NIMP-R14 alkalmazásakor az egerek csontvelőjében és tüdejében nem volt teljes a neutrofil granulociták depléciója, de az áramlási citometriás vizsgálatokban Ly6G-negatív eseményként jelentek meg a sejtek^{154,158}. Ez egy hibás eredményt adhat, ezért érdemes az Ly6G mellett más antitestek alkalmazását is bevezetni, pl. CD11b, Ly6C, 7/4. Az oldalirányú szórás (Side Scatter, SSc) révén, mely a sejtek granuláltsága alapján választja szét a leukocita populációkat, a neutrofil granulociták egy jól elkülöníthető csoportban jelennek meg (SSc^{high}). Amennyiben a neutrofil granulociták depléciója hatékony volt, az SSc^{high} sejtek nagy mértékben csökkennek a vizsgált mintában¹³¹, ezért érdemes ezt a paramétert is figyelembe venni.

1.2.2. Genetikailag módosított egértörzsek

A hosszútávú kísérletek kivitelezését nagyban megkönnyítik azok a lehetőségek, melyek a farmakológiai deplációs módszereknél hosszabb ideig tudják biztosítani a neutropéniát az egerekben¹³¹. Több neutropéniával jellemezhető egérmódellet is leírtak a neutrofil granulociták *in vivo* vizsgálatára, azonban ezek alkalmazhatóságát nagyban befolyásolják a limitáló tényezők, pl. nem elég hatékony és specifikus a PMN-hiány, az egerek fokozott érzékenységet mutatnak a patogénekkal szemben, megnövekszik az állatok mortalitása.

1.2.2.1. PMN^{DTR} egerek – egy indukálható neutropéniás modell

A *Corynebacterium diphtheriae* által termelt diftéria toxin (DT) alkalmazása révén lehetőség nyílik arra, hogy egy adott sejttípust szelektíven eltávolítsunk az egerekből, ezt „toxin-mediált sejt kiütésnek” is nevezik¹⁶⁰. Amennyiben a diftéria toxin receptort (DTR) egy specifikus egér sejttípusba juttatjuk, az adott sejttípust érzékennyé tehetjük a DT-ra¹⁶⁰. Egy DT injekciót követően gátlódik a protein szintézis és bekövetkezik a sejtek apoptózisa¹⁶¹.

A Cre-Lox rendszer (a sematikus ábrázolást ld. a 9. ábrán) alkalmazásával hozták létre azt a konstrukciót, mely révén sejtspecifikusan expresszálnak a DTR. A DTR-t kódoló génbe juttattak egy loxP szekvenciákkal kétoldról határolt STOP kazettát¹⁶², majd az egész konstrukciót a Gt(ROSA)26Sor lókuszba helyezték. A Rosa 26 konstitutívan aktív és az egerek minden sejtjében expresszálódik^{162,163}. Az iDTR egerekben, a Cre-rekombináz jelenlétében, a STOP kazetta törlődik (a Cre-rekombináz a loxP szekvenciák mentén hasítja a DNS-t) és a DTR expresszálódik¹⁶². A hMRP8-Cre a mieloid sejtekben, főként a neutrofil granulocitákban expresszálódik¹⁶⁴, 10-20%-ban egyes monocita/makrofág populációkban¹⁶⁵. Az iDTR és hMRP8-Cre egerek keresztezéséből hozták létre a PMN^{DTR} egértörzset, melyben egy DT injekcióval indukálható a neutrofil granulociták deplációja¹⁶⁶. Az injektálást követően egy napon belül szinte teljesen eltűnnek a neutrofil granulociták a vérből, csontvelőből és a lépéből^{138,166}. A DT injektálás nem érintette a vérben keringő és lépben levő eozinofil- és bazofil granulocitákat, B- és T-sejteket, illetve a peritoneális lavage-ban található makrofágokat, hízósejteket, dendritikus sejteket, B- és T-sejteket, valamint a csontvelőben található GMP sejteket¹⁶⁶. A vérben keringő Ly6C^{low} és Ly6C^{high} monociták

számában viszont csökkenést okozott, mely bizonyítja, hogy a hMRP8-Cre a monocitákban is aktív. Mivel a neutrofil granulociták már 2 nappal a DT kezelés után elkezdnek megjelenni a vérben, ezért hosszabb távú kísérletek esetén ismételt injektálásra van szükség. A módszer egy további hátránya lehet, hogy az ismételt DT injektálás hatására anti-DT antitestek keletkeznek az egerekben, ez pedig a deplécio hatékonyságának csökkenésével jár¹⁶⁷.

1.2.2.2. *G-CSF-receptor hiányos egerek*

Az első neutropéniás egérmodellt Liu és mtsai. hozták létre és jellemezték 1996-ban¹⁶⁸. A granulocita kolónia-stimuláló faktor receptor (G-CSFR) a G-CSF sejtfelszíni receptora, mely a neutrofil granulociták proliferációjában, illetve differenciálódásában játszik kulcsfontosságú szerepet¹⁶⁹. A G-CSFR-t kódoló *Csf3r* gén törlésével létrehozott KO egerekben a neutrofil granulociták száma 80%-os csökkenést mutatott a perifériás vérben, míg a csontvelői mintákban ez a csökkenés 50%-os volt¹⁶⁸. Valószínűleg a kevésbé hatékony neutrofil granulocita hiánynak tudható be, hogy ezt a modellt ritkán alkalmazzák¹³¹. A G-CSFR számos fontos szerepet lát el (pl. az endotél sejtek szabályozása¹⁷⁰, valamint migrációja és proliferációja¹⁷¹, az oszteoblasztok szabályozása, ezáltal pedig a csont regenerációja¹⁷², szimpatikus idegsejtek szignalizációja¹⁷³), így törlése több mellékhatással is jár a neutropéniás állapoton felül.

1.2.2.3. *G-CSF-hiányos egerek*

A G-CSF citokint elsősorban monociták, makrofágok, limfociták, valamint az immunreakciókban szerepet játszó endotél sejtek, kötőszöveti sejtek, fibroblasztok, asztrociták és csontvelői stroma sejtek termelik^{174,175}. A G-CSF meghatározza a neutrofil granulocita prekursorok és az érett alakok túlélését, proliferációját és differenciálódását, valamint a csontvelői mobilizációt és a migrációt^{80,168,176,177}.

A G-CSF-hiányos (G-CSF^{-/-}) egerekben csökkent a neutrofil granulociták száma a vad típushoz képest, viszont a perifériás vérben még fennmaradt 20-30% érett PMN¹⁷⁸. A csontvelőben 50%-kal csökkent a granulocita prekursorok száma, emellett csökkent a granulociták és a makrofágok száma is. A G-CSF^{-/-} egerek fogékonyabbak voltak a *Listeria monocytogenes* fertőzéssel szemben¹⁷⁸. A fenti limitációkat figyelembe véve, az

egértörzs használata esetén érdemes párhuzamosan más neutropéniához vezető lehetőségeket is alkalmazni.

1.2.2.4. *Gfi-1*-hiányos egerek

A *Gfi-1* (growth factor independent-1) által kódolt fehérje a cink-ujj domén kapcsolódása révén a DNS-hez kötődik, így képes bizonyos gének csendesítésére^{179,180}. Az első *Gfi-1*-hiányos egeret (*Gfi-1*^{-/-}) 2002-ben hozták létre a 2-es és 4-es exon teljes, valamint az 5-ös exon részleges törlésével²². A KO eger létrehozása előtt a *Gfi-1*-et főként a T-sejt differenciációval és aktivációval kapcsolatban vizsgálták^{179,181}, később azonban kiderült, hogy nem csak a limfociták, de a csontvelő sejtjei, valamint a granulociták és az LPS által aktivált makrofágok is expresszálják. 2003-ban egy másik *Gfi-1*^{-/-} egeret is létrehoztak az 1-es és 2-es exon teljes, valamint a 3-as exon egy részének törlésével¹⁸². Mindkét KO modell esetén azt tapasztalták, hogy megnőtt az egerek mortalitása, kisebb méretűek voltak, mint a VT társaik, valamint csökkent a sejtek száma a tímuszban^{22,182}. A *Gfi-1*^{-/-} egerekben gyakorlatilag hiányoztak az érett neutrofil granulociták úgy a perifériás vérben, mint a lépben és a csontvelőben. Emellett azonban megjelent egy „atipikus mieloid sejt” populáció, mely a granulociták és makrofágok tulajdonságait is hordozta, és képes volt a fagocitózisra, valamint ROS termelésre¹⁸². A *Gfi-1* törlése számos további rendellenességet okozott, pl. a dendritikus sejtek, B- és T-sejtek abnormális differenciációja^{182,183}; az IL-2, TNF, IL-10 és IL-1 β citokinek rendellenes termelése^{22,184}; szemgyulladás kialakulása²². A *Gfi-1* expresszálódik a belső fülben, a retinában és az agyban is^{185,186}, így hiányában súlyos viselkedésszerű zavarok figyelhetők meg az állatokban.

A *Gfi-1*^{-/-} egerekben fennálló konstitutív PMN-hiányt lehet kompenzálni egy rövid időre neutrofil granulociták vagy prekursorok adoptív transzferével. Ezt a megközelítést alkalmazták a neutrofil granulociták K/B \times N szérum transzfer arthritisben betöltött szerepének vizsgálatakor is¹²⁹. A *Gfi-1* KO egerekben nem jött létre az ízületi gyulladás, azonban egy szubletális besugárzást és VT csontvelői sejtek injektálását követően kialakult az állatokban az autoantitest-mediált arthritisz.

1.2.2.5. *Genista* modell

A *Genista* egérmodellben a Gfi-1 aktivitása csökken a cinkujj doménben létrehozott pontmutációnak köszönhetően^{187,188}. Ez a pontmutáció nem befolyásolja a Gfi-1 expresszióját, de hatással van a DNS és a Gfi-1 interakciójára. A *Genista* egerekben egy nagyfokú, de nem teljes neutropénia jön létre, mindez azonban nem jár együtt az egerek, vad típusú társaiktól elmaradó növekedésével, illetve fokozott mortalitással, még konvecionális körülmények között sem¹⁸⁷. A mutáns egerekben növekedett az Ly6C⁺ és az Ly6C⁻ monociták száma. Bár csökkent a tímuszban levő sejtek, valamint a B-sejt prekursorok száma, az egerek normális érett T- és B-sejtszámmal rendelkeztek¹⁸⁷. A *Genista* egerek NK-sejtjei csökkentett érzékenységet mutattak¹⁸⁸, melyre magyarázat lehet, hogy a neutrofil granulociták fontos szerepet töltenek be az NK-sejtek differenciációjában és aktivációjában¹⁸⁹. Emellett CD11b⁺/Ly6G^{intermediate} neutrofil granulocita előalakok jelentek meg a perifériás vérben, mely magyarázat lehet arra, hogy a *Genista* egerekben létrejött a gyulladós reakció az autoantitest-indukált artritisz modellben¹⁸⁷, ami érett neutrofil granulociták hiányában nem alakul ki^{129,190}. Ezek az éretlen előalakok nem tudtak elegendő védelmet biztosítani az akut bakteriális fertőzésekkel szemben¹⁸⁷, így a *Genista* egereket sikeresen alkalmazták a neutrofil granulociták patogénekkal szembeni védekezésben betöltött szerepének vizsgálatára^{155,191}.

1.2.2.6. *Foxo3a*-hiányos egerek

A forkhead (FOXO) transzkripciós faktor alcsalád kulcsfontosságú szerepet tölt be az immunsejtek apoptózisának és proliferációjának szabályozásában¹⁹². A *Foxo3a*-hiányos (*Foxo3a*^{-/-}) egerek perifériás vérében normális a neutrofil granulociták száma, viszont megjelentek az aktivált Th-sejtek, melyek citokineket bocsátottak ki, ennek magyarázata lehet, hogy a *Foxo3a*, számos egyéb funkciója mellett, gátolja az NF- κ B útvonalat, így hiányában megnövekszik a gyulladást elősegítő gének átírása¹⁹³. Azt is megfigyelték, hogy a *Foxo3a*^{-/-} egerekben nem jöttek létre PMN-függő gyulladós reakciók, mint pl. az immunkomplex-mediált ízületi gyulladás és a tioglikolát-indukált hashártya-gyulladás¹³⁰. Megvizsgálva a gyulladós környezetet kiderült, hogy csökkent a neutrofil granulociták száma a kontrollhoz képest, melynek hátterében az áll, hogy a *Foxo3a* kötődik a Fas-ligand promoteréhez, így blokkolja a Fas-ligand kifejeződését és

növeli a sejtek túlélését. A Foxo3a hiányában azonban nő a Fas-ligand expresszió és bekövetkezik a sejtek apoptózisa¹³⁰.

A fenti megfigyelések alapján a Foxo3a^{-/-} egereket főként olyan kísérletek esetén érdemes alkalmazni, amik a neutrofil granulociták gyulladási folyamatokban való szerepét vizsgálják¹³¹.

1.2.2.7. *Cxcr2*-hiányos egerek

A neutrofil granulociták csontvelőből történő mobilizációját a CXCR2 és CXCR4 kemokin receptorok szabályozzák. A csontvelői stromasejtek által konstitutívan expresszált CXCL12 kemokin a PMN sejtfelszínén expresszáldó CXCR4 ligandja, melyek kapcsolódása révén a neutrofil granulociták a csontvelőben maradnak. Ezzel szemben a CXCR2 stimulálására megkezdődik a PMN mobilizáció a perifériás vérbe³³. A CXCR2-hiány (CXCR2^{-/-})¹⁹⁴ esetén az egerekben egy enyhe neutropéniás állapot jön létre, kb. 60%-os csökkenést mutat a neutrofil granulociták száma a perifériás vérben a vad típushoz képest, emellett azonban a lépben nem csökkent, a csontvelőben pedig duplájára nőtt a PMN sejtek száma³³. Mivel a CXCR2 a neutrofil granulocitákon kívül más leukocitákon is expresszáldik (pl. monocita/makrofág, hízósejt, endotélsejt, epitélsejt)¹⁹⁵⁻¹⁹⁷, ezért a CXCR2-hiánya a neutropénián túl egyéb hatásokkal is járhat, melyet érdemes figyelembe venni a modell alkalmazásakor.

1.2.3. Humán veleszületett neutropéniás állapotok

A humán neutrofil granulocitákhoz köthető rendellenességek a primer immunhiányos állapotok kb. 20%-át teszik ki. Ezeket a rendellenességeket vagy a nagyon alacsony neutrofil granulocita szám (súlyos, veleszületett neutropénia), vagy pedig a PMN sejtek funkciójában bekövetkezett károsodás okozza²¹. Ebben a fejezetben röviden bemutatom a veleszületett neutropéniás állapotok okait. A neutrofil granulociták hiányában kialakuló, visszatérő fertőzések gyakran okoznak szövődményeket, pl. fekélyt, kiütéseket, hosszan tartó, nehezen gyógyuló sebeket. A neutropéniában szenvedő embereknek gyakran van magas láza, melyet antibiotikumok alkalmazásával szoktak kezelni. Bizonyos neutropéniás állapotok terápiájaként G-CSF kezelést is alkalmaznak²⁴.

A súlyos, veleszületett neutropéniás állapotok okai lehetnek a neutrofil granulociták kialakulásában bekövetkezett károsodások vagy a PMN sejtek csökkent

élettartama a csontvelőben. Az egyik legelterjedtebb ok a neutrofil elasztáz kódoló *ELANE* génjét érintő pontmutációk, melyek az endoplazmatikus retikulum (ER) zavarát és korai sejthalált okoznak a promielocita stádiumban¹⁹⁸. Egyéb, az ER-ben lokalizált fehérjék (G6PC3 és JAGN1) esetén bekövetkezett mutációk is serkentik a neutrofil granulociták apoptózisát, mely bizonyítja, hogy a PMN sejtek különösen érzékenyek az ER-ban bekövetkezett stresszre^{24,199}. A GFI1 transzkripciós represszor befolyásolja a komplex epigenetikus szabályozást a mieloid sejtek differenciációja szempontjából, így az ebben a molekulában létrejövő mutációk is okozhatnak neutropéniát^{200,201}. A Kostmann betegség esetén kialakuló neutropénia hátterében a *HAX1* génben bekövetkezett funkcióvesztéses mutáció okozta G-CSF szignalizációs károsodás áll²⁴.

A CXCR4-et érintő mutációk következtében kialakuló WHIM (warts, hypogammablobulinemia, infections, myelokathexis) szindróma esetében megnövekszik a CXCR4 szignál, így felhalmozódnak a csontvelőben az érett neutrofil granulociták, a periférián viszont neutropénia alakul ki²⁰².

1.3. Allergiás kontakt dermatitisz

A neutrofil granulociták allergiás kontakt dermatitiszben betöltött szerepéről nagyon kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Bár néhány szakirodalmi adat arra utal, hogy szerepet játszanak a CHS létrejöttében, nem általánosan elfogadott tény, hogy a betegség egy neutrofil-függő folyamat, ezért célkítűzéseim között ennek részletesebb megvizsgálása is szerepel. Az alábbiakban részletesen ismertetem az allergiás kontakt dermatitist és annak egérmódeljét, a kontakt hiperszenzitivitást.

Az allergiás kontakt dermatitisz egy, a felnőtt lakosság kb. 20%-át érintő²⁰³, gyulladásos bőrbetegség, melyet a kontakt allergénnel való ismételt érintkezés vált ki, és intenzíven viszkető, duzzadt, bőrpírral, gyakran hólyagképződéssel járó tüneteket okozhat. Nőknél kétszer gyakrabban fordul elő, mint a férfiaknál²⁰⁴, és gyakran fiatal korban kezdődik, 15%-os előfordulást mutatva a 12-16 éves korosztályban²⁰⁵. Az allergiás kontakt dermatitisz egy késői típusú hiperszenzitivitási (Delayed Type Hypersensitivity – DTH) reakció, melynek kialakulása több, mint 12 óráig tart és más túlérzékenységi reakciókkal szemben, ezt a folyamatot nem ellenanyagok közvetítik, hanem T-sejtek. A kiváltó okok lehetnek: használati tárgyak fémjei (pl. króm, nikkel),

festékanyagok (pl. henna, hajfestékek, textil festékek; ld. 3. ábra), illatanyagok, szerves anyagok (pl. terpentín, formaldehid), tartósítószer²⁰³.



3. ábra: Textil festékekkel kezelt nyaklánc okozta allergiás kontakt dermatitisz.

Forrás: Nygaard és munkatársai nyomán (206).

Az allergiás kontakt dermatitisznek két fázisát különböztethetjük meg: a szenzitizációt és az elicitációt (effektor fázist).

1.3.1. Szenzitizációs fázis

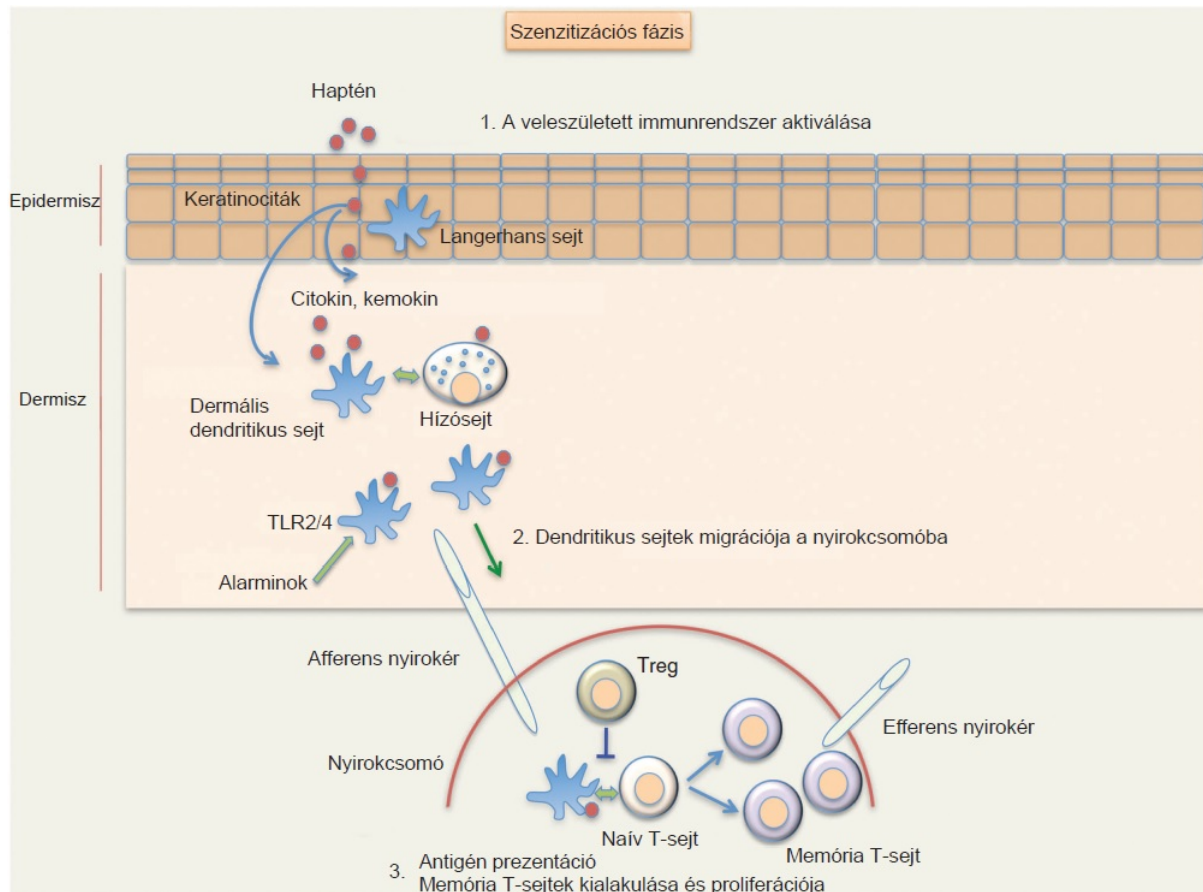
A szenzitizáció során a hapténnek nevezett kis molekulású anyagok bejutnak a bőrön át az epidermiszbe, majd az ott jelenlévő fehérjemolekulákhoz (pl. albumin) kötődnek. A keratinociták fontos szerepet játszanak a haptén-hordozófehérje komplex kialakításában²⁰⁷, mely elengedhetetlen az immunválasz kiváltásához, a T-sejtek aktiválásához²⁰⁸. A keratinociták emellett alarminnak nevezett veszélymolekulákat (pl. DNS, RNS, húgysav, ATP, ROS, hősokk fehérjék stb.) és citokineket is kibocsátanak, mellyel hozzájárulnak a gyulladásos mikrokörnyezet kialakításához a bőrben, így segítve a veleszületett immunrendszer aktiválódását. Az alarminok TLR2 és TLR4 receptorokon, P2X₇ ATP-receptoron, valamint az NLRP3 inflammaszómán keresztül aktiválják a bőrben lévő dendritikus sejteket (Langerhans sejtek és dermális dendritikus sejtek)^{209,210}, amelyek IL-6, IL-12, TNF- α , IL-1 β és IL-18 citokinek termelésével válaszolnak^{209,211,212}.

A szekretált IL-1 β és IL-18 a keratinocitákat IL-1 α , TNF- α és GM-CSF termelésre készíteti, amelyek elősegítik a Langerhans sejtek migrációját az epidermiszbe²¹³, ahol a haptén-hordozó komplexet bekebelezik és a közeli nyirokcsomókba szállítják, majd MHC molekulán keresztül prezentálják a naiv T-sejteknek^{212,214}.

Az aktiválás következtében a T-sejtek IL-2 növekedési faktort termelnek, amely egy T-sejt expanziót eredményez^{212,214,215}. Az immunológiai mikrokörnyezet (a szenzitizáló allergén mennyisége, veszélymolekulák és a citokinek) határozza meg a T-sejtek végső arányát és fenotípusát, hogy effektor/regulációs/memória sejté differenciálódnak²¹¹. A nyirokcsomókban a dendritikus sejtek (DC) IL-12 és IFN- γ termelése határozza meg a T-sejt polarizációt CD4+ Th vagy CD8+ Tc irányba^{203,216}. Ha a mikrokörnyezetben is jelen van IL-2 és TGF- β , az a regulációs T-sejtek (Treg) differenciálódásának kedvez, melyek immunszuppresszív IL-10 citokint termelnek, ezzel korlátozva az allergiás kontakt dermatitisz mértékét és időtartamát, hozzájárulva a tolerancia kialakulásához.^{212,215,217,218}

A veleszületett immunsejtek közül nem csak a dendritikus sejtek, de a hízósejtek is elengedhetetlenek bizonyultak az allergiás reakció kiváltásában. A hízósejtek ICAM-1 vagy LFA-1 molekulán keresztül stimulálják a DC-eket. Az aktiválódott dendritikus sejtek pedig megnövekedett Ca²⁺ beáramlást váltanak ki a hízósejtekben, ami a két sejtípus kölcsönös, aktiváló interakciójára utal²¹⁹.

A szenzitizációs fázis főbb részleteit a 4. ábrán összegezve mutatom be.



4. ábra: Az allergiás kontakt dermatitisz szenzitizációs fázisának sematikus ábrázolása.

A haptén aktiválja a keratinocitákat és a hízósejteket, melyek különböző kémiai mediátorok termelése révén aktiválják a bőr dendritikus sejtjeit (1). Az aktivált dendritikus sejtek bekebelezik az antigént és a nyirokcsomóba vándorolnak (2), ahol prezentálják azt a naív T-sejteknek. A T-sejtek antigén-specifikus memória T-sejtekké differenciálódnak. A regulációs T-sejteknek (Treg) szuppresszív hatása csökkenti az effektor T-sejtek kialakulását (3). Forrás: Honda és munkatársai alapján ⁽²²⁰⁾ módosítva.

1.3.2. Elicitációs fázis

Amennyiben az egyén ismételt kapcsolatba kerül a kontakt allergénnel, a folyamat az elicitációs fázisba lép tovább. A kontakt allergén epidermiszbe jutása után a keratinociták és Langerhans sejtek gyors válaszként citokineket (IL-1 β , TNF- α , IL-18) bocsátanak ki^{212,214,215,221}, melyek aktiválják a dendritikus sejtet és az endotél sejtet. A haptén általi aktiváció megnöveli a vérerek permeabilitását a hízósejt által kibocsátott hisztamin révén²¹⁹, ez a folyamat megkönnyíti a leukociták bőrbe való

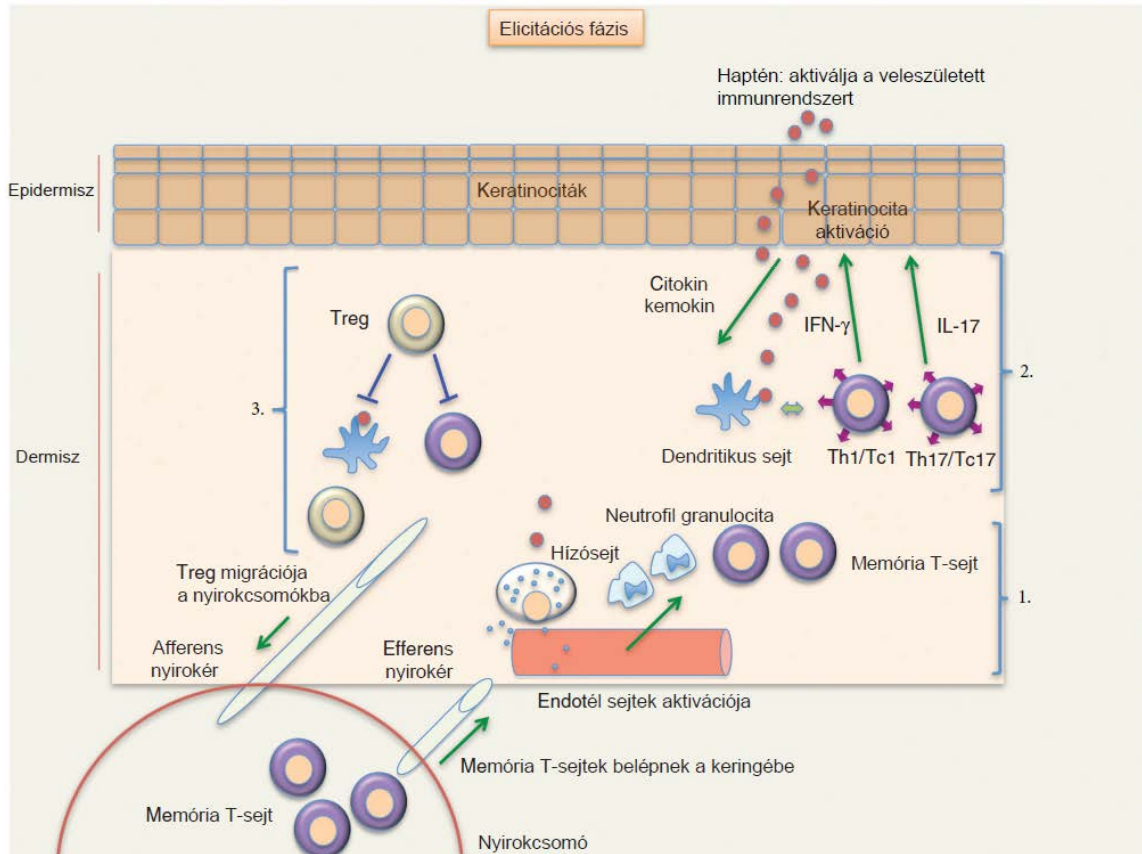
infiltrációját²²⁰. A keratinociták és a hízósejtek által termelt kemokinek (CXCL1 és CXCL2) a neutrofilek toborzásában játszanak fontos szerepet²²², melyek fontosak a későbbi T-sejt infiltráció létrejöttében²²³.

A keratinociták által termelt IL-18 hozzájárul a dendritikus sejtek éréséhez, aktiválódásához és migrációjához. Elsősorban a DC-k prezentálják a kontakt allergénre specifikus T-sejtek számára az antigént, de az elicitációs fázisban a keratinociták is antigénprezentáló sejt-ként viselkednek, így felgyorsítják a haptén-specifikus effektor T-sejtek aktiválódását²¹⁵.

A bőrben levő vérerek aktivált endotél sejtjei E-szelektint expresszálnak, majd a kontakt allergén-specifikus T-sejteken levő CLA-val való kapcsolódás révén a T-sejtek lelassulnak a véráramban, átlépnek az endotéliumon és kijutnak a bőrbe^{211,215}. A bőrbe jutott T-sejt alpopulációk különböző citokineket termelnek (a Th1/Tc1 sejtekre IFN- γ , a Th17/Tc17 sejtekre pedig IL-17 termelése jellemző)^{203,214,220}. Az IFN- γ és IL-17 által aktivált keratinocitákban nő a citokin-termelés és az adhéziós molekulák kifejeződése, mindezek pedig fokozzák további T-sejtek, valamint makrofágok, természetes ölősejtek (NK-sejtek), hízósejtek, neutrofil granulociták és eozinofilek helyszínre történő vonzását, elősegítve ezzel a gyulladás fokozását és az allergén anyagot hordozó sejtek megölését, valamint eltávolítását^{212,220}. A sejtek közötti kölcsönhatás következményeként létrejövő gyulladás az allergiás kontakt dermatitiszre jellemző duzzadt, vörös, viszkető bőrfelületet eredményezi.

A gyulladásos válasz megszűnésében nagy szerepe van a Treg sejteknek, amelyek a gyulladás helyén IL-10-et termelve gátolják az immunsejtek szövetekbe való kilépését azáltal, hogy a citokin hatására csökken a vérér endotél sejtjein az E/P-szelektin expressziója²²⁴.

Az elicitációs fázis fentebb említett részleteit az 5. ábra foglalja össze.



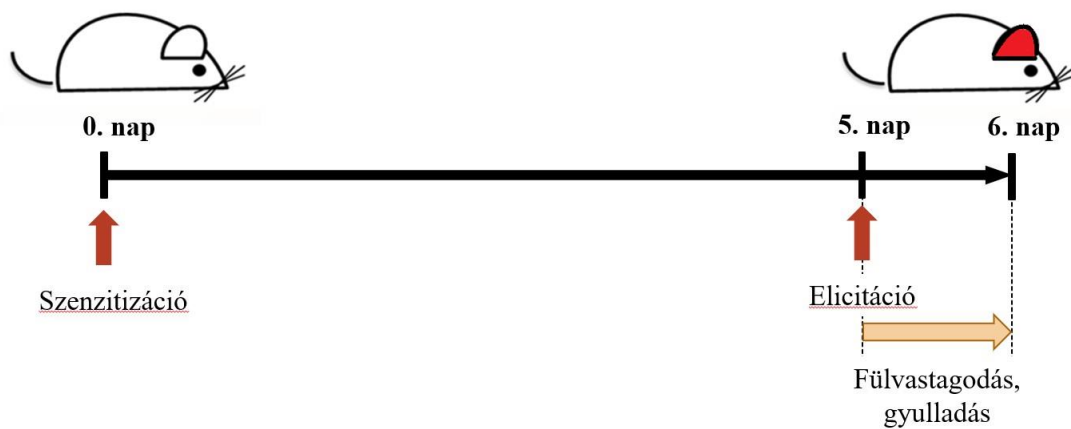
5. ábra: Az allergiás kontakt dermatitisz elicitációs fázisának sematikus ábrázolása.

A hapténnal való újra találkozást követően, a keratinociták és hízósejtek kémiai mediátorok termelésével aktiválják az endotél sejteket. Ez nagymértékű gyulladással jár, beleértve az antigén-specifikus T-sejteket is (1). Az effektor T-sejtek proinflammatorikus citokineket és kemokineket bocsátanak ki, melyek további immunsejteket vonzanak a gyulladás helyszínére, növelve ennek mértékét (2). A Treg sejtek a gyulladás helyén gátló funkciót látnak el, mely révén csökkentik az immunsejtek infiltrációját, így elősegítik a gyulladás megszűnését, majd a nyirokcsomókba vándorolnak (3). Forrás: Honda és munkatársai alapján ⁽²²⁰⁾ módosítva.

1.3.3. Kontakt hiperszenzitivitás

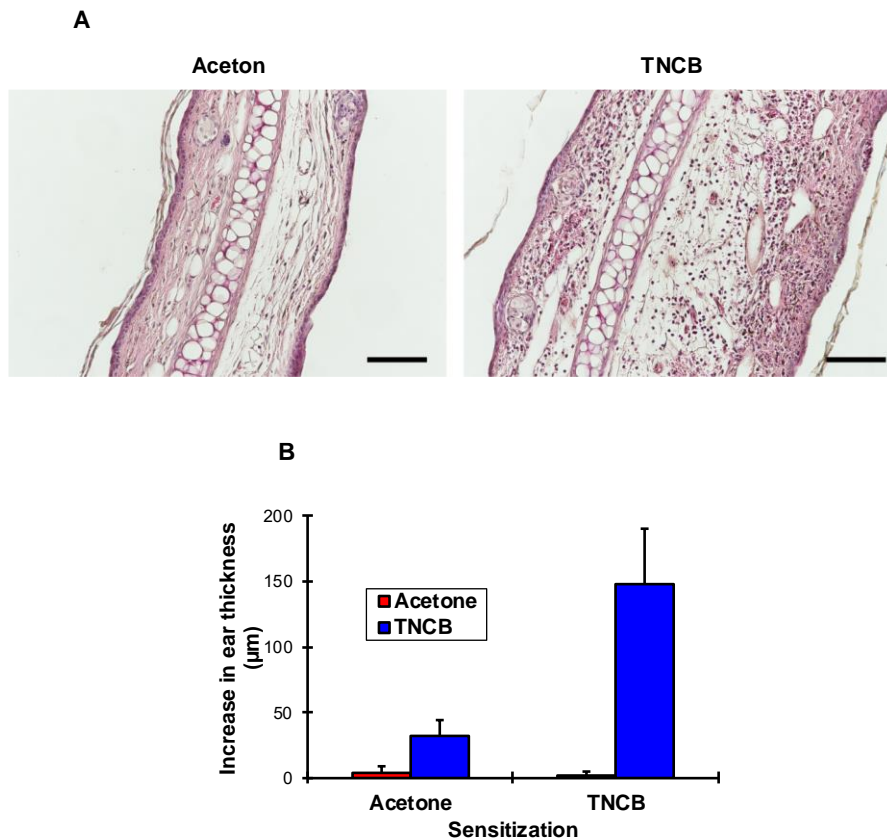
A kontakt hiperszenzitivitás (Contact Hypersensitivity, CHS) az allergiás kontakt dermatitisz kísérletes egérmodellje, melyben kontakt allergénként szerves oldószerben feloldott erősen lipofil molekulákat, pl. 2,4-dinitroklorobenzén (DNCB), 2,4,6-trinitroklorobenzén (TNCB), FITC²¹⁴, vagy egyéb allergizáló vegyületet, pl. oxazolont,

krotonolaj²²⁵ alkalmaznak az állat borotvált hasi felületén. Allergéntől függően, 5-7 nap múlva ugyanannak a vegyületnek az egér fülén vagy talpán történő alkalmazása váltja ki az elicitációs vagy effektor fázist. A fülön vagy a talpon fellépő duzzanat mértéke írja le a gyulladás intenzitását²¹⁴ (lásd. 6., 7. ábra). Bár a szenzitizáció körülményei mások a humán allergiás kontakt dermatitiszhez képest, a CHS mégis egy megbízható, stabilan alkalmazható és az egyik legrégebbi, immunológiában használt állatmodell, mely lehetővé teszi mind a két fázis tanulmányozását²²⁶.



6. ábra: A kontakt hiperszenzitivitás (CHS) modelljének sematikus ábrázolása.

A CHS nulladik napján az egereket az allergénnel, vagy a kontroll vivőanyaggal szenzitizálják a borotvált hasi felületen. A kísérlet ötödik napján az egerek kezdeti fülvastagság-mérése után, az elicitációs fázis kiváltása érdekében ismét alkalmazzák az allergént az állatokon, ezúttal a fülön. A hatodik napon mért fülvastagság-növekedés biztosít információt a gyulladás mértékéről. (Saját ábra)



7. ábra: A kontakt hiperszenzitivitás megjelenése.

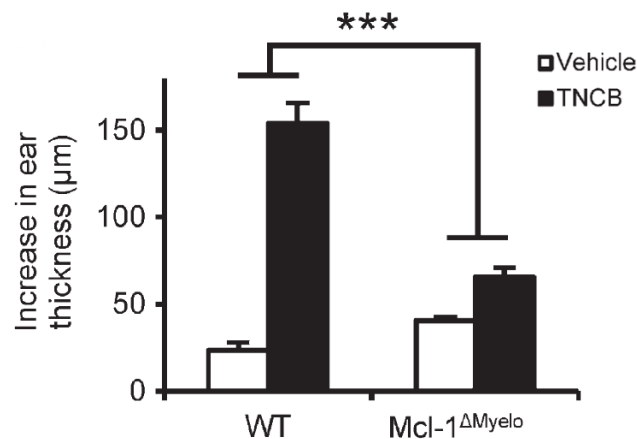
A kontakt hiperszenzitivitás (CHS) szövettani képe 20x-os nagyításban (A) és a fülvastagság változásai (B) vad típusú egerekben kontroll (acetone) és TNCB kezelést követően. Forrás: (A) Aradi Petra (Jakus-labor) és (B) Mócsai-labor korábbi eredményei.

1.3.4. A neutrofil granulociták szerepe a kontakt hiperszenzitivásban

A neutrofil granulociták megtalálhatók az allergiás kontakt dermatitiszben szenvedő betegek bőrének seibeiben²²⁷, így a kutatók elkezdték mélyebben megvizsgálni ezen sejttípus CHS-ben betöltött szerepét. Engeman és mtsai. anti-Gr-1 antitesttel depletálták a neutrofileket az elicitációs fázis előtt és egy csökkent CHS választ tapasztaltak. Amennyiben neutrofil granulocitákat injektáltak a fülbe, a gyulladás létrejött. Ebből arra következtettek, hogy a neutrofil granulocitáknak fontos szerepe lehet az elicitációs fázis létrejöttében²²³. Ahogy azt már korábban ismertettem, az anti-Gr-1 antitest a neutrofil granulociták mellett más sejttípusokra is hatással van, így pl. a monocitákra, makrofágokra, dendritikus sejtekre és aktivált T-sejtekre^{228,229}, mely

megkérdőjelezte a fenti eredményt. Munkatársam, Felix Weber más megközelítéssel vizsgálta a neutrofil granulociták szerepét, illetve közös kísérleteinkben arra is kerestük a választ, hogy szükségesek-e ezek a sejtek a CHS szenzitizációs fázisában²²⁵. A projekt bővebb kifejtésére részben ebben a fejezetben, részben pedig az eredmények fejezetben kerül sor, ahol az általam végzett kísérleteket ismertetem majd.

A neutrofil granulociták CHS-ben betöltött szerepének vizsgálatához elsősorban a dolgozatomban jellemzett $Ly2^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$ mutánst használtuk, melyet a továbbiakban $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egéreként fogok említeni. Felix Weber munkatársam kimutatta, hogy az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekben szignifikánsan csökkent a TNCB-re adott CHS válasz, a neutrofil granulociták hiányában az állatok védettnek bizonyultak ebben a modellben (lásd. 8. ábra)²²⁵. Ezt követően egy neutrofil-depléciós megközelítést is alkalmazott, amelyben egy anti-Ly6G antitestet (NIMP-R14)¹⁵⁵ használt 24 órával a szenzitizáció előtt. A depléció következtében drasztikusan csökkent a vérben keringő és a lépben lévő neutrofil granulociták száma, és a TNCB hatására nem jött létre a CHS válasz ezekben az egerekben²²⁵. Így két megközelítéssel is igazolódott, hogy a neutrofil granulociták fontos szerepet töltenek be a CHS létrejöttében.



8. ábra: Az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ mutáció hatása a kontakt hiperszenzitivás létrejöttére.

Vad típusú (Wild Type, WT) és $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekben az ábrafeliratnak megfelelően acetonnal (vehicle – mely az allergén oldószere) vagy TNCB-vel történt meg a szenzitizáció. 5 nappal később TNCB alkalmazásával történt a gyulladós válasz kiváltása, melynek mértékét a fülvastagság 24 órát követő növekedésével határozták meg. Forrás: Weber és munkatársai nyomán (²²⁵).

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. A neutropéniás *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs részletes jellemzésén belül arra kerestük a választ, hogy hogyan befolyásolja az Mcl-1 mieloid-specifikus törlése:
 - a neutrofil granulociták számát normál és steril gyulladással körülmények között?
 - az egyéb leukocita populációk számát a perifériás vérben?
 - az egerek túlélését, megjelenését és szaporodását?
 - az egerek védettségét az autoantitest-indukált artritisszel szemben?
 - az állatok érzékenységét a bakteriális és gombás fertőzésekkel szemben?
2. Hogyan befolyásolja az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése:
 - a neutrofil-granulociták és az egyéb leukocita populációk számát a perifériás vérben?
 - az egerek túlélését és szaporodását?
3. Milyen változások jellemzőek a perifériás vér leukocita populációira és az autoantitest-indukált artritisz lefolyására a G-CSF-receptor-hiányos egerekben a vad típusúhoz képest?
4. A kontakt hiperszenzitivitás betegségmodell melyik fázisához elengedhetetlenek a neutrofil granulociták? Befolyásolja-e a *Lyz2*^{Cre/Cre} mutáció a gyulladással válasz létrejöttét?

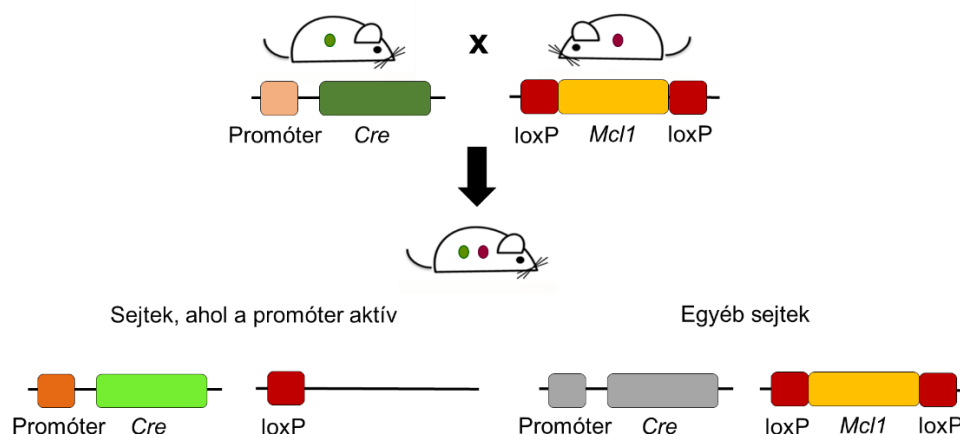
3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

3.1.1. A felhasznált genetikailag módosított egértörzsek

Az Mcl-1 fehérjét kódoló gén $Mcl1^{tm1Ywh}$ ($Mcl1^{flox}$) floxolt allélját hordozó egereket You-Wen He munkacsoportjától kaptuk (Duke University, Durham, NC)¹⁰⁷. Az $Mcl1^{flox}$ egereket kereszteztük a Cre rekombinázt a mieloid sejtekben expresszáló $Lyz2^{tm1(cre)lfo}$ ($Lyz2^{Cre}$, más néven LysM-Cre) knock-in egértörzssel, így létrehoztuk a $Lyz2^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$ mutánst, melyet a továbbiakban $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egérként említék.

A Cre rekombinázt által mediált kondicionális KO egerek létrehozásával lehetőség nyílik az Mcl-1 fehérje sejtvonala- vagy szövet-specifikus törlésére. A Cre-lox rendszer sematikus ábrázolását és részletes leírását a 9. ábra foglalja össze.



9. ábra: A Cre-lox rendszer sematikus ábrázolása.

A tenyészpár egyik tagja hordozza azt a konstrukciót, melyben egy promóter mögé behelyezett Cre rekombinázt gén található. A másik egérben a törölni kívánt gént két oldalról loxP szekvenciákkal határolják. Az utódokban, amennyiben a promóter aktív, expresszálódik a Cre rekombinázt, mely képes a DNS-t a loxP szekvenciák mentén hasítani, így lehetőség adódik az adott gén (ez esetben az Mcl1 fehérjét kódoló gént) sejtvonala- vagy szövetspecifikus törlésére. Azokban a sejtekben, ahol a promóter nem aktív, a Cre rekombinázt nem hasítja a DNS-t, így a fehérje expresszálódik. (Saját ábra)

Az egértörzs fenntartásához $Mcll^{\Delta Myelo}$ és $Lyz2^{Cre/Cre}Mcll^{flox/+}$ tenyészpárokat szaporítottunk, így a homozigóta $Mcll^{\Delta Myelo}$ utódok mellett $Lyz2^{Cre/Cre}Mcll^{flox/+}$ alomtestvér kontroll állatokat is nyertünk. Más tenyésztési stratégiákat is alkalmaztunk, beleértve az $Mcll^{\Delta Myelo}$ homozigóta tenyésztést is, melyeket bővebben az eredmények részénél ismertetek.

Egy neutrofil-specifikusabb deléció érdekében kereszteztük az $Mcll^{flox/flox}$ egereket az MRP8-Cre transzgenikus állatokkal²³⁰ és létrehoztuk az $MRP8-CreMcll^{flox/flox}$ egértörzset, melyet a továbbiakban $Mcll^{\Delta PMN}$ egérként említék.

A G-CSF receptor-hiányos¹⁶⁸ ($Csf3r^{tm1Link}$, a továbbiakban $Csf3r^{-/-}$) egereket a Jackson Laboratory-tól vásároltuk. Az FVB/N genetikai háttérű G-CSF receptor-hiányos²³¹ egereket Ivo P. Touw (Rotterdami Erasmus Egyetem, Hollandia) biztosította számunkra.

A K/BxN szérum transzfer arthritisz háttérkolóniájának számító transzgenikus T-sejt receptort hordozó KRN törzs ($Tg(TcraR28,TcrbR28)KRNDim$)¹²⁴ Diane Mathis és Christopher Benoist laborjából (Harvard Egyetem, Boston, USA) származott. A NOD, illetve a CD45.1 allélt C57BL/6 genetikai háttéren hordozó ún. BoyJ (B6.SJL-*Ptprca*) törzset a Jackson Laboratory-tól vásároltuk.

A különböző genotípusú egerek azonosítása genomiális DNS-ből történt, allélspecifikus PCR technikával. Minden felhasznált génmódosított egértörzs, kivéve a fentebb említett FVB/N genetikai háttérű G-CSF receptor-hiányos egereket, C57BL/6 háttérű volt. A kontrollként használt C57BL/6 állatokat a saját állatházunkban, specifikus patogén-mentes (SPF) körülmények között tenyésztettük. Kísérleteinkhez 2-6 hónap közötti hím és nőstény egereket használtunk.

Az egereket SPF vagy konvencionális állatházban, egyedileg szellőztetett ketrecekben (Tecniplast) tartottuk. A konvencionális állatházban többször kimutatták a következő fertőzéseket: rágcsáló hepatitis vírus (MHV), *Theiler* egér encephalomyelitis vírus (TMEV), egér norovírus (MNV), *Helicobacter*, *Entamoeba*, *Hexamastix*, *Syphacia obvelata* és *Myocoptes musculus* atka fajok. A Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottsága (EÁB) illetve a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága valamennyi állatkísérletünket engedélyezte.

3.1.2. Csontvelői kimérák

Egyes *in vivo* kísérleteinkben, az egerek korlátozott elérhetősége miatt, csontvelői kimérákat is alkalmaztunk. A donor állatokból cervikális diszlokációt követően eltávolítottuk a sípcsontokat és a combcsontokat, majd ezeket HBSS oldattal átmostuk. Centrifugálást (5 perc, 5000 rpm, 4°C) követően az üledéket α -MEM oldatban vettük fel. Az előzetesen letálisan (11,5 Gy) besugárzott, CD45.1 allélt hordozó recipiensekbe (B6.SJL-Ptprc^a), izofluránnal történő anesztéziát követően, intravénás úton jutattuk be a CD45.2-t expresszáló csontvelői donorsejteket. A besugárzáshoz ¹³⁷Cs izotóppal működő Gamma-Service Medical (Lipcse, Németország) D1 irradiátort használtunk. A transzplantáció után 4 héttel a csontvelői kimérákból perifériás vért vettünk, hogy megállapítsuk a transzplantáció sikerességét. A mintákat Ly6G és CD45.2 jelölés után áramlási citométerrel vizsgáltuk. A csontvelői kimérákat a transzplantációt követő 4-10 héten belül használtuk fel.

3.2. A sejtek előkészítése és az áramlási citometriás vizsgálatok

3.2.1. Perifériás vér

A kísérleteink során vizsgált leukocita populációkat perifériás vérmintákból határoztuk meg, sejtfelszíni receptorok és molekulák, valamint méret és granuláltság alapján. A perifériás vért az egerek farkán végzett bemetszést követően, a farokvénából nyertük heparinizált pipetta hegyek segítségével. 10 μ l vér vettünk az állatoktól, majd PBS 5% FBS 1% heparin oldatban vettük fel a mintát. Egy mosást követően centrifugáltuk a mintákat (5 perc, 5000 rpm, 4°C), majd a sejteket egy órán keresztül 4°C-on, sötétben inkubáltuk a megfelelő fluorokrómmal konjugált antitestekkel. Ezt követően a sejteket egy, a vörösvértestek lízisét és a leukociták fixálását eredményező oldatban (1 \times FACS lízis oldat, BD Biosciences) vettük fel, 500 μ l-es végtérfogatban.

3.2.2. Tioglikolát-indukált peritonitisz modell

A kísérletes peritonitist 1 ml 3%-os tioglikolát (Liofilchem) intraperitoneális injektálásával hoztuk létre. Négy óra elteltével, a cervikális diszlokációt követően, megnyitottuk az egerek hasüregét és 5 ml jéghideg, 5% FBS-t tartalmazó PBS-sel átmostuk. A hasüregi mintákat lecentrifugáltuk (1500 rpm, 5 perc, 4°C), majd a sejteket

1 ml 5% FBS-t tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk és egy órán keresztül 4°C-on, sötétben inkubáltuk a megfelelő fluorokrómmal konjugált antitestekkel. Egy mosást és centrifugálást (5 perc, 5000 rpm, 4°C) követően a sejteket 500 µl 5% FBS-t tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk.

3.2.3. Áramlási citometriás mérés

A mintákat egy 488 nm-es hullámhosszúságú lézerfényt kibocsátó áramlási citométeren mértük le (BD Biosciences FACSCalibur), az adatokat az FCS Express 6 (De Novo Software) alkalmazásával elemeztük és ábráztuk.

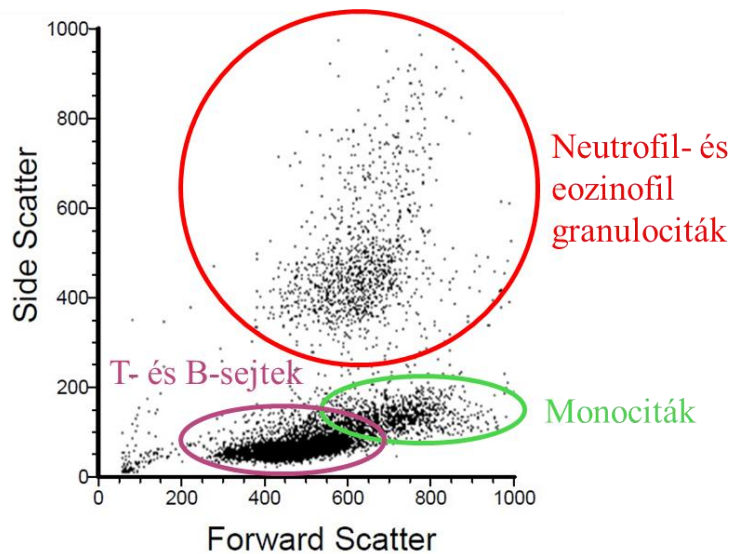
A különböző leukocita populációkat a rájuk jellemző, tipikus előre- (Forward Scatter, FSc) és oldalszórás (Side Scatter, SSc) alapján határoztuk meg (ld. 10. ábra), majd ezeken belül az alábbi specifikus sejtfelszíni markerek révén különítettük el:

- Neutrofil granulociták – CD11b⁺Ly6G⁺Siglec-F⁻
- monociták – CD11b⁺Ly6G⁻Siglec-F⁻
- eozinofil granulociták – Ly6G⁻Siglec-F⁺
- T-sejtek – CD3⁺
- B-sejtek – B220⁺

A perifériás vér monocita populációját további két alpopulációra választottuk az Ly6C jelölés alapján.

Az áramlási citometriás mérésekhez használt antitesteket a BD Biosciences-től vásároltuk: CD3 (17A2), CD11b (M1/70), CD45R/B220 (RA3-6B2), CD45.2 (104), Ly6C (AL-21), Ly6G (1A8), Siglec-F (E50-2440).

A mintaelőkészítés során végig meghatározott térfogatokkal dolgoztunk, a mérést 12 µl/perc sebességgel, egy percig végeztük, így a kapott adatok alapján abszolút koncentrációban tudtuk megadni a vizsgált sejtek számát.



10. ábra: Az áramlási citometriás méréseknél alkalmazott kapuzási stratégia.

Az áramlási citometriás mérés során a sejtek előre irányuló fényszórása (Forward Scatter, FSc) a méretükről és oldalszórása (Side Scatter, SSc) a granuláltságukról szolgáltat információt. Az általunk vizsgált fehérvérsejtek ezen paraméterek alapján jól elkülönülő populációkként jelennek meg. A neutrofil granulociták és az eozinofil granulociták (piros kör) közepes méretű sejtek és nagyfokú granuláltság jellemzi őket. A monociták (zöld kör) nagyobbak, míg a B- és T-sejtek (lila kör) kisebb méretűek és egyik sejtípus sem tartalmaz granulomokat, így alacsony az oldalirányú szórásuk. (Saját ábra)

3.3. Hematológiai paraméterek vizsgálata

Az egerekből izuflurános altatást mellett kb. 100 µl vért vettünk egy heparinózott üveg kapillárisal, majd a mintákat 4°C-on tároltuk a mérésig. A vérmintákat egy 3-part diff hematológiai automata analizátorral mértük le, mely egy kifejezetten állatmintákra kalibrált készülék volt. A mérés révén információkat kaptunk a fehérvérsejtek arányáról, a vörösvértestek számáról, valamint a hemoglobin koncentrációról és a hematokrit értékéről is.

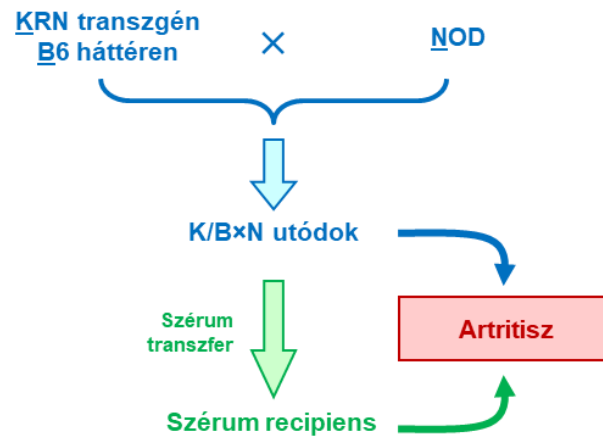
3.4. Túlélés-, termékenység- és tömegvizsgálatok

A túlélés- és termékenységi adatokat az állatházunk SPF terének online adatbázisából nyertük, melyben évekre visszamenőleg elérhető minden fontos adat az egyedi azonosítóval ellátott egerekről. Így lehetőségünk volt az állatházunk eddigi összes egerének adatait elemezni. A konvencionális állatházban történő túlélés vizsgálata egy kisebb csoporton történt, ez esetben egy kézzel írt nyilvántartást vezettünk.

Az egerek testtömegének mérésére az SPF térben került sor. Külön regisztráltuk a hím és nőstény egerek testtömegét 2 hetes koruktól kezdve, hetente egyszeri gyakorisággal.

3.5. K/B×N szérum transzfer artritisz

A C57BL/6 genetikai háttérű KRN transzgénikus T-sejt receptort hordozó egerek és a NOD egerek keresztezése révén létrehoztuk a transzgén-pozitív K/B×N és a kontrollként használt transzgén-negatív B×N utódokat^{124,232}. A transzgén pozitív egerekben egy olyan gyulladást figyeltünk meg, mely a humán autoimmun artritiszhez nagyon hasonló képet mutat. A gyulladás a KRN T-sejt receptor és az autoimmunitásra hajlamosító MHC II (Ag⁷) jelenlétében jön létre, háttérében a glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI) elleni autoantitest-termelés áll²³³. Ez az ízületi gyulladás pedig a beteg állatok szérumával átvihető egészséges egerekre is (ld. 11. ábra).



11. ábra: A K/B×N arthritisz-család sematikus ábrázolása.

Az ábra a genetikailag meghatározott K/B×N arthritis (kék) és az indukálható K/B×N szérum-transzfer arthritis (zöld) kialakulását mutatja. (Mócsai Attila rajza)

A transzgen jelenlétét allél-specifikus PCR-rel, valamint az ízületi gyulladásos fenotípus megjelenésével ellenőriztük. A 3 hónaposnál idősebb K/B×N és B×N egerekből retroorbitális véreztetéssel vért vettünk, melyet egy éjszakán át 4°C-on tartottunk. Másnap leszívtuk az alvadékról a szérumot, melyet további centrifugálással megtisztítottunk a sejtektől. Az így nyert artritogén és kontroll szérumot -20°C-on tároltuk a felhasználásig.

K/B×N szérum transzfer arthritiszt 300 µl K/B×N (artritogén) vagy B×N (kontroll) szérum intraperitonális injektálásával indukáltuk az egerekben. Ezt követően 2 héten keresztül naponta követtük az ízületi gyulladás súlyosságát, melyet pontozással és a boka vastagságának mérésével számszerűsítettünk^{35,232,234,235}. A gyulladás klinikai tüneteit egy 0-10-ig terjedő skálán pontoztuk, a bokavastagságot pedig egy speciális tolómérő (Kroepelin) segítségével mértük. A pontozást és a méréseket 2 független vizsgáló végezte, majd a kapott eredményeket átlagoltuk.

3.6. Kontakt hiperszenzitivitás modell (CHS)

3.6.1. Klasszikus CHS modell

A CHS kiváltásához 2,4,6-trinitroklorobenzént (TNCB) alkalmaztunk, melyet acetonban oldottunk fel. A kísérlet 0. napján egy speciális kisállat nyírógéppel (Aesculap Exacta) szőrtelenítettük az egerek hasát majd szenzitiváció céljából, 100 µl 3%-os TNCB-

vel vagy a kontrollként alkalmazott acetonnal kezeltük a szabad bőrfelületet. A szenzitizációt követő 5. napon megmértük az egerek kezdeti fülvastagságát egy érzékeny, kézi vastagságmérő (Mitutoyo) segítségével. A mérés után mind a kontroll, mind pedig az allergénnel szenzitizált egerek fülére 20 µl 1%-os TNCB oldatot pipettáztunk. 24 órával később ismét megmértük az egerek fülvastagságát. A két mérés közötti különbség mutatta a gyulladáshoz való válasz mértékét.

3.6.2. Passzív CHS modell

A passzív CHS vagy adoptív transzfer kivitelezéséhez az egereket a fent említett módon szőrtelenítettük, majd a hasukon 100 µl, a fülükön 20 µl 3%-os TNCB-vel kezeltük. A szenzitizációt követő 5. napon, az egerek eutanáziáját követően, eltávolítottuk a felületes ágyéki- és a fül előtti nyirokcsomókat, PBS-ben, jégen tartottuk, majd egy 70 µm-es steril szűrőt alkalmazva (BD Biosciences) egysejtes szuszpenziót készítettünk. A naiv recipiens egerekbe 2×10^7 nyirokcsomó sejtet injektáltunk intravénásan. Közvetlenül ezután megmértük az egerek kezdeti fülvastagságát, majd a fülükre 20 µl 1%-os TNCB oldatot pipettáztunk. 24 órával később ismét megmértük az állatok fülvastagságát, majd a különbség alapján ábrázoltuk a válasz mértékét.

3.7. *In vivo* fertőzéses modellek

A fertőzéses kísérletek kivitelezéséhez az ATCC25923 *Staphylococcus aureus* baktériumtörzset és az SC5314 *Candida albicans* gomba törzset alkalmaztuk, melyek a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből származtak.

A *Staphylococcus aureus*-t agy-szív infúziós (brain-heart infusion, BHI) agarban tartottuk fenn, majd egy éjszakán át tenyésztettük 37°C-on BHI tápoldatban. Az egereket 100 µl PBS-ben felvett, 2×10^7 (túlélés vizsgálatához) vagy 1×10^7 (kolonizáció vizsgálatához) *S. aureus* baktériumot tartalmazó intraperitonális injekcióval fertőztük.

A *Candida albicans*-t élesztő/pepton/dextróz (yeast extract/peptone/dextrose, YPD) táptalajon tartottuk fenn, majd egy éjszakán át 30°C-on, folyékony YPD tápoldatban növesztettük. Az egereket 100 µl PBS-ben felvett, 1×10^5 *C. albicans* gombával fertőztük, a farokvénába adott injekcióval.

Mind a bakteriális, mind a gombás fertőzés esetén követtük az állatok túlélését és a bakteriális/gombák általi kolonizációt. Az állatok túlélését 10 napon keresztül vizsgáltuk. Az egerek eutanáziáját követően eltávolítottuk a veséket, lépét, májat és az agyat, melyeket steril PBS-ben homogenizáltunk. Az egerek vérének a retro-orbitális vénás plexusból gyűjtöttük, üveg Pasteur pipetta segítségével. A peritoneális mintavételhez 5 ml jéghideg PBS-sel mostuk át az egerek hasüregét. A baktériumok és gombák okozta terhelést 12 órával a fertőzést követően, a kolóniaképző egység (Colony-Forming Unit, CFU) számolási módszerével határoztuk meg a vér-, peritoneális- és homogenizált szervmintákból. Hígítási sort alkalmaztunk az *S. aureus* esetén BHI, a *C. albicans* esetén pedig YPD agar táptalajon. A plate-eket 1 napig, 37°C-on (*S. aureus*), és két napig, 30°C-on inkubáltuk (*C. albicans*), majd CFU-t számoltunk és az eredményt CFU/g szövetben, vagy CFU/ml-ben ábrázoltuk.

3.8. Az adatok ábrázolása és statisztikai elemzése

A kísérleteket minimum három egér/genotípus/kezelés elemszámmal és minimum három ismétlésben végeztük el, amennyiben egy kísérletnél másképp jártunk el, azt az adott ábrázolásnál külön közlöm. A dolgozatomban bemutatott oszlopdiagramok és kinetikai görbék a reprezentatív ábrák esetében az átlagot és a szórás (SD), több független kísérlet esetén pedig az átlagot és az átlag szórását (SEM) mutatják.

A steril peritonitisz modell esetében a szöveti sejtszámokat a teljes hasüregi tartalomra számoltuk ki.

Az adatok statisztikai elemzéséhez a StatSoft Statistica szoftvert használtuk. A vérmintákból nyert adatokat, valamint a baktériumok és gombák CFU-számának elemzését kétmintás Student-féle *t*-próbával végeztük. A peritonitisz, artritisz és CHS kísérletek adatait kétutas varianciánálízisnek (ANOVA) vetettük alá. A tömegmérés görbéinek elemzéséhez Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. A túlélési vizsgálatok eredményeit a Kaplan-Meier nemparaméteres túlélési modellel és log-rank teszttel elemeztük. A szignifikancia határának a 0,05-ös *p* értéket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

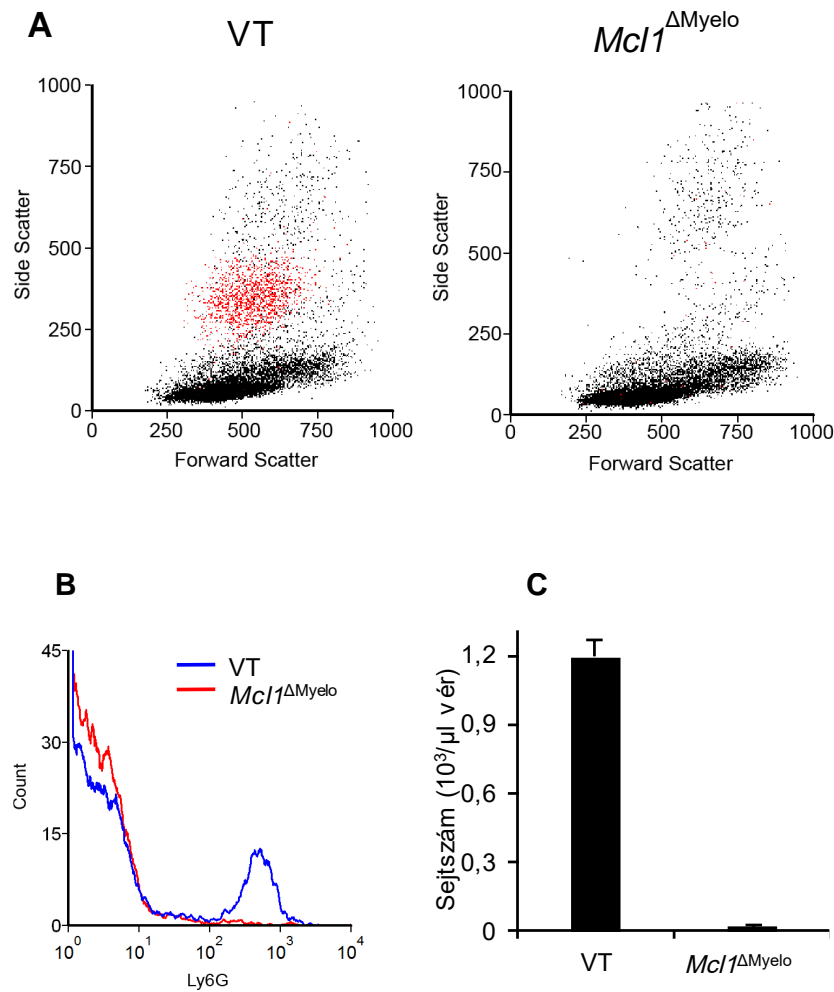
4.1. A neutropéniás *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek jellemzése

Az ebben a fejezetben bemutatott kísérleteink célja egy új neutrofil granulocita-hiányos egértörzs általános jellemzése és feltételezhetően neutrofil-függő gyulladáso és fertőzőes betegségmodellekben való *in vivo* validálása volt. A kísérletek során a neutrofil granulociták túléléséhez feltétlenül szükséges¹⁰⁷ Mcl-1 anti-apoptotikus fehérjének a mieloid kompartmentben való sejtvonal-specifikus törlését vizsgáltuk.

4.1.1. Az Mcl-1 mieloid-specifikus deléciója súlyos neutropéniához vezet

Az Mcl-1 mieloid-specifikus törlésének vizsgálatára *Lyz2*^{Cre/Cre}*Mcl1*^{flox/flox} egereket hoztunk létre, melyekben a lizozim M-et kódoló *Lyz2* gén endogén promotere által irányított Cre rekombináz hatására a mieloid kompartmentben törlődik az Mcl-1-et kódoló *Mcl1* gén (ld. 9. ábra). Ezeket az egereket a továbbiakban *Mcl1*^{ΔMyelo} egereknek nevezzük. A kísérletekben használt kontroll egerek tartalmaztak vad típusú C57BL/6 állatokat, *Lyz2*^{Cre/Cre} vagy *Mcl1*^{flox/flox} mutánsokat (melyekben csak az egyik gén mutációja volt jelen), valamint az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek *Lyz2*^{Cre/Cre}*Mcl1*^{flox/+} alomtestvéreit is.

A vad típusú állatok perifériás vére egyértelmű neutrofil granulocita populációt tartalmazott, melyre Ly6G-pozitivitás, közepes előre irányuló szórás és magas oldalirányú szórás volt jellemző (12. ábra A és B panel). Ez a populáció lényegében teljesen hiányzott az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekből (12. ábra A és B panel). Kvantitatív elemzésünk (12. ábra C panel) azt mutatta, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutánsokban a vad típusú állatokhoz viszonyítva átlagosan 98,1%-kal csökkent a keringő PMN sejtek száma ($p = 8,0 \times 10^{-23}$).



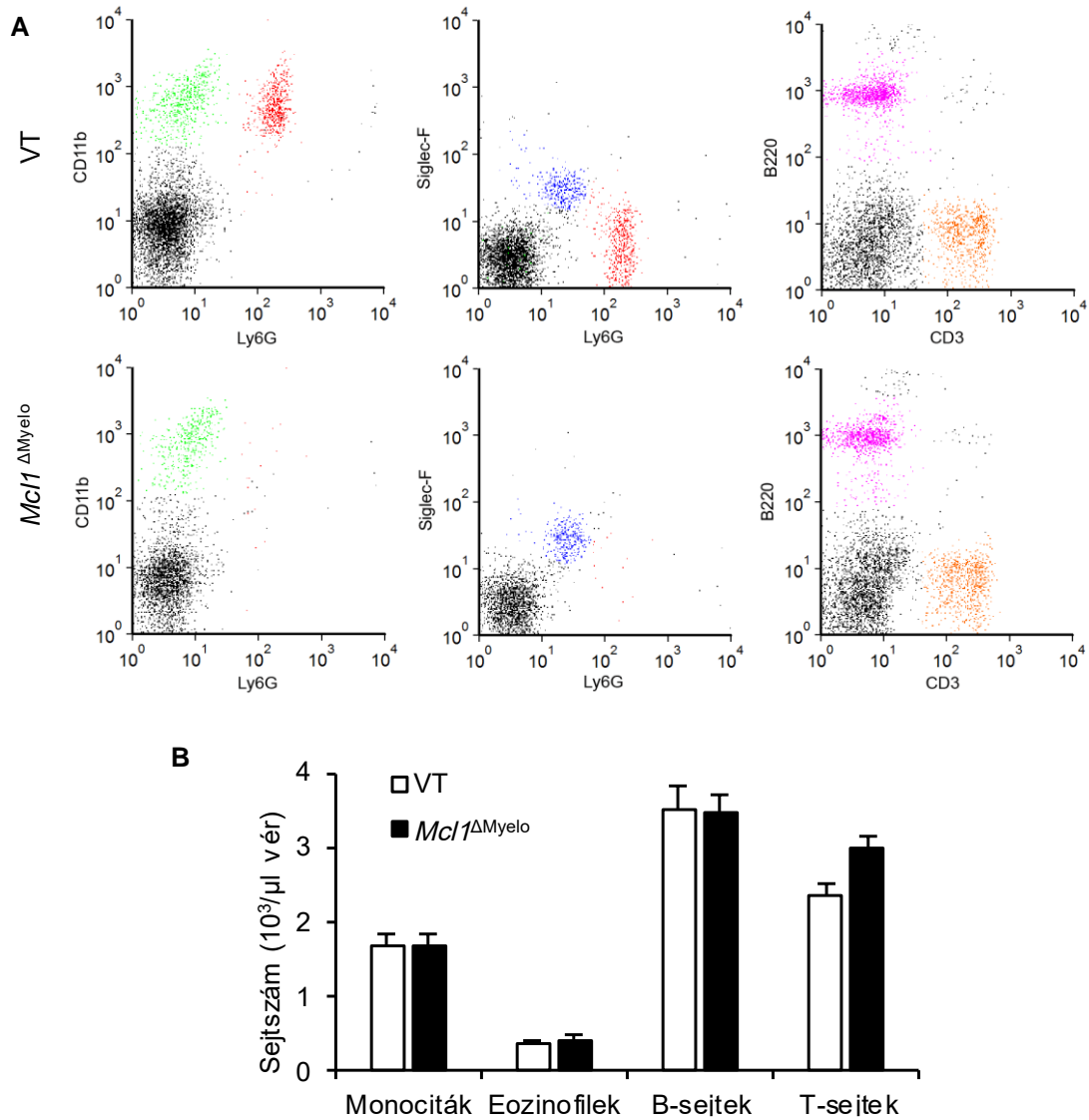
12. ábra: Az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció hatása a keringő neutrofilek számára.

Vad típusú (VT) és Mcl1^{ΔMyelo} egerek perifériás vérént Ly6G-ellenes antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk. Az ábrán a sejtek fényszórását (A), az Ly6G-expresszió megoszlását (B) és a keringő neutrofil granulociták (Ly6G⁺ sejtek) abszolút koncentrációját (C) tüntettük fel. Az A panelen az Ly6G-pozitív sejteket vörös színnel jelöltük. Az A és B panelek reprezentatív ábrák, a C panelen 7 független mérésből származó adatok átlagát (21-28 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.1.2. Egyéb leukocita-populációk vizsgálata *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben

Ezután megvizsgáltuk az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció hatását más leukocita-vonalakra. Amint a 13. ábrán látható, az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben nem változott a keringő monociták (CD11b⁺Ly6G⁻Siglec-F⁻ sejtek; $p = 0,96$), az eozinofilek (Siglec-F⁺Ly6G⁻; $p = 0,49$) és

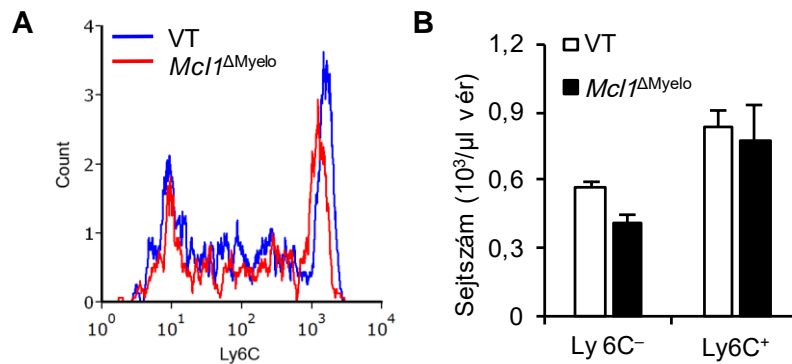
a B-sejtek (B220⁺; p = 0,86) száma, míg a T-sejtek (CD3⁺) száma mérsékelt emelkedést mutatott (p = 0,012).



13. ábra: Egyéb leukocita-populációk vizsgálata *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben.

Vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek perifériás vérére az A panelen jelzett antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A panelen az adott markerekkel történő festés eredménye látható. A neutrofileket vörös, a monocitákat zöld, az eozinofileket kék, a B-sejteket mályva, a T-sejteket narancssárga színnel jelöltük. A B panelen az egyes populációk keringő abszolút sejtkoncentrációi láthatók. Az A panelen reprezentatív ábrákat tüntettem fel, a B panelen 7 független mérésből származó adatok átlagát (21-28 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

A következőkben megvizsgáltuk a monociták két funkcionálisan eltérő szubpopulációjának, az Ly6C⁺ „gyulladásos” monocitáknak és az Ly6C⁻ „járőröző” monocitáknak a megoszlását. Amint azt a 14. ábra A panelje mutatja, az Ly6C-expresszió hasonló lefutást mutatott a vad típusú és az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek CD11b⁺Ly6G⁻Siglec-F⁻ monocita-populációin belül. Az eredmények kvantitatív vizsgálata (14. ábra B panel) kimutatta, hogy az Ly6C⁺ monociták abszolút számában nem volt eltérés a két genotípus között ($p = 0,73$), miközben az Ly6C⁻ monociták száma kismértékben, bár statisztikailag szignifikáns módon csökkent az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben ($p = 0,0039$).

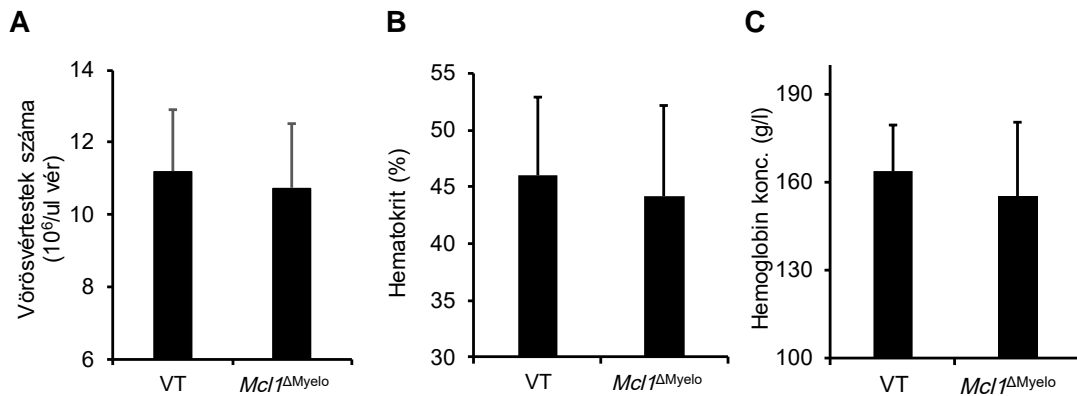


14. ábra: A monociták alpopulációinak a megoszlása *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben.

Vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek perifériás vérének CD11b, Ly6G, Siglec-F és Ly6C antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk az Ly6C-expresszió megoszlását a CD11b⁺Ly6G⁻Siglec-F⁻ (monocita) sejteken belül. Az A panel az Ly6C-expresszió hisztogramját, a B panel a keringő Ly6C⁻ és Ly6C⁺ monociták abszolút koncentrációját mutatja. Az A panel reprezentatív ábra, a B panelen 5 független mérésből származó adatok átlagát (13-14 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.1.3. Egyéb hematológiai paraméterek vizsgálata

A fehérvérsejteken túlmenően a vörösvértestek (vvt) számát (14. ábra A panel), a hematokrit (htk) értéket (14. ábra B panel) és a hemoglobint (hgb) koncentrációt (14. ábra C panel) is megvizsgáltuk. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben egyik paraméter sem mutatott eltérést a vad típusú egerekhez képest (vvt, $p = 0,29$; htk, $p = 0,19$; hgb, $p = 0,3$) (15. ábra).

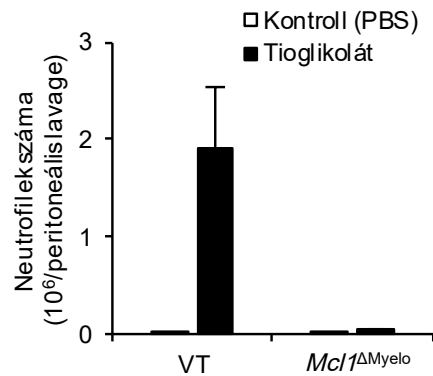


15. ábra: A perifériás vér hematológiai paramétereinek vizsgálata *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben.

Két független kísérletből származó, 10 vad típusú (VT) és 8 *Mcl1*^{ΔMyelo} egér vérmintájából készült elemzés 3-part diff. hematológiai analizátorral, melyben a vörösvértestek számát (A panel), a hematokrit értéket (B panel) és a hemoglobin koncentrációt (C panel) mutatjuk.

4.1.4. Neutrofil granulociták vizsgálata steril gyulladás során

Gyulladásos körülmények között is vizsgálni szeretnénk volna a szöveti PMN sejtek számát. Ennek érdekében tioglikolát táptalajjal steril peritonitist váltottunk ki, és vizsgáltuk a gyulladás során a peritóneumba vándorló neutrofilek számát. Amint a 16. ábrán látható, vad típusú állatokban a tioglikolát injekció robusztus neutrofil-infiltrációt eredményezett, az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben azonban nem volt megfigyelhető érdemi neutrofil-felzaporodás a szövetben (97%-os csökkenés; $p = 1,3 \times 10^{-4}$). Ez arra utal, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek súlyos PMN-hiánya gyulladásos körülmények között is megmarad.



16. ábra: Neutrofil-infiltráció a gyulladásos peritóneumba.

*Tioglikolát intraperitoneális injekciójával steril peritonitist váltottunk ki vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben (a kontroll egerek PBS kaptak). 4 órával a peritonitisz indukciója után áramlási citometriával meghatároztuk a peritoneális neutrofil granulociták abszolút számát, amit a fenti oszlopdiagrammon ábrázoltunk. Az ábrán 3 független mérésből származó adatok átlagát (6-8 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.*

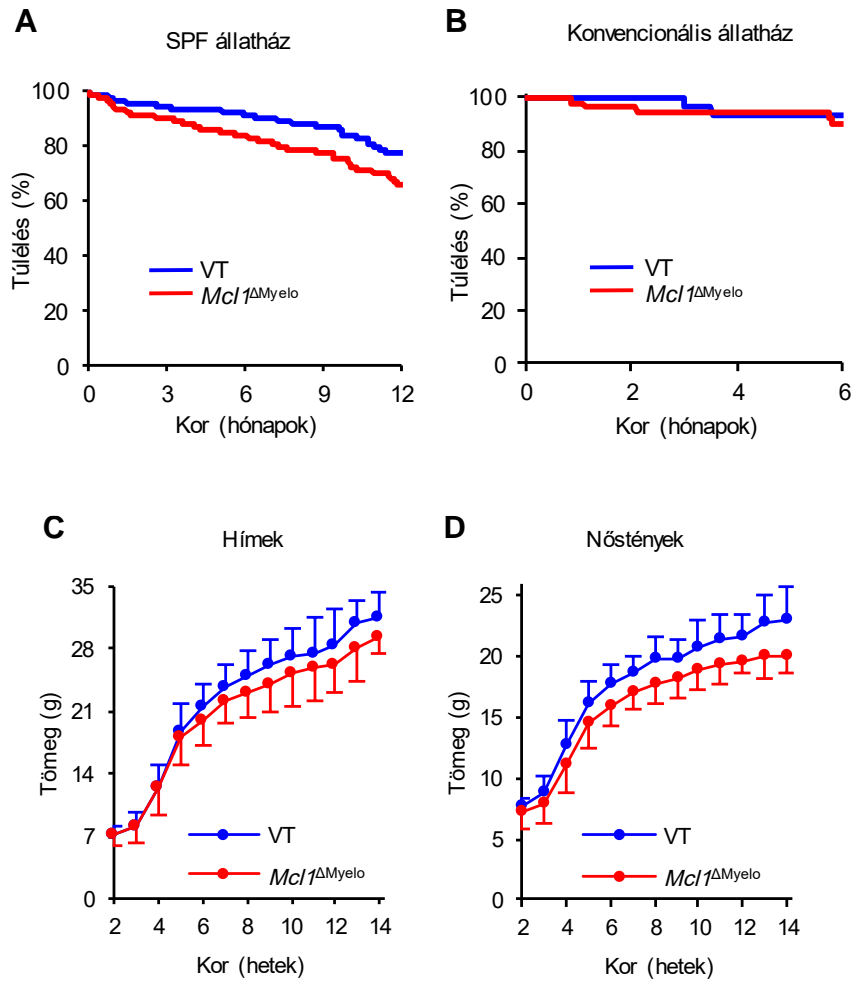
4.1.5. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek túlélése és megjelenése

A szakirodalomban általánosan elfogadott, hogy a súlyos neutropénia összeegyeztethetetlen az élettel. Ezt azonban –feltételezhetően jelentős részben a kísérleteink kezdetén elérhető neutropeniás egérmodellek^{22,168,178,182,187} korlátai miatt– korábban senki nem vizsgálta kísérleti egerekben. Ezért fontosnak tartottuk, hogy hosszabb ideig kövessük az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek túlélését, így erről a tulajdonságukról is átfogó képet kaphassunk.

Meglepő módon és a korábbi feltételezéseinkkel ellentétben, az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek túlélése specifikus patogén-mentes (SPF) körülmények között csak kis mértékben különbözött a vad típusú állatokétól (17. ábra A panel). Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek túlélése csökkent a vad típusú állatokhoz képest (6 hónapos korban rendre 84% és 92%, 12 hónapos korban rendre 66% és 78%), és feltételezhetően a vizsgált egerek nagyon nagy száma (977 VT és 611 *Mcl1*^{ΔMyelo}) miatt ez a különbség statisztikailag szignifikáns volt ($p < 0,00001$). Fontos kiemelni ugyanakkor, hogy a korai életkorban (2-4 hónap), amikor a legtöbb állatkísérletet végzik, ez a különbség nem volt jelentős, és nem okozott nehézséget a kísérletek kivitelezésében.

Egy kisebb csoporton és rövidebb időtartamban egy konvencionális állatházban (ld. 3.1.1. fejezet), tehát a valós körülményekhez közelebbi feltételek mellett is vizsgáltuk az *Mcll*^{ΔMyelo} egerek túlélését (17. ábra B panel). Bár az *Mcll*^{ΔMyelo} állatok túlélése ismét kismértékben, bár statisztikailag szignifikáns módon alacsonyabb volt a vad típusú egerek túlélésénél (6 hónapos korban rendre 88% és 93%; $p = 0,032$).

A következőkben további általános vizsgálatokat végeztünk az egereken. Nem bemutatott adatainkban nem találtunk lényeges különbséget a vad típusú és az *Mcll*^{ΔMyelo} egerek általános megjelenése vagy viselkedése között. Az állatok testtömege kismértékben csökkent az *Mcll*^{ΔMyelo} egerekben, a nőstényekben a különbség statisztikailag is szignifikánsnak mutatkozott (17. ábra C-D panel; hímeknél és nőstényeknél rendre $p = 0,22$ és $2,0 \times 10^{-6}$). Az egerek boncolása során észlelt egyetlen következetes különbség az *Mcll*^{ΔMyelo} állatokban megfigyelhető splenomegalia volt, ami az idősebb egyedeknél súlyosabbnak bizonyult (az adatokat nem mutatjuk be).



17. ábra: Az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek túlélése és testtömege.

Tenyészetünkben megvizsgáltuk és Kaplan-Meier túlélési görbék formájában ábrázoltuk a vad típusú (VT) és $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek túlélését mind specifikus patogén-mentes (SPF; A panel), mind konvencionális (B panel) körülmények között. Vizsgáltuk továbbá az egerek testsúlyának változását mind hím (C), mind nőstény (D) egyedek esetében. A túlélési görbék 611 VT és 977 $Mcl1^{\Delta Myelo}$ (A), valamint 31 VT és 52 $Mcl1^{\Delta Myelo}$ (B) egér adatait ábrázolják. A testtömeg átlagának és szórásának ábrázolásához 7-28 egér/genotípus (C), valamint 9-26 egér/genotípus (D) adatait használtuk fel.

4.1.6. $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek homoizóta formában való tenyésztése

A túlélésük és egészségi állapotuk mellett az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ állatok fertilitását és szaporodását is megvizsgáltuk specifikus patogén-mentes (SPF) körülmények között. Amint az 1. táblázatban látható, minden alkalmazott stratégia mellett születtek utódok,

még akkor is, amikor mindkét szülő $Mcl1^{\Delta Myelo}$ genotípusú volt. Bár a tenyésztés hatékonysága (ami azt mutatta meg, hogy a pároztatások hány százalékából született utód) alacsonyabb volt, amikor $Mcl1^{\Delta Myelo}$ nőtényeket alkalmaztunk, az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egértörzs tenyésztése még homozigóta formában is a vad típusú tenyészpárokéval összevethető számú utódot eredményezett. Összességében az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek tenyésztésekor megfigyelt mérsékelt szaporodási zavar nem volt lényegesen súlyosabb a más genetikailag manipulált egerek tenyésztésekor megfigyelhetőnél. Ezen túlmenően az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek a konvencionális állatházunkban is képesek voltak homozigóta formában szaporodni (nem mutatott adatok).

1. táblázat: Az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek fertilitása.

Az ábra vad típusú (VT) és $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek pároztatásából származó almok tenyésztési jellemzőit mutatja. További magyarázatot ld. a szövegben.

Apa	Any a	Teny észpárok száma	A tenyésztés hatékonysága	Átlagos alomméret	A párosítás és az ellés között átlagosan eltelt idő
VT	VT	64	70	6,3	40
$Mcl1^{\Delta Myelo}$	VT	71	68	5,6	51
VT	$Mcl1^{\Delta Myelo}$	29	45	4,2	41
$Mcl1^{\Delta Myelo}$	$Mcl1^{\Delta Myelo}$	29	41	5,2	39

Az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek túlélésének és szaporodásának további vizsgálata érdekében elemeztük az utódok genotípusának a megoszlását. Amint az a 2. táblázatban látható, az utódok genotípusának megoszlása mindig nagyon közel állt a mendeli öröklődési szabályok szerint várható arányokhoz, ami az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek normális embrionális és korai posztnatális túlélésére utal.

2. táblázat: Az utódok genotípusainak a megoszlása.

Különböző tenyésztési stratégiák mellett vizsgáltuk az egyes utódok genotípusát. A táblázat az egyes tenyésztési stratégiák esetén mutatja az adott genotípusú utódok számát, valamint az összes utódhoz viszonyítva a tényleges, illetve a mendeli öröklési szabályok alapján várt arányokat.

		Apa	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/+}$	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/+}$	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$
		Any a	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/+}$	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/+}$	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$
Utódok genotípusa	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/flox}$	Utódok száma	50	37	281	225
		Összes %-a (tényleges)	26	48	46	100
		Összes %-a (várt)	25	50	50	100
	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{flox/+}$	Utódok száma	93	40	328	0
		Összes %-a (tényleges)	49	52	54	0
		Összes %-a (várt)	50	50	50	0
	$Ly2Z^{Cre/Cre}Mcl1^{+/+}$	Utódok száma	48	0	0	0
		Összes %-a (tényleges)	25	0	0	0
		Összes %-a (várt)	25	0	0	0

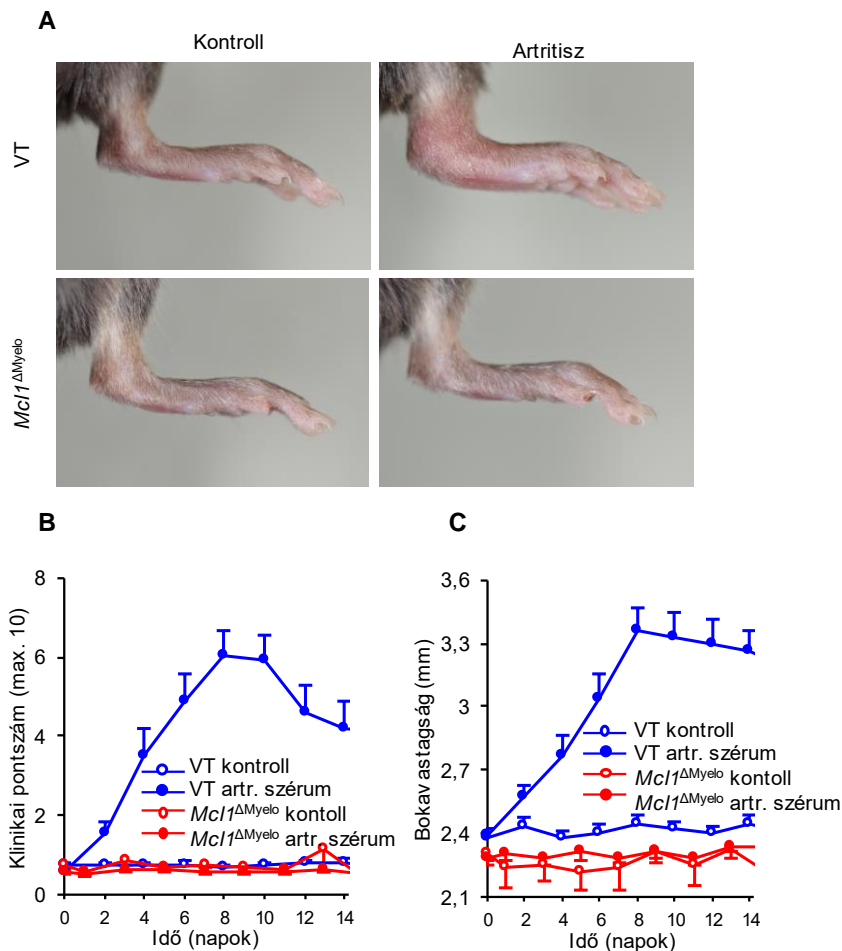
Eddigi eredményeink összességében arra utalnak, hogy az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek életképesek és még homozigóta mutáns formában is termékenyek, mind specifikus patogén-mentes, mind konvencionális állatházi körülmények között. A keringő neutrofil granulociták szinte teljes hiányában meglepő túlélés mellett ezen eredmények azt is jelzik, hogy az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egértörzslet viszonylag könnyű fenntartani, ezért technikailag nagyon hasznos modell lehet a neutrofil-funkciók *in vivo* vizsgálatához. Ez különösen igaz azért, mert a homozigóta tenyésztés során nincs szükség az utódok egyedi genotípusának meghatározására, és azért, mert a legtöbb egérkísérletet fiatalabb állatokkal (2-6 hónapos) végezzük, ahol csekély az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ mutáció túlélést csökkentő hatása.

4.1.7. Az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek védettek az autoantitest-indukált artritisszel szemben

A következőkben vizsgálni szeretnénk volna az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekben megfigyelhető neutropénia funkcionális jelentőségét. Ennek érdekében autoantitest-indukált, neutrofil-függő *in vivo* artritisz-modellben vizsgáltuk a betegség kialakulását.

A K/B×N szérum-transzfer artritisz modellben^{233,236} vizsgáltuk a különböző genotípusú egereket, mivel korábbi eredmények a neutrofil granulociták fontos szerepére utaltak ebben a modellben^{128,129} (ld. még a 1.1.4. fejezetben). Amint az a 18. ábra A

paneljén látható, a K/B×N széruminjekció vad típusú egerekben robusztus artritist váltott ki, míg az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ mutánsok teljesen védettnek bizonyultak a betegség kialakulásával szemben. A klinikai pontszám (18. ábra B panel; $p = 4,2 \times 10^{-5}$) és a bokavastagság (18. ábra C panel; $p = 0,0059$) követése szintén megerősítette ezeket a megállapításokat.



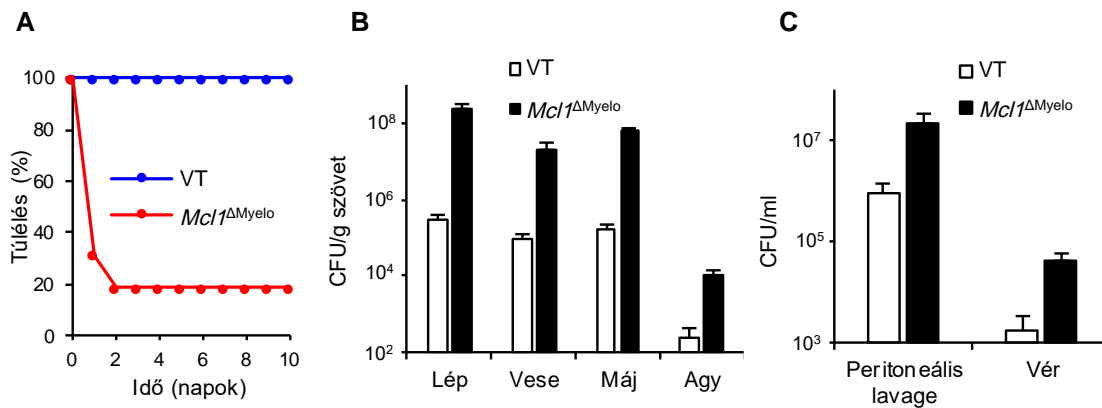
18. ábra: Autoantitest-indukált artritisz $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekben.

Vad típusú (VT) és $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egereket artritogén K/B×N szérummal vagy kontroll (B×N) szérummal kezeltünk és fényképen rögzítettük a bokatájék morfológiáját a széruminjekciót követő 7. napon (A panel, reprezentatív fotók), valamint folyamatosan követtük a gyulladás jeleit egy szubjektív klinikai pontszám (B panel) és a bokavastagság (C panel) meghatározásával. A B és C panelen 3 független mérésből származó adatok átlagát (5-9 egér/kontroll és 9-15 egér/artr. szérum) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.1.8. Fokozott érzékenység a bakteriális és gombás fertőzésekkel szemben

Bár az *MclI*^{ΔMyelo} egerek közel normális túlélése arra utal, hogy ezek az egerek ellenállnak a kommenzális flóra mikrobiális terhelésének, szeretnénk volna megvizsgálni az állatok kísérletesen indukált fertőzésekkel szembeni érzékenységét is. Ezért egereinket szisztémás *Staphylococcus aureus* vagy *Candida albicans* fertőzésnek vetettük alá.

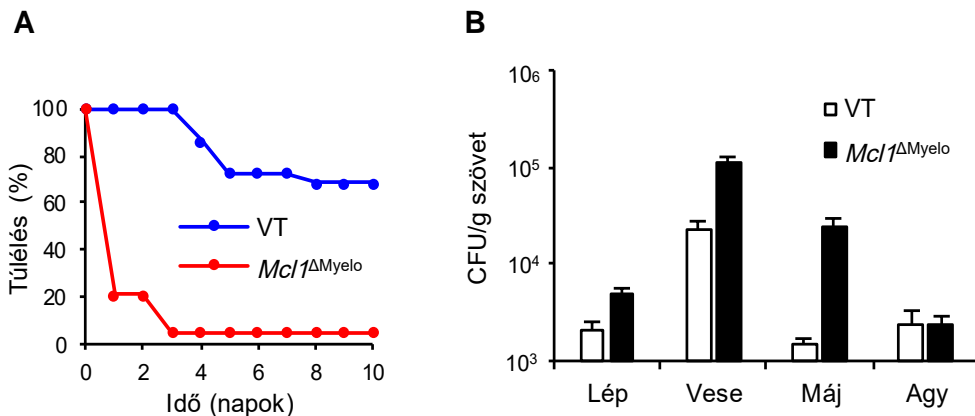
A *S. aureus* egy Gram-pozitív patogén, amely képes bőr- és légúti fertőzéseket, tályogképződést és bakteriémia/szepszis kialakulását kiváltani^{237,238}. A neutrofil granulociták feltételezhetően alapvető szerepet játszanak a gazdaszervezet ezen kórokozókkal szembeni védekezésében. Amint a 19. ábra A paneljén látható, míg a vad típusú állatok mindegyike túlélte a 2×10^7 db *S. aureus*-szal történő intraperitoneális fertőzést, a párhuzamosan vizsgált *MclI*^{ΔMyelo} egerek több mint 80%-a két napon belül elpusztult a fertőzésben ($p = 1,0 \times 10^{-5}$). 1×10^7 baktériummal való fertőzést követő 12 órával megvizsgáltuk az egyes szövetek baktériumterhelését is (19. ábra B-C panel). Eredményeink azt mutatták, hogy a lépben ($p = 0,0015$), a vesékben ($p = 0,023$) és a májban ($p = 9,0 \times 10^{-5}$) több mint 100-szorosára nőtt a baktériumterhelés az *MclI*^{ΔMyelo} egerekben. A baktériumok száma szignifikánsan emelkedett az agyban ($p = 0,028$) és a vérben ($p = 0,0038$) is, a peritoneumban azonban nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,098$).



19. ábra: Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek bakteriális fertőzés iránti érzékenysége.

Vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔMyelo} egereket szisztémás *S. aureus* fertőzésnek vetettük alá, majd vizsgáltuk az egerek túlélését (A panel), valamint az egyes szövetekben (B panel) és folyadéktartalmakban (C panel) található kolóniaképző kórokozók (CFU) számát. A túlélési görbék (A) 3 független kísérletből származó, 16 egér/genotípus adatait ábrázolják. A B és C paneleken 3 független mérésből származó adatok átlagát (9-10 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

A *C. albicans* egy kórokozó élesztőgomba, amely képes felületen vagy szisztémás fertőzéseket okozni, és egyben a kórházban szerzett fertőzések egyik leggyakoribb oka²³⁹. A neutrofil granulociták azon kritikus immunsejtek között vannak, amelyek megvédik a gazdaszervezetet a *C. albicans* fertőzéstől. Amint a 20. ábra A paneljén látható, a 10⁵ *C. albicans*-szal végzett intravénás fertőzés a vad típusú állatok 27% -ának elhullását eredményezte, míg ugyanaz a fertőzés az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek 95% -ánál okozott gyors letalitást ($p < 0,00001$). A kórokozó okozta kolonizáció 12 óra elteltével történő elemzése (20. ábra B panel) kimutatta, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek májában több mint tízszeresére növekedett a gombák száma ($p = 1,0 \times 10^{-4}$), és mérsékelt gombaszám-növekedés volt megfigyelhető a lépben ($p = 0,0096$) és a vesékben ($p = 5,2 \times 10^{-7}$) is. Az állatok agyának a vizsgálata ezzel szemben nem mutatott ki különbséget a két genotípus között ($p = 0,97$).



20. ábra: Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek gombás fertőzés iránti érzékenysége.

Vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔMyelo} egereket szisztémás *C. albicans* fertőzésnek vetettük alá, majd vizsgáltuk az egerek túlélését (A panel), valamint az egyes szövetekben található kolóniaképző kórokozók (CFU) számát (B panel). A túlélési görbék (A) 3 független kísérletből származó, 19-22 egér/genotípus adatait ábrázolják. A B panelen 4 független mérésből származó adatok átlagát (10-11 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

Eddigi eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek rendkívül érzékenyek bakteriális vagy gombás kórokozók, például a *S. aureus* vagy a *C. albicans* általi fertőzéses folyamatokra, melynek oka feltételezhetően a neutrofil granulociták által mediált kórokozó-eltávolítás csökkenése ezekben az egerekben.

4.2. Az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése

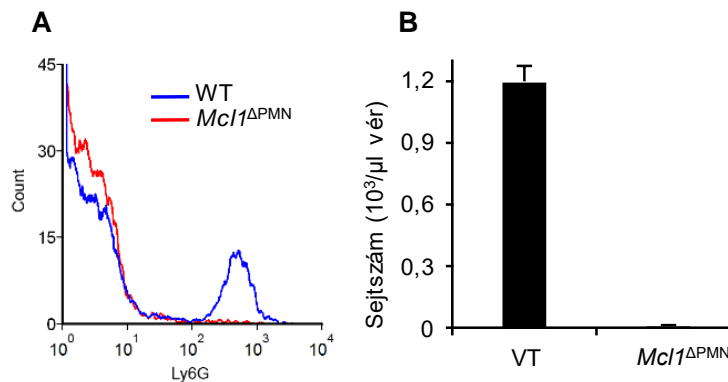
A fenti kísérletekben az Mcl-1-et a teljes mieloid kompartmentből töröltük. A következő kísérletekben megvizsgáltuk az Mcl-1 szűkebb spektrumú, a neutrofil granulocitákra korlátozódó törlésének következményeit is.

4.2.1. Az Mcl-1 neutrofil-specifikus delécioja súlyos neutropéniát eredményez

Az Mcl-1-törlés hatásainak szűkebb, neutrofil-specifikus tesztelése érdekében az *Mcl1*^{flox/flox} egereket MRP8-Cre transzgén hordozó egerekkel is kereszteztük, melyekben

a Cre expressziója a neutrofil kompartmentre korlátozódik²⁴⁰. A kapott MRP8-CreMcll^{flox/flox} mutánsokat a továbbiakban Mcll^{ΔPMN} egereknek nevezzük.

Az Mcll^{ΔPMN} egerekben lényegében teljesen hiányoztak az Ly6G-pozitív sejtek (21. ábra A panel). A neutrofilek számának kvantitatív vizsgálata (21. ábra B panel) drámai, 99,1%-os csökkenést mutatott ($p = 9,8 \times 10^{-12}$), amely még az Mcll^{ΔMyelo} állatoknál tapasztalt 98,1%-os csökkenésnél is súlyosabb volt.

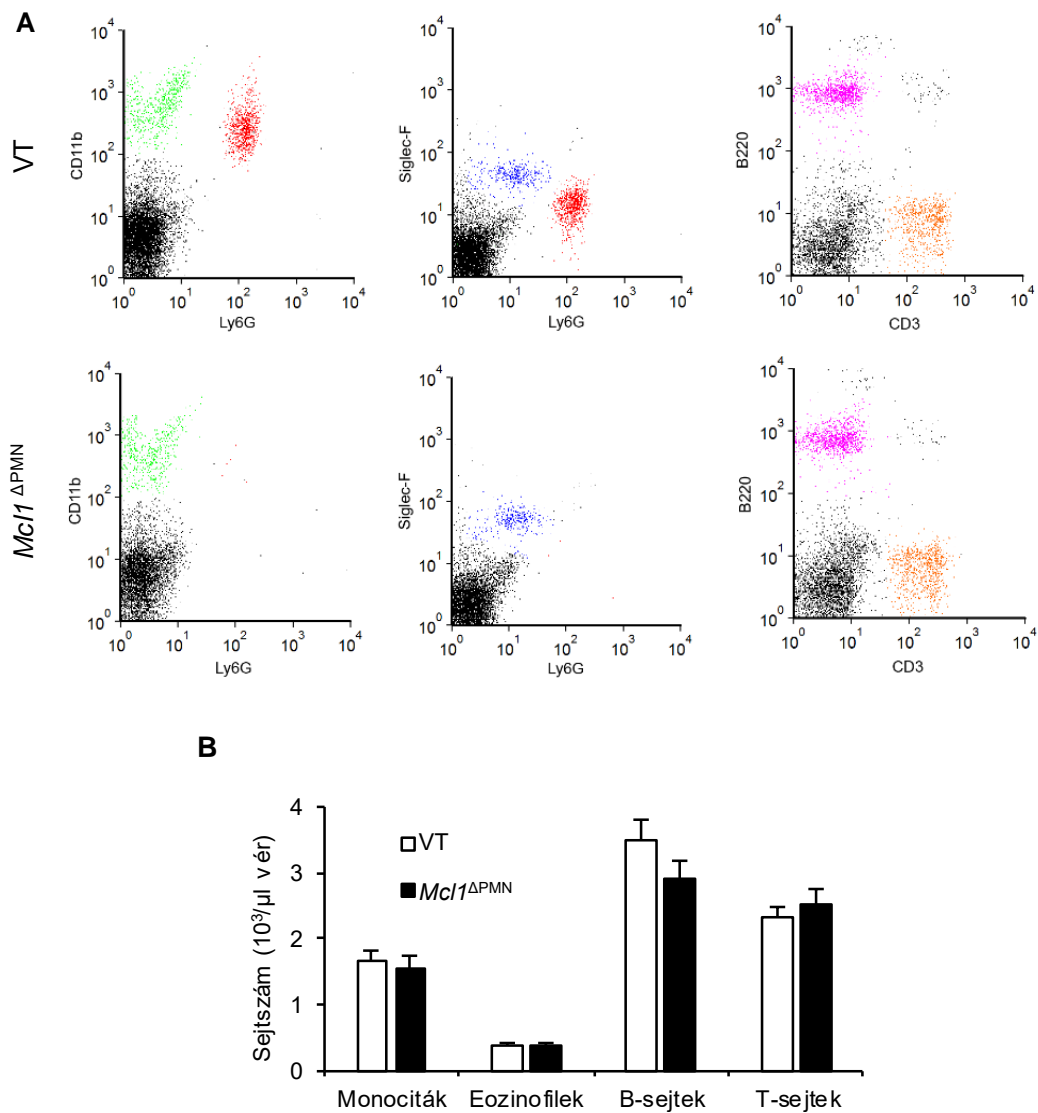


21. ábra: Az Mcll^{ΔPMN} mutáció hatása a keringő neutrofilek számára.

Vad típusú (VT) és Mcll^{ΔPMN} egerek perifériás vérének Ly6G-ellenes antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A panel az Ly6G-expresszió megoszlását, a B panel a keringő neutrofil granulociták (Ly6G⁺ sejtek) abszolút koncentrációját mutatja. Az A panel reprezentatív ábra, a B panelen 4 független mérésből származó adatok átlagát (10-22 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.2.2. Egyéb leukociták vizsgálata Mcll^{ΔPMN} egerekben

Az egyéb leukocita-populációk vizsgálata (22. ábra) azt mutatta, hogy az Mcll^{ΔPMN} mutáció nem befolyásolta a keringő monociták ($p = 0,60$), eozinofilek ($p = 0,99$), B-sejtek ($p = 0,21$) és T-sejtek ($p = 0,58$) számát.

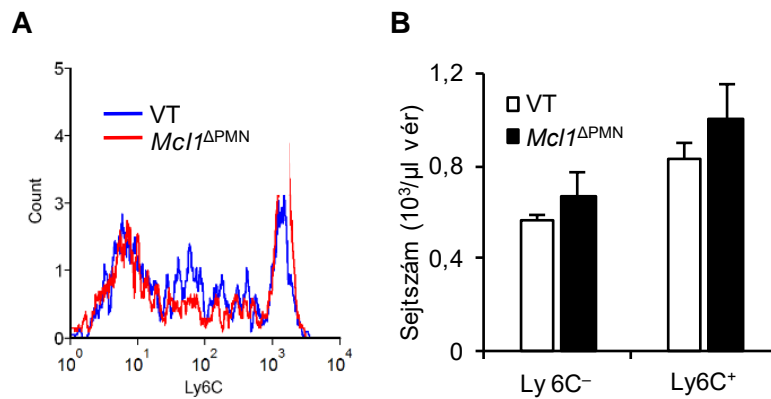


22. ábra: Egyéb leukocita-populációk vizsgálata *Mcl1*^{ΔPMN} egerekben.

Vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔPMN} egerek perifériás vérére az A panelen jelzett antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A panelen az adott markerekkel történő kettős festés eredménye látható. A neutrofileket vörös, a monocitákat zöld, az eozinofileket kék, a B-sejteket mályva, a T-sejteket narancssárga színnel jelöltük. A B panelen az egyes populációk keringő abszolút sejtkoncentrációi láthatók. Az A panelen reprezentatív ábrákat tüntettem fel, a B panelen 4 független mérésből származó adatok átlagát (10-22 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

Az *Mcl1*^{ΔPMN} mutáció nem befolyásolta a monocita-szubpopulációk eloszlását sem (23. ábra A panel), mind az Ly6C⁺ gyulladáscsökkentő monociták (p = 0,24), mind az Ly6C⁻

járőröző monociták ($p = 0,26$) száma a vad típusú egerekben tapasztalhatóhoz hasonlóan alakult (23. ábra B panel).

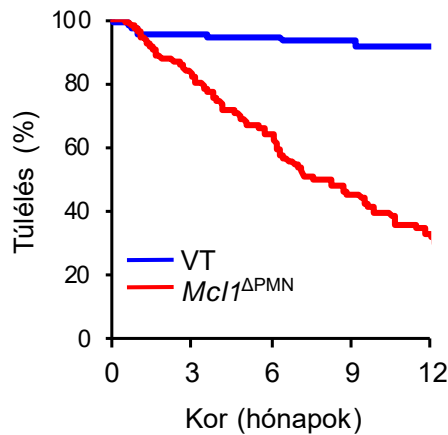


23. ábra: A monociták alpopulációinak a megoszlása *Mcl1*^{ΔPMN} egerekben.

Vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔPMN} egerek perifériás vérének CD11b, Ly6G, Siglec-F és Ly6C antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk az Ly6C-expresszió megoszlását a CD11b⁺Ly6G⁻Siglec-F⁻ (monocita) sejteken belül. Az A panel az Ly6C-expresszió hisztogramját, a B panel a keringő Ly6C⁻ és Ly6C⁺ monociták abszolút koncentrációját mutatja. Az A panel reprezentatív ábra, a B panelen 3 független mérésből származó adatok átlagát (8-14 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.2.3. Az *Mcl1*^{ΔPMN} egerek túlélése és szaporodása

Fenti eredményeink azt mutatták, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutációhoz hasonlóan az *Mcl1*^{ΔPMN} mutáció is súlyos és szelektív neutropeniához vezet. A következőkben szeretnénk volna megvizsgálni az *Mcl1*^{ΔPMN} egerek túlélését és szaporodási képességeit is. A túlélési vizsgálatok (24. ábra) az *Mcl1*^{ΔPMN} állatok túlélésének jelentős csökkenését mutatták, ami 6 hónapos korban 58%-os, 12 hónapos korban pedig már csak 30%-os túlélést eredményezett ($p < 0,000001$). Az *Mcl1*^{ΔPMN} egerek kisebbek voltak a vad típusú alomtársaiknál, és általános állapotuk is láthatóan elmaradt azokétól (nem mutatott eredmények). Az *Mcl1*^{ΔPMN} egerek tenyésztési hatékonysága szintén sokkal alacsonyabb volt, az *Mcl1*^{ΔPMN} × *Mcl1*^{ΔPMN} tenyészpárok 14%-ának születtek utódai (3. táblázat).



24. ábra: Az $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerek túlélése.

Az SPF állatházunkban megvizsgáltuk és Kaplan-Meier túlélési görbék formájában ábrázoltuk a vad típusú (VT) és $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerek túlélését. További magyarázatot ld. a szövegben. A túlélési görbék 469 VT és 138 $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egér adatait ábrázolják.

3. táblázat: Az $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerek fertilitása.

Tenyészetünkben megvizsgáltuk az adott egerek párosításából származó almok tenyésztési jellemzőit. További magyarázatot ld. a szövegben.

Apa	Anya	Tenyéspárak száma	A tenyésztés hatékonysága (%)	Átlagos alomméret	A párosítás és az ellés közt eltelt idő (nap)
VT	VT	72	78	5,5	37
$Mcl1^{\Delta PMN}$	$Mcl1^{\Delta PMN}$	14	14	4,6	22

A fent bemutatott korlátozott túlélési és tenyésztési képesség jelentősen megnehezítette az $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerek fenntartását. Ezt tovább bonyolította az a tény, hogy az ilyen nehezen fenntartható vonalakat heterozigóta formában szükséges tenyészteni, ezért minden utódot egyenként genotipizálni szükséges, és az utódoknak előreláthatólag a legjobb stratégia mellett is csak töredéke (a leggyakrabban használt MRP8-Cre $Mcl1^{flox/+} \times Mcl1^{flox/flox}$ tenyésztési stratégia esetén 25%-a) lesz a kívánt $Mcl1^{\Delta PMN}$ genotípusú.

4.2.4. Egyéb vizsgálatok $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerekben

Bár a kezdeti eredmények arra utaltak, hogy az $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerek teljes védelmet élveznek a K/B×N szérum-transzfer artritisszel szemben, az egerek korlátozott elérhetősége és rossz általános állapota nem tette lehetővé elegendő számú hasonló kísérlet elvégzését (nem-bemutatott eredmények). Érdekes megemlíteni ugyanakkor, hogy az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekkel ellentétben a néhány általunk felboncolt $Mcl1^{\Delta PMN}$ állat nem mutatta jelentős splenomegalia jeleit (nem-bemutatott eredmények).

A csontvelő-átültetési kísérletek azt mutatták, hogy az $Mcl1^{\Delta PMN}$ csontvelő-kimérák is rossz általános állapotban voltak, és a transzplantáció után 3–8 héttel elpusztultak (az adatokat nem mutatjuk be).

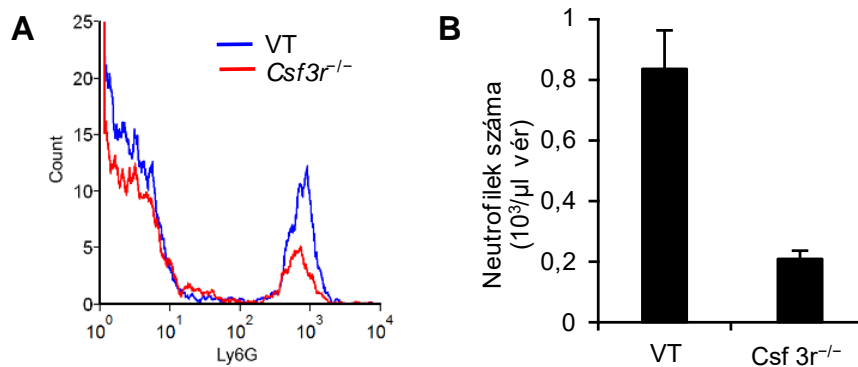
Eredményeinket összefoglalva, bár az $Mcl1^{\Delta PMN}$ mutáció súlyos és specifikus neutropeniához vezet, az állatok rossz általános állapota, korlátozott túlélése, csökkent termékenysége, valamint a nem homozigóta tenyésztési stratégia miatt összességében csak nagyon korlátozottan alkalmasak *in vivo* kísérletek kivitelezésére.

4.3. A G-CSF-receptor-hiányos egerek jellemzése

Korábbi vizsgálatok során más munkacsoportok G-CSF-receptor-hiányos egereket alkalmaztak neutropeniás egérmódelként^{241,242}. A következő kísérletekben az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ és $Mcl1^{\Delta PMN}$ egerekkel való összehasonlíthatóság érdekében röviden megvizsgáltuk a G-CSF receptorát kódoló *Csf3r* gén törlésének hatását is.

4.3.1. Részleges neutropénia G-CSF-receptor-hiányos egerekben

Ezekben a kísérletekben megvizsgáltuk a G-CSF-receptor-hiányos ($Csf3r^{-/-}$) egerek¹⁶⁸, mint referencia neutropeniás egértörzs neutrofil-kompartimentjének a jellegzetességeit. Amint azt a 25. ábra A panelje mutatja, a $Csf3r^{-/-}$ egerek perifériás vérében áramlási citometriával egyértelműen kimutatható volt egy jellegzetes Ly6G-pozitív sejtpopuláció. A neutrofil granulociták kvantitatív vizsgálata (25. ábra B panel) kimutatta, hogy a PMN sejtek száma szignifikánsan, de csak részlegesen csökkent, ahogy azt az irodalmi adatokból várható volt¹⁶⁸ (75%-os csökkenés; $p = 1,1 \times 10^{-4}$). Ez a csökkenés nem volt annyira súlyos és következetes, mint az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ vagy $Mcl1^{\Delta PMN}$ állatoknál.

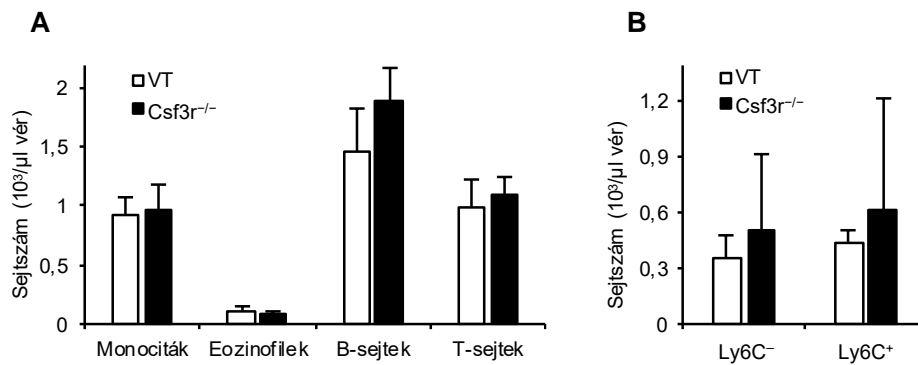


25. ábra: A *Csf3r*^{-/-} mutáció hatása a keringő neutrofilek számára.

Vad típusú (VT) és *Csf3r*^{-/-} egerek perifériás vérént Ly6G-ellenes antitestekkel festettük és áramlási citometriával vizsgáltuk. Az A panel az Ly6G-expresszió megoszlását, a B panel a keringő neutrofilek (Ly6G⁺ sejtek) abszolút koncentrációját mutatja. Az A panel reprezentatív ábra, a B panelen 3 független mérésből származó adatok átlagát (8 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.3.2. Egyéb leukocita-populációk vizsgálata *Csf3r*^{-/-} egerekben

A következőkben megvizsgáltuk az egyéb leukocita-populációkat is. Amint a 26. ábra A panelje mutatja, az *Mcl1*^{ΔMyelo} és *Mcl1*^{ΔPMN} mutációkhoz hasonlóan a *Csf3r*^{-/-} mutáció sem befolyásolta érdemben a keringő monociták, eozinofilek, B-sejtek és T-sejtek számát. Az Ly6C⁺ és Ly6C⁻ monocita-szubpopulációkban sem találtunk lényeges különbséget a vad típusú és *Csf3r*^{-/-} egerek között (26. ábra B panel).

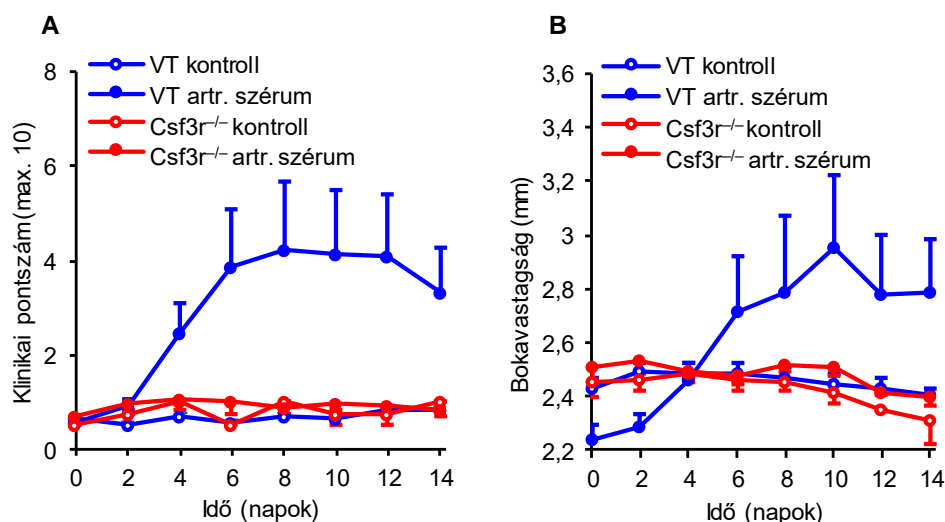


26. ábra: Egyéb leukocita-populációk és alpopulációk vizsgálata *Csf3r*^{-/-} egerekben.

Áramlási citometriával vizsgáltuk vad típusú (VT) és *Csf3r*^{-/-} egerek perifériás véréét. Az A panel az egyes fő leukocita-populációk, a B panel az Ly6C⁻ és Ly6C⁺ monociták abszolút koncentrációját mutatja. Az A panelen 3 független mérésből származó adatok átlagát (8 egér/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk. A B panelen 2 független mérésből származó adatok átlagát (4 egér/genotípus) és a szórást (SD) ábrázoltuk.

4.3.3. A *Csf3r*^{-/-} egerek védettek az autoantitest-indukált artritisszel szemben

Egy kisebb csoporton megvizsgáltuk a *Csf3r*^{-/-} mutáció hatását az autoantitest-indukált K/B×N szérum-transzfer artritisz modellben. Amint az a 27. ábrán látható, a *Csf3r*^{-/-} egerek nagymértékű védettséget mutattak az autoantitest-indukált artritisszel szemben, ami arra utal, hogy a neutrofil granulociták számának részleges csökkenése is képes megakadályozni a betegség kialakulását.



27. ábra: Autoantitest-indukált artritisz *Csf3r*^{-/-} egerekben.

Vad típusú (VT) és *Csf3r*^{-/-} egereket artritogén K/B×N szérummal vagy kontroll (B×N) szérummal kezeltünk és folyamatosan követtük a gyulladás jeleit egy szubjektív klinikai pontszám (A panel) és a bokavastagság (B panel) meghatározásával. Az ábrán egy kísérlet eredményét tüntettem fel, az átlagot (2-3 egér/genotípus) és a szórást ábrázolva.

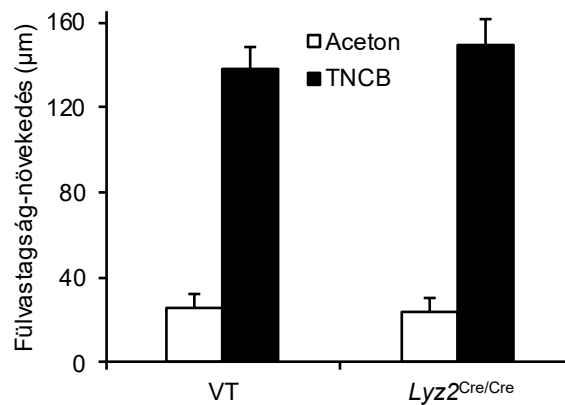
Noha a *Csf3r*^{-/-} egerek túlélése nem csökkent lényegesen, nehézségeink voltak a *Csf3r*^{-/-} egerek homozigóta formában történő tenyésztésével (nem-mutatott eredmények). Ezek a nehézségek, valamint a csak részleges neutropénia miatt a *Csf3r*^{-/-} mutáció csak korlátozottan alkalmas a neutrofil granulociták hiányának *in vivo* modellezésére.

4.4. A kontakt hiperszenzitivitás vizsgálata neutrofil-hiányos egértörzsekben

Az alábbi kísérletek alapja Felix Weber kollégám azon megfigyelése volt, mely szerint *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben jelentősen károsodott a kontakt hiperszenzitivitásnak (CHS), a humán allergiás kontakt dermatitisz *in vivo* állatmodelljének a kialakulása (ld. 8. ábra). Én egy későbbi fázisban csatlakoztam ehhez a projekthez, feladatom elsősorban az alapmegfigyelés háttérében levő folyamatok és ezekkel kapcsolatos további kérdések vizsgálata volt. Az alábbiakban néhány olyan kísérletet mutatok be, melyekben döntő hozzájárulásom volt. Ezekon túlmenően az itt nem bemutatott további közölt kísérletek jelentős részében is részt vettem.

4.4.1. A $Lyz2^{Cre/Cre}$ mutáció nem befolyásolja a CHS létrejöttét

A 8. ábrán bemutatott alapmegfigyelés szerint az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek jelentős mértékben védettek a CHS kialakulásával szemben. Mivel azonban az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ mutáció $Lyz2^{Cre/Cre}$ komponense a lizozim M-et kódoló $Lyz2$ gén funkcionális törlését eredményezi²⁴³, szeretnénk volna megvizsgálni a $Lyz2^{Cre/Cre}$ egerek válaszképességét is a CHS modellben. Amint a 28. ábrán látható, a $Lyz2^{Cre/Cre}$ mutáció nem befolyásolta a CHS kifejlődését ($p = 0,51$), jelezve, hogy az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek csökkent válaszáat nem a lizozim M hiánya eredményezi.



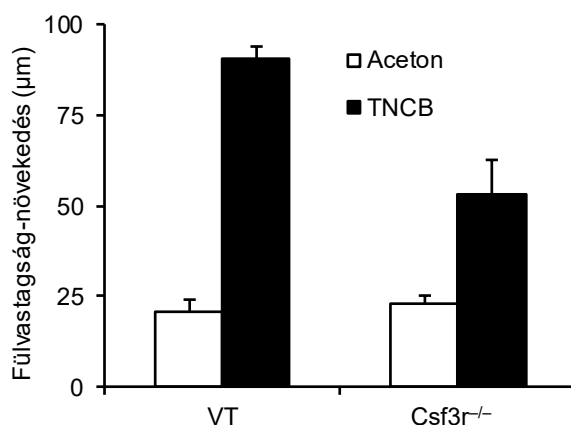
28. ábra: Kontakt hiperszenzitivitás vizsgálata $Lyz2^{Cre/Cre}$ egerekben.

Vad típusú (VT) és $Lyz2^{Cre/Cre}$ egereket az ábrafeliratnak megfelelően acetonnal vagy TNCB-vel szenzitizáltunk, majd 5 nappal később TNCB-vel váltottuk ki a fül gyulladósos választ, melyet a fülvastagság 24 órás emelkedésének meghatározásával követtünk. Az ábrán 3 független mérésből származó adatok átlagát (6 egér/kezelés/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.4.2. Kontakt hiperszenzitivitás a G-CSF-receptor hiányában

A neutrofil graulociták szerepét egy további neutropéniás egértörzs, a G-CSF-receptor-hiányos $Csf3r^{-/-}$ egerek segítségével is szeretnénk volna vizsgálni. Mivel ekkor még nem álltak rendelkezésünkre saját $Csf3r^{-/-}$ egerek, ezekhez a kísérletekhez olyan csontvelői kimérakat alkalmaztunk, amelyeket FVB/N genetikai háttérrel rendelkező G-CSF receptor hiányos egerekből²³¹ származó csontvelői sejtek letálisan besugarazott vad típusú FVB/N recipiensekbe történő transzplantációjával állítottunk elő. Az ilymódon

létrehozott kimérákban a vad típusú kimérákhoz képest 92%-kal csökkent a keringő neutrofil granulociták száma ($p = 1,67 \times 10^{-12}$). Amint a 29. ábrán látható, a G-CSF-receptor hiánya jelentősen, bár nem teljes mértékben csökkentette a kontakt hiperszenzitivitás kialakulását ($p = 0,0068$).



29. ábra: Kontakt hiperszenzitivitás vizsgálata *Csf3r*^{-/-} csontvelői kimérákban.

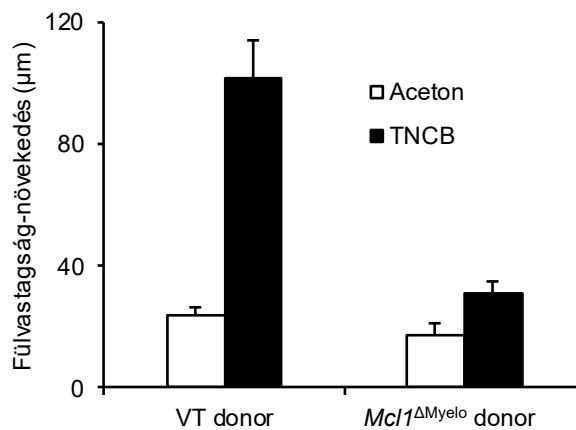
*Vad típusú (VT) és *Csf3r*^{-/-} csontvelői kimérákat az ábrafeliratnak megfelelően acetonnal vagy TNCB-vel szenzitizáltunk, majd 5 nappal később TNCB-vel váltottuk ki a fülgyulladásos választ, melyet a fülvastagság 24 órás emelkedésének meghatározásával követtünk. Az ábrán 3 független mérésből származó adatok átlagát (8 egér/kezelés/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.*

A 8. ábrával együtt a fenti megfigyelések együttesen az első genetikai bizonyítékot szolgáltatották a neutrofil granulociták funkcionális szerepére a kontakt hiperszenzitivitás létrejöttében, mind a C57BL/6, mind az FVB/N genetikai háttéren. A G-CSF-receptor hiányának kisebb mértékű hatása valószínűleg az állatok keringő PMN-számának kevésbé súlyos csökkenése miatt jött létre.

4.4.3. A neutrofil granulociták szerepe a CHS szenzitizációs fázisában

Az eddigi eredményeinket olyan kísérletekben nyertük, melyekben a szenzitizáció és az elicitáció ugyanazon egérben, tehát ugyanazon genetikai módosítás jelenlétében történt. A következő kísérletekben szeretnénk volna különválasztani a szenzitizáció és az elicitáció fázisához szükséges feltételeket, ezért a szenzitizáció utáni 5. napon

eltávolítottuk a szenzitizáció helyének megfelelő nyirokcsomókat, az azokból kinyert sejteket (elsősorban T-sejteket) egy másik egérbe injektáltuk, és ebben a második egérben váltottuk ki a CHS elicitációs fázisát. Az első ilyen kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a neutrofil granulociták hiánya a szenzitizációs fázis során befolyásolja-e az ezen egerekből származó T-sejtek közreműködésével vad típusú recipiensekben kialakuló gyulladással válasz létrejöttét. Amint a 30. ábrán látható, TNCB-vel szenzitizált vad típusú egerek nyirokcsomó-sejtjeinek injektálása után jelentős gyulladással válasz jött létre a recipiensekben az acetonnal szenzitizált egerek nyiroksejtjeit kapó kontroll egerekhez képest. Ezzel szemben alig jött létre emelkedett válasz akkor, amikor a szenzitizáció $Mcl1^{\Delta Myelo}$, tehát genetikailag neutrofil-hiányos donor egerekben történt ($p = 0,00025$).



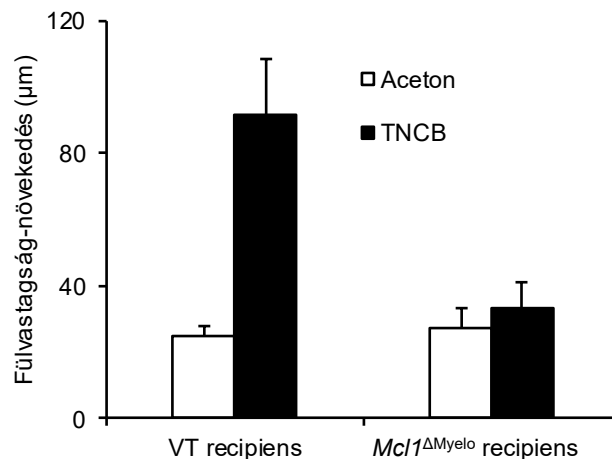
30. ábra: A neutrofil granulociták szerepe a kontakt hiperszenzitivitás szenzitizációs fázisában.

Vad típusú (VT) és $Mcl1^{\Delta Myelo}$ donor egereket az ábrafeliratnak megfelelően acetonnal vagy TNCB-vel szenzitizáltunk, majd 5 nappal később vad típusú recipiens egerekbe injektáltuk a szenzitizált donor egerek nyirokcsomósejtjeit. A recipiensekben ezután TNCB-vel váltottuk ki a fül gyulladással választ, melyet a fülvastagság 24 órás emelkedésének meghatározásával követtünk. Az ábrán 3 független mérésből származó adatok átlagát (9 egér/kezelés/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

4.4.4. A neutrofil granulociták szerepe a CHS elicitációs fázisában

Következő célunk a neutrofil granulociták szerepének vizsgálata volt a CHS elicitációs fázisában. Ennek érdekében vad típusú donor egereket TNCB-vel

szenzitizáltunk, majd a nyirokcsomói sejteket vad típusú vagy *Mcl1*^{ΔMyelo} recipiens egerekbe injektáltuk, melyekben TNCB-vel váltottuk ki a CHS elicitációs fázisát. Amint a 31. ábrán látható, a TNCB-vel szenzitizált donor sejtek részvételével jelentős CHS válasz jött létre vad típusú recipiensekben. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} recipiensekben azonban ugyanilyen körülmények között alig jött létre CHS válasz ($p = 0,029$), ami a neutrofil granulocitáknak az elicitációs fázisban való részvételére utal.



31. ábra: A neutrofil granulociták szerepe a kontakt hiperszenzitivitás elicitációs fázisában.

Vad típusú donor egereket az ábrafeliratnak megfelelően acetonnal vagy TNCB-vel szenzitizáltunk, majd 5 nappal később vad típusú (VT) és *Mcl1*^{ΔMyelo} recipiens egerekbe injektáltuk a szenzitizált donor egerek nyirokcsomósejtjeit. A recipiensekben ezután TNCB-vel váltottuk ki a fül gyulladásos válaszát, melyet a fülvastagság 24 órás emelkedésének meghatározásával követtünk. Az ábrán 3 független mérésből származó adatok átlagát (5-9 egér/kezelés/genotípus) és az átlag szórását (SEM) ábrázoltuk.

Fenti eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a kontakt hiperszenzitivitásnak mind a szenzitizációs, mind az elicitációs fázisában fontos szerepet játszanak a neutrofil granulociták.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Egy új neutrofil-hiányos egértörzs jellemzése

5.1.1. Problémafelvetés

Bár a neutrofil granulociták alapvető szerepet játszanak számos fiziológiás és kóros kórfolyamatban, *in vivo* szerepük vizsgálatának módszertana jelentős korlátoktól szenved. Ennek elsődleges oka az, hogy a PMN sejtek számának csökkentésére az értekezésben bemutatott kísérletek előtt rendelkezésre álló eszközöknek lényeges korlátai voltak. Míg a neutrofil-ellenes antitestek (RB6-8C5, NIMP-R14, 1A8) által létrehozott deplíciónak vannak bizonyos előnyei (könnyű hozzáférhetőség, hosszadalmas keresztezés nélkül is alkalmazható transzgénikus törzseken), ennek a megközelítésnek egyben számos korlátja is van (korlátozott specificitás és hatékonyság, nagyon magas reagensköltségek, átmeneti jellegű hatás). A korábban leírt genetikailag neutropéniás modelleknek^{22,130,168,178,182,187} szintén voltak az *in vivo* alkalmazhatóságot jelentősen korlátozó fenotípusai (ld. még a 1.2.2. fejezetben). A *Gfi1*-hiányos egerek a súlyos neutropénia mellett különféle T- és B-sejt-rendellenességeket mutattak és medián túlélési idejük kb. 8-10 hét volt^{22,182}. Ez összhangban van a domináns negatív *GFI1* mutációt hordozó beteg emberekben megfigyelhető súlyos neutropéniával és limfocita defektusokkal²⁰¹. A „Genista” egerek csak részleges neutrofil granulocita-hiányt mutattak, és nem voltak teljes mértékben védettek egy neutrofil-függő *in vivo* gyulladással szemben sem¹⁸⁷. A *G-CSF*¹⁷⁸ vagy a *G-CSF* receptor¹⁶⁸ hiánya csak mérsékelten csökkentette a keringő PMN-számot, és az utóbbi törzs tenyésztése is nehézségekbe ütközik. A *Foxo3a* transzkripciós faktor hiánya felgyorsítja a neutrofilek apoptózisát a gyulladás helyén, de nem befolyásolja a keringő neutrofil granulociták számát¹³⁰. A *Cxcr2* hiánya összetett fenotípust eredményez, melyben a neutropénia mellett a neutrofilek kemotaktikus vándorlása és esetleg más sejtvonalak működése is károsodott, ami megnehezíti az esetleges eredmények interpretációját¹⁹⁴.

Összességében elmondhatjuk, hogy kísérleteink kezdetekor nem állt rendelkezésre olyan egértörzs, melyben specifikusan és nagy hatékonysággal lehetett volna vizsgálni a neutrofil granulociták szerepét *in vivo* körülmények között.

5.1.2. Hatékonyság, validálás

Az értekezésben bemutatott kísérletek elsődleges célja az *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs, mint egy a korábbiaknál hatékonyabban alkalmazható neutrofil-hiányos modell jellemzése volt. Eredményeink azt mutatták, hogy az *Mcl1* gén mieloid-specifikus törlése súlyos neutrofil granulocita-hiányt (neutropéniát) eredményez ezekben az egerekben. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció hatására a keringő PMN-szám a normális érték kevesebb, mint 2%-ára csökkent, és az eredeti közleményben szereplő, de dolgozatomban nem bemutatott kísérletekben nagyon jelentős csökkenést figyeltünk meg egyes szöveti neutrofilek (csontvelő, lép) populációiban is. A neutropénia steril gyulladás során is fennmaradt, ami arra utal, hogy nem csak a nyugalmi, hanem a gyulladásos körülmények között is használható modellrendszerrel van dolgunk.

A PMN-szám csökkenésén túlmenően vizsgáltuk az *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs viselkedését feltételezhetően neutrofil granulocita-függő *in vivo* betegségmodellekben is. Ezen kísérletek elsődleges célja az *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs, mint az neutrofil granulociták különböző betegségfolyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára alkalmas *in vivo* neutropéniás egértörzs validálása volt. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek fokozottan érzékenyek mind a bakteriális (*S. aureus*), mind a gombák (*C. albicans*) általi fertőzésekkel szemben, ami a fertőzött egerek csökkent túlélésében, valamint az egyes szervekben megtelepedő kórokozók számának jelentős megemelkedésében volt nyomon követhető. A fertőzéses modellek mellett az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek az autoantitest-indukált artritisz, valamint (az eredeti közleményben szereplő, de értekezésemben nem bemutatott eredmények alapján) az autoantitest-indukált dermatitisz kialakulásában is teljesen védettek voltak. Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy az *in vivo* betegségmodellek vizsgálata megerősítette az *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs alkalmazhatóságát a neutrofil granulociták *in vivo* szerepének vizsgálatára.

5.1.3. Specificitás

Kísérleteink egyik fontos kérdése volt, hogy milyen mértékben befolyásolja az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció a neutrofil granulocitákon kívüli egyéb sejttípusok számát. Eredményeink azt mutatták, hogy az az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben nem változott érdemben a keringő monociták, eozinofilek, B- és T-sejtek száma. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció a fő monocita-szubpopulációk megoszlását sem befolyásolta számottevően. Nem publikált,

de dolgozatomban bemutatott eredmények szerint az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció a vér vörösvérsejtjeinek paramétereit sem befolyásolta. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek meglehetősen specifikus neutrofil-hiánnyal rendelkeznek.

A neutrofil-hiány specifikitása az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben két tényezőtől fakad. Ezek egyike az antiapoptotikus *Mcl1* gén deléciója mieloid vonalban, ami mind a neutrofil granulocitákban, mind a monocita-makrofág sejtekben leállítja az Mcl-1 fehérje szintézisét, viszont nem befolyásolja az Mcl-1 expresszióját a nem-mieloid (limfoid, eritroid, stb.) vonalakban. A másik fontos tényező az, hogy az Mcl-1 elengedhetetlen a neutrofil granulociták túléléséhez, de nem szükséges a monocita/makrofág sejtek túléléséhez^{107,112}. Ez a két tényező együttesen vezet ahhoz, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben hiányoznak a PMN sejtek, de nem károsodott a monocita/makrofág vonal. Utóbbit az *Mcl1*^{ΔMyelo} csontvelő sejtektől *in vitro* differenciáltatott makrofágoknak az eredeti közleményben szereplő, de dolgozatomban nem bemutatott normál száma és általános megjelenése is jelzi, annak ellenére, hogy az *Mcl1* gén vizsgálata hatékony deléciót mutat ezekben a sejtekben.

Bár az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció meglehetősen specifikusnak bizonyult a neutrofilek vonatkozásában, következetesen megfigyeltük a B-sejtek számának csökkenését az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek csontvelőjében. Ennek a megállapításnak a fontossága jelenleg nem egyértelmű, különös tekintettel a normális keringő és lépbeli B-sejtszámra. A B-sejteknek az eredeti közleményben bemutatott, de dolgozatomban nem szereplő részletesebb elemzése rámutatott arra, hogy a recirkuláló B-sejtek száma is csökken az *Mcl1*^{ΔMyelo} állatok csontvelőjében. Ez arra utal, hogy zavart szenved a csontvelői B-sejtkompartment. Jelenleg nem tudjuk kizárni, hogy ezt a megfigyelést a LysM-nek a korai B-sejtvonalban való expressziója okozza, amint azt az ImmGen adatbázis (www.immgen.org) is jelzi. Azt is fontos megjegyezni, hogy a lépben levő makrofágok száma megemelkedett az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben, ami kapcsolatban lehet az ezekben az állatokban megfigyelhető lépmegnagyobbodással.

5.1.4. Mechanizmus

Bár az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció mind a perifériás vérben, mind a különféle szövetekben súlyos neutropeniát okoz, jelenleg azonban még nem teljesen világos, hogy a mutáció mely szakaszában zavarja meg a neutrofil granulociták fejlődését és/vagy túlélését.

Feltételezésünk szerint az Mcl-1 hiánya a neutrofilek spontán apoptotikus programjának az aktiválódását és ezáltal a sejtek elhalását eredményezi. Mivel a csontvelőben nem csökken a Ly6G^{med/dim} sejtek száma, feltételezzük, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció a neutrofil granulociták fejlődésének késői fázisában érinti a sejteket. Ezt támasztják alá munkacsoportunk nem publikált eredményei, melyek szerint HoxB8 által transzdukált vad típusú mieloid progenitorok nem képesek benépesíteni az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek csontvelejét, ami arra utal, hogy a mieloid progenitor „niche”-t az állatok endogén sejtjei foglalják el. Nem tudjuk továbbá, hogy a feltételezett apoptotikus sejtelhalás után hol történik az apoptotikus PMN sejtek eltávolítása. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben megfigyelhető lépmegnagyobbodás felveti annak a lehetőségét, hogy a feltételezhetően nagy mennyiségben keletkező apoptotikus neutrofil granulociták további feldolgozása a lépben történik (bár a lépmegnagyobbodás hiánya az *Mcl1*^{ΔPMN} egerekben egyéb szempontok szerepére is utalhat).

5.1.5. A felhasználhatóság szempontjai

Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek jelentőségét részben a korábbi modelleknél könnyebb felhasználhatóság adja. Kísérleteink azt mutatják, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek a súlyos neutropénia ellenére is túlélnek és homozigóta formában is szaporodnak. Ezek az egerek ezért rendkívül hasznosak lehetnek a neutrofil granulociták *in vivo* folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatában, mivel egyéb beavatkozások és további költségek nélkül is hosszantartó, súlyos és specifikus neutropénia figyelhető meg bennük. A felhasználhatóság szempontjából kiemelten fontos, hogy az egerek homozigóta formában szaporodnak, mert így az *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs minimális munkaerő-ráfordítással (az egerek egyedi genotipizálása nélkül) is fenntartható.

A felhasználhatóság fenti szempontjai különösen szembeötlőek a fentebb említett egyéb genetikai és farmakológiai modellekkel szemben. Más modellek esetében jelentős reagens-költségek (depletáló antitestek) keletkeznek, vagy a heterozigóta fenntartás igénye miatt megnövekedett munkaerő-ráfordítást igényel az egértörzs szaporítása és genotipizálása. Az egyéb szakmai szempontok (hatékonyság, specificitás) mellett véleményünk szerint ezek a tulajdonságok is az *Mcl1*^{ΔMyelo} egértörzs előnyét mutatják a többi neutrofil-hiányos egértörzssel szemben.

5.1.6. Egyéb közlemények ugyanezzel az egértörzssel

Az értekezésem nagy részének alapját jelentő közlemény az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek első részletes jellemzése és kísérletes neutropénia-modellként történő validálása. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy az Mcl-1 mieloid-specifikus sejtörlésének hatásait korábban mások is vizsgálták^{107,225}. Eredményeink összhangban állnak ezekkel a korábbi eredményekkel, ugyanakkor jelentős mértékben ki is egészítik azok következtetéseit, egyrészt a neutropénia mértékének és specificitásának, másrészt az egerek túlélésének és szaporodásának, harmadrészt az egerek fertőzőes és gyulladásos betegségmodellekben való viselkedésének vizsgálatával. Korábban (a részletes jellemzés publikálása előtt) mi magunk is használtuk már az *Mcl1*^{ΔMyelo} egereket a neutrofil granulociták szerepének tesztelésére különféle egyéb betegségmodellekben, például a graft versus host betegségben²⁴⁴, a kontakt hiperszenzitivitás vizsgálatában²²⁵, valamint kísérletes köszvény²⁴⁵ és lupus²⁴⁶ modellekben. Mindezek összességében megerősítették e modell hasznosságát a neutrofil granulociták funkcióinak *in vivo* vizsgálatában.

5.1.7. Más modellek vizsgálata és összehasonlítása

Az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció jellemzése mellett megvizsgáltuk az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlésének hatását és összevetettük a két egértörzs jellemzőit egy harmadik, korábban mások által alkalmazott neutrofil-hiányos egértörzs, a G-CSF-receptor-hiányos *Csf3r*^{-/-} egértörzs jellemzőivel is.

Részletesen vizsgáltuk az *Mcl1*^{ΔPMN} egereket, amelyekben az *Mcl1* delécióját az MRP8-Cre transzgen hozza létre, amely specifikusabb a neutrofil granulocitákra, mint a *Lyz2*^{Cre} knock-in mutáció²⁴⁰. Bár az *Mcl1*^{ΔPMN} mutáció szintén drámai mértékben csökkentette a keringő neutrofilek számát és az egyéb fehérvérsejt-típusok vizsgálata alapján az elváltozás lényegében neutrofil-specifikusnak tűnik, ezen egerek korlátozott túlélése és rossz tenyésztése miatt nagyon nehéz őket *in vivo* neutropénia modellként használni. Bár jelenleg nem világos, hogy miért rendelkeznek az *Mcl1*^{ΔMyelo} és az *Mcl1*^{ΔPMN} egerek eltérő túlélési és tenyésztési jellemzőkkel, az egyik lehetséges magyarázat az, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben fennmaradó kb. 2% neutrofil granulocita elegendő a kommenzális flóra felügyeletéhez, az *Mcl1*^{ΔPMN} mutánsokban ennek a sejtszámnak csak kb. felét (kb. 1%) találtuk, ami nem éri el a normális túléléshez szükséges PMN sejtszámot. Elméletileg lehetséges lenne, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek

túlélése valamilyen genetikai sodródás következménye az egérkolóniánkban, tehát kiszelektálódott egy a neutrofil-hiányt jobban toleráló genetikai háttér. A tenyésztés során azonban fokozottan ügyeltünk ennek a lehetőségnek az elkerülésére, és részben pont emiatt tenyésztettük az egereinket heterozigóta formában. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} és *Mcl1*^{ΔPMN} egerek eltérő túlélése mögötti mechanizmusok feltárása további jelentős kísérleteket igényel, beleértve az apoptózisnak és a progenitorok *in vitro* differenciálódásának/proliferációjának a vizsgálatát.

A fentiek mellett megvizsgáltuk a G-CSF-receptor-hiányos *Csf3r*^{-/-} egértörzset is. Eredményeink szerint a *Csf3r*^{-/-} mutáció csak részleges neutropéniát eredményez, ami sokkal kevésbé súlyos az *Mcl1*^{ΔMyelo} és *Mcl1*^{ΔPMN} egerekben megfigyelhető neutrofil-hiánynál. A *Csf3r*^{-/-} mutáció az *Mcl1*^{ΔMyelo} és *Mcl1*^{ΔPMN} mutációkhoz hasonlóan lényegében specifikus a neutrofil granulocitákra. Érdekes módon a *Csf3r*^{-/-} egerek is nagyrészt védettek az autoantitest-indukált artritisszel szemben, ami arra utal, hogy a PMN sejtek számának részleges csökkenése is elég az artritist kiváltó folyamatok felfüggesztéséhez. Érdekes módon a részleges neutrofil-hiány ellenére a *Csf3r*^{-/-} egerek csak heterozigóta formában tarthatók fenn, ami egyrészt egyéb G-CSF-függő folyamatok jelentőségére utal, másrészt ismét hangsúlyozza az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek homozigóta formában történő tenyészthetőségének a jelentőségét.

Kísérleteinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció egerekben súlyos és specifikus neutropéniát eredményez, ami a fertőzések elleni fokozott érzékenységben és az autoantitest-indukált gyulladásos betegségek elleni védettségben is megnyilvánul, ugyanakkor nem akadályozza az egerek túlélését és szaporodási képességét. A súlyos és meglehetősen specifikus neutropénia, a nagyrészt normális túlélés és a homozigóta formában történő fenntartás lehetősége együttesen nagyon alkalmassá teszi az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutációt a neutrofil granulociták szerepének elemzésére a kísérleti egerek normál és kóros folyamatainak *in vivo* modelleiben. Eredményeink azt is jelzik, hogy a rágcsálók a keringő neutrofilszám drámai csökkenése ellenére is képesek a lényegében normális túlélésre és szaporodásra. Ezek alapján esetleg szükséges lehet újraértékelni a neutrofil granulocitáknak a rágcsálók túlélésében és általános egészségi állapotában betöltött szerepét.

5.2. A neutrofil granulociták szerepe a kontakt hiperszenzitivitás kialakulásában

Dolgozatom második részében a neutrofilek szerepét vizsgáltam a kontakt hiperszenzitivitás (CHS; a humán allergiás kontakt dermatitisz állatmodellje) kialakulásában. A dolgozatom bevezetőjében bemutatott eredmények szerint az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek védettek voltak a CHS kialakulásával szemben. Saját eredményeim azt mutatták, hogy a *Csf3r*^{-/-} mutáció szintén akadályozza a CHS kialakulását. Emellett azt is kimutattam, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció *Lyz2*^{Cre/Cre} komponense, nem befolyásolja a CHS létrejöttét. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a károsodott választ nem a lizozim M, hanem a neutrofil granulociták hiánya okozza.

Ezek az eredmények összességében a PMN sejtek szerepére utaltak a CHS patogenezise során.

További kísérleteimben T-sejtek adoptív transzferével vizsgáltam a neutrofil granulociták szerepét a CHS kialakulásában. Ezen kísérletekben a szenzitizációs fázis után izoláltuk az érintett nyirokcsomók T-sejtjeit, majd azokat recipiens állatba injektálva próbáltuk kiváltani a CHS elicitációs fázisát. Ily módon lehetségessé vált a szenzitizáció és az elicitáció celluláris és molekuláris folyamatainak külön-külön való vizsgálata.

Eredményeink azt mutatták, hogy akkor is csökkent a CHS válasz, ha csak a szenzitizációt végeztük a neutrofil-hiányos *Mcl1*^{ΔMyelo} (donor) egerekben, illetve akkor is, ha csak az elicitáció történt *Mcl1*^{ΔMyelo} (recipiens) egerekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a neutrofil granulociták mind a CHS szenzitizációs, mind annak elicitációs fázisához szükségesek.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az egereknek az elicitáció előtti anti-Gr-1 (RB6-8C5) ellenanyaggal történő kezelése gátolta a CHS-választ, jelezve a Gr-1-pozitív sejtek (feltételezhetően neutrofilek) fontos szerepét a CHS elicitációs fázisában²²³. Ezek összhangban voltak a saját kísérleti eredményeinkkel, melyek szerint csökkent a CHS válasz, ha a vad típusú egerek szenzitizációját követően azok T-sejtjeit *Mcl1*^{ΔMyelo} recipiens egerekbe injektáltuk és ezekben az egerekben végeztük az elicitációs kezelést.

Meglepő volt ugyanakkor az ellenkező irányú kísérlet, melyben *Mcl1*^{ΔMyelo} donor egerekben végeztük a szenzitizációt, majd az ezekből nyert T-sejteket vad típusú egerekbe injektáltuk, és ezekben indukáltuk az elicitációs fázist. Mivel az *Mcl1*^{ΔMyelo} donor T-sejtekkel „szenzitizált” recipiensek válasza alig különbözött a nem-szenzitizált állatok választától, kísérleteink a neutrofil granulociták szerepére utaltak a CHS

szenitizációs fázisában. Ez egyben azt jelentette, hogy feltételezéseink szerint a neutrofilek fontos szerepet játszanak az adaptív immunfolyamatok korai lépéseinek a létrejöttében, ami teljesen ellentmondott a neutrofilekről korábban alkotott képnek, mely szerint ezek a sejtek csak, mint az adaptív immunrendszer végrehajtó sejtei vesznek részt az immunfolyamat hierarchiájának alsóbb, későbbi részeiben.

Fenti eredményeink tehát a neutrofil granulociták működésének egy különleges további aspektusára, az adaptív immunfolyamatok korai lépéseihez való hozzájárulásukra hívták fel a figyelmet.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A célkitűzéseim alapján a következtetéseimet az alábbi 4 pontban foglalom össze.

1. Az Mcl-1 antiapoptotikus fehérje mieloid-specifikus törlése ($Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek) nagymértékben (98,1%-kal) csökkentette a neutrofil granulociták számát a perifériás vérben és steril gyulladásos körülmények között a tioglikolát-indukált peritonitisz modellben. Ezzel szemben az egyéb leukocita populációk száma nem, vagy csak alig változott az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekben. A nagyfokú neutropénia ellenére az egerek túlélnek az SPF, valamint konvencionális körülmények között is, emellett homozigóta formában is szaporodnak. Bár tömegük kis mértékben csökkent a vad típushoz képest, mégsem tértek el általános megjelenésükben az alomtestvér kontroll állatoktól. $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerek védettnek bizonyultak az általunk vizsgált neutrofil-függő K/B×N szérumsztransfer artritisszel szemben. Az állatok nagyfokú érzékenységet mutattak a mind a bakteriális (*S. aureus*), mind a gombák (*C. albicans*) általi fertőzésekkel szemben, mely magas mortalitásban és a vizsgált szervekben megtelepedő kórokozók számának jelentős megemelkedésében volt nyomon követhető.
2. Az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése ($Mcl1^{\Delta PMN}$ egerek) nagyfokú neutropéniát eredményezett a perifériás vérben, emellett egyéb leukocita populációk számában nem történt változás a vad típushoz képest. Az egerek magas mortalitást és csökkent termékenységet mutattak, általános megjelenésükben elmaradtak a kontroll állatokhoz képest.
3. A G-CSF-receptor hiányában csak részlegesen csökkent a neutrofil granulociták száma és más leukocita populációkban nem történt változás. A részleges csökkenés a PMN sejtek számában elengedő volt ahhoz, hogy a G-CSF-receptor-hiányos állatok védettséget élvezzenek autoantitest-indukált artritisszel szemben.
4. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a neutrofil granulociták a kontakt hiperszenzitivitás (CHS) mindkét fázisához (szenzitiváció és elicitáció) szükségesek. Emellett igazoltuk, hogy az $Mcl1^{\Delta Myelo}$ egerekben a gyulladásos választ nem a lizozim M, hanem a neutrofil granulociták hiánya okozza, mivel a $Lyz2^{Cre/Cre}$ mutáns egerekben a vad típushoz hasonló gyulladásos válasz jött létre a CHS modellben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A neutrofil granulociták (neutrofilek) a veleszületett immunrendszer részét képezik, nélkülözhetetlenek a bakteriális és gombás fertőzések elleni védekezésben. Kiemelkedő jelentőségük ellenére korábban nem létezett a neutrofilek *in vivo* szerepének vizsgálatára alkalmas neutrofil-hiányos egérmodell. PhD-munkám során részletesen jellemeztem egy új neutrofil-hiányos egértörzset, és vizsgáltam a neutrofilek gyulladásoos betegségmodellekben betöltött szerepét.

Első kísérleteim során kimutattam, hogy az Mcl-1 antiapoptotikus fehérje mielod-specifikus törlésének (*Mcl1*^{ΔMyelo} mutáció) következtében nagymértékben csökkent a keringő neutrofilek száma, miközben lényegében nem változott az egyéb fehérvérsejt-típusok száma. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek közel normális túlélést mutattak, és képesek voltak homozigóta formában is szaporodni. A neutropénia funkcionális jelentőségét megerősítette, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek védettnek bizonyultak a neutrofil-függő K/B×N szérum-transzfer artritisz modellben. Ahogy az várható volt, az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek fokozott érzékenységet mutattak a *Staphylococcus aureus*, illetve *Candida albicans* okozta szisztémás fertőzések esetén.

További kísérleteim során azt találtam, hogy az Mcl-1 neutrofil-specifikus deléciója (*Mcl1*^{ΔPMN} mutáció) szintén súlyos és specifikus neutropéniához vezet. Ezeknek az egereknek a túlélése és a szaporodása azonban nagymértékben csökkent, ezzel korlátozva neutrofil-hiányos egérmodellként való alkalmazásukat. Összehasonlításképpen a G-CSF receptor-hiányos (*Csf3r*^{-/-}) egerekben csak részleges neutrofil-hiány volt megfigyelhető.

Végül vizsgáltam a neutrofilek szerepét a kontakt hiperszenzitivitás (CHS) létrejöttében. Az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerek és az allergén-specifikus T-sejtek adoptív transzfere révén kimutattam, hogy a neutrofilek a CHS szenzitivizációs és elicitációs fázisában is részt vesznek. Emellett kimutattam, hogy a *Lyz2*^{Cre/Cre} mutáció nem befolyásolja a CHS kialakulását, mely azt jelzi, hogy a károsodott választ nem a lizozim M hiánya okozza.

Eredményeim azt mutatják, hogy az *Mcl1*^{ΔMyelo} egerekben létrejött súlyos és meglehetősen specifikus neutropénia, a normál túlélés és a homozigóta formában történő tenyésztés lehetősége miatt ez a mutáció rendkívül alkalmas a neutrofil granulociták szerepének vizsgálatára normál és patológiás *in vivo* egérmodellekben.

8. SUMMARY

Neutrophils are part of the innate immune system and are essential players during bacterial and fungal infections. Despite their major importance, there were no suitable neutrophil-deficient mouse model for the *in vivo* analysis of neutrophil function. During my PhD work, I characterized a novel neutrophil-deficient mouse strain and investigated the role of neutrophils in inflammatory disease models.

During my first experiments, I showed that myeloid-specific deletion of the antiapoptotic Mcl-1 protein (*Mcl1*^{ΔMyelo} mutation) led to severe and specific reduction of circulating neutrophil counts without affecting other circulating leukocyte lineages. *Mcl1*^{ΔMyelo} mice showed mostly normal survival and were able to breed in homozygous form. The functional relevance of neutropenia was confirmed by the complete protection of *Mcl1*^{ΔMyelo} mice from arthritis development in the neutrophil-dependent K/B×N serum-transfer model. As expected, *Mcl1*^{ΔMyelo} mice showed increased susceptibility to systemic *Staphylococcus aureus* or *Candida albicans* infection.

In my further experiments, I found that the neutrophil-specific deletion of Mcl-1 (*Mcl1*^{ΔPMN} mutation) also led to severe and specific neutropenia. However, those mice showed strongly reduced survival and breeding, limiting their use as a model of neutrophil deficiency. In comparison, G-CSF receptor-deficient (*Csf3r*^{-/-}) mice showed only a partial neutropenia.

Finally, I tested the role of neutrophils in contact hypersensitivity (CHS), an animal model of human allergic contact dermatitis. Using *Mcl1*^{ΔMyelo} mice and adoptive transfer of allergen-specific T-cells, I showed that neutrophils are critically involved in both the sensitization and elicitation phase of CHS. In addition, I showed that the *Lyz2*^{Cre/Cre} mutation did not affect CHS development, indicating that the defective response in *Mcl1*^{ΔMyelo} mice is not caused by the lack of lysozyme M.

My results indicate that the severe and fairly specific neutropenia, mostly normal survival, and the possibility of breeding in homozygous form make the *Mcl1*^{ΔMyelo} mutation highly suitable for the analysis of the role of neutrophils in *in vivo* models of normal and pathological processes in experimental mice.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Spanopoulou E. (1996) Cellular and molecular analysis of lymphoid development using Rag-deficient mice. *Int Rev Immunol*, 13: 257-288.
2. Fukuda T, Asou E, Nogi K, Goto K. (2017) Evaluation of mouse red blood cell and platelet counting with an automated hematology analyzer. *J Vet Med Sci*, 79: 1707-1711.
3. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33: 657-670.
4. Mocsai A. (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 210: 1283-1299.
5. Nemeth T, Mocsai A. (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett*, 143: 9-19.
6. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11: 519-531.
7. Doring Y, Drechsler M, Soehnlein O, Weber C. (2015) Neutrophils in atherosclerosis: from mice to man. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35: 288-295.
8. Carbone F, Nencioni A, Mach F, Vuilleumier N, Montecucco F. (2013) Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 110: 501-514.
9. Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR. (2015) Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35: 888-901.
10. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC, Cooper MA. (2013) Neutrophils--a key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 40: 463-470.
11. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. (2012) Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*, 18: 1407-1412.
12. Geddings JE, Mackman N. (2014) New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*, 111: 570-574.

13. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, Shimizu T, Dameron M, Bruhns P. (2011) Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*, 121: 1484-1496.
14. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. (2016) Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*, 16: 431-446.
15. Baik SH, Cha MY, Hyun YM, Cho H, Hamza B, Kim DK, Han SH, Choi H, Kim KH, Moon M, Lee J, Kim M, Irimia D, Mook-Jung I. (2014) Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*, 35: 1286-1292.
16. Stock AJ, Kasus-Jacobi A, Pereira HA. (2018) The role of neutrophil granule proteins in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 15: 240.
17. Smith JA. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*, 56: 672-686.
18. Kaplan MJ, Radic M. (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*, 189: 2689-2695.
19. Rosales C. (2018) Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*, 9: 113.
20. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, Sieow JL, Penny HL, Ching GC, Devi S, Adrover JM, Li JLY, Liong KH, Tan L, Poon Z, Foo S, Chua JW, Su IH, Balabanian K, Bachelier F, Biswas SK, Larbi A, Hwang WYK, Madan V, Koeffler HP, Wong SC, Newell EW, Hidalgo A, Ginhoux F, Ng LG. (2018) Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity*, 48: 364-379 e368.
21. Németh T, Sperandio M, Mócsai A. (2020) Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 19: 253-275.
22. Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, Duhrsen U, Moroy T. (2002) Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet*, 30: 295-300.
23. Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R, Gantner BN, Dinner AR, Singh H. (2006) Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, 126: 755-766.

24. Ley K, Hoffman HM, Kubes P, Cassatella MA, Zychlinsky A, Hedrick CC, Catz SD. (2018) Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol*, 3.
25. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. (2013) Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*, 70: 3813-3827.
26. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22: 285-294.
27. Ley K, Smith E, Stark MA. (2006) IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res*, 34: 229-242.
28. von Vietinghoff S, Ley K. (2009) IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol*, 183: 865-873.
29. Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK. (2000) Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol*, 164: 4783-4789.
30. Manz MG, Boettcher S. (2014) Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*, 14: 302-314.
31. Lapidot T, Kollet O. (2002) The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*, 16: 1992-2003.
32. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. (2009) CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*, 113: 4711-4719.
33. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. (2010) CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*, 120: 2423-2431.
34. Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. (2009) Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood*, 114: 1331-1339.
35. Kovács M, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Z, Lowell CA, Mócsai 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.

36. Tecchio C, Cassatella MA. (2016) Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol*, 28: 119-128.

37. Kolaczkowska E, Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13: 159-175.

38. Mócsai A. (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 210: 1283-1299.

39. Powell D, Lou M, Barros Becker F, Huttenlocher A. (2018) Cxcr1 mediates recruitment of neutrophils and supports proliferation of tumor-initiating astrocytes in vivo. *Sci Rep*, 8: 13285.

40. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7: 678-689.

41. Woodfin A, Reichel CA, Khandoga A, Corada M, Voisin MB, Scheiermann C, Haskard DO, Dejana E, Krombach F, Nourshargh S. (2007) JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood*, 110: 1848-1856.

42. Voisin MB, Nourshargh S. (2013) Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun*, 5: 336-347.

43. Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. (2002) Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol*, 9: 30-35.

44. Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, Lee DM. (2006) Neutrophil-derived leukotriene B₄ is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med*, 203: 837-842.

45. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci*, 58: 978-989.

46. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*, 32: 452-460.

47. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, 17: 638-650.

48. Németh T, Mócsai A. (2016) Feedback amplification of neutrophil function. *Trends Immunol*, 37: 412-424.
49. Lammermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmuller W, Parent CA, Germain RN. (2013) Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, 498: 371-375.
50. Kienle K, Lammermann T. (2016) Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. *Immunol Rev*, 273: 76-93.
51. 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.
52. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA, Nourshargh S. (2011) The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol*, 12: 761-769.
53. Nourshargh S, Renshaw SA, Imhof BA. (2016) Reverse migration of neutrophils: Where, when, how, and why? *Trends Immunol*, 37: 273-286.
54. Ligeti E, Mócsai A. (1999) Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochem Pharmacol*, 57: 1209-1214.
55. Rorvig S, Ostergaard O, Heegaard NH, Borregaard N. (2013) Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J Leukoc Biol*, 94: 711-721.
56. Borregaard N, Cowland JB. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89: 3503-3521.
57. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28: 340-345.
58. Robinson JM. (2009) Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol*, 131: 465-469.
59. Segal AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23: 197-223.
60. Rada B, Hably C, Meczner A, Timar C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E. (2008) Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol*, 30: 237-253.
61. Rada B, Leto TL. (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol*, 15: 164-187.

62. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med*, 343: 1703-1714.
63. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-1535.
64. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*, 18: 581-588.
65. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M. (2016) New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front Immunol*, 7: 302.
66. Daniel C, Leppkes M, Munoz LE, Schley G, Schett G, Herrmann M. (2019) Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nat Rev Nephrol*, 15: 559-575.
67. Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-518.
68. Benito-Martin A, Di Giannatale A, Ceder S, Peinado H. (2015) The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol*, 6: 66.
69. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. (2016) Neutrophil-derived exosomes: A new mechanism contributing to airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 55: 450-461.
70. 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: 243-257.
71. Eken C, Sadallah S, Martin PJ, Treves S, Schifferli JA. (2013) Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 218: 382-392.
72. Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE, Tacchini-Cottier F. (2010) Neutrophil-derived CCL3 is essential for the

rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*, 6: e1000755.

73. Bennouna S, Denkers EY. (2005) Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. *J Immunol*, 174: 4845-4851.

74. van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med*, 201: 1281-1292.

75. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S. (2006) Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 79: 977-988.

76. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. (2011) Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*, 23: 317-326.

77. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, Magri G, Knowles DM, Tam W, Chiu A, Bussel JB, Serrano S, Lorente JA, Bellosillo B, Lloreta J, Juanpere N, Alameda F, Baro T, de Heredia CD, Toran N, Catala A, Torreadell M, Fortuny C, Cusi V, Carreras C, Diaz GA, Blander JM, Farber CM, Silvestri G, Cunningham-Rundles C, Calvillo M, Dufour C, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A, Casanova JL, Ganal SC, Diefenbach A, Arostegui JI, Juan M, Yague J, Mahlaoui N, Donadieu J, Chen K, Cerutti A. (2011) B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*, 13: 170-180.

78. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 40: 315-327.

79. Dincey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, 58: 705-715.

80. Basu S, Dunn A, Ward A. (2002) G-CSF: function and modes of action (Review). *Int J Mol Med*, 10: 3-10.

81. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*, 94: 595-601.
82. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. (2010) In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116: 625-627.
83. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. (2003) Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 19: 583-593.
84. Luo HR, Loison F. (2008) Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol*, 83: 288-295.
85. Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. (2003) Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *J Biol Chem*, 278: 28443-28454.
86. Mayadas TN, Cullere X. (2005) Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol*, 26: 388-395.
87. Kanayama A, Miyamoto Y. (2007) Apoptosis triggered by phagocytosis-related oxidative stress through FLIPS down-regulation and JNK activation. *J Leukoc Biol*, 82: 1344-1352.
88. Marsden VS, Strasser A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol*, 21: 71-105.
89. Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. (2005) The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res*, 15: 749-769.
90. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 3516-3520.
91. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. (2010) Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett*, 584: 2981-2989.
92. Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, Korsmeyer SJ. (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev*, 14: 23-27.

93. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 426: 671-676.
94. Arbour N, Vanderluit JL, Le Grand JN, Jahani-Asl A, Ruzhynsky VA, Cheung EC, Kelly MA, MacKenzie AE, Park DS, Opferman JT, Slack RS. (2008) Mcl-1 is a key regulator of apoptosis during CNS development and after DNA damage. *J Neurosci*, 28: 6068-6078.
95. Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, Korsmeyer SJ. (2005) Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, 307: 1101-1104.
96. Liu H, Eksarko P, Temkin V, Haines GK, 3rd, Perlman H, Koch AE, Thimmapaya B, Pope RM. (2005) Mcl-1 is essential for the survival of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 175: 8337-8345.
97. Hsu SY, Lin P, Hsueh AJ. (1998) BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol*, 12: 1432-1440.
98. Leu JJ, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, 6: 443-450.
99. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gomez G, Brady HJ. (2006) Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 281: 5750-5759.
100. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. (1999) The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol*, 19: 6195-6206.
101. Huang HM, Huang CJ, Yen JJ. (2000) Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood*, 96: 1764-1771.
102. Jourdan M, De Vos J, Mechti N, Klein B. (2000) Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death Differ*, 7: 1244-1252.

103. Chao JR, Wang JM, Lee SF, Peng HW, Lin YH, Chou CH, Li JC, Huang HM, Chou CK, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. (1998) *mcl-1* is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol*, 18: 4883-4898.
104. Leu CM, Chang C, Hu C. (2000) Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing *mcl-1* via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*, 19: 1665-1675.
105. Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, Kumar S, Raje N, Richardson PG, Harousseau JL, Anderson KC. (2004) VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood*, 104: 2886-2892.
106. Villunger A, Scott C, Bouillet P, Strasser A. (2003) Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. *Blood*, 101: 2393-2400.
107. Dzhagalov I, St John A, He YW. (2007) The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood*, 109: 1620-1626.
108. Milot E, Filep JG. (2011) Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *ScientificWorldJournal*, 11: 1948-1962.
109. Altnauer F, Conus S, Cavalli A, Folkers G, Simon HU. (2004) Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J Biol Chem*, 279: 5947-5957.
110. Hamasaki A, Sendo F, Nakayama K, Ishida N, Negishi I, Nakayama K, Hatakeyama S. (1998) Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the *bcl-2*-related A1 gene. *J Exp Med*, 188: 1985-1992.
111. Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR, Edwards SW. (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol*, 70: 783-792.
112. Steimer DA, Boyd K, Takeuchi O, Fisher JK, Zambetti GP, Opferman JT. (2009) Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood*, 113: 2805-2815.
113. Lee DM, Weinblatt ME. (2001) Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 358: 903-911.
114. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. (2009) Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 373: 659-672.

115. McInnes IB, Schett G. (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365: 2205-2219.
116. Cooles FA, Isaacs JD. (2011) Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 23: 233-240.
117. Kinne RW, Stuhlmuller B, Burmester GR. (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther*, 9: 224.
118. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. (1984) Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 27: 845-851.
119. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*, 327: 580-583.
120. Mohr W, Westerhellweg H, Wessinghage D. (1981) Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. an electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 40: 396-399.
121. Edwards SW, Hallett MB. (1997) Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today*, 18: 320-324.
122. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. (2010) Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 49: 1618-1631.
123. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. (2007) Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*, 2: 1269-1275.
124. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. (1996) Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*, 87: 811-822.
125. Nandakumar KS, Holmdahl R. (2007) Collagen antibody induced arthritis. *Methods Mol Med*, 136: 215-223.
126. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*, 10: 4025-4031.
127. Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, Wicks IP. (2004) Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 11398-11403.

128. Wipke BT, Allen PM. (2001) Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 167: 1601-1608.
129. Monach PA, Nigrovic PA, Chen M, Hock H, Lee DM, Benoist C, Mathis D. (2010) Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis: critical producers of Fc receptor γ , the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1. *Arthritis Rheum*, 62: 753-764.
130. Jonsson H, Allen P, Peng SL. (2005) Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat Med*, 11: 666-671.
131. Stackowicz J, Jonsson F, Reber LL. (2019) Mouse Models and Tools for the in vivo Study of Neutrophils. *Front Immunol*, 10: 3130.
132. Colvin OM. (1999) An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr Pharm Des*, 5: 555-560.
133. Hengstler JG, Hengst A, Fuchs J, Tanner B, Pohl J, Oesch F. (1997) Induction of DNA crosslinks and DNA strand lesions by cyclophosphamide after activation by cytochrome P450 2B1. *Mutat Res*, 373: 215-223.
134. Manepalli S, Gandhi JA, Ekhar VV, Asplund MB, Coelho C, Martinez LR. (2013) Characterization of a cyclophosphamide-induced murine model of immunosuppression to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *J Med Microbiol*, 62: 1747-1754.
135. Hellman S, Grate HE. (1971) Effect of cyclophosphamide on the murine hematopoietic stem cell compartment as measured by different assay techniques. *Blood*, 38: 706-714.
136. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. (2006) Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis*, 6: 55.
137. Katkar GD, Sundaram MS, NaveenKumar SK, Swethakumar B, Sharma RD, Paul M, Vishalakshi GJ, Devaraja S, Girish KS, Kemparaju K. (2016) NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. *Nat Commun*, 7: 11361.
138. Stackowicz J, Balbino B, Todorova B, Godon O, Iannascoli B, Jonsson F, Bruhns P, Reber LL. (2018) Evidence that neutrophils do not promote *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. *Nat Commun*, 9: 2304.

139. Radford JA, Knight RK, Rubens RD. (1985) Mitomycin C and vinblastine in the treatment of advanced breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 21: 1475-1477.
140. Gigant B, Wang C, Ravelli RB, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, Sobel A, Knossow M. (2005) Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, 435: 519-522.
141. Jordan MA, Thrower D, Wilson L. (1992) Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci*, 102 (Pt 3): 401-416.
142. Looney MR, Su X, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA. (2006) Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*, 116: 1615-1623.
143. Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. (1997) Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol*, 120: 1075-1082.
144. Nevalainen TJ. (1975) Cytotoxicity of vinblastine and vincristine to pancreatic acinar cells. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 18: 119-127.
145. Jagetia GC, Krishnamurthy H, Jyothi P. (1996) Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology*, 112: 227-236.
146. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol*, 151: 2399-2408.
147. Han Y, Cutler JE. (1997) Assessment of a mouse model of neutropenia and the effect of an anti-candidiasis monoclonal antibody in these animals. *J Infect Dis*, 175: 1169-1175.
148. Abbitt KB, Cotter MJ, Ridger VC, Crossman DC, Hellewell PG, Norman KE. (2009) Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J Leukoc Biol*, 85: 55-63.
149. Carr KD, Sieve AN, Indramohan M, Break TJ, Lee S, Berg RE. (2011) Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol*, 41: 2666-2676.

150. Matsuzaki J, Tsuji T, Chamoto K, Takeshima T, Sendo F, Nishimura T. (2003) Successful elimination of memory-type CD8⁺ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo. *Cell Immunol*, 224: 98-105.
151. Norman KE, Cotter MJ, Stewart JB, Abbitt KB, Ali M, Wagner BE, Wallace WA, Forlow SB, Hellewell PG. (2003) Combined anticoagulant and antiselectin treatments prevent lethal intravascular coagulation. *Blood*, 101: 921-928.
152. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*, 83: 64-70.
153. Faget J, Boivin G, Ancey P-B, Gkasti A, Mussard J, Engblom C, Pfirschke C, Vazquez J, Bendriss-Vermare N, Caux C, Vozenin M-C, Pittet MJ, Gunzer M, Meylan E. (2018) Efficient and specific Ly6G⁺ cell depletion: A change in the current practices toward more relevant functional analyses of neutrophils. *bioRxiv*: 498881.
154. Pollenus E, Malengier-Devlies B, Vandermosten L, Pham T-T, Mitera T, Possemiers H, Boon L, Opdenakker G, Matthys P, Van den Steen PE. (2019) Limitations of neutrophil depletion by anti-Ly6G antibodies in two heterogenic immunological models. *Immunology Letters*, 212: 30-36.
155. Charmoy M, Milon G, Tacchini-Cottier F. Role of Neutrophils in the Early Shaping of the Leishmania major Specific Immune Response in Experimental Murine Cutaneous Leishmaniasis. In: Tacchini-Cottier F, van Zandbergen G eds. *Neutrophils in Infectious Diseases*: Bentham Science Publishers Ltd.; 2011:49-58.
156. Gillis CM, Jonsson F, Mancardi DA, Tu N, Beutier H, Van Rooijen N, Macdonald LE, Murphy AJ, Bruhns P. (2017) Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 139: 1253-1265 e1214.
157. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA. (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. *J Immunol*, 165: 2628-2636.
158. Beutier H, Gillis CM, Iannascoli B, Godon O, England P, Sibilano R, Reber LL, Galli SJ, Cragg MS, Van Rooijen N, Mancardi DA, Bruhns P, Jonsson F. (2017) IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 139: 269-280 e267.

159. Ribeiro-Gomes FL, Roma EH, Carneiro MB, Doria NA, Sacks DL, Peters NC. (2014) Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infect Immun*, 82: 2713-2727.
160. Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. (2001) Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, 19: 746-750.
161. Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O. (1968) Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*, 243: 3553-3555.
162. Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, Jung S, Waisman A. (2005) A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods*, 2: 419-426.
163. Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3789-3794.
164. Elliott ER, Van Ziffle JA, Scapini P, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA. (2011) Deletion of Syk in neutrophils prevents immune complex arthritis. *J Immunol*, 187: 4319-4330.
165. Abram CL, Roberge GL, Pao LI, Neel BG, Lowell CA. (2013) Distinct roles for neutrophils and dendritic cells in inflammation and autoimmunity in moth-eaten mice. *Immunity*, 38: 489-501.
166. Reber LL, Gillis CM, Starkl P, Jonsson F, Sibilano R, Marichal T, Gaudenzio N, Berard M, Rogalla S, Contag CH, Bruhns P, Galli SJ. (2017) Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 214: 1249-1258.
167. Hochweller K, Striegler J, Hammerling GJ, Garbi N. (2008) A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol*, 38: 2776-2783.
168. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC. (1996) Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity*, 5: 491-501.

169. Panopoulos AD, Watowich SS. (2008) Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine*, 42: 277-288.
170. Kojima H, Otani A, Oishi A, Makiyama Y, Nakagawa S, Yoshimura N. (2011) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates oxidative stress-induced apoptosis in vascular endothelial cells and exhibits functional and morphologic protective effect in oxygen-induced retinopathy. *Blood*, 117: 1091-1100.
171. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A. (1989) Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, 337: 471-473.
172. Christopher MJ, Link DC. (2008) Granulocyte colony-stimulating factor induces osteoblast apoptosis and inhibits osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*, 23: 1765-1774.
173. Lucas D, Bruns I, Battista M, Mendez-Ferrer S, Magnon C, Kunisaki Y, Frenette PS. (2012) Norepinephrine reuptake inhibition promotes mobilization in mice: potential impact to rescue low stem cell yields. *Blood*, 119: 3962-3965.
174. Demetri GD, Griffin JD. (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78: 2791-2808.
175. Watari K, Ozawa K, Tajika K, Tojo A, Tani K, Kamachi S, Harigaya K, Takahashi T, Sekiguchi S, Nagata S, et al. (1994) Production of human granulocyte colony stimulating factor by various kinds of stromal cells in vitro detected by enzyme immunoassay and in situ hybridization. *Stem Cells*, 12: 416-423.
176. Hamilton JA. (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8: 533-544.
177. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. (2002) G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 17: 413-423.
178. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. (1994) Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84: 1737-1746.

179. Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, Tschlis PN. (1993) Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Mol Cell Biol*, 13: 1759-1768.
180. Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. (1996) Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, 16: 4024-4034.
181. Karsunky H, Mende I, Schmidt T, Moroy T. (2002) High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene*, 21: 1571-1579.
182. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, Orkin SH. (2003) Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity*, 18: 109-120.
183. Rathinam C, Geffers R, Yucel R, Buer J, Welte K, Moroy T, Klein C. (2005) The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity*, 22: 717-728.
184. Shi LZ, Kalupahana NS, Turnis ME, Neale G, Hock H, Vignali DA, Chi H. (2013) Inhibitory role of the transcription repressor Gfi1 in the generation of thymus-derived regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E3198-3205.
185. Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJ, Schumacher A, Grimes HL, Zoghbi HY, Orkin SH, Bellen HJ. (2003) The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development*, 130: 221-232.
186. Yang H, Gan J, Xie X, Deng M, Feng L, Chen X, Gao Z, Gan L. (2010) Gfi1-Cre knock-in mouse line: A tool for inner ear hair cell-specific gene deletion. *Genesis*, 48: 400-406.
187. Ordonez-Rueda D, Jonsson F, Mancardi DA, Zhao W, Malzac A, Liang Y, Bertoso E, Grenot P, Blanquet V, Sabrautzki S, de Angelis MH, Meresse S, Duprez E, Bruhns P, Malissen B, Malissen M. (2012) A hypomorphic mutation in the Gfi1 transcriptional repressor results in a novel form of neutropenia. *Eur J Immunol*, 42: 2395-2408.
188. Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordonez-Rueda D, Barlogis V, Mahlaoui N, Fenis A, Narni-Mancinelli E, Beaupain B, Bellanne-Chantelot C, Bajenoff

- M, Malissen B, Malissen M, Vivier E, Ugolini S. (2012) Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med*, 209: 565-580.
189. Sporri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. (2008) A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol*, 181: 7121-7130.
190. Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, Daeron M, Bruhns P. (2011) Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor FcγRIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol*, 186: 1899-1903.
191. Mora-Cartin R, Gutierrez-Jimenez C, Alfaro-Alarcon A, Chaves-Olarte E, Chacon-Diaz C, Barquero-Calvo E, Moreno E. (2019) Neutrophils Dampen Adaptive Immunity in Brucellosis. *Infect Immun*, 87.
192. Birkenkamp KU, Coffey PJ. (2003) FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J Immunol*, 171: 1623-1629.
193. Lin L, Hron JD, Peng SL. (2004) Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*, 21: 203-213.
194. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, Wood WI, Moore MW. (1994) Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science*, 265: 682-684.
195. Boisvert WA, Rose DM, Johnson KA, Fuentes ME, Lira SA, Curtiss LK, Terkeltaub RA. (2006) Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol*, 168: 1385-1395.
196. Hallgren J, Jones TG, Abonia JP, Xing W, Humbles A, Austen KF, Gurish MF. (2007) Pulmonary CXCR2 regulates VCAM-1 and antigen-induced recruitment of mast cell progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20478-20483.
197. Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K. (2006) Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest*, 116: 695-702.
198. Nustede R, Klimiankou M, Klimenkova O, Kuznetsova I, Zeidler C, Welte K, Skokowa J. (2016) ELANE mutant-specific activation of different UPR pathways in congenital neutropenia. *Br J Haematol*, 172: 219-227.
199. Boztug K, Jarvinen PM, Salzer E, Racek T, Monch S, Garncarz W, Gertz EM, Schaffer AA, Antonopoulos A, Haslam SM, Schieck L, Puchalka J, Diestelhorst J,

- Appaswamy G, Lescoeur B, Giambruno R, Bigenzahn JW, Elling U, Pfeifer D, Conde CD, Albert MH, Welte K, Brandes G, Sherkat R, van der Werff Ten Bosch J, Rezaei N, Etzioni A, Bellanne-Chantelot C, Superti-Furga G, Penninger JM, Bennett KL, von Blume J, Dell A, Donadieu J, Klein C. (2014) JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia. *Nat Genet*, 46: 1021-1027.
200. Olsson A, Venkatasubramanian M, Chaudhri VK, Aronow BJ, Salomonis N, Singh H, Grimes HL. (2016) Single-cell analysis of mixed-lineage states leading to a binary cell fate choice. *Nature*, 537: 698-702.
201. Person RE, Li FQ, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, Eliopoulos G, Kaufman C, Bertolone SJ, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Grimes HL, Horwitz M. (2003) Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet*, 34: 308-312.
202. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. (2003) Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*, 34: 70-74.
203. Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JH, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA, Johansen JD, Karlberg AT, Kimber I, Lepoittevin JP, Liebsch M, Maibach HI, Martin SF, Merk HF, Platzek T, Rustemeyer T, Schnuch A, Vandebriel RJ, White IR, Luch A. (2012) Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci*, 69: 763-781.
204. Thyssen JP, Linneberg A, Menne T, Johansen JD. (2007) The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*, 57: 287-299.
205. Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C, Andersen KE. (2002) Contact allergy and allergic contact dermatitis in adolescents: prevalence measures and associations. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis (TOACS). *Acta Derm Venereol*, 82: 352-358.
206. Nygaard U, Kralund HH, Sommerlund M. (2013) Allergic contact dermatitis induced by textile necklace. *Case Rep Dermatol*, 5: 336-339.

207. Naisbitt DJ. (2004) Drug hypersensitivity reactions in skin: understanding mechanisms and the development of diagnostic and predictive tests. *Toxicology*, 194: 179-196.
208. Faulkner L, Meng X, Park BK, Naisbitt DJ. (2014) The importance of hapten-protein complex formation in the development of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 14: 293-300.
209. Martin SF. (2015) New concepts in cutaneous allergy. *Contact Dermatitis*, 72: 2-10.
210. Weber FC, Esser PR, Muller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, Zeiser R, Idzko M, Jakob T, Martin SF. (2010) Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med*, 207: 2609-2619.
211. Martin SF. (2012) Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Exp Dermatol*, 21: 382-389.
212. Koppes SA, Engebretsen KA, Agner T, Angelova-Fischer I, Berents T, Brandner J, Brans R, Clausen ML, Hummler E, Jakasa I, Jurakic-Toncic R, John SM, Khnykin D, Molin S, Holm JO, Suomela S, Thierse HJ, Kezic S, Martin SF, Thyssen JP. (2017) Current knowledge on biomarkers for contact sensitization and allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 77: 1-16.
213. Wang B, Amerio P, Sauder DN. (1999) Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol*, 66: 33-39.
214. Kaplan DH, Igyarto BZ, Gaspari AA. (2012) Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*, 12: 114-124.
215. Rustemeyer T, van Hoogstraten IMW, von Blomberg BME, Gibbs S, Scheper RJ. Mechanisms of irritant and allergic contact dermatitis. In: Johansen JD FP, Lepoittevin J-P (szerk.). *Contact Dermatitis*. Springer, Berlin Heidelberg, 2011:43–90.
216. Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas JF. (2009) Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 64: 1699-1714.
217. Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Davidson NJ, Rennick D. (1995) Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med*, 182: 99-108.
218. Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, Achachi A, Benetiere J, Kaiserlian D, Dubois B, Nicolas JF. (2010) Inducible costimulator (ICOS)

is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 126: 280-289, 289 e281-287.

219. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Kohler A, Peschke K, Vohringer D, Waskow C, Krieg T, Muller W, Waisman A, Hartmann K, Gunzer M, Roers A. (2011) Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity*, 34: 973-984.

220. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. (2013) Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, 133: 303-315.

221. Watanabe R, Fujimoto M, Ishiura N, Kuwano Y, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H, Sato S, Tedder TF, Tamaki K. (2007) CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am J Pathol*, 171: 560-570.

222. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S. (2009) Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 124: 809-818 e802.

223. Engeman T, Gorbachev AV, Kish DD, Fairchild RL. (2004) The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J Leukoc Biol*, 76: 941-949.

224. Ring S, Schafer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. (2006) CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol*, 36: 2981-2992.

225. Weber FC, Németh T, Csepregi JZ, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, Oswald E, Puskás LG, Jakob T, Mócsai A, Martin SF. (2015) Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med*, 212: 15-22.

226. Martin SF. (2013) Induction of contact hypersensitivity in the mouse model. *Methods Mol Biol*, 961: 325-335.

227. Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Brocker EV, Toksoy A, Gillitzer R. (2001) Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol*, 158: 431-440.

228. Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD. (2008) Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 29: 306-317.

229. Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, Londrigan SL, Bedoui S, Brooks AG, Reading PC. (2010) Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. *J Gen Virol*, 91: 2158-2166.
230. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. (2004) JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*, 119: 431-443.
231. Hermans MH, van de Geijn GJ, Antonissen C, Gits J, van Leeuwen D, Ward AC, Touw IP. (2003) Signaling mechanisms coupled to tyrosines in the granulocyte colony-stimulating factor receptor orchestrate G-CSF-induced expansion of myeloid progenitor cells. *Blood*, 101: 2584-2590.
232. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. (2009) Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 206: 577-593.
233. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. (1999) From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10: 451-461.
234. Németh T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Z, Walzog B, Settleman J, Mócsai A. (2010) Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: Generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol*, 185: 3064-3075.
235. Németh T, Futosi K, Sitaru C, Ruland J, Mócsai A. (2016) Neutrophil-specific deletion of the CARD9 gene expression regulator suppresses autoantibody-induced inflammation in vivo. *Nat Commun*, 7: 11004.
236. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. (1999) Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*, 286: 1732-1735.
237. Fournier B, Philpott DJ. (2005) Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev*, 18: 521-540.
238. Verdrengh M, Tarkowski A. (1997) Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 65: 2517-2521.
239. Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. (2015) Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 15: 630-642.

240. Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. (2014) Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods*, 408: 89-100.
241. Eyles JL, Hickey MJ, Norman MU, Croker BA, Roberts AW, Drake SF, James WG, Metcalf D, Campbell IK, Wicks IP. (2008) A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood*, 112: 5193-5201.
242. Campbell IK, Leong D, Edwards KM, Rayzman V, Ng M, Goldberg GL, Wilson NJ, Scalzo-Inguanti K, Mackenzie-Kludas C, Lawlor KE, Wicks IP, Brown LE, Baz Morelli A, Panousis C, Wilson MJ, Nash AD, McKenzie BS, Andrews AE. (2016) Therapeutic Targeting of the G-CSF Receptor Reduces Neutrophil Trafficking and Joint Inflammation in Antibody-Mediated Inflammatory Arthritis. *J Immunol*, 197: 4392-4402.
243. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, 8: 265-277.
244. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mócsai A, Reichardt W, Karlsson FJ, Radhakrishnan SV, Hanke K, Schmitt-Graeff A, Freudenberg M, von Loewenich FD, Wolf P, Leonhardt F, Baxan N, Pfeifer D, Schmah O, Schonle A, Martin SF, Mertelsmann R, Duyster J, Finke J, Prinz M, Henneke P, Hacker H, Hildebrandt GC, Hacker G, Zeiser R. (2014) Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med*, 20: 648-654.
245. Reinwald C, Schauer C, Csepregi JZ, Kienhofer D, Weidner D, Malissen M, Mócsai A, Schett G, Herrmann M, Hoffmann M. (2016) Reply to "Neutrophils are not required for resolution of acute gouty arthritis in mice". *Nat Med*, 22: 1384-1386.
246. Kienhofer D, Hahn J, Stoof J, Csepregi JZ, Reinwald C, Urbonaviciute V, Johnsson C, Maueroeder C, Podolska MJ, Biermann MH, Leppkes M, Harrer T, Hultqvist M, Olofsson P, Munoz LE, Mócsai A, Herrmann M, Schett G, Holmdahl R, Hoffmann MH. (2017) Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI Insight*, 2: 92920.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A doktori értekezésem alapjául szolgáló publikációk:

- I. Weber FC*, Németh T*, **Csepregi JZ***, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, Oswald E, Puskás LG, Jakob T, Mócsai A, Martin SF. (2015) Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med*, 212: 15-22. (*megosztott elsőszerzős közlemény)
IF: 11,24

- II. **Csepregi JZ***, Orosz A*, Zajta E, Kása O, Németh T, Simon E, Fodor S, Csonka K, Barátki BL, Kövesdi D, He YW, Gácsér A, Mócsai A. (2018) Myeloid-specific deletion of Mcl-1 yields severely neutropenic mice that survive and breed in homozygous form. *J Immunol*, 201: 3793-3803. (*megosztott elsőszerzős közlemény)
IF: 4,71

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk:

- III. Acs A, Kovacs AW, **Csepregi JZ**, Toro N, Kiss G, Gyori J, Vehovszky A, Kovacs N, Farkas A. (2013) The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 70: 98-106.
IF: 2,58

- IV. Borbely E, Botz B, Bolcskei K, Kenyer T, Kereskai L, Kiss T, Szolcsanyi J, Pinter E, **Csepregi JZ**, Mócsai A, Helyes Z. (2015). Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun*, 45: 50-59.
IF: 5,87

- V. Botz B, Bolcskei K, Kemeny A, Sandor Z, Tekus V, Setalo G Jr, **Csepregi J**, Mocsai A, Pinter E, Kollar L, Helyes Z. (2015) Hydrophobic cyanine dye-doped micelles for optical *in vivo* imaging of plasma leakage and vascular disruption. *J Biomed Opt* 20(1): 016022.
IF: 2,55
- VI. Botz B, Kemeny A, Brunner SM, Locker F, **Csepregi J**, Mocsai A, Pinter E, McDougall JJ, Kofler B, Helyes Z. (2016) Lack of Galanin 3 Receptor Aggravates Murine Autoimmune Arthritis. *J Mol Neurosci* 59(2):260-9.
IF: 2,22
- VII. Horvath A, Menghis A, Botz B, Borbely E, Kemeny A, Tekus V, **Csepregi JZ**, Mocsai A, Juhasz T, Zakany R, Bogdan D, Matyus P, Keeble J, Pinter E, Helyes Z. (2017) Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse. *Sci Rep* 7:39863.
IF: 4,12
- VIII. Kienhofer D, Hahn J, Stoof J, **Csepregi JZ**, Reinwald C, Urbonaviciute V, Johnsson C, Maueroder C, Podolska MJ, Biermann MH, Leppkes M, Harrer T, Hultqvist M, Olofsson P, Munoz LE, Mocsai A, Herrmann M, Schett G, Holmdahl R, Hoffmann MH. (2017) Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI Insight*, 2: 92920.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Mócsai Attilának, aki nagy szeretettel és bizalommal fogadott a Gyulladásélettan laborban még egyetemista koromban, amikor egy egy hónapos részképzésre érkeztem Kolozsvárról. Köszönöm, hogy esélyt adott arra, hogy a munkacsoportjának tagja lehessen és előbb laboratóriumi biológusként, majd PhD-hallgatóként elmerüljek a tudomány világában. Hálás vagyok, hogy mindig nyitva állt az ajtaja előttem és minden kérdésemre mélyreható, türelmes választ kaptam tőle.

Köszönöm Dr. Hunyady László professzor úrnak, aki a Semmelweis Egyetem Élettani Intézet igazgatójaként és Dr. Ligeti Erzsébet professzor asszonynak, aki a Celluláris és molekuláris élettan doktori program vezetőjeként biztosította a támogató háttérrel a tudományos munkám elvégzéséhez. Hálás vagyok az Élettani Intézet valamennyi munkatársainak, hogy baráti, befogadó és motiváló légkört teremtettek a sokszor nehéznek bizonyuló hétköznapiakban is.

Hálás vagyok Simon Edinának, hogy a kezdetek kezdetén meglátott bennem valami pluszt, így támogatta az ötletet, hogy a munkatársává váljak. Ez a munkatársi kapcsolat hamar barátsággá alakult, ami nagyban megkönnyítette a beilleszkedést és a mindennapokat. Emellett köszönöm a magasfokú szakmai felkészítést és a kiemelkedő háttérmunkát, amivel nagymértékben hozzájárult ahhoz, hogy ez a munka megszülethessen. Ha ő nincs, mai napig nem merek megfogni egy egeret!

Köszönetemet fejezem ki Dr. Felix Weber-nek, aki elsőként vezetett be a kísérletezés világába, nagyfokú bizalommal és elfogadással támogatta a kezdeti munkám során. Hálás vagyok Dr. Németh Tamásnak, hogy a „szárnyai alá vett”, türelemmel átadta szakmai tudását és megtanított a precíz, odafigyelő munkavégzésre.

Hálás vagyok Orosz Anita-nak a rengeteg segítségért, baráti támogatásért és azért, hogy bizalommal ráhagyhattam az „elvarratlan szálakat”, mert tudtam, hogy jó kezekben lesznek. Köszönettel tartozom Kása Orsolyának a közös kísérletezés, a sok nevetés és a sikertelen pillanatokban együtt bosszankodás élményeiért.

Hálás vagyok Dr. Fodor Szabinának és Dr. Gácsér Attila munkacsoportjának (Csonka Katalin és Zajta Erik), hogy nyitottak voltak a közös munkára és precíz, mindig tette kész hozzáállással segítettek teljesebbé tenni a doktori munkámat.

Köszönöm egykori tudományos diákköri hallgatóimnak Szikszai Donátnak és Thomas Winkler-nek, hogy segítségükkel támogatták a munkámat.

Köszönöm Dr. Kovács Miklósnak, Pató Zsuzsának, Erdélyi Andrásnak, Dr. Csete Dánielnek, Dr. Szilveszter Katának, Dr. Futosi Krisztinának és Dr. Győri Dávidnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk a kérdéseimmel és, hogy biztosították a támogató, baráti hangulatot a laborban. Köszönet illeti Tóth Annát és Kiss Nórát a kiemelkedő háttérmunka elvégzéséért, Papp László állatgondozót, aki az SPF állatházban végzett méréseket biztosította számomra, valamint Mikesy Árpádot, aki a szérumpreparálásban volt segítségemre. Köszönettel tartozom Aradi Petrának, hogy felhasználhattam a mikroszkópos fotóit a disszertációmban.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm férjemnek és kislányomnak a rengeteg támogatást, szeretetet, odaadást és türelmet, amivel hozzájárultak, hogy elinduljak a tudományos munkám ösvényén és a végére is érjek az útnak. Hálás vagyok a szüleimnek, nővéremnek és családjának, valamint a férjem családjának, hogy szeretetükkel és segítségnyújtásukkal támogattak és motiváltak. Köszönöm továbbá szüleimnek, hogy hitre neveltek, így Isten mindig biztos kapaszkodó volt, ha elbizonytalanodtam volna. Nélkülük ez a munka biztosan nem valósult volna meg.