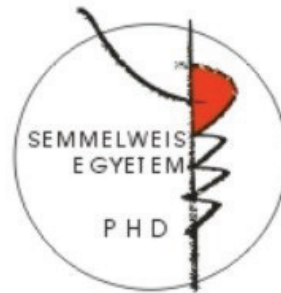


# Jelátviteli folyamatok vizsgálata neutrofil granulocitákban és az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában

Doktori értekezés

**Dr. Németh Tamás**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Helyes Zsuzsanna egyetemi docens,  
az MTA doktora

Dr. Cervenak László tudományos főmunkatárs, PhD

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prohászka Zoltán tudományos  
főmunkatárs, az MTA doktora

Dr. Nagy György egyetemi adjunktus, PhD

Budapest  
2012

# 1. Tartalomjegyzék

<b>1. TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>2</b>
<b>2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>6</b>
<b>3. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. A neutrofil granulociták működésének általános jellemzése.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Jelátviteli folyamatok az immunvédekezésben .....</b>	<b>14</b>
3.2.1. Klasszikus immunreceptorok .....	14
3.2.2. Az Fc $\gamma$ -receptorok és szerepük neutrofilekben .....	16
3.2.3. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ) .....	18
3.2.4. A CARD9, mint egy potenciális Fc $\gamma$ -receptor hírvivő .....	20
3.2.5. A $\beta_2$ -integrinek és jelentőségük a neutrofil granulociták működésében .....	23
3.2.6. A $\beta_2$ -integrinek jelátvitel neutrofil granulocitákban .....	24
3.2.7. A p190RhoGAP, mint lehetséges integrin-szabályozott molekula neutrofilekben.....	26
<b>3.3. Autoimmun betegségek.....</b>	<b>28</b>
3.3.1. Az autoimmun betegségek általános jellemzése .....	28
3.3.2. Az autoimmun ízületi gyulladások, a rheumatoid arthritis.....	30
<b>3.4. Autoimmun kórképek, neutrofilek és az immunreceptor(-szerű) jelátvitel: kapcsolódási pontok .....</b>	<b>31</b>
3.4.1. A neutrofilek szerepe autoimmun betegségekben .....	31
3.4.2. A neutrofilek és az autoimmun ízületi gyulladások .....	33
3.4.3. Az Fc $\gamma$ -receptorok és a $\beta_2$ -integrinek szerepe autoimmun ízületi gyulladásokban .....	36
<b>3.5. Tirozin-kináz gátlók, mint terápiás szerek .....</b>	<b>39</b>
3.5.1. Tirozin-kináz gátlók az onko-hematológiában .....	39
3.5.2. Tirozin-kináz inhibitorok autoimmun arthritiszben .....	40
3.5.3. A tirozin-kináz gátló dasatinib és a neutrofilek.....	41
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>42</b>
<b>5. MÓDSZEREK .....</b>	<b>43</b>

<b>5.1. A kísérletekhez használt egértörzsek, csontvelői kimérák.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Hemi- és homozigóta transzgénikus egerek elkülönítése kvantitatív PCR segítségével .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3. A neutrofil granulociták izolálása, a kísérleti körülmények .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4. A nyugalmi sejt felszíni expresszió áramlási citometriával történő mérése..</b>	<b>46</b>
<b>5.5. A neutrofilek sejt válaszainak vizsgálati módszerei .....</b>	<b>47</b>
5.5.1. A neutrofilek aktiválásának módozatai .....	47
5.5.2. A neutrofilek in vitro sejt válaszainak mérése.....	48
5.5.3. Jelátviteli folyamatok vizsgálatai .....	51
5.5.4. A neutrofilek in vivo migrációjának vizsgálata.....	53
<b>5.6. Csontvelői makrofágok tenyésztése és aktiválása.....</b>	<b>54</b>
5.6.1. Csontvelői makrofágok tenyésztése .....	54
5.6.2. A makrofágok funkcionális válaszainak mérése .....	55
<b>5.7. Csontvelői hízósejtek tenyésztése .....</b>	<b>56</b>
<b>5.8. A K/BxN szérum transzfer artritisz kiváltása és mérése .....</b>	<b>56</b>
<b>5.9. A kísérletekből származó adatok értékelése és prezentálása.....</b>	<b>57</b>
<b>6. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>58</b>
<b>6.1. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata egér neutrofil granulocitákban és neutrofil-függő autoimmun ízületi gyulladásban .....</b>	<b>58</b>
6.1.1. A p190RhoGAP jelenlétének ellenőrzése neutrofil granulocitákban.....	58
6.1.2. A p190RhoGAP null mutáció jellemzése.....	59
6.1.3. A p190RhoGAP <sup>-/-</sup> egyedek jellemzése .....	62
6.1.4. A p190RhoGAP-hiányos csontvelői kimérák létrehozása .....	63
6.1.5. A p190RhoGAP <sup>-/-</sup> neutrofilek sejt felszíni integrin- és Fc $\gamma$ -receptorainak jellemzése .....	65
6.1.6. A p190RhoGAP-hiányos neutrofilek $\beta_2$ -integrin-függő szuperoxid-termelése és szétterülése .....	66
6.1.7. A p190RhoGAP szerepe a neutrofilek migrációjában .....	69
6.1.8. A p190RhoGAP szerepe neutrofilek $\beta_2$ -integrin-független sejt válaszaiiban	71

6.1.9. Szükséges-e a p190RhoGAP a neutrofil- és CD18-függő K/BxN szérum transzfer artritiszhez?.....	73
<b>6.2. Az Fc-receptor <math>\gamma</math>-lánc és ITAM-tirozinjainak szerepe neutrofil granulociták működésében és autoimmun ízületi gyulladásban.....</b>	<b>77</b>
6.2.1. Az FcR $\gamma$ -lánc szerepe neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált folyamataiban .....	77
6.2.2. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok szerepének vizsgálati megközelítése .....	78
6.2.3. A projekthez használt egerek fenntartása és genotipizálása .....	80
6.2.4. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc tirozinmutáns neutrofilek jellemzése .....	81
6.2.5. Az FcR $\gamma$ ITAM-tirozinjainak szerepe neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor kiváltotta sejtválaszaiban .....	83
6.2.6. Az FcR $\gamma$ ITAM-tirozinok szerepe az autoimmun artritisz effektor fázisában .....	85
<b>6.3. A CARD9 szerepének vizsgálata primer fagocitasejtekben és autoantitest-mediált ízületi gyulladásban .....</b>	<b>89</b>
6.3.1. A CARD9-hiányos egér neutrofilek jellemzése .....	89
6.3.2. Rövidebb távú neutrofil sejtválaszok CARD9 hiányában.....	90
6.3.3. Károsodott NF- $\kappa$ B-jelpálya immunkomplex-aktivált CARD9-hiányos neutrofilekben.....	90
6.3.4. Csökkent Fc $\gamma$ -receptor-függő kemokin-termelés CARD9 hiányában.....	91
6.3.5. A Syk tirozin-kináz szerepe neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében .....	92
6.3.6. Egy CARD9-cel kapcsolódni képes fehérje, a Bcl10 szerepe neutrofilekben .....	95
6.3.7. A CARD9 szerepe makrofágok Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében .....	96
6.3.8. A CARD9 szerepe autoimmun ízületi gyulladás effektor fázisában.....	98
6.3.9. Szükséges-e a CARD9 autoantitest-mediált autoimmun bőrgyulladásához? .....	99
6.3.10. Miként vesz részt a CARD9 az autoantitest-mediált ízületi gyulladásban? .....	100
<b>6.4. A dasatinib néhány neutrofil sejtválaszra gyakorolt hatásának vizsgálata</b>	<b>103</b>
6.4.1. A dasatinib hatása neutrofilek $\beta_2$ -integrin inside-out szignalizációjára .....	103
6.4.2. Érintetlen $\beta_2$ -integrin-függő fagocitózis dasatinib jelenlétében .....	105

<b>7. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>107</b>
<b>8. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>116</b>
<b>9. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>117</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>118</b>
<b>11. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>119</b>
<b>12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>142</b>
<b>13. A TÁRSSZERZŐK KÖZÖTTI MUNKAMEGOSZTÁS .....</b>	<b>143</b>
<b>14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>145</b>

## 2. Rövidítések jegyzéke

Abl	Abelson kinase (Abelson-kináz)
ACR	American College of Rheumatology (Amerikai Rheumatológiai Társaság)
ANOVA	Analysis of variance (Variancia-analízis)
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikai Sejtkultúra Kollekción)
Bcl10	B cell lymphoma/leukemia 10 protein (B-sejt limfóma/leukémia 10 fehérje)
Bcr	Breakpoint cluster region protein
BCR	B cell receptor (B-sejt receptor)
$\beta$ -Geo	$\beta$ -galaktozidáz-neomicin rezisztencia fúziós fehérje
BP	Bullózus pemfigoid
CAIA	Collagen antibody-induced arthritis (Kollagén-antitest kiváltotta ízületi gyulladás)
CARD9	Caspase activation and recruitment domain-containing protein 9 (Kaspáz-aktiváló és -toborzó domén 9 fehérje)
CARMA1	CARD-MAGUK 1 fehérje
CB	Citokalazin B
CBM	CARMA1/CARD9-Bcl10-Malt1 komplex
CD	Cluster of differentiation (Differenciációs marker)
CGD	Chronic granulomatous disease (Krónikus granulomatózis)
CIA	Collagen-induced arthritis (Kollagén-indukált ízületi gyulladás)
CMG14-12	M-CSF-termelő sejtvonal
CML	Chronic myelogenous leukemia (Krónikus mieloid leukémia)
DAP-12	DNAX-activating protein of 12 kDa
DFP	Diizopropil-fluorofoszfát
DMARD	Disease-modifying antirheumatic drugs (Betegségmódosító antireumatikus kezelés)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco-féle módosított Eagle médium)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav

EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim-kötött immunszorbens vizsgálat)
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay (Elektroforetikus mobilitás shift módszer)
Eph-receptor	Ephrin-receptor
EULAR	European League Against Rheumatism (Európai Antirheuma Szövetség)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Fluoreszcencia alapú sejtszétválogatás)
Fbg	Fibrinogén
FCS	Fetal calf serum (Magzati borjú szérum)
FcR	Fc-receptor
FcR $\gamma$ <sup>1</sup>	Fc-receptor $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ -lánc)
Fc $\gamma$ R <sup>1</sup>	Fc $\gamma$ -receptor
FITC	Fluoreszcein izotiocianát
fMLP	Formil-metionil leucil fenilalanin
GAP	GTP-ase activating protein (GTP-áz aktiváló fehérje)
GAPDH	Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (Granulocita kolónia-stimuláló faktor)
GFP	Green fluorescent protein (Zöld fluoreszcens fehérje)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulocita-monocita kolónia-stimuláló faktor)
GMP	Granulocyte-monocyte progenitor (Granulocita-monocita progenitor)
GPCR	G protein-coupled receptor (G-fehérje-kapcsolt receptor)
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase (Glükóz-6-foszfát izomeráz)
Gr1	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 (p190RhoGAP)
Gy	Gray
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Hank-féle normalizált sóoldat)
HLA	Human leukocyte antigen (Humán leukocita antigén)

---

<sup>1</sup> Rövidítésük könnyen összetéveszthető!

HSA	Humán szérum albumin
IC	Immunkomplex
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule 1 (Intercelluláris sejtadhéziós molekula 1)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B $\alpha$	NF- $\kappa$ B inhibitor $\alpha$
IL-3	Interleukin-3
IL-17	Interleukin-17
IL-23	Interleukin-23
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (Immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum)
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (Immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminális kináz)
kDa	Kilodalton
LAD	Leukocyte adhesion deficiency (Leukocita adhéziós deficiencia)
LFR	Laktoferrin
Mac-1	Macrophage-1 antigen (Makrofág-1 antigén, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$ )
MACS	Magnetic-activated cell sorting (Mágneses sejtszeparáció)
MAGUK	Membrane –associated guanylate kinase (Membrán-asszociált guanilát-kináz)
Malt1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (Nyálkahártya-asszociált nyirokszöveti limfóma transzlokációs fehérje 1)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogén-aktivált protein kináz)
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 protein (Mieloid-sejt leukémia-1 fehérje)
M-CSF	Monocyte/macrophage colony-stimulating factor (Monocita/makrofág kolóniastimuláló faktor)
MEM, $\alpha$	Minimum Essential Medium Eagle, $\alpha$ modification (Minimálisan szükséges tápanyagokat tartalmazó Eagle médium)
MHC	Major histocompatibility complex (Fő hisztokompatibilitási komplex)



MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ (Makrofág gyulladássos protein 1 $\alpha$ , CCL3)
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2 (Makrofág gyulladássos protein 2, CXCL2)
ND	Nem detektálható
NET	Neutrophil extracellular traps (Neutrofilból származó extracelluláris csapda)
NFAT	Nuclear factor of activated T cells (Aktivált T-sejt nukleáris faktor)
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
NK-sejt	Natural killer cell (Természetes ölósejt)
NOD egér	Non-obese diabetic mouse (I. típusú cukorbeteg egér)
NOD fehérje	Nucleotide-binding oligomerization domain protein (Nukleáris oligomerizációs doménnal rendelkező fehérje)
OSCAR	Osteoclast-associated receptor (Oszteoklaszt-asszociált receptor)
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Szintetikus TLR2 agonista
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Kórokozó-asszociált molekuláris mintázat)
PBS	Phosphate buffered saline (Foszfáttal pufferelt sóoldat)
PDGF	Platelet-derived growth factor (Vérlemezkere-eredetű növekedési faktor)
PDZ	Posztzinaptikus denzitás fehérje – <i>Drosophila disc large</i> tumor suppressor –Zonula occludens-1 fehérje domén
PE	Phycoerythrin
PGK	Phosphoglycerate kinase (Foszfoglicerát kináz)
PIR-A	Paired immunoglobulin-like receptor-A
PKC $\delta$	Protein kinase C- $\delta$ (Protein-kináz C- $\delta$ )
PMA	Phorbol 12-miristate 13-acetate (Forbol-mirisztil acetát)
PMN	Polymorphonuclear leukocytes (Polimorfonukleáris sejt, neutrofil granulocita)
PMSF	Phenyl-methane-sulfonyl fluoride (Fenil-metil-szulfonilfluorid)
PNPP	Para-nitrophenyl-phosphate (p-nitrofenil foszfát)
PRR	Pattern-recognition receptor (Mintázat-felismerő receptor)

qPCR	Quantitative polimerase chain reaction (Kvantitatív polimeráz lánreakció)
RA	Rheumatoid arthritis (Rheumatoid artritisz)
RNS	Ribonukleinsav
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SH2	Src homology 2 domain (Src-homológia 2 domén)
SH3	Src homology 3 domain (Src-homológia 3 domén)
SLE	Systemic lupus erythematosus (Szisztémás lupus erythematosus)
SLP-76	SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa (SH2-domént tartalmazó, 76 kilodalton méretű leukocita adapter fehérje)
Src	Eukaryotic Sarcoma tyrosine kinase (Eukarióta Szarkóma tirozin-kináz)
TCR	T cell receptor (T-sejt receptor)
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$ (Tumor nekrozis faktor $\alpha$ )
TREM-1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (Mieloid sejt aktivációs receptor 1)
VT	Vad típus
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase of 70 kilodalton (Zéta-lánc asszociált 70 kilodalton méretű protein kináz)

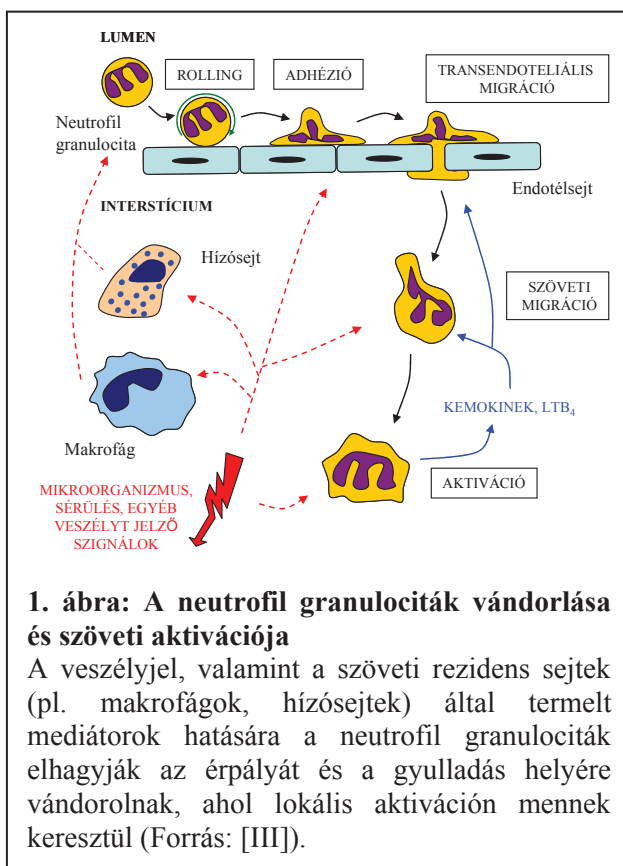
### 3. Bevezetés, irodalmi háttér

#### 3.1. A neutrofil granulociták működésének általános jellemzése

Az emberi perifériás vér fehérvérsejtjeinek több, mint 60%-át alkotó neutrofil granulociták (más elnevezéssel polimorfonukleáris sejtek (PMN)) elengedhetetlen alkotóelemei a szervezet kórokozók elleni immunvédekezésének. Mind a perifériás vérben való számuk csökkenése (granulocitopénia), mind működési zavaraik jelentősen megnövelik a szervezet bakteriális és gombás fertőzések iránti fogékonyságát. A granulociták neutrális festődése alapján elnevezett, alapvetően rövid élettartamú granulociták a csontvelőben a granulocita-monocita progenitor (GMP) sejtből

keletkeznek [1]. A terminálisan differenciált sejtek kezdetben a csontvelőben raktározódnak, majd egy máig részleteiben nem teljesen ismert szabályozási folyamatnak engedelmessé a véráramba kerülnek.

A gyulladásmentes állapotban a vérben keringő neutrofilek bizonyos stimulusok (veszélyjelek (pl. mikroorganizmus behatolását jelző molekulák, sejtpusztulás következtében szabaddá váló intracelluláris alkotóelemek), valamint egyéb gyulladásos sejtekből származó citokinek) hatására kezdetben gyengébb, majd szoros kapcsolatba kerülnek a gyulladásos mediátorok hatására megváltozott felszínű endotélsejtekkel. A bonyolult, több tényezőtől álló folyamatot az alábbi egyszerűsített sémával jellemezzük. Az első, „görgésnek” (rollingnak) nevezett folyamathoz elsősorban szelektinokra van szükség, míg a második letapadási (adhéziós) lépést már a heterodimer sejtadhéziós molekulacsalád, a neutrofilek felszínén található integrinek



**1. ábra: A neutrofil granulociták vándorlása és szöveti aktivációja**

A veszélyjel, valamint a szöveti rezidens sejtek (pl. makrofágok, hízósejtek) által termelt mediátorok hatására a neutrofil granulociták elhagyják az ér pályát és a gyulladás helyére vándorolnak, ahol lokális aktiváción mennek keresztül (Forrás: [III]).

végzik. A folyamatsor végén a neutrofilek elhagyják az érpályát egy ugyancsak integrin-mediált lépés, a transzendenteliális migráció (diapedezis) során (**1. ábra**). A szövetekbe került és ott vándorló sejtek ezt követően a rezidens immunsejtek (pl. makrofágok, hízósejtek) által elválasztott mediátorok (pl. gyulladásos citokinek, leukotriének), valamint a behatoló mikroorganizmusok konzervált molekuláinak hatására aktiválódni képesek.<sup>2</sup>

A neutrofilek aktivációjában számos sejt felszíni receptor vehet részt. A mikroorganizmusok konzervált molekuláit (kórokozó-asszociált molekuláris mintázatok (Pathogen-associated molecular patterns, PAMP) a mintázat-felismerő receptorok (Pattern recognition receptors, PRR) ismerik fel. Legjellegzetesebb képviselőik az interleukin-1 receptor szupercsaládba tartozó Toll-like receptorok (TLR). A neutrofilek felszínén megtalálható legfontosabb Toll-like receptorok a többek között a Gram-pozitív baktériumok sejt falának glikolipidjét, a lipoteikolsavat felismerő TLR2 és a Gram-negatív baktériumok sejt falalkotó lipopoliszacharidjának receptora, a TLR4 [4]. A G-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR) közül kiemelendő a mintázat-felismerő receptor bakteriális tripeptid formil-metionil-leucil fenilalanin (fMLP) receptor, a leukotrién B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) receptorai, a komplementfragment C5a receptora, valamint egyes kemokin-receptorok (pl. az interleukin-8 receptora emberben, a CXCL2 receptora egérben). A GPCR-ek az aktiváció mellett az indukált citoszeletális átrendeződés révén az irányított sejt vándorlás, a kemotaxis folyamatának is lényeges elemei. A neutrofil granulociták működésében a korábban említett integrinek, valamint a plazmasejtek által termelt immunglobulin G-t megkötő Fc $\gamma$ -receptorok is jelentősek.

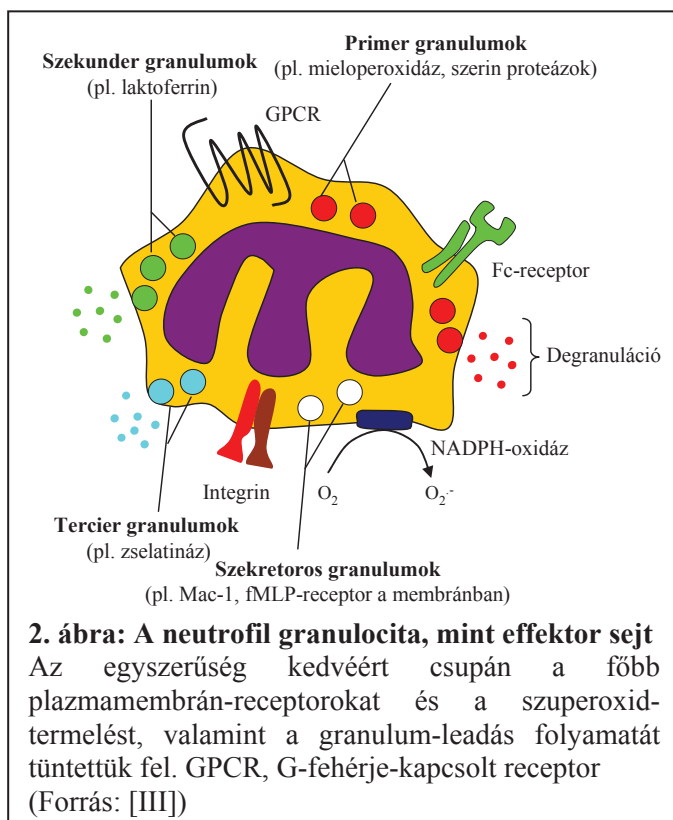
Az aktivált neutrofil granulociták hatékony effektor sejtek. Egyrészt képesek a behatoló ágens bekebelezésére (fagocitózisára), mely alapján a neutrofileket a fagocitasejtek közé soroljuk. A bekebelezett kórokozó elpusztításában számos folyamat és molekula vesz részt. A sejtérés különböző fokain megjelenő granulumok (**2. ábra**) különféle proteázokat, RNázokat, valamint a mikroorganizmusok növekedéséhez, túléléséhez esszenciális komponenseket megkötő fehérjéket (pl. B<sub>12</sub>-vitaminkötő-

---

<sup>2</sup> Fontos hangsúlyozni, hogy a neutrofil granulociták nem csupán egyszerű „végrehajtó sejtek”. Egyre több megfigyelés mutat arra, hogy kétirányú kapcsolat áll fenn a neutrofilek és a makrofágok között a szöveti gyulladás során [2]. A neutrofilek képesek továbbá a dendritikus sejtek, a B-sejtek és a T-sejtek működését is befolyásolni, elsősorban citokin-elválasztás által [5,6], bár felmerült a neutrofilek esetleges antigénprezentáló volta is egérben [3].

fehérjét, laktoferrint) tartalmaznak, melyek közvetett vagy közvetlen módon fejtik ki antimikrobiális hatásaikat a degranuláció folyamatát követően. A neutrofilek további funkciói között szerepel a különböző toxikus oxigénmetabolitok termelése, mely révén egyre hatékonyabb antimikrobiális oxigénszármazékok keletkeznek. Az aktiválódott neutrofilek bizonyos esetekben a sejthalál egy speciális formáján, a neutrofil extracelluláris csapda (Neutrophil extracellular trap, NET) képzésének folyamatán mennek keresztül, mely során a sejtekből származó DNS és antimikrobiális fehérje-komplexek eredményezik a kórokozók elpusztítását [5]. A gyulladás helyére érkező és ott aktiválódó granulociták továbbá a belőlük származó leukotriének (pl.  $LTB_4$ ) és az elválasztott, az elsősorban a sejtváándorlást befolyásoló citokinek, a kemokinek segítségével további neutrofileket (és egyéb immunsejteket) vonzanak a szövetekbe, ezáltal is erősítve a gyulladásos választ (pozitív visszacsatolás).

A szövetekben aktiválódott neutrofilek – rövid élettartamuknak megfelelően –



hamar elpusztulnak. Az apoptotikus neutrofilek makrofágok általi felvétele mérsékli a további neutrofil-inváziót és megkezdődik az eredeti szöveti állapot helyreállítása.<sup>3</sup> A neutrofilek termelődését és csontvelői mobilizációját részben a G-CSF–IL-17-tengely igazítja a gyulladás mértékéhez az alábbi módon. A granulopoesis és a csontvelői granulocita mobilizáció mértékének egyik legfőbb szabályozóját, a G-CSF-t

elsősorban nem immunsejtek termelik. A G-CSF produkcióját részben az egyes T-sejt

<sup>3</sup> Amennyiben a kiváltó esemény nem szűnik meg, a neutrofilek fokozatosan makrofágoknak és T-sejteknek adják át a helyüket és a gyulladás krónikussá válik. Ez ugyanakkor nem jelenti azt, hogy idült gyulladásban a neutrofileknek nincs szerepe (ennek megfelelően fontosak pl. egyes krónikus betegségek akut fellángolásaiban).

populációk által leadott interleukin-17 (IL-17) fokozza. Az IL-17-produkció a makrofágokból és a dendritikus sejtekből származó IL-23 hatása alatt áll. Az apoptotikus neutrofilek makrofágok általi felvétele a gyulladt szövetekben csökkenti az IL-23 termelését, negatívan visszahatva a további neutrofilszám-növekedésre [6].<sup>4</sup>

A neutrofil granulociták működése számos ponton zavart szenvedhet, megnövelve a szervezet fogékonyságát bizonyos fertőzésekre. Amennyiben a neutrofilek érpálya-elhagyása során az adhézióban, valamint a transzendentáliális migrációban elengedhetetlen integrinek, azok közül is a  $\beta_2$ -integrinek CD18 láncá érintett, súlyos, visszatérő bakteriális fertőzésekkel lehet számolni (leukocita adhéziós deficiencia I-es típus) [8]. Ha a szöveti aktiváció során a NADPH-oxidáz funkcióképtelen (pl. krónikus granulomatózisban) [9], vagy egyes granulomok szelektíven hiányoznak (pl. neutrofil specifikus granulom deficienciában) rekurrens, gennykeltők általi gyulladások jelentkeznek.

Összegezve tehát elmondhatjuk, hogy a neutrofil granulociták esszenciálisak bizonyos kórokozókkal szembeni immunvédekezésben. Aktivációjuk – számos receptor közreműködésével – hatékony sejtválaszok kialakulását és a mikroorganizmus eliminálását eredményezi, ennek tükörképeként működészavaruk fokozott fertőzések iránti fogékonyságot okoz. A neutrofilek működésének minél pontosabb megismerése tehát igen lényeges kérdés.

## **3.2. Jelátviteli folyamatok az immunvédekezésben**

Az immunműködésekben számos receptor vesz részt, melyek részletes tárgyalása meghaladná dolgozatom keretét. Jelen fejezetben a klasszikus immunreceptorokkal – azokon belül is elsősorban az Fc $\gamma$ -receptorokkal – és a  $\beta_2$ -integrinokkal foglalkozom részletesebben.

### **3.2.1. Klasszikus immunreceptorok**

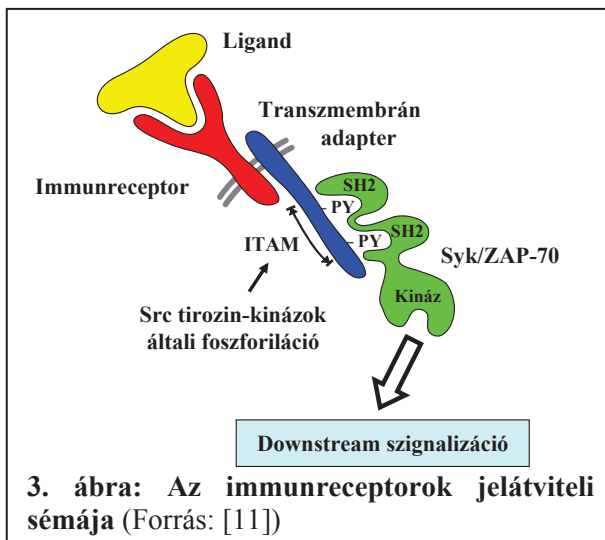
A klasszikus immunreceptorok az immunvédekezés esszenciális elemei. Ide tartoznak az antigén-receptorok (B-sejt receptor (BCR), a T-sejt receptor (TCR)) és az

---

<sup>4</sup> A folyamat a rezidens baktérium-flóra révén nagy valószínűséggel gyulladástmentes állapotban is regulálja a neutrofilek számát a szervezetben [7].

Fc-receptorok (FcR). Az adaptív immunitás kulcsszereplőivel, az antigén-receptorokkal szemben az Fc-receptorok a veleszületett immunvédekezés sejtípusain is megtalálhatóak és az immunrendszer két tagozata közötti kapcsolatban jelentősek. Az Fc-receptorok felosztása immunglobulin-ligandjaik nehézlánca alapján történik. Ennek megfelelően az IgG-t megkötőt Fc $\gamma$ -receptornak, az IgE-vel asszociálódót Fc $\epsilon$ -receptornak, az IgA-t felismerőt Fc $\alpha$ -receptornak, az IgM-t megkötőt Fc $\mu$ -receptornak nevezzük.

Az immunreceptorok jelátviteli folyamatai sok tekintetben hasonlóak és általánosságban a következőképpen jellemezhetőek (**3. ábra**) [10,11]. Valamennyi receptor jelpályájában fontos szereplők az Src-kinázok, melyek a receptor-komplexekkel nyugalomban is asszociálódni képes tirozin-kinázok. A receptorok ligandkötését követően az Src tirozin-kináz család tagjai foszforilálják a receptor



ligandkötő láncán vagy az azzal asszociálódó segédláncon (pl. Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ , CD3  $\zeta$ -lánc, Fc-receptor  $\gamma$ -lánc, DAP-12) található konzervált szignalizációs szakasz, az immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum (ITAM) két tirozinjét (a szekvencia leírására az YxxL-x<sub>6-8</sub>-YxxL képlet szolgál, ahol x bármilyen aminosavat jelölhet [12]).<sup>5</sup> Az ITAM- tirozinok foszforilációja

indítja el a további tirozin-kináz kaszkádot, melynek központi eleme az ITAM fosztotirozinokhoz Src-homológia 2 (SH2)-domén révén kapcsolódni képes tirozin-kináz, a Syk (BCR, FcR) vagy a ZAP-70 (TCR). Mindezek az immunreceptor jelátvitel disztális elemeihez, a mitogén-aktivált protein kinázokhoz (MAP-kináz), a transzkripció faktor NF- $\kappa$ B-hez (BCR esetében a CARMA1-Bcl10-Malt1 komplex közvetítésével), valamint az aktivált T-sejtek nukleáris faktorához, az NFAT-hoz vezetnek és hozzák létre a jellegzetes sejtválaszokat.

<sup>5</sup> Említésre méltó, hogy egyes esetekben az Src-kinázokon kívül más enzimek is foszforilálhatják az ITAM-tirozinokat (pl. a C-terminális Src-kináz vagy a Syk) [10].

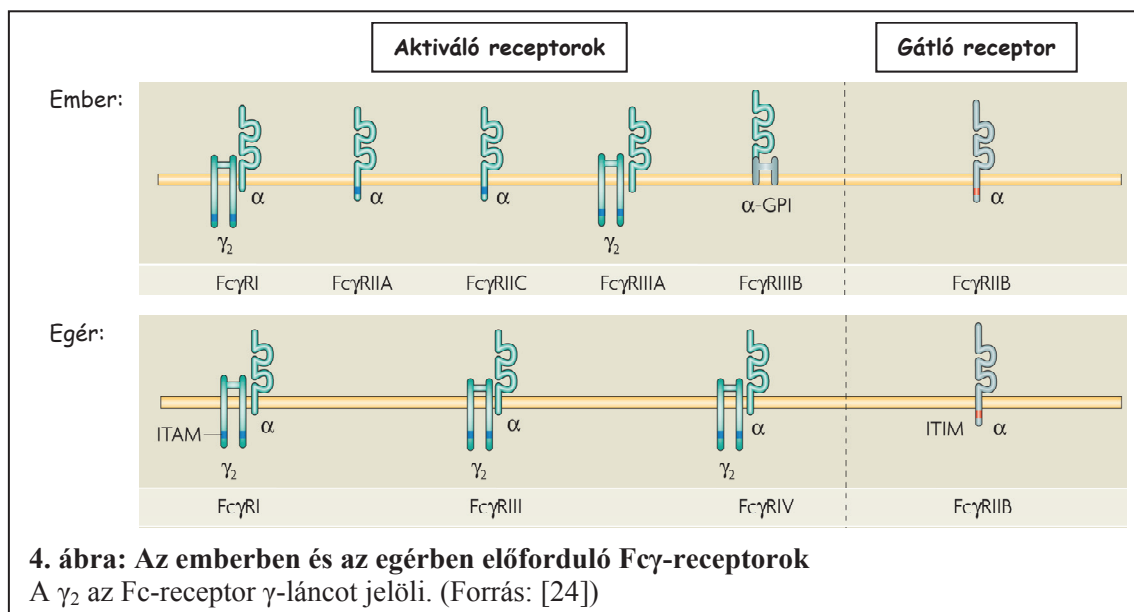
Az elmúlt években derült fény arra, hogy a sejtadhéziós molekula integrinek az immunreceptorokhoz hasonló jelátvitellel rendelkeznek a veleszületett immunvédelem számos sejtípusában, így makrofágokban, neutrofilekben [13], dendritikus sejtekben [14], oszteoklasztokban [15], vérlemezkékben [16] és mikrogliaokban [17].

A fejezet további részében elsősorban az Fc $\gamma$ -receptorokkal, valamint a  $\beta_2$ -integrinokkal foglalkozom részletesebben.

### 3.2.2. Az Fc $\gamma$ -receptorok és szerepük neutrofilekben

A természetes immunsejtek felszínén megtalálható Fc $\gamma$ -receptorok számos, a behatoló kórokozók eliminálásában fontos végrehajtó esemény elindítói lehetnek. Így létrehozhatják az ágens bekebelezését és intracelluláris elpusztítását, de fagocitózis nélkül is eliminálhatják a betolakodót (pl. antitest-dependens celluláris citotoxicitás, ADCC révén) [18-20]. Ezeken túlmenően az Fc $\gamma$ -receptorok részt vehetnek a dendritikus sejtek érésében és antigén-bemutatásában, szabályozhatják a B-sejtek aktivációját és a plazmasejtek túlélését [21,22]. Egyes autoimmun kórképek (pl. a szisztémás lupus erythematosus (SLE)) kialakulása és bizonyos Fc $\gamma$ -receptor polimorfizmusok között is határozott korreláció van [23].

Az Fc $\gamma$ -receptorok működésük alapján aktiváló és gátló csoportokba sorolhatóak (4. ábra). Az aktiváló Fc $\gamma$ -receptorok közé tartozik emberben az Fc $\gamma$ RI (CD64), az Fc $\gamma$ RIIA/Fc $\gamma$ RIIC (CD32A/CD32C) és az Fc $\gamma$ RIIIA/Fc $\gamma$ RIIIB (CD16A/CD16B), egérben pedig az Fc $\gamma$ RI, az Fc $\gamma$ RIII és az Fc $\gamma$ RIV [24]. (Az aktiváló Fc $\gamma$ -receptorokat





IgG iránti affinitásuk alapján is szokás csoportosítani. A nagy affinitással rendelkező Fc $\gamma$ RI-en kívül a többi receptor alacsony, illetve közepes affinitással jellemezhető [24]. Az egyetlen gátló receptor az Fc $\gamma$ RIIB.

A természetes immunitás sok sejtjéhez (pl. a makrofágokhoz) hasonlóan a neutrofil granulociták felszínén is nagy számban található Fc $\gamma$ -receptorok. Ezen receptorok aktiválását követően a sejtek leadják bizonyos granulumaik tartalmát, a NADPH-oxidáz alegységeinek összeállása következtében beindul a szuperoxid-termelés, immobilizált immunkomplex felszín esetében a sejtek alakja is megváltozik, a neutrofilek szétterülnek. Opszonizált kórokozóval történő interakció során beindul a fagocitózis és a különböző effektor válaszok következtében a behatoló ágens elpusztul és megemésztődik.

Humán neutrofil granulociták felszínén nyugalomban kétféle aktiváló Fc $\gamma$ -receptor található. Az Fc $\gamma$ RIIA és a feltehetően az Fc $\gamma$ RIIA-n keresztül szignalizáló Fc $\gamma$ RIIIB, mely glikozil-foszfatidil-inozitol-horgonnyal rögzül a plazmamembránhoz. Az Fc $\gamma$ RI csak egyes stimulusok (pl. interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )) hatására jelenik meg a sejtek felszínén [25-27]. Egér neutrofilek esetében a sejtek felszínén nyugalomban az Fc $\gamma$ RIII és az Fc $\gamma$ RIV fejeződik ki. A génszekvencia és az extracelluláris részek hasonlósága alapján az egér Fc $\gamma$ RIII a humán Fc $\gamma$ RIIA-nak, az Fc $\gamma$ RIV a humán Fc $\gamma$ RIIA-nak feleltethető meg.<sup>6</sup>

A neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor-mediált jelátvitelére a klasszikus immunreceptorokéval mutat hasonlóságot, azonban sok ponton még tisztázatlan. A receptorok jelpályájában számos tirozin-kináz vesz részt. Kezdeti lépésként az Src-kinázok aktiválódnak. Bár a Syk egyes Fc $\gamma$ -receptor-mediált válaszokban betöltött szerepét mind saját munkacsoportunk, mind más munkacsoportok is felvetették [28,29], a Syktól disztálisabban elhelyezkedő jelátviteli molekulák közül csupán néhányat sikerült eddig azonosítani (ezek közül a foszfolipáz C $\gamma$ 2 és a foszfatidil-inozitol-3-kináz  $\beta$  szerepe emelendő ki [30,31]). Mindezek felvetik a jelpálya további vizsgálatának szükségességét.

Jelenlegi ismereteink továbbá rendkívül hiányosak azon a téren, hogy vajon a neutrofilek felszínén található Fc $\gamma$ -receptorok képesek-e és amennyiben igen, milyen folyamatsoron keresztül hosszabb távú effektor válaszokat létrehozni (pl. képesek-e az

---

<sup>6</sup> Megemlítendő, hogy a gátló receptor Fc $\gamma$ RIIB is megtalálható neutrofil granulocitákon.

immunműködések regulálásában lényeges citokinek termelését beindítani). A kérdés elméleti jelentőségén messze túlmutat a neutrofilek különféle gyulladásokban betöltött fontos szerepe.

### 3.2.3. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ )

Az Fc $\gamma$ -receptorok (Fc $\gamma$ R) ligandkötő  $\alpha$ -láncának extracelluláris régiója két vagy három immunglobulin-szerű doménból épül fel [32]. Az  $\alpha$ -lánc ezen kívül tartalmaz még egy rövid transzmembrán szakaszt és egy intracelluláris régiót. Az Fc $\gamma$ RII és az Fc $\gamma$ RIIIB kivételével valamennyi Fc $\gamma$ -receptor  $\alpha$ -lánc rövid intracitoplazmatikus szakasszal rendelkezik. Ezen  $\alpha$ -láncok transzmembrán régiója töltött aminosavat (arginint (a humán Fc $\gamma$ RI esetében), esetleg hisztidint) tartalmaz, mely lehetővé teszi egy kis méretű (86 aminosavból álló), diszulfid-híddal kapcsolt homodimer segédlánc, az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR  $\gamma$ -lánc, FcR $\gamma$ ; rövidítése könnyen összetéveszthető az Fc $\gamma$ -receptorokéval) ellentétes töltésű aminosavjával (pl. aszpartáttal) létrejövő elektrosztatikus kapcsolatot (sóhid révén) [33]. Kiemelendő, hogy FcR $\gamma$  hiányában a segédlánccal kapcsolódó Fc $\gamma$ -receptorok nem fejeződnek ki a sejtek felszínén [33-35]. Ennek hátterében a sejtmembránban való stabilizálás hiánya (pl. Fc $\gamma$ RI esetében), esetleg az endoplazmatikus retikulumban történő retenció állhat (pl. Fc $\gamma$ RIIIA) [36].

Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ) szerkezetileg három részre osztható. Az extracelluláris szakasz nem tartalmaz ligandkötésre alkalmas részt. A transzmembrán régióban a ligandkötő receptor-láncokkal (pl. az Fc $\gamma$ -receptorok  $\alpha$ -láncával) való kapcsolódást lehetővé tevő töltött aminosav található. Az intracelluláris szakasz tartalmazza az immunreceptor jelátvitelnél tárgyalt immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívumot (az ITAM-et).

Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc nem csupán Fc $\gamma$ -receptorokkal asszociálódhat. Elsőként, mint a nagy affinitású Fc $\epsilon$ -receptor segédláncát írták le (innen ered a fehérjét kódoló gén neve is: *Fcer1g*). Az Fc-receptorokkal rokonságot mutató, a többek között a hízósejtek működésében szereplő [37], a neutrofileken is kifejeződő [38] Paired Immunglobulin-like receptor-A (PIR-A) rövid intracelluláris szakasszal és transzmembrán régiójában töltött arginin aminosavval rendelkezik [39], mely lehetővé teszi az FcR  $\gamma$ -láncal való kapcsolódását [40]). A PIR molekulák szoros rokonságot mutatnak a leukocita immunglobulin-like receptorokkal (LILR) is, melyek közül a

LILR1C egér neutrofileken is megtalálható. A LILR1C a PIR-A-hoz hasonlóan a transzmembrán doménjében töltött aminosavval rendelkezik és feltehetően FcR $\gamma$ -val kapcsolódik [41]. További, FcR  $\gamma$ -láncsal kapcsolódni képes receptor a többek között a humán neutrofilek és monociták aktivációjában fontos oszteoklaszt-asszociált receptor (OSCAR) [42] és az egyes gombafalkomponensek felismerését végző (a mintázatfelismerő receptorok közé tartozó) C-típusú lektin dektin-2, valamint egyes esetekben a humán Fc $\alpha$ -receptor (CD89) [43,44]. A vérlemezkék kollagén-receptor GPVI molekulája is FcR $\gamma$ -asszociált [45]. Bár egyelőre a pontos kapcsolódás nem ismert, úgy tűnik, hogy neutrofilekben és makrofágokban a  $\beta_2$ -integrinek működéséhez is szükség van segédláncra, így pl. az FcR $\gamma$ -ra [13].

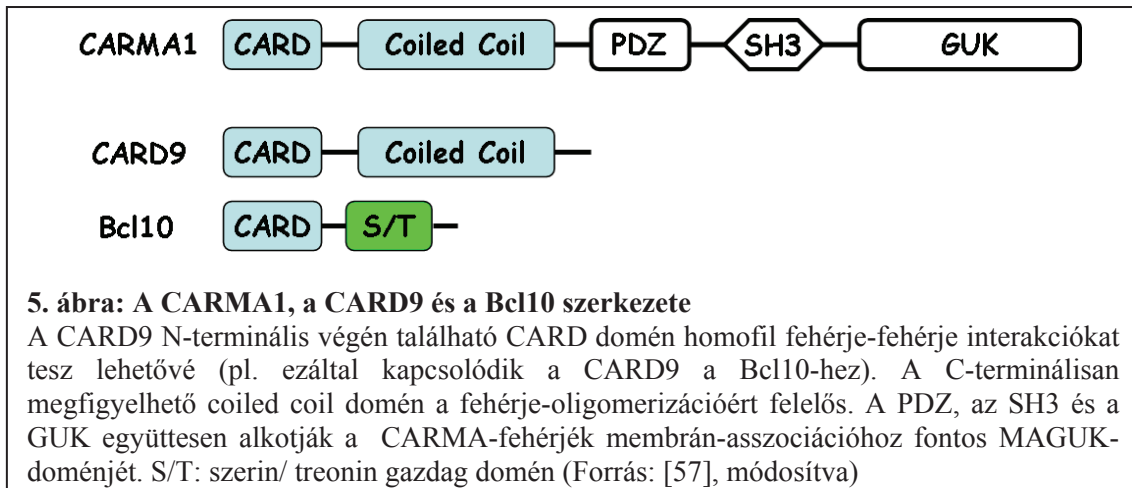
Fc-receptor  $\gamma$ -lánc hiányában számos sejtválasz károsodott: elmarad az opszonizált vörösvértestek makrofágok általi bekebelezése, a természetes ölüsejtek antitest-dependens celluláris citotoxicitás (ADCC) funkciója, nem alakulnak ki IgE-mediált hízósejtválaszok [34]. Ezeken túl az FcR $\gamma$ -hiányos egerek védettek az IgE-indukált anafilaxiával és az antitest-mediált glomerulonephritis-szel szemben [34,46]. Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc szükséges az autoimmun artritisz effektor fázisának kialakulásához is. Bár kollagén II-indukált artritisz (CIA) során FcR $\gamma$ -hiányos egerekben a vad típushoz hasonlóan létrejön az immunizáció, az állatok mégis védettek a gyulladás kialakulásával szemben [47]. Ezzel összhangban az ízületi gyulladás jelentős csökkenése figyelhető meg FcR $\gamma$ -hiányos egerekben humán glükóz-6-foszfát izomeráz-elleni antitesttel vagy anti-kollagén II antitesttel történő kezelést követően [48,49]. Hasonlóképpen védettek az FcR $\gamma$ -hiányos egyedek a K/BxN szérumsztransfer artritisz kialakulásával szemben [50]. Úgy tűnik, hogy ennek hátterében részben a neutrofil granulociták FcR $\gamma$ -expressziója áll [51].

Mivel Fc-receptor  $\gamma$ -lánc hiányában nem fejeződnek ki egérben aktiváló Fc $\gamma$ -receptorok (és további néhány receptor) az immunsejtek felszínén, nem egyértelmű, hogy az FcR $\gamma$  csupán a receptorok plazmamembránban történő stabilizációjához vagy esetleg azon túlmenően a receptorok működéséhez is szükséges-e (pl. ITAM-tirozinjai révén).

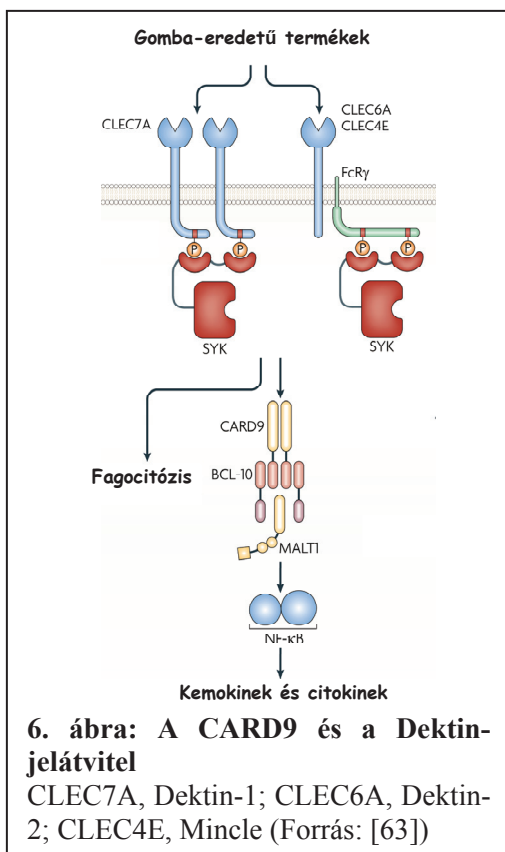
### 3.2.4. A CARD9, mint egy potenciális Fc $\gamma$ -receptor hírvivő

Mint korábban említettem, az immunreceptorok jelátvitelének fontos résztvevői az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktorok, melyek számos sejtfunkciót szabályoznak az immunsejtek érésén, aktivációján és túlélésén keresztül a proliferációig [52-55]. Emlőssejtekben a p50, a p52, a RelA (p65), a c-Rel és a RelB NF- $\kappa$ B alegységek fejeződnek ki, melyek mindegyike rendelkezik N-terminális DNS-kötő/dimerizációs doménnel [54]. Az NF- $\kappa$ B alegységek a sejtek nyugalmi állapotában a citoplazmában találhatóak dimer formában (pl. p50/p65) az I $\kappa$ B fehérjékhez asszociálódva, mely kölcsönhatás során az I $\kappa$ B fehérjék elfedik az NF- $\kappa$ B alegységek nukleáris lokalizációs szignálját és interferálnak a DNS-kötő régióival [56]. Megfelelő stimulusok hatására (így pl. az antigénreceptorok vagy a Toll-like receptorok ligandkötésének eredményeképpen) az I $\kappa$ B fehérjék a I $\kappa$ B kináz komplex révén foszforilálódnak és a proteasómában lebomlanak (klasszikus aktivációs út). Ezáltal az NF- $\kappa$ B alegységek szabaddá válnak és bejutnak a magba, ahol számos gén transzkripcióját befolyásolhatják, így pl. az antimikrobiális hatású defenzinek, citokinek, kemokinek átírását fokozhatják Toll-like receptor aktivációt vagy az interleukin-2 termelését eredményezhetik T-sejt receptor stimulációt követően [54]. A T- és B-sejt receptor jelátvitel során az NF- $\kappa$ B alegységek működésének fontos szabályozói a scaffold CARMA intracelluláris adapter fehérjék, azokon belül is elsősorban a CARMA1 (CARD11) [55]. A limfociták antigén-receptorának ligandkötését követően a CARMA1 két másik adapter fehérje (a Bcl10 és a Malt1) segítségével (ez a limfoid CBM-komplex) regulálja az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktorok magi transzlokációját, feltehetően az I $\kappa$ B kináz komplex közvetítésével [12,54].

A CARMA1-hez hasonlóan kaszpáz-aktiváló és -toborzó doménnel (caspase activation and recruitment domain, CARD) rendelkező CARD9 egy hozzávetőleg 60 kilodalton nagyságú intracelluláris adapter fehérje, mely nagy mértékben expresszálódik mieloid sejtekben (pl. dendritikus sejtekben, makrofágokban) (**5. ábra**) [57]. A molekulát a Millennium Pharmaceuticals adatbázisában történő, CARD-domén alapú keresés során találták meg 2000-ben [58]. Egyre több adat utal arra, hogy a mieloid sejtek immunreceptor(-szerű) jelpályájában is megtalálható egy, a limfoid CBM-hez hasonló CARD9-Bcl10-Malt1 trimerikus komplex (mieloid-CBM, M-CBM, [12,59]).



Egyes mieloid sejtekben a CARD9 részt vesz bizonyos sejtfelszíni mintázat-



felismerő receptorok ITAM-szerű jelpályájában.<sup>7,8</sup> A CARD9 elengedhetetlen a gombafalalkotó  $\beta$ -glukánt felismerő receptor, a Dektin-1 (CLEC7A) jelátviteléhez [59,61]. A C-típusú lektinek közé tartozó Dektin-1 intracelluláris szakaszán egyetlen tirozint tartalmazó ITAM-szerű domén (hemITAM) található. Ennek megfelelően az SH2-domén-tartalmú molekulák (pl. Syk) aktivációjához feltehetően két receptor együttes ligandkötése szükséges [63]. Az aktivált Syk tirozin-kináz fontos szereplője mind a Dektin-1-mediált fagocitózisnak, mind a citokin- és kemokin-termelésnek dendritikus sejtekben [64,65]. A Syktól a jelpályában disztálisabban elhelyezkedő CARD9 ellenben a zimozán-

indukált fagocitózishoz nem szükséges, ugyanakkor elengedhetetlen a citokin-

<sup>7</sup> A CARD9 fontos szereplőnek tűnik egyes intracelluláris mintázat-felismerő receptorok jelátvitelében is. CARD9 hiányában elmarad a peptidoglikán-származék muramil-dipeptid NOD2-n keresztül létrejövő p38-foszforylációt, valamint a TNF $\alpha$ - és IL-6-termelést okozó hatása [60]. A CARD9 továbbá esszenciálisnak tűnik az intracelluláris kórokozó *Listeria monocytogenes*-szel szemben [60,61]. Ezekon túlmenően CARD9-függőnek bizonyult az intracelluláris TLR3 és TLR7 [60], valamint a vírusszenzor RIG-I jelátvitel is [62].

<sup>8</sup> A CARD9 Toll-like receptor jelátvitelben betöltött szerepe meglehetősen ellentmondásos [59,61].

produkcíóhoz dendritikus sejtekben. A CARD9 ez utóbbi hatását az NF- $\kappa$ B-alegységek aktivációja révén, feltehetően a Bcl10-Malt1 komplexen keresztül hozza létre (**6. ábra**) [59,61]. Az aktivált Syk és a CARD9 között a protein-kináz C $\delta$  (PKC $\delta$ ) áll: Dektin-1 stimulációt követően a PKC $\delta$  foszforilálódik, hiányában érintetlen a Syk-foszforiláció, ellenben károsodott a CARD9-foszforiláció, valamint a CARD9-Bcl10 asszociáció [66]. Egy másik C-típusú lektin, az Fc-receptor  $\gamma$ -láncához kapcsolt Dektin-2 (Syk-függő) jelátvitelében is fontos szereplőnek tűnik a CARD9. (Ebben az esetben a CARD9 nagy valószínűséggel a Th17-polarizációhoz is szükséges [67].) A fentiekkel összhangban a CARD9-hiányos egerek nagy mértékű fogékonyságot mutattak a *Candida albicans* fertőzéssel szemben [59]. Azonosítottak továbbá emberben egy recesszíven öröklődő CARD9-mutációt, mely mucocutan candidiasisra, esetenként invazív candidiasisra hajlamosít [68].

Dendritikus sejtekben és makrofágokban a CARD9 megkerülhetetlen résztvevőnek tűnik klasszikus ITAM-függő folyamatokban is. Az Fc $\gamma$ -receptor III kiváltotta TNF $\alpha$ -, interleukin-6-, valamint interleukin-12-termelés jelentősen károsodott CARD9 hiányában [61]. Hasonlóképpen a korábban említett FcR $\gamma$ -kapcsolt OSCAR, illetve DAP12-asszociált TREM-1 stimulációja is csökkent citokin-produkciót eredményezett CARD9<sup>-/-</sup> sejtek esetében. Ezen folyamatok Bcl10-függőnek bizonyultak, felvetve, hogy nagy valószínűséggel a CARD9 a Bcl10 adapter fehérjével való kapcsolatán keresztül szabályozza ezekben az esetekben is az NF- $\kappa$ B-citokin útvonalat [61]. Mindezek arra utalnak, hogy a limfociták antigénreceptor jelátviteléhez hasonlóan a mieloid sejtek ITAM-függő, NF- $\kappa$ B-aktivációhoz vezető folyamataiban is fontos résztvevő a CBM-komplex, csupán ez utóbbi esetben a CARMA1 helyett a CARD9 a trimerikus komplex tagja.

A Syk tirozin-kináz esszenciális alkotója neutrofil granulociták egyes ITAM-mediált folyamatainak: hiányában mind az Fc $\gamma$ -receptorokon [28,29], mind a  $\beta$ <sub>2</sub>-integrineken keresztüli aktiváció károsodott [69]. Ezen túlmenően munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a Syk-hiányos egerek teljes védettséget élveztek az Fc $\gamma$ -receptor-,  $\beta$ <sub>2</sub>-integrin- és neutrofil-dependens autoantitest-mediált autoimmun ízületi gyulladásban, a K/BxN szérumszintézis artritiszben [70], mely részben a neutrofil granulocitákban kifejeződő Syknek volt köszönhető [29]. Annak ellenére, hogy a CARD9 határozott expressziót mutat mieloid sejtekben és szerepét kimutatták

makrofágok, valamint dendritikus sejtek ITAM-függő (és ITAM-szerű) folyamataiban, ahol a molekula a Syktől disztálisan aktiválódik, a CARD9 szerepéről nincs adat neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében. Nyitott kérdés továbbá, hogy a CARD9 a fertőzőes gyulladások mellett szerepet játszik-e (steril) autoimmun folyamatokban.

### 3.2.5. A $\beta_2$ -integrinek és jelentőségük a neutrofil granulociták működésében

Az integrinek fontos sejt-sejt/sejt-extracelluláris mátrix kapcsolóelemek, adhéziós molekulák. Szerkezetileg nemkovalens módon kapcsolt heterodimerek: egy  $\alpha$ - és egy  $\beta$ -láncból állnak [71]. Nevezéktanuk alapját elsősorban  $\beta$ -láncuk adja, ennek megfelelően beszélünk többek között  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -integrinekről. Az integrinek integráns plazmamembrán-receptorok, melyek láncként egy több száz aminosavból álló extracelluláris, egy transzmembrán és egy, a belső citoskeletális rendszerhez horgonyzódó, 20-70 aminosavból álló citoplazmatikus régiót tartalmaznak [72]. Ezen adhéziós molekulák kétirányú jelátvitésre képesek. A nyugalomban az alacsony affinitású OFF („kikapcsolt”) állapotban lévő fehérjék a sejt belsejéből érkező szignálok hatására konformáció- és membrán-lokalizáció változáson mennek keresztül: megnövekszik a molekulák ligandjaik iránti affinitása, megnő a fehérjék lokális sűrűsége a plazmamembránban és a létrejövő kötések erősebbekké válnak (fokozódó aviditás). Mindezeket együttesen belülről-kifelé irányuló, azaz „inside-out” szignalizációnak nevezzük. (Természetesen a sejt kapcsolódásra képes állapotba hozásában a megfelelő stimulusok hatására az intracelluláris granulumokból kihelyeződő „újabb” integrinek is fontos szereplők (ez az integrin-upreguláció folyamata)). Az integrinek természetesen nem csupán passzív kapcsolóelemek, ligandjaik megkötését követően jelátvitel indul a sejt belsejébe („outside-in” szignalizáció). Az integrin-mediált folyamatok közé számos sejtválasz tartozik. Az integrinek befolyásolhatják a sejtek citoskeletális átrendeződését, vándorlását, túlélését, transzkripciós aktivitását, proliferációját [71,73].

A  $\beta_2$ -integrinek, más néven leukocita integrinek elengedhetetlenek az egészséges immunműködésekhez. A  $\beta_2$ -integrinek (CD11/CD18: CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1), CD11c/CD18 (CR4), CD11d/CD18) fontos szereplői a neutrofilek működéseinek, melyet jól példáz a CD18-defektussal jellemezhető humán

Leukocita adhéziós deficiencia I-es formájának (LAD I) klinikai megjelenése [8]. A kórképben szenvedő egyénekre jellemzőek a visszatérő, makacs bakteriális gyulladások és a csökkent sebgyógyulási hajlam [8,9]. A kórkép hátterében főként a neutrofil granulociták és a monociták károsodott érpálya-elhagyási képessége (valamint a T-sejtek csökkent működése) áll. A  $\beta_2$ -integrinek ugyanis elengedhetetlenek az érpálya-elhagyás során a neutrofileknek a gyulladással kapcsolatos mediátorok által megváltoztatott felszíni expressziót mutató endotélial kovalens kötött integrin-  
ligand felszínen és opsonizált zimoszán kiváltotta oxidatív intermedierek-termelése is erőteljesen károsodott a vad típusú sejtekéhez képest [74], egybehangzóan a humán LAD I-es betegekből származó neutrofilek fMLP-aktivációt követő csökkent letapadási képességével [75] (mindkét esetben a CD18-hiányos eredményeket blokkoló antitestekkel is megerősítették). A nagy mértékű granulocitózissal (és a humán LAD I-hez hasonlóan nagyobb bakteriális fertőzések iránti fogékonysággal) jellemezhető CD18-hiányos egerekben<sup>9</sup> a toxikus bőrgyulladás indukcióját követően csak elenyésző mértékben jelentek meg neutrofilek a bőrben, melynek oka feltehetően a sejtek csökkent endotélialhoz való tapadásában keresendő, mivel a CD18-hiányos neutrofilek fMLP-kiváltott, intravitális mikroszkóppal a cremaster vénákban vizsgált adhézioja drasztikus csökkenést mutatott a CD18-at kifejező sejtekével szemben [74]. A  $\beta_2$ -integrinek azonban nem csupán a neutrofilek érpályából való kijutásához (elsősorban a CD11a/CD18 révén) és szöveti aktivációjához (döntően a CD11b/CD18-on keresztül) szükségesek, hanem fontosak egyes baktériumok közvetlen elpusztításában is, így CD11b-blokkoló antitestek jelenlétében (valamint a komplement-receptor 4 (CD11c/CD18)  $\alpha$ -láncának gátlása esetén) károsodott volt a TNF $\alpha$ -előkezelt neutrofilek *Staphylococcus aureus* pusztítása [77].

### 3.2.6. A $\beta_2$ -integrinek jelátvitelének neutrofil granulocitákban

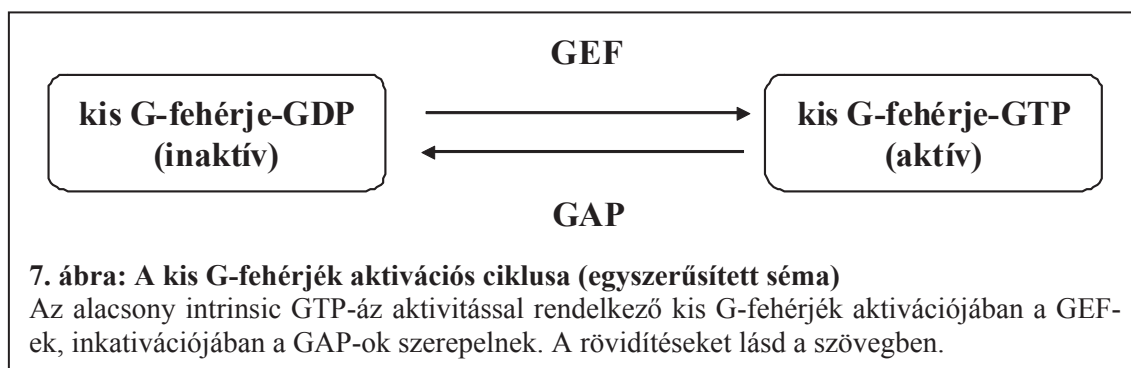
Fagocitasejtekben a  $\beta_2$ -integrinek ligandkötésüket követően komplex, a mai napig nem minden elemében tisztázott jelátviteli folyamatot indítanak meg. Bár az integrinek saját enzimaktivitással nem rendelkeznek, jelátvitelükben azonban számos

<sup>9</sup> Ezt a null mutáns allélt homozigóta formában hordozó egértörzs (*Itgb2*<sup>tm2Bay/tm2Bay</sup>) [71] nem tévesztendő össze a hipomorf mutáns allélvariánst homozigótaként tartalmazó egérkolóniával (*Itgb2*<sup>tm1Bay/tm1Bay</sup>) [76].



enzim szerepel [11]. Neutrofil granulociták és makrofágok integrin-mediált jelátviteli folyamataihoz elengedhetetlen egy intracellulárisan foszforilálható tirozinokat tartalmazó transzmembrán adapter segédlánc, az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ) vagy a DAP12 jelenléte [13]. A segédláncok foszforilációját az Src-kináz család tagjai végzik [13], melyek mind neutrofilek, mind makrofágok integrin-jelátvitelének fontos szereplői: genetikai hiányuk határozott károsodást eredményezett az adhézió-függő sejtválaszokban egérben [78-80]. A  $\beta_2$ -integrinek ligandkötésének hatására aktiválódó jelpályában további tirozin-kinázok is szerepelnek, így fontos résztvevő a Syk tirozin-kináz is: hiányában elmarad az adhézió-függő módon aktivált neutrofilek szuperoxid-termelése, laktoferrin-leadása és szétterülése, valamint a monociták ICAM-1-függő szétterülése [69,81]. Az FcR $\gamma$  és a DAP12 foszforilált ITAM-tirozinjai ideális dokkoló felszín biztosítanak a Syk tirozin-kináznak; a kináz egyes SH2-doménon belüli pontmutációi megakadályozzák a segédláncsal való kapcsolódást következményes sejtválasz-károsodást okozva [13]. A fent vázolt Src-család–foszforilált-ITAM–Syk jelátviteli útvonal a klasszikus immunreceptorok jelpályájához igen hasonló.

A proximális eseménysorok viszonylagos tisztázottsága ellenére a fagocitasejtek  $\beta_2$ -integrin jelátvitelének további lépéseiről kevés adat áll rendelkezésre. A kivételek közé tartozik az immunreceptor szignalizációban fontos adapter fehérje, az SLP-76, melynek hiánya esetén a Sykhez hasonlóan károsodik a  $\beta_2$ -integrin-jelátvitel neutrofilekben [82], valamint a foszfolipáz C $\gamma$ 2, mely ugyancsak elengedhetetlen résztvevőnek bizonyult neutrofilek adhéziófüggő folyamataiban [30,83]. Külön kiemelendő a kis intrinsic GTP-áz aktivitással rendelkező kis G-fehérjék, azok közül is a Rho család tagjainak szerepe. A kis G-fehérjék jellegzetes aktivációs ciklussal



rendelkeznek: az inaktív, GDP-kötő és az aktív GTP-kötő forma közötti átmenetet a Guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) és a GTP-hidrolízist gyorsító GTP-áz aktiváló fehérjék (GAP-ok) teremtik meg (7. ábra). Bár a Rho kis G-fehérje család több

neutrofil granulocitában megtalálható tagja (pl. Rac1, Rac2, Cdc42, Rho) fontos szereppel bír a  $\beta_2$ -integrin-mediált sejtválaszok kialakulásában [84-87], ugyanakkor ezen kis G-fehérjék működésének pontos szabályozása a  $\beta_2$ -integrin-mediált folyamatokban nem teljesen ismert. Ez felveti a veleszületett immunvédekezésben nélkülözhetetlen neutrofil granulocita  $\beta_2$ -integrin-jelátvitel további vizsgálatának szükségességét.

### 3.2.7. A p190RhoGAP, mint lehetséges integrin-szabályozott molekula neutrofilekben

Mint említettük, a neutrofilek  $\beta_2$ -integrin-jelátvitel komplex és mind a mai napig nem teljesen tisztázott folyamatsor. A  $\beta_2$ -integrinek ligandkötését követően a **neutrofilekben** kifejeződő Src tirozin-kináz család tagjai (a Hck, az Fgr és a Lyn fehérjék) aktiválódnak. Hck és Fgr hiányában károsodott a neutrofilek adhézió-függő szétterülése és szuperoxid-termelése [78], degranulációja [80], valamint migrációja [69]. Az Src-kinázok egyes esetekben feltehetően a Rho kis G-fehérjéken keresztül hoznak létre sejtválaszokat neutrofilekben. A Rho kis G-fehérjék családjába tartozó molekulák közül a Rac1, Rac2, a Cdc42 és a RhoA is fontos szereplő neutrofilek  $\beta_2$ -integrin-jelátvitelében és az aktin citoskeletális átrendeződés révén a migrációban. Rac1<sup>-/-</sup> egerekben csökkent a neutrofilek fMLP kiváltotta, tüdőszövetbe történő vándorlása [88], Rac1 és Rac2 együttes hiányában pedig jelentősen károsodott a neutrofil granulociták CD18-függő letapadása és irányított kemotaxisa Boyden-kamrában [84]. A hemopoetikus-specifikus expressziót mutató Rac2 továbbá fontos résztvevője neutrofilek kemoattraktáns-indukált primer granulom-ürítésének (pl. mieloperoxidáz- és elasztáz-leadás) [89] és fMLP-, valamint Fc $\gamma$ -receptor-mediált szuperoxid-termelésének [90] (mely utóbbi háttérében nem a p47phox és a p67phox membrán-transzlokációjának zavara áll [91]). A Rac2 egyik mutációjában súlyos, életet veszélyeztető infekciók alakulnak ki csecsemőkorban: a LAD I jellegzetességeit (pl. neutrofilia, csökkent neutrofilszám a gyulladós helyszíneken [92]) mutató kórkép háttérében fagocita-deficiencia áll (ennek megfelelően egyes szerzők a betegséget a LAD IV-es formájának tartják) [93-95]. A Cdc42 kis G-fehérjéről kimutatták, hogy képes a neutrofilek polarizációját (és migrációját) a Mac-1 jelátvitelének módosításán

keresztül befolyásolni [86]. A RhoA ugyancsak lényeges regulátora a granulociták migrációjának [87,96].

Integrinek, Src-kinázok és kis G-fehérjék azonban számos **nem-hemopoetikus sejtben** is jelen vannak és sokféle funkciót szabályoznak a lamellopodium/filopodium képzésén át a sejt vándorlásig [97,98]. A hemopoetikus sejtekkel ellentétben ezekben a sejtekben az integrin–Src kezdeti lépéssort a kis G-fehérjékkel összekötő mechanizmus részleteiben jóval ismertebb és részben egy 190 kDa méretű GTP-áz aktiváló fehérje, a p190RhoGAP (másik nevén Grf1, p190-A vagy ARHGAP35) révén jön létre. Fibroblasztokban a p190RhoGAP az Src-kinázok egyik szubsztrátja: az epidermális növekedési faktor (EGF) hatására tirozinokon foszforilálódik [99,100], a p190RhoGAP teljes tirozin-foszforilációja pedig az aktív c-Src mennyiségét tükrözi [101]. (A c-Src overexpressziója esetén a p190RhoGAP-foszforiláció emelkedését megnövekedett DNS-szintézis követi [101], mivel a p190RhoGAP talán a kis G-fehérjék és a nukleáris történések kapcsolódásában is szerepet játszik [102]). A p190RhoGAP-ról továbbá kimutatták, hogy idegsejtekben az egyik fő Src-szubsztrát [103]. Fibroblasztokban és melanomasejtekben úgy tűnik, hogy a molekula tirozinon történő foszforilálódása és/vagy membrán-transzlokációja integrinek ligandkötését követően jön létre [104-106].

A p190RhoGAP mind sejtmentes, mind sejtes rendszerekben képes GAP-aktivitást kifejteni a Rho kis G-fehérje család tagjain [107,108] (a családon belüli szubsztrát-specifitását jelentős mértékben befolyásolja a protein-kináz C általi foszforiláció [109]), felvetve, hogy a fehérje esetleg kapcsolódási pont lehet az integrinek és a kis G-fehérjék között. Ezt látszik alátámasztani, hogy a p190RhoGAP overexpressziója fokozta a fibroblasztok szétterülését és migrációját [110] és az idegsejtek integrin-függő neurit-növekedését [103], ugyanakkor a p190RhoGAP funkciójának blokkolása gátolta a fibroblasztok szétterülését, adhézióját, polarizációját és vándorlását [110]. A p190RhoGAP hipomorf mutáns allélt homozigóta formában tartalmazó magzatokban (melyek egy N-terminális régió nélküli csonkolt p190RhoGAP-ot expresszálnak) megfigyelhető jellegzetes idegrendszeri rendellenességeket (pl. corpus callosum és commissura anterior agenesia) [111] feltehetően integrin-mediált axon-növekedési zavar okozza [103].<sup>10</sup>

<sup>10</sup> A p190RhoGAP hipomorf allélra homozigóta magzatok (*Grf1<sup>tm1JSet/tm1JSet</sup>*) perinatális letalitást mutatnak. Ezekben a magzatokban a fenti idegrendszeri eltéréseken kívül egyéb súlyos

A nem-hemopoetikus sejteken (pl. fibroblasztokon) végzett, a fentiekben tárgyalt kísérletek felvetették, hogy a p190RhoGAP esetleg szerepet játszhat hasonló folyamatokban hemopoetikus sejtekben is. Ezt a felvetést támogatja, hogy a p190RhoGAP megtalálható neutrofilekben és különböző stimulusok hatására (pl.  $\beta_2$ -integrinek keresztükötése, fMLP) a citoszolból a membránhoz képes transzlokálódni [112-115]. Rekombináns p190RhoGAP sejtmentes rendszerben képes fokozni a Rac1, valamint a Rac2 GTP-áz aktivitását és ezáltal csökkenteni a szuperoxid-termelést, felvetve, hogy a p190RhoGAP esetleg képes szabályozni a NADPH-oxidáz működését [112]. Humán neutrofilek  $\beta_2$ -integrin keresztükötése azon túl, hogy a p190RhoGAP membránhoz történő áthelyeződését eredményezte, fokozta a fehérje RhoA-GAP aktivitását és a p120RasGAP-pal történő asszociációját, mely folyamatok Src-kináz gátlókkal felfüggeszthetőnek bizonyultak [114].<sup>11</sup>

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy nem-hemopoetikus sejtek integrin jelátvitelében az Src-kinázok és a kis G-fehérjék között fontos kapcsolódási pont a p190RhoGAP, ugyanakkor neutrofilek működésében a p190RhoGAP pontos szerepe még tisztázatlan.

### 3.3. Autoimmun betegségek

#### 3.3.1. Az autoimmun betegségek általános jellemzése

Az autoimmun betegségek krónikus, progresszív kórképek, melyek az Amerikai Egyesült Államok lakosságának közel 3%-át érintik és 90/100 000 új megbetegedést eredményeznek évente [117,118]<sup>12</sup>. Bár a megbetegedések relatíve ritkák, a fiatal- és középkorú nők (< 65 év) egyik legjelentősebb haláloki tényezői az Amerikai Egyesült Államokban [118], de jelentős mortalitási tényezők a 75 év alatti korosztályban Nagy-Britanniában is [120] (Magyarországi adatok nem állnak rendelkezésre). Az autoimmun kórképeket klasszikusan szisztémás (pl. szisztémás lupus erythematosus (SLE)) és szervspecifikus (pl. I-es típusú diabetes mellitus) csoportokba osztják, bár a klinikailag

---

központi idegrendszeri károsodások is kialakulhatnak: velőcsőzáródási rendellenesség, a nagyagy féltekéinek károsodott fúziója, az oldalkamrák alakjának torzulása, a nagyagy rétegződésének érintettsége és a szemkehely záródásának zavarai (coloboma) [111].

<sup>11</sup> A p190RhoGAP szerepe a neutrofileken túl felmerült makrofágokban is [116].

<sup>12</sup> Magyarországon az autoimmun betegségek előfordulási gyakoriságát 5 %-ra teszik [119].

hasznos felosztás korántsem jelenti azt, hogy a betegségek hátterében jelentősen eltérő patomechanizmus állna [121].

A korábbi központi nézet szerint az autoimmun betegségek olyan, az immuntolerancia letörése következtében kialakuló kórképek, melyek hátterében kizárólag az autoantigénekkal reagálni képes autoreaktív limfociták eliminálásának (klonális deléciójának) károsodása áll, mely megzavarja a szervezet saját-idegen antigén-felismerési képességét [121]. Ugyanakkor mára világossá vált, hogy egészséges szervezetben is megtalálhatóak kis mennyiségben „csendes” autoreaktív limfociták, melyek fontosak a normál immunműködésekhez és önmagukban nem okoznak autoimmun folyamatokat. A ma elfogadott nézet szerint az autoimmunitás kialakulásának ugyanis az autoreaktív limfociták jelenlétén túli további lényegi eleme a proinflammatorikus citokinek által létrehozott lokális mikroökönyezet [121], mely az autoreaktív limfociták aktivációján keresztül eredményez határozott immunválaszt az idegenként felismert saját autoantigének jelenlétében.

Az autoimmun betegségek kialakulásában számos genetikai és környezeti faktor vehet részt. A legismertebb az autoimmun betegségek és az MHC-allélvariánsok kapcsolata: egyes változatok hajlamot, mások védelmet biztosítanak. Így pl. a HLA-B27 jelenléte Bechterew-kórra hajlamosít [122], míg egyes HLA-DQ variánsok esetében csökken az I-es típusú diabetes mellitus kialakulásának a valószínűsége [123]. Az ösztrogén szerepe is jelentős: nőkben jóval gyakoribbak az autoimmun kórképek [118]. Egyes fertőzések a bakteriális mimikri révén segíthetik az autoimmun kórkép bekövetkeztét, erre jó példa a *Campylobacter jejuni* infekció és a Guillain-Barré szindróma kapcsolata [124]. Néhány gyógyszer is autoimmun betegség-szerű kórképeket eredményezhet (pl. egyes cephalosporinok hapténként viselkedve hemolitikus anémiát okozhatnak [125]).

Klasszikusan az autoimmun kórképek patogenezisét több szakaszra oszthatjuk (lásd később a 9. ábra A részét, [III]). Az első – klinikailag csendes – immunizációs időszakban az adaptív immunvédekezés sejtjei (egyes T- és B-limfocita populációk) specifikus módon felismerik az autoantigént, aktiválódnak és proliferálnak. Ezt követően a létrejövő effektor T-sejtek vagy a termelődő autoantitestek a megfelelő szövetekben felhalmozódnak és – elsősorban – a természetes immunvédelem sejtjei

révén létrehozzák a szövetkárosítást (effektor fázis). A két folyamat között esetenként elkülönítünk egy átmeneti fázist is (pl. a rheumatoid artritisz esetén).<sup>13</sup>

Mint azt a továbbiakban részletesen tárgyaljuk, az autoimmun betegségek terápiája korántsem mondható megoldottnak és a jelenleg használatos szerek számos mellékhatással rendelkeznek. Mindez felveti a patomechanizmusok pontosabb feltérképezésének, valamint újabb támadáspontok és potenciális gyógyszerek azonosításának igényét.

### 3.3.2. Az autoimmun ízületi gyulladások, a rheumatoid artritisz

Az autoimmun ízületi gyulladások krónikus lefolyást mutató, kifejezett fájdalommal és fokozódó mozgáskorlátozottsággal járó betegségek. Ide tartozik többek között a rheumatoid artritisz (RA), az artritisz psoriatica és a szisztémás lupus erythematosus-hoz társuló artritisz. Az autoimmun ízületi gyulladások a világ fejlett országaiban élők egy tekintélyes hányadát érintik: az egyik leggyakoribb forma, a csoport prototípusának is tekinthető rheumatoid artritisz egyes becslések szerint az össznéesség 1%-ánál fordul elő [126,127]<sup>14</sup>. A betegség jellemzően az idősebb korosztályt érinti, azon belül is elsősorban a nőket, azonban egyre gyakrabban jelentkezik napjainkban már középkorúakban is. A korábban említetteknek megfelelően a rheumatoid artritisz kialakulásában mind genetikai tényezők (pl. a humán leukocita antigén (HLA)-DRB1 lókuszában egyes változatai), mind környezeti faktorok (pl. dohányzás) fontos szerepet játszanak.

Klinikailag a rheumatoid artritisz egy progresszív autoimmun ízületi gyulladás, mely kezdetben tipikusan a kéz kisízületeit támadja meg és ezt követően válik sokízületi gyulladássá. A betegség során jellegzetes a szinoviális területen megfigyelhető sejtszám-szaporulat (hyperplasia), valamint az egyre inkább



**8. ábra: Súlyos rheumatoid artritisz röntgenképe** (Forrás: www.gentili.net)

<sup>13</sup> Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy a fent említett stádiumok – krónikus betegségekről lévén szó – a klinikai tünetek megjelenését követően már bizonyos mértékig párhuzamosan zajlanak a szervezetben.

<sup>14</sup> A magyarországi adatok hasonló tartományba esnek [128].

előtérbe kerülő porc- és csontdestrukció, következményes ízületi deformitással. Ezek együttesen az ízületi funkció súlyos mértékű csökkenéséhez, végső soron a beteg munkaképességének beszűküléséhez vezethetnek (**8. ábra**). A diagnózis felállításához használt alacsony érzékenységű és fajlagosságú korábbi kritériumrendszereket (pl. ACR 1987) a jövőben felváltó 2010-es kritériumrendszer (ACR/EULAR 2010) az alábbi tényezőket veszi figyelembe: az érintett ízületek száma, a szerológia eredmények (rheumatoid faktor, autoantitestek jelenléte), a gyulladásos markerek (pl. C-reaktív protein) szintjének emelkedése és a tünetek fennállásának ideje [129].

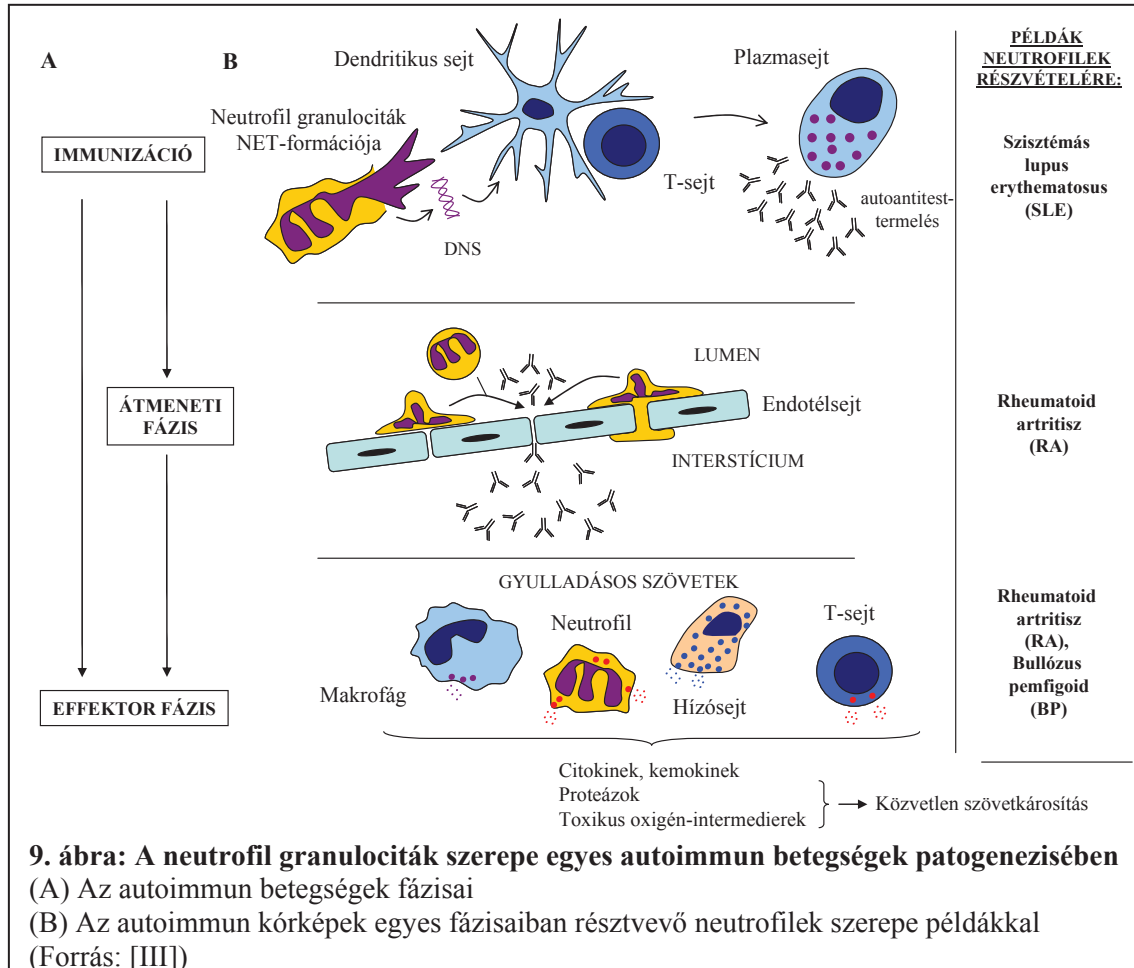
A rheumatoid arthritisz patogenezisében számos sejttípus szerepel. Míg az immunizációs fázist viszonylag kevés számú sejtpopuláció hozza létre (így antigénprezentáló, valamint B- és T-sejtek), a klinikai tünetek gazdag sorát létrehozó effektor stádiumban már jóval többféle sejttípus szerepel: szinoviális fibroblasztok [130], endotélsejtek, osteoblastok [131], kondrociták, makrofágok [132], hízósejtek [133], vérlemezkék [134], neutrofilek [135-137]. Dolgozatomban ez utóbbi, egyes autoimmun gyulladásos léziókban nagy számban megtalálható sejttípussal foglalkozom.

### **3.4. Autoimmun kórképek, neutrofilek és az immunreceptor(-szerű) jelátvitel: kapcsolódási pontok**

#### **3.4.1. A neutrofilek szerepe autoimmun betegségekben**

Egyre több kísérletes és klinikai adat mutat arra, hogy a May-Grünwald-Giemsza keneten jellegzetes morfológiát mutató neutrofil granulociták egyes autoimmun betegségek kialakulásában fontos szereppel bírnak [III]. A neutrofilek az autoimmun betegségek valamennyi fázisában szerepet játszhatnak (**9. ábra**). A sejthalál egy jellegzetes formáján, a NET-formáción keresztülmenő neutrofilekről *in vitro* mérésekben kimutatták, hogy fontos forrásai lehetnek azon DNS-antimikrobiális peptid komplexeknek, melyek ellen autoantitestek termelődnek szisztémás lupus erythematosus-ban [138,139]. Autoantigént szolgáltathatnak a neutrofilek autoimmun vasculitiszben is. Az immunizációs fázisban termelődő autoantitestek szöveti lerakódásához bizonyos esetekben ugyancsak fontosak a neutrofilek. Így mind a neutrofilek genetikai hiánya [140], mind a neutrofilek antitesttel történő depléciója esetén [141] jelentősen csökken az autoantitest-lerakódás a humán rheumatoid arthritisz egyes egérmódeljeiben. Az effektor fázisban történő neutrofil-részvételre ugyancsak

számos adat utal: így a neutrofilek nagy számban találhatóak meg egyes autoimmun ízületi gyulladásban szenvedő betegek szinoviális folyadékában [142], ahol a jelenlévő mediátorok egy jelentős része feltehetően neutrofil eredetű, illetve részben a neutrofileken fejt ki hatásait [136].



A fent említett betegségeken kívül egyes autoimmun bőrbetegségeken is jelentős résztvevők a neutrofilek. Egy autoimmun hólyagos bőrbetegségben, a bullózus pemfigoidban (BP-ben) szenvedő betegek autoantitestet tartalmazó széruma ex vivo kísérletben a dermális-epidermális határra toborozta a neutrofileket, ahol a sejtek a két réteg elválasztását eredményezték [143]. Újszülött egerekben a bullózus pemfigoid 180 antigén ellenes antitestekkel BP-szerű betegséget lehet kiváltani, ahol a léziókban nagy számban találhatóak neutrofilek, melyek depléciója védettséget eredményezett a betegség kialakulásával szemben [144,145]. Egy másik hasonló megbetegedés, az epidermolysis bullosa acquisita (EBA) hátterében leggyakrabban a VII-es kollagén ellenes autoantitestek megjelenése áll. Humán fagyasztott bőrmetszetek EBA-s betegtől



származó szérummal való kezelését követően a neutrofilek a dermális-epidermális határra vándoroltak és ugyancsak a két réteg szeparációját eredményezték [146]. Az EBA passzív egérmódeljében a neutrofilek antitesttel történő eltávolítása megakadályozta a betegség kialakulását [147].

Összegzésként elmondhatjuk, hogy az utóbbi időben számos autoimmun kórképben, így többek között a rheumatoid artritiszben, a szisztémás lupus erythematosus-ban, bizonyos autoimmun bőrbetegségeken (pl. bullózus pemfigoidban, epidermolysis bullosa acquisitában) és egyes autoimmun vasculitisekben [148] sikerült kimutatni a neutrofilek szerepét.

### **3.4.2. A neutrofilek és az autoimmun ízületi gyulladások**

Mint korábban említettük, a rheumatoid artritiszben szenvedő betegek szinoviális folyadékában nagy mennyiségben találhatóak neutrofil granulociták [142], melyek jellemzően aktivált fenotípust mutatnak. Így felszínükön megjelenik a nyugalmi körülmények között nem kifejeződő Fc $\gamma$ RI (CD64), mely feltehetően a gyulladás során felszaporodott IFN- $\gamma$ -nak köszönhető és ami nagy valószínűséggel hozzájárul a neutrofilek immunkomplex-mediált szövetkárosításához [149]. Rheumatoid artritiszben betegek ízületi folyadékában olyan mediátorok találhatóak, melyek képesek a neutrofilek funkcióját befolyásolni (pl. C5a, GM-CSF), illetve melyek esetleg neutrofil eredetűek is lehetnek (pl. IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ ) [136]. A neutrofilek szerepére utal továbbá, hogy bizonyos rheumatoid artritiszben betegekben az extrakorporális granulocita-ferezis (mely során a granulociták számát csökkentik) jótékony hatásának bizonyult [150,151].

Az autoimmun ízületi gyulladások modellezésére számos kísérletes állatmodell áll rendelkezésre. Egyes esetekben – ilyen a kollagén-indukált artritisz (CIA) és a K/BxN artritisz [152] – a betegség valamennyi fázisa (beleértve az immunizációs és az effektor stádiumokat) megfigyelhető, míg szelektíven az effektor fázis vizsgálatára használatos modell a kollagén-antitest indukált artritisz (CAIA) [153], a K/BxN szérum transzfer artritisz [154], valamint a humán TNF transzgen artritisz [155]. Míg ez utóbbi modell klinikai relevanciáját a rheumatoid artritisz egyes formáiban nagy hatékonysággal alkalmazható TNF-antagonista kezelés erősíti [156,157], az autoantitest-mediált kísérletes megközelítések humán megbetegedésekhez való jó

közelítését a rheumatoid arthritisben szenvedő betegek nagy részének szérumában kimutatható, feltételezhetően kóroki szerepű autoantitestek (pl. II-es típusú kollagén-ellenes antitest, citrullinált peptidek elleni antitestek) támasztják alá [158].

Míg humán autoimmun artritisekben viszonylag nehezen vizsgálható a neutrofilek közvetlen szerepe, annál több lehetőség kínálkozik a sejtek szerepének azonosítására kísérletes állatmodellekben. Egérben többféle módon lehet neutrofilhiányos állapotot létrehozni. Átmeneti neutrofil-depléción kiváltható a neutrofil-specifikus érési marker, az Ly-6G vagy a Gr-1 ellenes antitestek<sup>15</sup> segítségével [159], a kezelés hatékonysága (a neutrofil granulociták perifériás vérből való eltűnése) egyszerűen ellenőrizhető áramlási citometriával. A genetikai megközelítésre számos mód áll rendelkezésre. A Gfi-1 egy cinkujjas transzkripciós faktor, melynek hiányában gyakorlatilag nem alakulnak ki érett neutrofil granulociták (ennek megfelelően ezen génhányos egerek jellemzően hajlamosabbak Gram-pozitív baktériumok általi gennyess gyulladásokra) [160]. Míg a forkhead transzkripciós faktor Foxo3a hiánya nem érinti a perifériás neutrofilszámot, a gyulladásos környezetben (pl. kísérletes ízületi gyulladásban, hashártya-gyulladásban) ugyanakkor gyakorlatilag nem található PMN [161]. Ennek hátterében az áll, hogy a gyulladásos szövetekbe érkező vad típusú neutrofil granulocitákban a Foxo3a kötődik a Fas-ligand promoteréhez, ezáltal blokkolja az egyes citokinek hatására fokozódó Fas-ligand kifejeződést és növeli a sejtek túlélését. A Foxo3a hiányában a gyulladásos mediátorok (pl. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) által kiváltott Fas-ligand-expresszió-fokozódás és a következményes apoptotikus folyamatsor azonban zavartalanul folyhat le. Egy, a Bcl-2 családba tartozó antiapoptotikus fehérje, az Mcl-1 mieloid-specifikus deléción jelentősen csökkenti a neutrofilek túlélését és ennek következtében a csontvelőben lévő, valamint a vérben keringő neutrofilek számát, anélkül, hogy egyéb sejtvonalak (pl. a makrofág populáció) méretét jelentősen befolyásolná [162,163]. A fent említett módszerek körültekintő használatával a neutrofil granulociták autoimmun ízületi gyulladásos modellekben betöltött szerepéről viszonylag pontos képet alkothatunk.

Több adat utal arra, hogy kísérletes ízületi gyulladásos modellekben nélkülözhetetlenek a neutrofil granulociták. Három naponta adott Gr-1 ellenes

---

<sup>15</sup> A Gr-1 ellenes antitestek a neutrofil-specifikus Ly-6G mellett felismerik a néhány egyéb mieloid sejten is megtalálható Ly-6C-t is.

monoklonális antitesttel meg lehetett akadályozni a K/BxN szérumszűrő artritisz kialakulását [159]. A kezelést az első öt nap bármelyikén alkalmazva csökkenthető volt a már kialakult gyulladás mértéke, mutatva, hogy a neutrofilek nem csupán a betegség kiváltásához szükségesek, hanem a betegség normál progressziójához is elengedhetetlenek. Ezzel összhangban mind a  $Gfi-1^{-/-}$ , mind a  $Foxo3a$ -hiányos egerek védettek voltak a K/BxN szérumszűrő artritisszel szemben [51,161]. Míg vad típusú neutrofilek adása helyreállította,  $Foxo3a$ -hiányos PMN-ek szervezetbe juttatása nem befolyásolta a gyulladás mértékét  $Foxo3a^{-/-}$  állatokban, jelezve, hogy a megfigyelt védettségért elsősorban a  $Foxo3a$  neutrofil granulocitákból való hiánya felelt. A neutrofilek éréséhez és csontvelőből való mobilizációjához fontos G-CSF hiányában gyakorlatilag nem alakult ki kollagén-indukált artritisz (CIA), ezzel összhangban a G-CSF-ellenes monoklonális antitesttel való kezelés drasztikus gyulladáscsökkenést eredményezett vad típusú CIA-s egérben [164]. További vizsgálatainkban a szerzők CIA-s egerek szérumában emelkedett G-CSF-szinteket mutattak ki és reciprok csontvelő-transzplantációs megközelítéssel igazolták, hogy a G-CSF termelésért elsősorban nemhemopoetikus, míg a G-CSF hatásáért (a G-CSF receptorának kifejeződéséért) hemopoetikus eredetű sejtek felelősek [165]. A neutrofilek depléciója jelentősen csökkentette az ízületi gyulladás mértékét vad típusú egerekben és mind a G-CSF lokális, mind szisztémás adása nagymértékben képes volt növelni a neutrofilek gyulladásos területre történő vándorlását. Mindezek azt mutatják, hogy a G-CSF nem csupán a granulopoiesis során, valamint a csontvelői raktár mobilizálásában fontos gyulladásos körülmények között, hanem a granulociták érpálya-elhagyásában (és esetleg a szövetekben történő aktivációjában) is markáns szereplő [165]. Az egyik humán IL-8 kemokin analóg, a jelentős mértékben a neutrofilekből származó és a hatását részben azokon kifejtő MIP-2 (másik nevén CXCL2) szintjének a gyulladt lábokban való változása pozitív összefüggést mutatott az ízületi gyulladás mértékével CIA-s egyedekben, továbbá a MIP-2 antagonizálása részleges védettséget biztosított a betegséggel szemben [166]. Hasonlóképpen parciális csökkenést eredményezett az egerek antileukoproteinázal, a neutrofil szerin proteázok egyik gátlószerével történő kezelése kollagén-ellenes antitest indukált artritiszben [167]. Mindezek az adatok rávilágítanak a neutrofil granulociták szerepére egyes autoimmun ízületi gyulladásokban, ahol ezen sejtek túlműködésével lehet számolni.

### 3.4.3. Az Fc $\gamma$ -receptorok és a $\beta_2$ -integrinek szerepe autoimmun ízületi gyulladásokban

Az autoantitest-mediált autoimmun ízületi gyulladások kritikus szereplői az IgG antitestek Fc-részét specifikusan felismerő Fc $\gamma$ -receptorok (Fc $\gamma$ R). Valamennyi aktiváló Fc $\gamma$ -receptor egérben egy segédlánccal, a foszforilálható tirozinokat magában foglaló ITAM-szekvenciát tartalmazó Fc-receptor  $\gamma$ -láncsal (FcR $\gamma$ ) asszociálódik. FcR $\gamma$  hiányában az egerek védettek a K/BxN szérumsztransfer artritisszel szemben [50]. Míg az Fc $\gamma$ -receptor I nem tűnt kritikus komponensnek az ízületi gyulladás kialakulásában, az Fc $\gamma$ RIII hiányában részleges károsodás volt megfigyelhető [50]. Ez felvetette a legújabban leírt aktiváló Fc $\gamma$ -receptor, az Fc $\gamma$ RIV kóroki szerepét, mely utóbbi végül igazolódott [168]. Annak vizsgálatára, hogy konkrétan a neutrofil granulociták felszínén lévő FcR  $\gamma$ -láncnak milyen szerepe van autoimmun artritiszben, a leggyakrabban megközelítés sejtvonalspecifikus FcR $\gamma$ -hiányos törzsek használata lenne. Mivel ilyen törzs nem állt rendelkezésre, Monach és munkatársai egy speciális megközelítést alkalmaztak. Neutrofil-hiányos Gfi-1<sup>-/-</sup> egereket szubletálisan (4 Gy dózissal) besugarozták, majd az egerekbe vad típusú, illetve FcR $\gamma$ -hiányos csontvelői sejteket injektáltak, mely által kevert csontvelői kimérákat hoztak létre. Azok az egyedek, melyek FcR  $\gamma$ -láncot nem expresszáló sejtuszpenziót kaptak (tehát amelyekben a neutrofil kompartmentben teljes mértékben hiányzott a segédlánc) nem alakult ki ízületi gyulladás az artritogén szérumsztransfer beadását követően [51], mutatva az FcR $\gamma$  jelentőségét neutrofilekben. További vizsgálataikban a szerzők azt találták, hogy a neutrofilek FcR $\gamma$ -kifejeződése nem a neutrofilek ízületbe történő migrációjához, hanem feltehetően a sejtek lokális aktivációjához volt szükséges. Az Fc $\gamma$ RIII szelektív hiánya a neutrofilek felszínéről nem eredményezte a gyulladás mértékének csökkenését [51].

Bizonyos autoantitest-mediált gyulladások esetében az immunkomplexek fizikálisan jól körülhatárolható területen alakulnak ki. Így rheumatoid artritisz (és az azt részben modellező K/BxN szérumsztransfer artritisz) esetén az ízületi rés porcok felszínén halmozódik fel a glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI) és az arra specifikus anti-GPI antitest [169], autoimmun glomerulonephritis-ben az immunkomplexek lerakódási helye a glomerulusok bazális membránja, az autoimmun hólyagos bőrgyulladás egyik formájában, az epidermolysis bullosa acquisitában (EBA) pedig a hám-irha határon keletkeznek a patomechanizmus kialakulása szempontjából fontos kollagén VII-anti-

kollagén VII antitest komplexek [146]. Ez utóbbi betegség esetében egy szellemes módszerrel vizsgálták a neutrofilek és az Fc $\gamma$ -receptorok szerepét a hólyagok kialakulásában. Egészséges egyénekből származó fagyasztott metszeteket EBA-ban szenvedő betegek szérumával előinkubáltak, majd a metszetre neutrofileket helyeztek. Kis idő elteltével a neutrofilek a hám-irha határra vándoroltak és in vitro körülmények között is létrehozták a betegségre jellemző bőrréteg-szeparációt [146]. Amennyiben epitópspecifikus F(ab')<sub>2</sub> fragmenteket használtak a jelenség kiváltásához, a szeparáció nem jött létre, mutatva az Fc $\gamma$ -receptorok nélkülözhetelen szerepét. A szervezetben bekövetkező immunkomplex-aktiváció modellezésére in vitro kísérleteink során ELISA-lemez felszínén hoztunk létre immobilizált immunkomplex felszín antigén és antitest segítségével. Ez a folyamat is Fc-dependens: amennyiben Jakus Zoltán kollégám F(ab')<sub>2</sub> fragmenttel hozta létre a csonka immunkomplexet, a felszín nem tudta a neutrofileket aktiválni [1].

Mint korábban említettem, az integrinek sejt-sejt, valamint sejt-extracelluláris mátrix interakcióban szereplő heterodimer sejt felszíni molekulák, melyek számos sejtműködésben játszanak szerepet a sejt vándorlástól kezdve a vérárvadáson át a csontbontásig [170]. Neutrofil granulocitákon legnagyobb mértékben a  $\beta$ -láncuk alapján  $\beta_2$ -integrineknek (vagy leukocita integrineknek) nevezett molekulák fejeződnek ki: ezek a CD11a/CD18 (LFA-1,  $\alpha_L\beta_2$ ) és a CD11b/CD18 (Mac-1, Komplement receptor 3,  $\alpha_M\beta_2$ ). A korábban említett LAD I-es egérmodellként is szolgáló CD18<sup>-/-</sup> egerek védettnek bizonyultak a K/BxN szérum transzfer artritisszel szemben [171]. A folyamatban a két fő leukocita integrin közül az LFA-1 mutatkozott kritikusnak. CD11a ellenes antitest segítségével a betegség kialakulása ugyancsak megakadályozható volt, sőt az antitestet a már manifeszt ízületi gyulladás időszakában alkalmazva is csökkenthető volt a gyulladás. Az LFA-1-ligand ICAM-1 blokkolása ICAM-2-hiányos egerekben ugyancsak határozottan csökkentette a gyulladás mértékét [171]. Amennyiben besugárzáson átesett Gfi-1<sup>-/-</sup> egerek LFA-1-hiányos csontvelői sejteket kaptak, a csontvelői repopulációt követően a vad típusú sejt szuszpenziót kapott társaikkal ellentétben védettek voltak az ízületi gyulladással szemben, mutatva, hogy az LFA-1-nek jelentős szerepe lehet a neutrofil granulociták felszínén autoimmun ízületi gyulladásban [51]. További adalék, hogy az említett kevert csontvelői kimérákkal végzett kísérletek alapján a szerzők azt találták, hogy az LFA-1 neutrofileken fontos

szereplő a sejtek gyulladt ízületbe történő vándorlásában. Mindezek alapján felmerül, hogy az LFA-1 farmakológiai gátlása esetleg hasznos lehetne autoimmun ízületi gyulladás terápiájában, azonban a súlyos fokú pikkelysömör kezelésében korábban használt LFA-1 neutralizáló efalizumabbal kapcsolatos negatív tapasztalatok óvatosságra intenek [172]. Bár a neutrofilek működésében fontos másik  $\beta_2$ -integrin, a Mac-1 hiányában a K/BxN szérumsztransfer artritisz érintetlen volt, kollagén-indukált artritiszben a Mac-1 fontos szereplőnek bizonyult [165].

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az Fc $\gamma$ -receptorok és a  $\beta_2$ -integrinek fontos szereppel bírnak a neutrofil-függő autoimmun ízületi gyulladások folyamatában. Továbbá leszögezhetjük, hogy a neutrofil granulociták sejtfelszíni Fc $\gamma$ -receptorainak, valamint  $\beta_2$ -integrinjeinek jelátvitelében szereplő molekulák azonosítása lényeges lehet a neutrofil-túlműködéssel jellemezhető autoantitest-mediált ízületi gyulladások patomechanizmusának pontosabb megértése szempontjából.

További fontos szempont, hogy az autoimmun ízületi gyulladások jelenlegi terápiában használt valamennyi gyógyszer igen komoly mellékhatásokkal rendelkezik. A tüneti terápiaként használt nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID-ok) ugyan a fájdalmat is mérséklék, azonban többek között jelentékeny gasztrointesztinális mellékhatásaik vannak. Az elsősorban az akut fellángolások esetén használt kortikoszteroidokkal szemben a következményes csonttritkulás és cukorbetegség komoly visszatartó tényező. A betegségmódosító szerekkel (Disease-modifying Anti-rheumatic drugs, DMARDs) történő terápia egyik alappillére a rheumatoid artritisz kezelésében arany standardnak tartott metotrexát [173]. A folsav-antagonista metotrexátról azonban tudni kell, hogy komoly citosztatikum, olykor drámai mellékhatásokkal (pl. fatális májkárosodás, pneumonitis): a kezelés során a beteg metotrexát-szintjét folyamatosan monitorozni érdemes [174]. Az ígéretes biológiai terápiák közé többek között az anti-TNF $\alpha$  kezelés (pl. adalimumab, etanercept), az interleukin-1 receptorának blokkolása (anakinra), a B-sejt, illetve a T-sejt működés gátlása (rituximab, illetve abatacept), valamint az interleukin-6 blokkolása (tocilizumab) tartozik [175]. Bár ezek a szerek bizonyos mértékben forradalmasították az autoimmun artritiszek terápiáját, ugyanakkor a gyógyszerek csupán a betegek egy részében hatásosak, elsősorban parenterálisan alkalmazhatóak, jelentősen megnövelik a kezelték fertőzések iránti hajlamát, ezen túlmenően pedig kifejezetten drágák. Így leggyakrabban valamely, önmagában az adott

betegnél kevésbé hatékony DMARD mellé adják kombinált terápiában [175]. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a rheumatoid arthritis terápiája korántsem tekinthető megoldottnak: újabb, hatékonyabb szerekre van szükség. Ehhez viszont újabb támadáspontokat kell azonosítani. A kísérleteinkben vizsgált és feltérképezett jelpályák molekulái a patomechanizmus pontosabb megértése mellett talán támadáspontját képezhetik a jelenleg sok mellékhatással rendelkező terápia újabb kandidánsainak.

### **3.5. Tirozin-kináz gátlók, mint terápiás szerek**

A receptor és nemreceptor tirozin-kinázok számos sejtműködést befolyásolnak a szervezetben a sejtek proliferációjától az immunműködésekig. Míg ezen enzimek megfelelő aktivitása kritikus a szervezet normál működéséhez, a molekulák mutációja daganatok kialakulásához, az immunsejtek túlműködésével együttjáró aktivitásfokozódása pedig az autoimmun szövetkárosításhoz járulhat hozzá. Míg a hematológiai rutinszerűen használnak tirozin-kináz gátlókat, az inhibitorok mint az autoimmun betegségek lehetséges terápiás szereiként csak mostanában kerülnek az érdeklődés középpontjába.

#### **3.5.1. Tirozin-kináz gátlók az onko-hematológiában**

A krónikus mieloid leukémia (CML) a felnőttkori leukémiák 15-20%-át alkotja [176]. A CML a hematopoietikus progenitorsejtek kontroll nélküli proliferációjának következtében kialakuló többfázisos vérképzőrendszeri megbetegedés. A kezdeti krónikus stádium átlagosan 3-5 év alatt adja át helyét az akcelerált fázis közvetítésével a blasztos krízisnek [177], mely általában fél éven belül halálhoz vezet súlyos fertőzés vagy vérzés révén. A CML-ben szenvedő betegek 95%-ban megtalálható a 9-es és 22-es kromoszóma transzlokációja következtében kialakuló Philadelphia-kromoszóma (t9, 22) [176]. A transzlokáció következtében egy szabályozás alól felszabadult tirozin-kináz aktivitással rendelkező Bcr-abl fúziós fehérjetermék keletkezik, mely szükséges és elégséges a malignus hematológiai kórkép kialakulásához.

Az orálisan adagolható tirozin-kináz gátló, az Abl-specifikusnak tartott imatinib forradalmasította a korábban elsősorban őssejt-transzplantáción és interferon- $\alpha$  kezeléssel alapuló CML krónikus fázisának terápiáját [178]. Az imatinib a CML krónikus fázisában szenvedő betegek döntő többségében teljes citogenetikai remissziót

okoz és drasztikusan lecsökkenti a halálozást. Az imatinib alapvetően jól tolerálható, leggyakoribb hematológiai mellékhatása a mieloszuppresszió [179], mely kolóniastimuláló faktorokkal, esetleg dózisredukcióval viszonylag jól kezelhető. A esetek 15-20%-ában azonban bizonyos mértékű imatinib-rezisztencia alakul ki a betegekben, melynek hátterében feltehetően a Bcr-abl fúziós gén bizonyos mutációi állnak [180]. Az imatinib-rezisztens krónikus mieloid leukémiában használandó második generációs tirozin-kináz gátlók a nilotinib és a dasatinib, melyek legújabb vizsgálatok szerint akár első választandók is lehetnek a terápiában [181,182]. Ugyanakkor természetesen egyik szer sem mentes a komoly mellékhatásoktól (pl. neutropenia, thrombocytopenia, anémia, hasmenés) [176] és nem számítanak kifejezetten olcsónak sem.

### **3.5.2. Tirozin-kináz inhibitorok autoimmun artritiszben**

A sejtproliferáció szabályozásán túl az immunreceptor jelátvitelben is fontos szereplők a különböző tirozin-kinázok, így a rheumatoid artritisz terápiájának egy újabb lehetőségét rejthetik az ezen tirozin-kinázokat gátló kismolekulájú inhibitorok [183]. A cél a hatékonyság mellett az orális adagolhatóság és a kedvező mellékhatás-profil lenne. Klinikai fázisvizsgálatokban jelenleg két ilyen inhibitort tesztelnek: a Janus-kináz gátló tofacitinibet (korábbi nevén tasocitinib, CP-690550) és az elsősorban a Syk-et bénító fostamatinibet (R788). A tofacitinib metotrexáttal kombinálva hatékonynak bizonyult metotrexátra nem megfelelően reagáló rheumatoid artritiszes betegekben [184]. A Syk-inhibitor fostamatinib ugyancsak eredményes volt az ízületi gyulladás tüneteinek mérséklésében [185,186]. A Syk hemopoetikus rendszerből való hiánya esetén nem alakult ki autoimmun ízületi gyulladás az artritogén szérum beadását követően egerekben [70]. A Syk szelektíven neutrofilekből való törlése esetén megfigyelhető kísérletes artritisszel szembeni védettség [29] azt sugallja, hogy a fostamatinib hatásáért részben a neutrofilek gátlása lehet felelős. Ezen túlmenően a hatását részben az Abl kináz gátlásán kifejtő, klasszikusan a krónikus mieloid leukémia kezelésében használt tirozin-kináz gátló imatinib képes volt rheumatoid artritiszes betegben remissziót eredményezni [187].



### 3.5.3. A tirozin-kináz gátló dasatinib és a neutrofilek

A tirozin-kináz gátló dasatinib (BMS-354825) egy olyan második generációs anti-leukémiás szer, melyet imatinib-rezisztens krónikus mieloid leukémiában és Philadelphia-kromoszóma-pozitív akut lymphoblastos leukémiában használnak [188]. A dasatinib az Abl-kináz és a Bcr-abl fúziós fehérje mellett gátolja az Src-kinázokat, valamint csökkenő érzékenységben a Btk család tagjait, a c-Kitet, a PDGF- és Eph-receptorokat is [189-191]. Mint korábban említettem, az Src tirozin-kináz család tagjai fontos résztvevői a neutrofil granulociták működésének: hiányukban jelentősen csökkentek a neutrofilek  $\beta_2$ -integrin-dependens sejtválaszai [78,80], valamint egyes Fc $\gamma$ -receptor-mediált folyamatai (munkacsoportunk nem publikált eredményei). A neutrofilekben expresszálandó három Src-kináz hiányában továbbá az egerek védettek voltak a K/BxN szérumszintézis artritisz kialakulásával szemben (Jakus Zoltán és Kovács Miklós nem publikált munkája). A dasatinib által gátolt egyik másik molekula, az Abl is fontos résztvevője neutrofil granulociták egyes folyamatainak [177,178].

Mindezek felvetették, hogy a kis molekulású tirozin-kináz gátló dasatinib esetleg már kisebb koncentrációban is képes lehet befolyásolni egészséges neutrofilek működését. A neutrofilekre gyakorolt hatás két szempontból lehet fontos: egyrészt mint a jelenlegi hematológiai alkalmazás „mellékhatása”, másik oldalról pedig mint egyes neutrofil túlműködéssel jellemezhető autoimmun folyamatok lehetséges új terápiájának kiindulópontja. A dasatinibvel kapcsolatos saját kísérleteim kezdetén még nem publikált kísérleteimben kollégám, Futosi Krisztina azt találta, hogy a kis molekulású dasatinib már alacsony, nanomoláris koncentrációban jelentősen és drasztikusan gátolta az egészséges donorok perifériás véréből származó neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin-függő szuperoxid-termelését TNF $\alpha$ , a komplementfragment C5a, valamint lipopoliszacharid jelenlétében ([IV], 1. ábra). A dasatinib hasonlóképpen blokkolta a neutrofilek fibrinogén-felületén TNF $\alpha$  hatására létrejövő szétterülését is ([IV], 2. ábra). Ugyanakkor a dasatinib nem befolyásolta a neutrofilek baktériumölését ([IV], 6. ábra). A vázolt folyamatok pontosabb megértése képezte az eredmények 6.4. alfejezetében ismertetett méréseim alapját.

## 4. Célkitűzések

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

- Milyen módon befolyásolja egy GTP-áz aktiváló fehérje, a p190RhoGAP a neutrofil granulociták integrin-függő, valamint integrin-független sejtválaszait és a neutrofil-, illetve integrin-mediált K/BxN szérum transzfer artritisz kialakulását?
- Szükséges-e az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc és két ITAM-tirozinja neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptorainak működéséhez, vagy a segédlánc csupán a receptorok sejtfelszíni kifejeződését biztosítja? Miként módosítja ezen tirozinok fenilalaninra történő cserélése az autoantitest-kiváltott ízületi gyulladást?
- Részt vesz-e és amennyiben igen, milyen módon a CARD9 adapter fehérje neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptorainak szignalizációjában és kísérletes autoimmun ízületi gyulladásban?
- Milyen hatással van a második generációs antileukémiás szer, a dasatinib egészséges humán neutrofilek  $\beta_2$ -integrin inside-out szignalizációjára és a bakteriális fagocitózisra?

Vizsgálataim során – a negyedik kérdéskör kivételével – genetikai megközelítést alkalmaztam génhányos egerek segítségével.

## 5. Módszerek

### 5.1. A kísérletekhez használt egértörzsek, csontvelői kimérák

A **p190RhoGAP** hiányának vizsgálatához egy új, a Jeffrey Settleman bostoni munkacsoportja által előállított p190RhoGAP mutáns allélt (*Grfl1*<sup>tm2JSet</sup>, a továbbiakban p190RhoGAP<sup>-</sup>) hordozó egértörzset használtam.<sup>16</sup> Tekintettel a p190RhoGAP-hiányos egerek (*Grfl1*<sup>tm2JSet/tm2JSet</sup>, a továbbiakban p190RhoGAP<sup>-/-</sup>) perinatális letalitására, kísérleteimet csontvelői kimérákon végeztem. A mutáció pontos jellemzése és a magzati májsejtek felhasználásával történő csontvelő-transzplantáció menete az eredmények fejezetben található. A p190RhoGAP vizsgálatokban integrin-függő referenciapontként szolgáló **CD18-hiányos** egerek (*Itgb2*<sup>tm2Bay/tm2Bay</sup>, a továbbiakban CD18<sup>-/-</sup>) Arthur Beaudet-től származtak [74].

Az **Fc-receptor  $\gamma$ -lánc** intracelluláris tirozinjainak vizsgálatához az FcR $\gamma$ -hiányos egértörzset (*Fcer1g*<sup>tm1Rav/tm1Rav</sup>) Jeffrey Ravetch munkacsoportjától [34], a vad típusú és az ITAM-tirozinmutáns FcR $\gamma$ -t kódoló transzgenikus allélokot (Tg(H-2K<sup>d</sup>-Fcer1g<sup>WT</sup>)Tks; Tg(H-2K<sup>d</sup>-Fcer1g<sup>YF/YF</sup>)Tks) hordozó egyedeket Takashi Saito laborjától kaptuk [192]. Munkacsoportunk első lépésként a klasszikus génaddíciós módon létrehozott utóbbi két törzset rákeresztelte a korábban említett FcR $\gamma$ -hiányos háttérre<sup>17</sup>, mely által az ITAM-tirozinok struktúra-funkció analízise lehetővé vált. A különböző genotípusú egyedek azonosítása genomiális DNS-ből allélspecifikus PCR technikával, a két génaddíciós törzs esetében további nukleotid szekvencia-analízissel történt.

A **CARD9-hiányos** (*Card9*<sup>tm1Jrld/tm1Jrld</sup>) [59] és a **Bcl10<sup>-/-</sup>** (*Bcl10*<sup>tm1Mak/tm1Mak</sup>) [193] egerek Jürgen Ruland laborjából érkeztek hozzánk. A CARD9-hiányos törzs szaporítása laborunkban zajlott, a meghatározás genetikai alapon történt. A **Syk-hiányos** (*Syk*<sup>tm1Tyb/tm1Tyb</sup>) csontvelői kimérákat a Victor Tybulewicz-től származó Syk heterozigóták felhasználásával állítottuk elő [194]. Tekintettel a Syk-hiányos egerek perinatális letalitására, a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> kimérákhoz hasonlóan állítottuk elő a csontvelői kimérákat. (Ebben az esetben azonban nem volt szükség agyilizátumok

<sup>16</sup> Ez a mutáció nem tévesztendő össze az ugyancsak a Settleman-féle munkacsoport által a korábbiakban előállított, trunkált fehérjét eredményező hipomorf variánssal (*Grfl1*<sup>tm1JSet</sup>, a továbbiakban p190RhoGAP<sup>hyppo</sup>) [111].

<sup>17</sup> A továbbiakban a vad típusú transzgenikus FcR $\gamma$  allélt FcR $\gamma$ -hiányos háttéren tartalmazó egyedeket FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> FcR $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz</sup>-nak, a tirozin-mutáns FcR $\gamma$ -t FcR $\gamma$ -hiányos háttéren kifejező állatokat FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> FcR $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz</sup>-nak jelölöm.

készítésére és a genotípusok Western-blottal való azonosítására (ld. a 6.1.3. alfejezetet), mivel a Syk-hiányos magzatoknak a károsodott vérér-nyirokér szeparáció [195] miatt jellegzetes „bevérzés-szerű” fenotípusa van (ezáltal a vad típusú társaktól könnyen elkülöníthetőek).

A K/B<sub>x</sub>N szérum transzfer artritisz háttérkolóniájának számító transzgenikus T-sejt receptort hordozó **KRN törzs** Diane Mathis és Cristopher Benoist laborjából (Harvard Egyetem, Boston, USA), a **NOD** egerek a Jackson Laboratory-tól származtak. A KRN és a KRN<sub>x</sub>NOD egerek autoreaktív T-sejt receptort hordozó egyedek azonosítása kezdetben a transzgenikus T-sejt receptor-ellenes antitest segítségével áramlási citometriával (CD4-re történő kapuzással), a későbbiekben PCR technikával történt.

A csontvelő-transzplantációk során a CD45.1-pozitív recipiensek szerepét betöltő **B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup>** egereket a Jackson Laboratory-tól vásároltuk. Valamennyi génihiányos egértörzsünk **C57BL/6** háttérű volt.

Csontvelő-transzplantációhoz az előzetesen letálisan (11,5-12 Gy-jel) besugárzott<sup>18</sup> CD45.1-pozitív recipiens egereknek megfelelő anesztézia mellett intravénásan CD45.2-t expresszáló csontvelői donorsejteket adtunk. A transzplantációt követő három hétben az egerek az ivóvizükkel neomicint és polymixin B-t tartalmazó antibiotikum-oldatot kaptak. A transzplantáció sikerességét négy héttel a műtét után végeztük áramlási citométerrel (perifériás vérből) a neutrofil granulociták CD45.2-expressziója alapján (a részleteket az eredmények 6.1.3. alfejezetében tárgyaljuk).

Vad típusú kontrollként genetikai módosítástól mentes vad típusú C57BL/6-os egereket, csontvelői kimérák esetében vad típusú C57BL/6-os egerek vagy a génihiányos magzatok vad típusú allélt hordozó testvéreinek hemopoetikus készletét tartalmazó kimérákat használtunk. Mind in vitro, mind in vivo kísérleteink során a különböző genotípusú csoportokban ugyanolyan nemű és életkorú (a csontvelői kimérák esetében azonos időpontban transzplantált), lehetőleg egy dobozból származó egyedeket használtunk.

---

<sup>18</sup>Helyszín: Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutatóintézet (OSSKI) vagy MTA Központi Fizikai Kutatóintézet; Sugárforrás:  $\gamma$ -sugárzó <sup>60</sup>Co

## 5.2. Hemi- és homozigóta transzgénikus egerek elkülönítése kvantitatív PCR segítségével

A génaddíciós technikával bejutattott exogén FcR $\gamma$ -gén hetero- (hemi-) vagy homozigóta formában való előfordulásának meghatározásához kvantitatív polimeráz láncreakciót (qPCR-t) használtuk. A qPCR-t megelőzően az egérfarokból tisztított DNS-oldatot spektrofotometriás módszerrel 80 ng/ml koncentrációra hígítottuk. A DNS-templátot, a megfelelő primereket, a DNS-szálak közé ékelődni képes, fluoreszcens festéket (a SYBR<sup>®</sup> Greent), a polimeráz enzimet, a magnézium-oldatot és a desztillált vizet üvegapillárisban mértük össze. A polimeráz reakció egy arra alkalmas, a kék fény tartományában gerjeszteni képes készülékben zajlott (Light Cycler, gyártó: Roche). A kérdéses gén (az exogén Fc-receptor  $\gamma$ -lánc génje) adott mintában történő amplifikálásával párhuzamosan referenciaként egy háztartási gén (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, GAPDH) sokszorozását is elvégeztük. A relatív DNS-mennyiség meghatározásához ezt a két adatot használtuk fel. A qPCR-t követően a reakció specifikusságának ellenőrzése végett a mintákat agaróz gélen futtattuk meg.

## 5.3. A neutrofil granulociták izolálása, a kísérleti körülmények

A kísérleteink során használt **egér neutrofil granulocitákat** csontvelőből preparáltuk szobahőmérsékleten. A cervikális diszlokációt követően az egerek comb- és lábszárcsontjait eltávolítottuk, végeiket bemetsztük, majd 25 gauge-s tű segítségével a csontvelőt kalcium- és magnéziummentes HBSS/20 mM HEPES-sel (Hank's Balanced Salt Solution/HEPES) átmostuk. A sejtsuszpenziót centrifugáltuk, majd a vörösvértestektől hipotóniás lízissel szabadultunk meg (0,2% nátrium-klorid oldatot alkalmaztunk 40 másodpercig; a fiziológiás tonicitást azonos mennyiségű 1,6%-os nátrium-klorid oldattal állítottuk helyre). A neutrofil granulociták többi fehérvérsejt-populációtól való elkülönítéséhez a sejtsuszpenziókat 62%-os Percoll gradiensre (gyártó: GE Healthcare) rétegeztük. Míg nagy sebességgel történő centrifugálást követően a monociták, a limfociták (elsősorban B-sejtek) és a nemneutrofil granulociták nagy része a HBSS és a 62%-os Percoll-oldat határán jelent meg, a neutrofil granulociták a cső alja közelében egy felhőben gyűltek össze. A mononukleáris sejtek leszívását és két mosási lépést követően a neutrofileket megszámláltuk. Egér neutrofil preparátumunk tisztasága áramlási citometriás mérések alapján 90% felettinek, az

eritrozín B vitális festék kizárása alapján vizsgált életképesség 98% feletti értéknek bizonyult (ld. a labor korábbi eredményeit, [69]).

A **humán neutrofil granulocitákat** önkéntes donorok perifériás véréből izoláltuk. A dextrans ülepítést követően a sejteket Ficoll gradiensen (gyártó: GE Healthcare) centrifugáltuk, majd a vörösvértesteket a fent említett módszerrel lizáltuk. A p190RhoGAP-expresszió pontosabb kimutatásához további lépésként mágneses sejtszeparációt alkalmaztunk. A klasszikus humán neutrofil preparátumunkat mágneses CD16-ellenes antitestekkel („CD16-mikrogyönggyel”, gyártó: Miltenyi Biotec) előinkubáltuk, majd mágneses térbe helyezett oszlopon folyattuk át. A mikrogyönggyel borított CD16-pozitív sejtek (döntően neutrofilek) a mágneses tér hatására az oszlophoz kötődtek, ezeket a CD16-negatív populáció kinyerésére végzett többszöri átmosás után, az oszlop mágneses térből való eltávolítását követően eluáltuk. A hagyományos neutrofil preparálással nyert minták – citospinnel történő centrifugálás és May-Grünwald-Giemsa festést követő meghatározás alapján –  $96,6\% \pm 1,6\%$ -ban tartalmaztak neutrofileket ( $n=3$ ), a fennmaradó sejtek elsősorban eozinofil granulociták voltak. A szeparálás utáni tisztaság  $99,1\% \pm 0,5\%$ -ra nőtt [II].

A gátlószerekkel történő kísérletek során a humán neutrofileket  $37\text{ °C}$ -on 30 percig előinkubáltuk dasatinibbel  $0,5\text{ mM}$  kalcium-klorid jelenlétében. Ezekben a kísérletekben kontrollként a csak  $0,1\%$  dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmazó minták szolgáltak.

A neutrofil granulociták izolálása és sejtválaszaik vizsgálata során a sejteket kalcium- és magnéziummentes HBSS +  $20\text{ mM}$  HEPES  $\text{pH}=7,4$  oldatban vettük fel. A funkcionális mérések előtt az oldatot kalcium-kloriddal (végkoncentráció:  $0,5\text{ mM}$ ) egészítettük ki, majd a sejteket 10 percig  $37\text{ °C}$ -on előmelegítettük. Az adhéziós mérések során a szuszpenzióhoz  $1\text{ mM}$  magnézium-kloridot adtunk. A funkcionális vizsgálatok  $37\text{ °C}$ -on történtek.

#### **5.4. A nyugalmi sejtfelszíni expresszió áramlási citometriával történő mérése**

A sejtfelszíni receptorok és molekulák kifejeződésének meghatározásához áramlási citométert használtunk. A sejteket  $1\text{ millió/ml}$  koncentrációban, PBS  $5\%$  FCS oldatban vettük fel, majd egy órán keresztül  $4\text{ °C}$ -on inkubáltuk a megfelelő

antitestekkel.<sup>19</sup> Az első lépésben használt fluoreszcens festékekkel nem konjugált vagy biotinilált antitesteket fluoreszcensen jelölt szekunder antitesttel vagy sztreptavidinnel tettük „láthatóvá” (előállító: BD Pharmingen; 30 perc, 4 °C). A sejteket az inkubációt követően (még a mérés előtt) egy, a vörösvértestek gyenge lízisét és a leukociták fixálását eredményező, formaldehidet, valamint etilén-glikolt tartalmazó oldatban (FACS lízis oldat, gyártó: BD Pharmingen) vettük fel. A mintákat egy 488 nm-es hullámhosszúságú lézerfényt kibocsátó áramlási citométeren mértük le (BD FACSCalibur, szoftver: CellQuest software). A neutrofilek azonosításához a sejtek jellegzetes oldalra és előre irányuló fényszórási tulajdonságait, valamint Gr-1/Ly-6G-pozitív voltát használtuk. Hisztogramjainkon az abszcisszán a fluoreszcencia-intenzitást, az ordinátán az események számát ábrázoltuk.

## 5.5. A neutrofilek sejtválaszainak vizsgálati módszerei

### 5.5.1. A neutrofilek aktiválásának módozatai

**Integrin-függő folyamatokhoz** 96-lyukú ELISA-lemezeket (Maxisorp F96, gyártó: Nalge Nunc International) fedtünk (előzetesen 10 percig 37 °C-on előmelegített) 150 µg/ml koncentrációjú humán fibrinogénnel egy órán keresztül, majd a plate-eket kétszer HBSS-sel mostuk [69]. A sejtszétterülés mikroszkópos vizsgálatához 24-lyukú szövetkultúra lemezeket használtunk. A neutrofilek furatokba való felvitele előtt a lyukakba a sejtuszpenzióval kiegészülve 50 ng/ml végkoncentrációjú TNF $\alpha$ - (gyártó: PeproTech), 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>- (gyártó: EMC Microcollections) vagy 10 ng/ml GM-CSF-oldatot (gyártó: PeproTech) tettünk.<sup>20</sup> Ezek a ligandok biztosították (az inside-out szignál révén) a neutrofilek sejt felszíni  $\beta_2$ -integrinjeinek aktiválódását és a molekulák expressziójának fokozódását ( $\beta_2$ -integrin upreguláció). Az aktivált  $\beta_2$ -integrinek közreműködésével a neutrofilek letapadtak a lemezek alján lévő fibrinogénhez.

<sup>19</sup> Méréseinkhez az alábbi antitesteket használtuk: anti-Gr-1 (klón: RB6-8C5) vagy anti-Ly-6G antitest (klón: 1A8)(érési marker expressziójának vizsgálata; előállító: BD Pharmingen); anti-Fc $\gamma$ RII/III (klón: 2.4G2) és anti-Fc $\gamma$ RIV antitest (klón: 9E9)(Fc $\gamma$ -receptor kifejeződés vizsgálata; előállító: BD Pharmingen, illetve Jeffrey Ravetch munkacsoportja); anti-CD11a (klón: M17/4), anti-CD11b (klón: M1/70) és anti-CD18 antitest (klón: C71/16)(integrinláncok expressziójának detektálása; előállító: BD Pharmingen); anti-CD16 (klón: 3G8, előállító: BD Pharmingen).

<sup>20</sup> A 96-lyukú plate furataiba az aktivációt megelőzően 10 µl térfogatban 10-szeres töménységű stimulust tartalmazó oldatot tettünk, a fent említett oldatkoncentrációkat a sejtek furatokba pipettázását követően értük el.

**Immobilizált immunkomplex-felszín** kialakításához kísérleteink döntő többségében ugyancsak ELISA-lemezeket használtunk (ez alól kivétel egyes intracelluláris molekulák aktiválódásának vizsgálata, mely során a sejteket 6 centiméter átmérőjű műanyag Petri-csészékbe helyeztük). Első körben a furatokba 20 µg/ml humán szérum albumint (HSA, gyártó: Sigma) vagy 20 µg/ml laktoferrint (LFR, gyártó: Sigma) helyeztünk karbonát-pufferben (35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH=9,6)(1 óra, szobahőmérséklet). Az antigén eltávolítását követően PBS 10% FCS került a lemezekre (1 óra, szobahőmérséklet), mely elsősorban az aspecifikus kötőhelyek elfedését szolgálta. Harmadik lépésként ugyancsak PBS 10% FCS közegben tettük a furatokba az 1:400 hígítású anti-HSA vagy anti-LFR poliklonális nyúl antitestet (1 óra, szobahőmérséklet). Utolsó mozzanatként kétszer mostuk a lemezeket HBSS oldattal. Amennyiben a furatokhoz történő antigén-kötődéshez szükséges volt (pl. szövetkultúra lemezek), a felületet 1 órán át szobahőmérsékleten PBS-ben hígított 0,1 mg/ml poli-L-lizinnel kezeltük, majd két PBS-sel történő mosást követően 15 percig 1:10-ben hígított glutáraldehiddel inkubáltuk. Újabb két mosást követően került fel a megfelelő antigén (a HSA vagy a LFR).

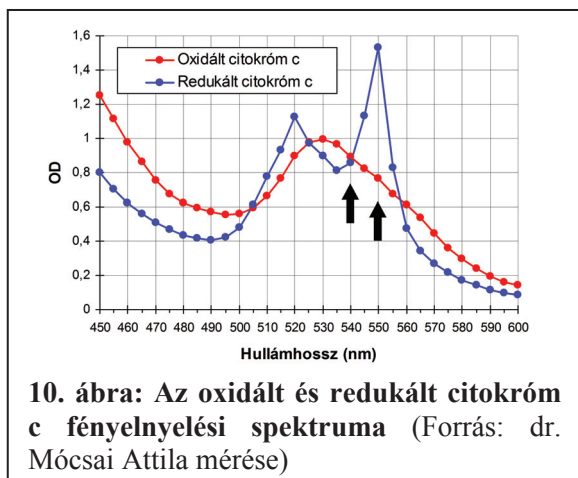
A szuszpenzióban (nem adherens módon) történő sejtaktivációhoz a végig magnéziummentes környezetben lévő egér neutrofileket 3 µM fMLP-vel, 10 perc 10 µM citokalazin B-vel (CB-vel) való előinkubációt követően 3 µM fMLP-vel (szuperoxid-termelés, degranuláció) vagy 50 ng/ml rekombináns TNFα-val, 100 nM PMA-val, illetve 10 ng/ml GM-CSF-fel (zselatináz degranuláció, p38-foszforyláció mérése, CD11b sejt felszíni upreguláció) stimuláltuk.

### 5.5.2. A neutrofilek in vitro sejt válaszainak mérése

A neutrofil granulociták bizonyos stimulusok hatására **szuperoxidot** képesek termelni. Ennek méréséhez az egér neutrofileket 4 x 10<sup>6</sup> sejt/ml koncentrációban tettük a megfelelő felszínre (integrin-ligand, immobilizált immunkomplex-felszín; a szuszpenzióban történő mérések esetében (pl. fMLP) az ELISA lemez felületének közvetlen aktiváló hatását a kötőhelyek PBS + 10% FCS oldattal történő blokkolásával akadályoztuk meg) és azonnal megkezdtük a mérést 37 °C-on, két perces időközönként történő detektálással. A szuperoxid-termelés meghatározásához citokrom c (gyártó: Sigma) redukciós tesztet használtunk. Az oxidált és a redukált citokrom c ugyanis eltérő



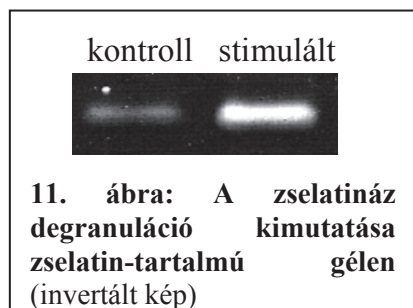
abszorpciós spektrummal rendelkeznek (**10. ábra**), így megfelelő hullámhosszon ELISA



lemez leolvasóban (Labsystems Multiskan Ascent multiplate reader, gyártó: Thermo Fischer Scientific) az extracelluláris térbe ürített szuperoxid mennyisége fotometriás módszerrel könnyen meghatározható. Két hullámhosszon végeztük méréseinket: egy referenciának használt 540 nm-es és egy, a tényleges változásokat nyomon

követő 550 nm-es hullámhosszon. A két csatornán kapott értékeket egymásból kivontuk, majd az abszorbancia adatokat nmol szuperoxidra konvertáltuk. Az eredményeket  $10^6$  sejtre vonatkoztatva ábráztuk.

A neutrofil granulociták szekunder és terciér granulumaiból felszabaduló zselatináz mennyiségét **zselatináz zimográfia** segítségével detektáltuk. A sejteket 50



ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ , illetve 10 ng/ml GM-CSF jelenlétében 30 percig vagy 10  $\mu\text{M}$  CB előkezelést követően 3  $\mu\text{M}$  fMLP jelenlétében 10 percig 37 °C-on inkubáltuk. A reakciók leállításához a sejteket tartalmazó lemezeket jégre helyeztük, a furatokba a szuszpenzióval megegyező térfogatban 4 °C-os HBSS oldatot

pipettáztunk. Ezt követően a lyukakban található térfogatok felső részéből furatonként 130  $\mu\text{l}$ -t áttettünk új Eppendorf-csövekbe és a mintákat 5 percig 1500 rpm fordulatszámra 4 °C-on centrifugáltuk. Végül a felülúszót négyszeres töménységű nemredukáló mintapufferhez adtuk és az Eppendorf-csöveket a futtatásig -20 °C-on tároltuk. A mintákat olyan 8%-os töménységű gélen futtattuk meg, melybe előzetesen 1 mg/ml koncentrációban zselatint (gyártó: Sigma) polimerizáltunk. A futtatást követően a géleket egy 2,5% Tritont tartalmazó oldattal szobahőmérsékleten 30 percig renaturáltuk, majd egy megfelelő nátrium- és kalcium-klorid-tartalmú, pH= 7,5-es előhívó oldatban 37 °C-on 12-16 órán át inkubáltuk.<sup>21</sup> Ezen idő alatt a felülúszóban

<sup>21</sup> Az előhívó oldat összetétele: 50 mM Tris-klorid pH=7,5; 200 mM nátrium-klorid; 0,2% Triton X-100; 5 mM kalcium-klorid.

jelenlévő zselatináz a gélben lévő szubsztrátját elbontotta, melyet egy aspecifikus fehérjefestést (Coomassie) követően festődési hiányként detektáltunk (**11. ábra**).

Fibrinogén felszínen egyes citokinek hatására, valamint immobilizált immunkomplex felületen a neutrofil granulociták letapadnak és **szétterülnek**. Ennek vizsgálatára a sejteket 30 percig inkubáltuk a megfelelő körülmények között 24-lyukú lemez furataiban, majd a reakciót jégen állítottuk le. A sejtek fixálásához 4% formalint tartalmazó HBSS-t használtunk. A bemutatott fényképeket a fáziskontraszt mikroszkóp kamerájának segítségével készítettük (20-szoros nagyítás; gyártó: Leica Microsystems). A mennyiségi kiértékeléshez 500 sejtet számoltunk le furatonként.

**In vitro migrációs** méréseink során a neutrofil granulocitákat az előzetesen mindkét felszínén fibrinogénnel fedett, 3  $\mu\text{m}$  pórusátmérőjű membránnal rendelkező Transwell-inzertekbe (gyártó: Corning Glass) tettük. Ezt követően az inzerteket egy olyan 24-lyukú lemez furataiba helyeztük, ahol a wellek tartalmazták a migráció kiváltását létrehozó kemoattraktánst (pl. fMLP-t, CXCL2-t). 60 percen át 37 °C-on történő inkubációt követően a reakciót jégen állítottuk le, majd a lemezeket lecentrifugáltuk és az inzerteket eltávolítottuk. A furatokban lévő folyadékokat leszívtuk, a bennük lévő sejteket lecentrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket egy 10  $\mu\text{M}$  PNPP-vel (gyártó: Sigma) kiegészített savas foszfatáz oldatban (Triton, nátrium-acetát, ecetsav, pH=5,3) lizáltuk, majd a lizátumokat visszapipettáztuk a megfelelő furatokba. Ezt követően egy 96-lyukú ELISA-lemezre osztottuk ki a mintákat. 90 perc, 37 °C-on történő inkubációt követően az enzimreakciót 5 N nátrium-hidroxiddal állítottuk le, majd az optikai denzitást ELISA mikrolemez leolvasóban olvastuk le 405 nm-en. A migrált sejtek arányát a minden méréshez külön készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

A **CD11b-upreguláció** mérése során 30 perces 50 ng/ml TNF $\alpha$ , illetve 10 ng/ml GM-CSF stimulust (egér neutrofilek) vagy 20 ng/ml TNF $\alpha$ , 100 ng/ml IL-8, illetve 100 nM fMLP stimulust (humán neutrofilek) alkalmaztunk magnéziummentes környezetben (Eppendorf-csővekben). A reakciókat jégen, hideg HBSS hozzáadásával állítottuk le. A sejteket lecentrifugáltuk, majd 5% FCS-t tartalmazó PBS-ben vettük fel és a mintákhoz biotinilált CD11b antitestet (klón: M1/70) vagy biotinilált IgG2b izotípus kontroll antitestet (klón: 27-35; gyártó: BD Pharmingen) adtunk. 60 perces, 4 °C-on történő inkubálást követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd FCS-tartalmú oldatban

reszuszpendáltuk. Ezt követően 30 percig FITC- vagy PE-jelölt sztreptavidin jelenlétében forgattuk a mintákat 4 °C-on. Két mosási lépés után a sejteket a korábban már említett áramlási citometriás fixáló oldatban vettük fel, majd áramlási citométeren mértük le. A **CD11b-aktiváció** méréséhez a CD11b aktív konformációját felismerő (fluoreszcensen jelölt) antitestet használtuk (klón: CRBM1/5; gyártó: eBioscience).

A **citokin-leadás** mérése során a sejteket immobilizált immunkomplex felszínen stimuláltuk 6 órán keresztül ELISA-lemezen. A reakciókat jégen állítottuk le, a furatokból leszívott térfogatokat lecentrifugáltuk, majd a felülúszók citokin-tartalmát ELISA-módszerrel (kit gyártója: R&D Systems) határoztuk meg. A citokin-leadás kinetikájának meghatározása során az első mérhető értékek 2 óránál jelentek meg, a rendszer legstabilabbnak 6 óránál mutatkozott (itt a sejttúlélés még 90 % körüli volt; nem mutatott mérések).

A bakteriális **fagocitózis** vizsgálatához GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus* törzset használtunk [196]. A baktériumokat 37 °C-on 20 percig opsonizáltuk kevert humán szérummal, majd a kétszer HBSS oldattal mosott baktériumokat humán neutrofil granulocitákhoz adtuk (neutrofil:baktérium=1:10). A reakciót jégen állítottuk le, a neutrofilhez nem kötődött baktériumokat HBSS-sel kimostuk (és nátrium-hipoklorittal inaktiváltuk), majd a neutrofileket a korábban említett FACS lízis pufferben vettük fel. A mérést áramlási citométeren végeztük. A fagocitózis aktív voltának igazolásához az aktin polimerizáció hatékony gátlószerét, a citokalazin D-t (10 µM koncentrációban; gyártó: Sigma) használtuk.

### 5.5.3. Jelátviteli folyamatok vizsgálatai

Az **intracelluláris jelátviteli folyamatok** vizsgálatához a neutrofileket stimulusfüggő módon 10-15 percig aktiváltuk, majd Triton-alapú lízis pufferben vettük fel a következő módokon. A magnéziummentes környezetben történő szuszpenziós mérések során az 50 ng/ml TNF $\alpha$  vagy 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> jelenlétében történő stimulálást követően a sejteket folyékony nitrogénbe helyeztük, majd ötszörös töménységű feltárót adtunk a mintákhoz és fokozatosan 4 °C-ra melegítettük azokat. Az immunkomplex felszínen történő aktivációt jégen állítottuk le, a sejtsuszpenziót leszívtuk, 4 °C-on lecentrifugáltuk, majd proteáz- és foszfatáz-gátlókkal (aprotinin, proteáz- és foszfatáz inhibitor komplex, nátrium-vanadát, PMSF, esetleg DFP)

kiegészített Triton-alapú oldatban lizáltuk (általában az egyszerűbb, a triton mellett nátrium-fluoridot, nátrium EGTA-t és benzamidint tartalmazó feltáró oldatban<sup>22</sup>, néhány esetben azonban az ezek mellett deoxikolátot és SDS-t is tartalmazó RIPA-ban<sup>23</sup>). A sejtlizátumokat visszapipettáztuk a jégen található lemezekre, majd felkapartuk a lemezhez kötődő letapadt sejteket. Végül a feltárást követően lecentrifugáltuk a Triton-inszolubilis frakciót (13200 rpm, 5 perc, 4 °C) és a fehérjetartalmú felülúszókhöz négyszeres töménységű redukáló ( $\beta$ -merkaptóetanolt tartalmazó) mintapuffert adtunk. A mintákat 10 percig 96 °C-on főztük, majd poliakrilamid gélen megfuttattuk és Western-blot technika segítségével a MAP-kináz p38-ra (antitest gyártója: Santa Cruz Biotechnology), foszfo-p38-ra (a 180-as pozíciójű treonin és 182-es pozíciójű tirozin foszforilálódását detektáló antitesttel), I $\kappa$ B $\alpha$ -ra vagy foszfo-I $\kappa$ B $\alpha$ -ra hívtuk elő (mindhárom antitestet a Cell Signaling Technology-tól vásároltuk, az utóbbi a 32-es pozíciójű treoninon foszforilálódott I $\kappa$ B $\alpha$ -t ismeri fel).

**Immunprecipitációs méréseink** során a Syk tirozin-kinázt a teljes sejtlizátumokból egy Syk-specifikus antitesttel (5F5, gyártó: Biolegend) történő inkubációt (60 perc, 4 °C, forgás) követően rekombináns Protein G-vel borított agaróz gyöngyök (gyártó: Invitrogen) segítségével (30 perc, 4°C, forgás) nyertük ki. Háromszori mosást követően a gyöngyöket másfélszeres töménységű redukáló mintapufferben vettük fel, majd a mintákat 10 percig 96 °C-on főztük. A poliakrilamid gélen történő futtatást követően a membránokat Syk-re (az antitest előállítója: Santa Cruz Biotechnology) vagy foszfortirozinra (az antitestet a 4G10 sejtklón termeli, gyártó: Millipore) hívtuk elő. A Syk esetében immunprecipitációra azért volt szükségünk, mivel egér neutrofil granulocitákon a különböző foszfo-Sykre specifikus antitestek nem adtak értékelhető jelet a stimulált mintákban.

Az **NF- $\kappa$ B-aktiváció** méréséhez a neutrofil granulocitákat 24-lyukú szövetkultúra lemezen immobilizált immunkomplexek segítségével aktiváltuk 30 percig 37 °C-on, majd a reakciót jégen állítottuk le. A sejteket NP40-tartalmú oldattal (proteáz- és foszfatáz-gátlók jelenlétében) tártuk fel, majd nukleáris extraktumot izoláltunk

<sup>22</sup> Az 1x töménységű feltáró oldat pontos összetétele: 154 mM nátrium-klorid; 30 mM HEPES; 1% Triton X-100; 20 mM nátrium-fluorid; 0,5 mM nátrium-EGTA pH=7,5; 10 mM benzamidin.

<sup>23</sup> A RIPA pontos összetétele: 154 mM nátrium-klorid; 30 mM HEPES; 1% Triton X-100; 20 mM nátrium-fluorid; 0,5 mM nátrium-EGTA pH=7,5; 10 mM benzamidin; 0,5% deoxikolát; 0,1% SDS.

belőlük. Ezeket a mintákat infravörös jelölővel ellátott NF- $\kappa$ B-kötő DNS-fragmentekkel inkubáltuk, majd poliakrilamid gélen megfuttattuk. Az NF- $\kappa$ B alegységeket (pl. p65) tartalmazó mintákban a fragment futása lelassult és leolvasáskor infravörös jelet adott a megfelelő magasságban (Elektroforetikus mobilitás shift assay (EMSA)).

Valamennyi mérés során a különböző genotípusú sejtekből teljes sejtlizátumokat készítettem és a sejtek genotípusát Western-blot segítségével ellenőriztem (Használt antitestek: 1. p190RhoGAP: D2D6 klón, Millipore és Klón 30, BD Pharmingen; 2. FcR  $\gamma$ -lánc: nyúl poliklonális antitest, Millipore; 3. CARD9: H-90 klón, Santa Cruz Biotechnology; Bcl10: H-197 klón, Santa Cruz Biotechnology). Tekintettel a p190RhoGAP fokozott proteázok iránti érzékenységre, kimutatásához a mintapuffert előzetesen 96 °C-ra melegítettük és 1:1 arányban adtuk a sejtekhez.

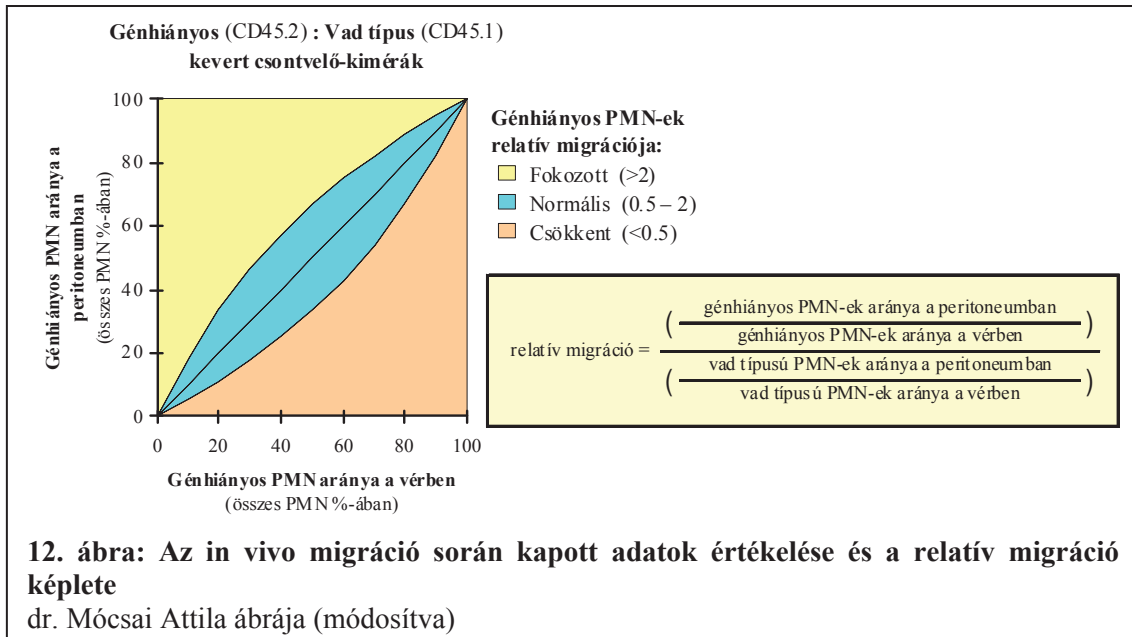
#### 5.5.4. A neutrofilek in vivo migrációjának vizsgálata

A neutrofilek in vivo migrációjának vizsgálatára kompetitív vándorlási tesztet alkalmaztunk. A tioglikolát (gyártó: Heipha Diagnostics) által indukált hashártyagyulladás esetében a CD45.1-pozitív vad típusú és CD45.2-pozitív génhányos neutrofileket keverten tartalmazó egerek (a kevert csontvelői kimérák) 2 ml tioglikolátot kaptak intraperitoneálisan. A 0., a 2. és a 4. órában perifériás vérmintát vettünk az állatoktól, majd a negyedik óra végén a cervikális diszlokációt követően a hasüreget megnyitottuk és 3 ml jéghideg PBS-sel átmostuk. Mind a perifériás vérben, mind a hasüregi mintákban jelenlévő sejteket lecentrifugáltuk (4 °C-on), 5% FCS-t tartalmazó PBS-ben reszuszpendáltuk és Gr-1-re/Ly-6G-re, valamint CD45.2-re specifikus, fluoreszcens festékekkel konjugált antitestekkel jelöltük. A mintákat a korábban említett fixáló oldatban vettük fel és áramlási citométeren mértük le.

Amennyiben egy tetszőleges gén hiányában a neutrofilek migrációja a vad típusnál alacsonyabb, a perifériás vérben megfigyelhetőnél lényegesen alacsonyabb CD45.2-pozitív sejtaránnyal számolhatunk a hasüregben (**12. ábra**). Fokozott migrációs képesség esetében fordított a helyzet, míg a vad típusúval megegyező migrációs kapacitásnál azonos arányokkal számolhatunk a vérben és a hasüregben. A migráció jellemzésére a relatív migrációt használtuk (**12. ábra**).

A neutrofil granulociták gyulladt szinoviális területre történő vándorlását a fenti elvek alapján vizsgáltuk, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben az artritogén

szérum intraperitoneális beadását követő 5. napon (egy alkalommal) perifériás vérmintát vettünk, majd a cervikális diszlokációval előlt egerek bokáinak közvetlen környezetét PBS/20 mM HEPES/10 mM nátrium-EDTA-oldattal mostuk át a neutrofilek kinyerésének céljából. Mintáinkat ezekben az esetekben is Gr-1/Ly-6G-re, valamint CD45.2-re jelöltük és áramlási citométeren mértük le.



## 5.6. Csontvelői makrofágok tenyésztése és aktiválása

### 5.6.1. Csontvelői makrofágok tenyésztése

A makrofágok tenyésztése steril körülmények között történt. A cervikális diszlokációval előlt egerek comb- és lábszárcsontjainak velőüregét steril fülkében PBS-sel kimostuk, a vörösvértesteket a mononukleáris sejtek fokozott hipotónia-érzékenysége miatt ACK lízis puffer (160 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na-EDTA) segítségével lizáltuk. A csontvelői sejteket 10 ng/ml rekombináns M-CSF-t tartalmazó α-MEM oldatban vettük fel (melyhez előzetesen 10% FCS-t és 1% penicillint/streptomocint adtunk) és szövetkultúra lemezekre helyezve inkubátorba tettük (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> környezet). Két nap elteltével a letapadt sejteket kidobtuk, az úszókat új médiumban vettük fel, megszámoltuk és 5 millió/ml koncentrációban baktérium-tenyésztő lemezekre helyeztük (ezekre a lemezekre az érett makrofágok felszínről való egyszerűbb felszedéséhez volt szükség). Újabb két nap után az úszó sejteket eltávolítottuk, a letapadt sejtekre pedig M-CSF-tartalmú 10% CMG14-12-felülűszót

[197] tartalmazó médiumot tettünk. (A CMG14-12-felülúszóban a kultúrák indításánál használt 10 ng/ml-es koncentrációnál nagyságrendekkel nagyobb mennyiségű M-CSF található. A tenyésztés első két napján alkalmazott alacsony dózis azért volt szükséges, hogy a makrofágok túléljenek, de ne tapadjanak ki a lemezekhez, ezáltal az egyéb adherens sejtektől (pl. fibroblasztoktól) jól elkülöníthetőek legyenek.) Kétnaponta cseréltük az M-CSF-tartalmú felülúszót a sejtek felhasználásáig, a 8. napig. A makrofág-tenyészetek tisztaságát áramlási citometriás vizsgálattal F4/80 jelölés (az antitest gyártója: AbD Serotec) alapján határoztuk meg (minden esetben > 98 %).

A CMG14-12-felülúszó gyártásához<sup>24</sup> a CMG14-12 sejtek DMEM + 1% penicillin/streptomycin + 10% FCS oldatban voltak tenyésztve 5-6 napig (a konfluencia folyamatos monitorozása mellett). A makrofágok tenyésztéséhez szűrt felülúszót használtunk.

### 5.6.2. A makrofágok funkcionális válaszainak mérése

A 8. napon a makrofág-tenyészetek felülúszóit leszívtuk, a lemezeket kétszer PBS-sel megmostuk, majd PBS/20 mM HEPES/5 mM nátrium-EDTA segítségével a makrofágokat felszedtük. Ezt követően kétszer mostuk a sejteket HBSS/20 mM HEPES segítségével, majd megszámloltuk őket. A sejteket  $10^6$ /ml koncentrációra hígítottuk, a HBSS/20 mM HEPES oldathoz 0,5 mM végkoncentrációban kalcium-kloridot adtunk és a sejteket 37 °C-on 10 percig előmelegítettük. Ezt követően a makrofágok médiumába 1 mM végkoncentrációban magnézium-klorid került és a sejteket a megfelelő lemez furataiba tettük. A funkcionális méréseket 37 °C-on végeztük.

A **szuperoxid-termelés** méréséhez luminometriás megközelítést alkalmaztunk. A lucigenint (gyártó: Sigma) 5 mg/ml koncentrációban a felhasználás előtt 15 perccel DMSO-ban kihígítottuk (és fénytől védve tároltuk), majd 1:100-ban a makrofágokhoz adtuk. A mérést 96-lyukú fehér luminometriás lemezekon luminométerben végeztük.

A **citokin-leadás** méréséhez a makrofágokat 24-lyukú szövetkultúra lemezekre tettük 1% penicillin/streptomycin tartalmú HBSS/20 mM HEPES-ben (kalcium és magnézium jelenlétében), majd a lemezeket 24 órán keresztül 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubátorban tartottuk. A mérést jégen állítottuk le, a furatokból a médiumot leszívtuk, centrifugáltuk, majd a felülúszók citokintartalmát ELISA-

<sup>24</sup> A CMG14-12-felülúszó „gyártását” laboratóriumi asszisztenseink végezték.

módszerrel, illetve szendvics-ELISA-alapú citokin array (gyártó: R&D Systems) segítségével vizsgáltuk.

### **5.7. Csontvelői hízósejtek tenyésztése**

A csontvelői hízósejteket – a makrofágok esetében leírtaknak megfelelően – steril körülmények között tenyésztettük. A csontvelő üregét az 5.6.1. alfejezetben tárgyaltaknak megfelelően mostuk ki, a vörösvértesteket ACK-val lizáltuk, majd a sejteket 500 ezer/ml koncentrációban 20% WEHI-3 felülúszót tartalmazó RPMI 1640 oldatban vettük fel (10% FCS és 1% penicillin-streptomycin jelenlétében) tenyésztő flakonokban. Háromnaponta az úszó sejteket lecentrifugáltuk (a letapadt sejteket kidobtuk) és új WEHI-3 felülúszót tartalmazó oldatban vettük fel. Három hét után a sejtek érettségét CD117-re (ez az őssejt faktor SCF receptora, a c-Kit) és Fcε-receptor I-re történő jelölés alapján áramlási citometriás módszerrel ellenőriztük. Amennyiben 85% felettinek bizonyult a tisztaság, a sejtekből teljes sejtlizátumot készítettünk, a mintákat poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd Western-blot módszer segítségével CARD9-re, valamint CARMA1-re (antitestek gyártója: Santa Cruz Biotechnology) hívtuk elő a membránokat.

A WEHI-3 felülúszóban olyan citokinek találhatóak, melyek a csontvelői hízósejtek (Bone marrow-derived mast cells, BMMC) éréséhez elengedhetetlenek, ezek közül a legfontosabb az IL-3. A WEHI-3 sejtvonalat az ATCC-től vásároltuk. Ezen mielomonocitás leukémia sejteket FCS-t, valamint antibiotikumot tartalmazó DMEM oldatban vettük fel 100 ezer/ml koncentrációban. Amikor a sejtsűrűség elérte a 600 ezer–1 millió/ml-t, a sejteket lecentrifugáltuk, a felülúszót begyűjtöttük és a sejteket 100 ezer/ml koncentrációban friss médiumban tenyésztettük tovább. A felülúszókat lecentrifugáltuk, 0,2 µm-es szűrőn átszűrtük, majd a felhasználásig –20 °C-on tartottuk.

### **5.8. A K/BxN szérum transzfer artritisz kiváltása és mérése**

Amennyiben KRN transzgenikus T-sejt receptort hordozó egereket NOD egerekkel keresztezünk, a transzgen-pozitív KRN x NOD utódokban spontán, a humán autoimmun artritiszekhez hasonló ízületi gyulladást figyelhetünk meg (K/BxN artritisz) [152]. A jelenség hátterében az áll, hogy a fent említett autoreaktív T-sejt receptor reagál az „autoimmun” MHC II-vel asszociálódott, a szervezetben ubikviter módon



kifejeződő glükóz-6-foszfát izomerázzal (GPI). Az ízületi gyulladás a beteg állatok szérumával átvihető egészséges egyedekre is (K/BxN szérum transzfer artritisz, [154]).

Három hónaposnál idősebb KRN x NOD transzgen-pozitív és -negatív egerektől vért gyűjtöttünk (a retroorbitális vénás plexusból), majd a vért egy éjszakán át 4 °C-on állni hagytuk. Az alvadékról másnap a szérumot leszívtuk, a „kontamináló” sejteket lecentrifugáltuk és a szérumokat felhasználásig –20 °C-on tároltuk. Az artritisz kiváltásához a szérumokat PBS-ben hígítottuk, 37 °C-on előmelegítettük, majd az egereknek intraperitoneálisan beadtuk (3-400 µl szérum egyedenként). Az ízületi gyulladás klinikai jeleit egy pontszám (skála: 0-10), a bokák vastagodását egy speciális mérőeszköz segítségével követtük 14 napon keresztül. A bokaízület funkcionális állapotáról az egészséges egyedeknek problémát nem okozó, 2 percen keresztüli rácson való lógás/lógatás segítségével nyertünk információt. Ennek ábrázolása során a túlélési görbék analógiájára az idő függvényében a rácson maradt egerek arányát tüntettük fel. A betegség-kiváltó K/BxN szérumok mellett kontrollként autoantitestet nem tartalmazó, transzgen-negatív BxN szérumot használtunk.

### **5.9. A kísérletekből származó adatok értékelése és prezentálása**

Valamennyi kísérletünket legalább három alkalommal elvégeztük és mindannyiszor a bemutatottakkal azonos eredményt kaptunk. In vitro méréseink során egyetlen kísérleten belül általában három párhuzamos, azonos csoportba tartozó mintát használtunk. A dolgozatomban bemutatott reprezentatív ábrák esetében a szórást (SD), több független kísérlet átlagának prezentációja során az átlag hibáját (SEM) tüntettem fel. A kísérletekből származó adatokat a kísérleti felállásnak megfelelően egy- vagy kétmintás t-próbának, illetve ismétléses, kétfaktoros variancia-analízisnek (ANOVA módszernek) vetettük alá (+ Tukey-féle post-hoc teszt). A statisztikai kiértékelésekhez a STATISTICA programot használtuk. A szignifikancia határának a  $p=0,05$  értéket tekintettük.

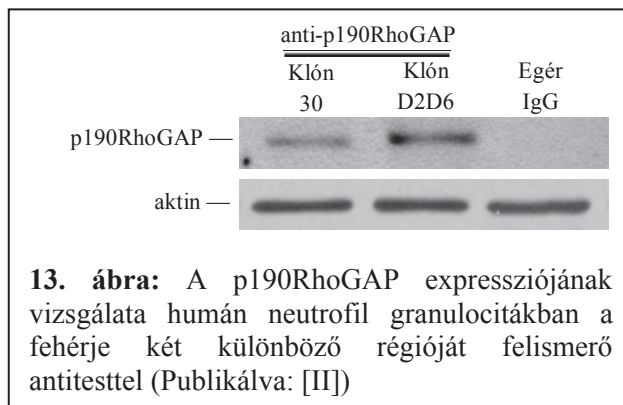
## 6. Eredmények

### 6.1. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata egér neutrofil granulocitákban és neutrofil-függő autoimmun ízületi gyulladásban

A bevezetőben ismertetett irodalmi adatok arra sarkalltak bennünket, hogy megvizsgáljuk, vajon a p190RhoGAP teljes hiánya miként befolyásolja a neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin-függő és -független sejtválaszait. Az alábbiakban tárgyaljuk eredményeinket publikáltuk [II].

#### 6.1.1. A p190RhoGAP jelenlétének ellenőrzése neutrofil granulocitákban

Első lépésként Western-blot technika segítségével megvizsgáltuk, hogy a p190RhoGAP kifejeződik-e humán neutrofil granulocitákban. Kétféle p190RhoGAP-

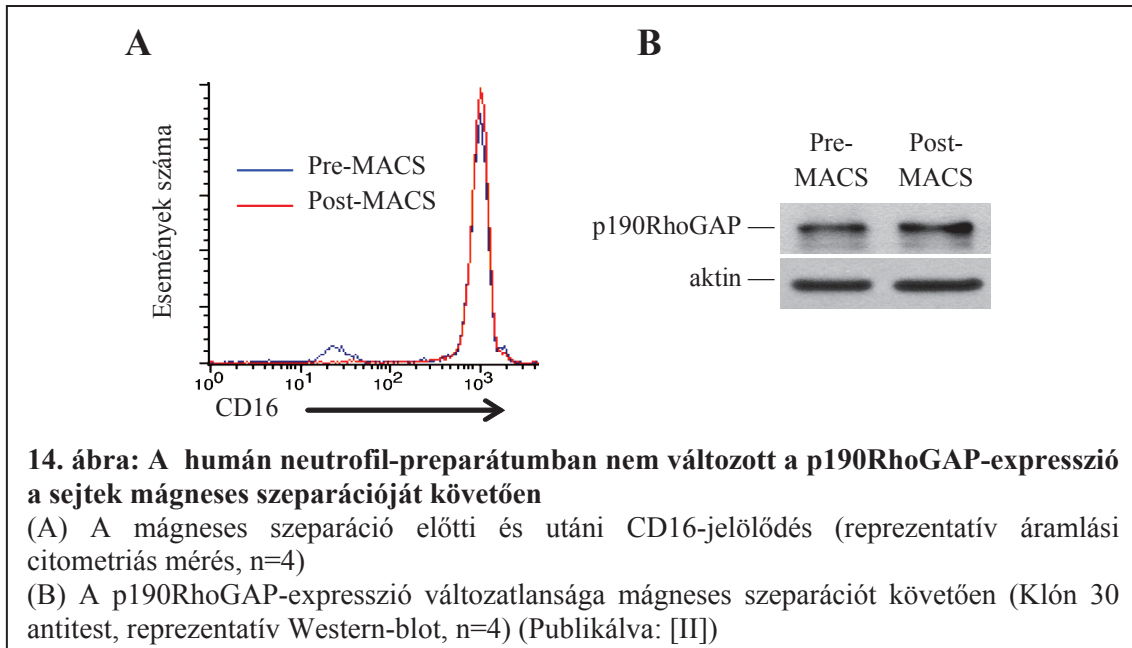


ellenes antitestet alkalmaztunk: az egyik a fehérje középső (klón: 30), a másik a molekula aminoterminális végét ismerte fel (klón D2D6). Mindkét antitest segítségével jól detektálható volt a p190RhoGAP jelenléte a standard humán neutrofil preparátumunkban; az izotípus

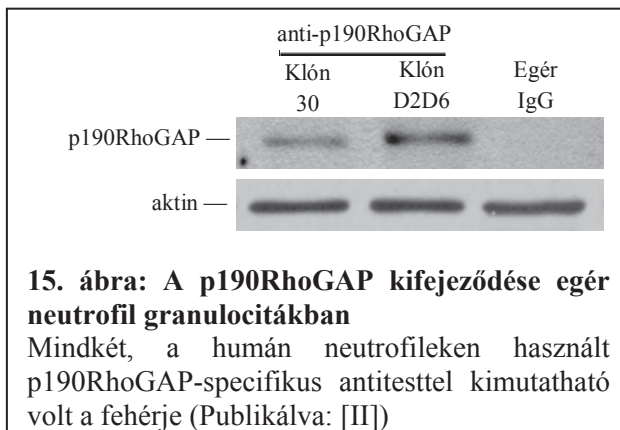
kontroll antitesttel (egér IgG) nem láttunk 190 kD magasságában jelet (**13. ábra**).

Mivel standard humán neutrofil preparátumunk neutrofil aránya 96% körüli volt, szerettük volna kizárni, hogy a 13. ábra jelei esetleg a neutrofil mintánkat szennyező egyéb sejtekből (pl. a „legnagyobb” mennyiségben jelen levő eozinofilekből) származtak. CD16-(F $\gamma$ RIII) alapú mágneses szeparáció (magnetic cell separation, MACS) segítségével tettük preparátumunkat tisztábbá: a May-Grünwald-Giemsa festés alapján a szeparáció előtti 96,6%-os neutrofil-arány 99,1%-osra növekedett (maradék sejtek: 0,2 % eozinofil granulocita /mutatva, hogy az egyes allergiás egyéneknél az eozinofileken megjelenő F $\gamma$ RIII nem zavarta a rendszerünket [198]/; 0,3 % limfocita; 0,4% egyéb morfológiailag nem azonosítható sejt; n=3). Egy, a mágneses CD16-ellenes antitesttől eltérő epitópot felismerő antitesttel történő jelölést követően áramlási

citométerrel jól látszott, hogy a mágneses szeparációt követően eltűnt a standard preparátumunk CD16-negatív populációja (**14. ábra** A része). Mindeközben immunblot technikával azt tapasztaltuk, hogy a mágneses szeparáció nem befolyásolta a p190RhoGAP jelenlétét a preparátumokban (**14. ábra** B része), mutatva, hogy a neutrofilekből származtak a 13. ábra 190 kDa magasságában látható fehérjecsíkjai.



Tekintettel arra a tényre, hogy a továbbiakban bemutatott méréseimet egér



neutrofil granulocitákon végeztem, ellenőriztem, hogy a fehérje kifejeződik-e egér neutrofilekben. Western-blot segítségével jól látható volt mind a p190RhoGAP amino-terminális, mind a középső részét felismerő antitest használata esetén a megfelelő magasságban a

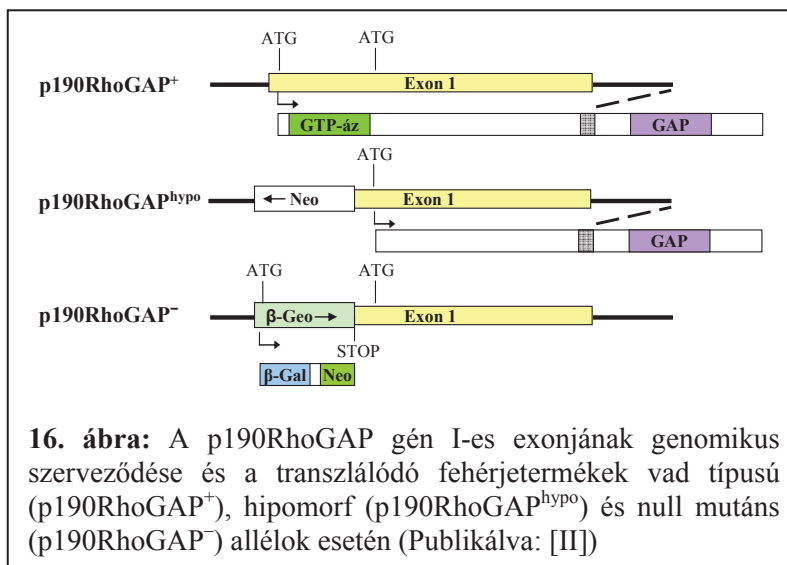
p190RhoGAP (miközben az egér izotípus antitesttel nem kaptunk jelet) (**15. ábra**).

### 6.1.2. A p190RhoGAP null mutáció jellemzése

A p190RhoGAP hiányának vizsgálatához a korábban a p190RhoGAP hipomorf mutáns allélt (*Gr1f1*<sup>tm1JSet</sup>, a későbbiekben p190RhoGAP<sup>hypo</sup>) [111] is előállító (Jeffrey Settleman által vezetett) munkacsoport null mutáns variánsát (*Gr1f1*<sup>tm2JSet</sup>, a

továbbiakban p190RhoGAP<sup>-</sup>) használtam. Az ez utóbbit hordozó egértörzs a laborunkba való kerülését megelőzően a kihalás szélére került, a gé módosítás részletes tervei elvesztek, így ránk várt a feladat, hogy a mutáció pontos helyét rekonstruáljuk.

A korábban leírt hypomorf mutáció (p190RhoGAP<sup>hypo</sup>) során a p190RhoGAP fehérjét kódoló gén első exonjának 5' végén található körülbelül 1,5 kilobázis nagyságú régiót (mely tartalmazza a fehérje translációjának iniciációs helyét) lecserélték egy ellentétes irányultságú, a negatív szelekcióhoz szükséges, egy PGK-promóter által

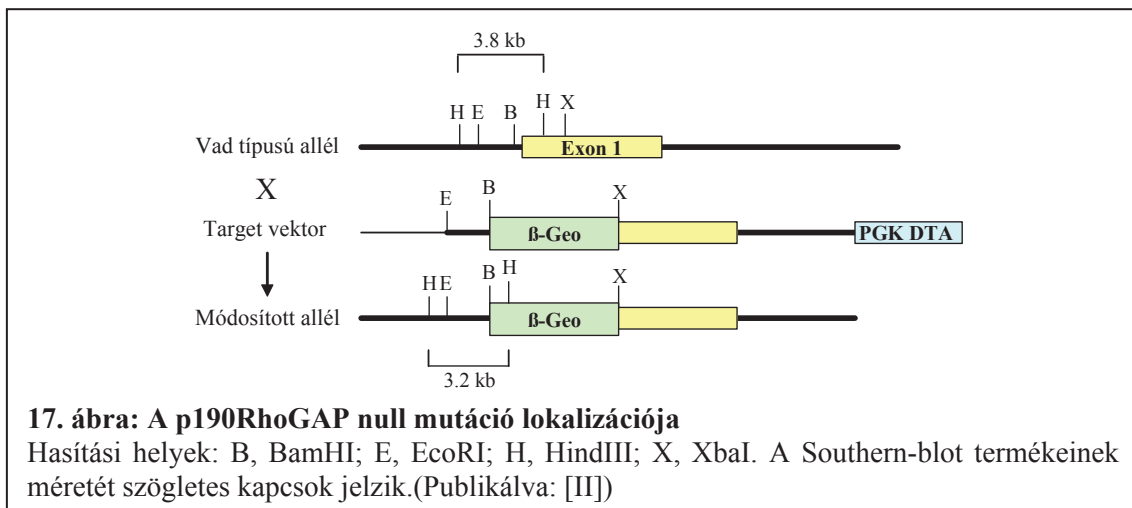


hajtott Neomicin kazettára (Neo) (16. ábra). Sajnálatos módon azonban a mutáció hipomorfnek mutatkozott: bár a fehérje aminoterminális részét felismerő antitest teljes hiányt mutatott, a középső szakasz ellen termeltetett antitest egy

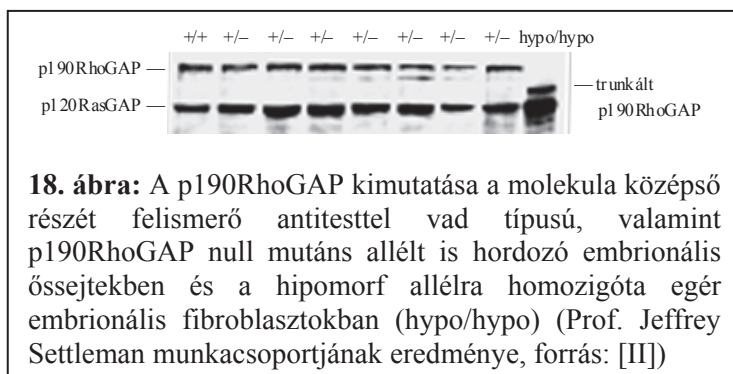
rövidebb, csonkolt fehérje jelenlétét jelezte. Feltételezhető volt, hogy ebben az esetben az inzerciótól 3' irányban a transláció el tudott indulni egy rejtett iniciációs rész (egy kriptikus downstream ATG) révén. Az újabb null mutáció (p190RhoGAP<sup>-</sup>) kialakításánál a kutatók egy másik megközelítést alkalmaztak. Az új targetáló vektorban a fent említett 1,5 kilobázis nagyságú exon 1 szakasz egy promóter nélküli,  $\beta$ -galaktozidáz-neomicin fúziós fehérjét kódoló  $\beta$ -Geo kazettával lett kicserélve normál (szensz) orientációban. Ez biztosította, hogy a teljesen funkcióképes upstream open reading frame megakadályozza a downstream rejtett belső transláció iniciációs hely használatát. A rendszer további előnye volt, hogy lehetővé tette az endogén p190RhoGAP-promóter aktivitásának mérését a későbbiekben a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának meghatározása révén (ugyanakkor a neomicin révén biztosította a negatív szelekciót).

A  $\beta$ -Geo kazetta pontos inzerciójának lokalizációjához és a kazetta szekvenciájának meghatározásához polimeráz láncreakcióval (PCR) történő

amplifikálást követően nukleotid-szekvenálást használtunk. Az egyes szakaszok meghatározásához a Vector NTI nevű szoftver segítségével primereket terveztem, oly módon, hogy a keletkező PCR-termékek átfedést mutassanak. A p190RhoGAP heterozigóta egyedek farkából tisztított DNS templátból felerősített termékeket agaróz gélen megfuttattuk, a gélből kitisztítottuk, majd szekvenálásra a németországi Eurofins MWG Operonhoz küldtük. A null mutáció  $\beta$ -Geo kazettájának, valamint a kazetta 5' és 3' inzerciójának vizsgálataink során feltárt szekvenciáját feltöltöttük a GenBank adatbázisba (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) a HM365221-es szám alatt. Ezen új, a létrehozó labor vezetőjéről *Gr1f1*<sup>tm2JSet</sup>-nek nevezett mutáció (17. ábra) (és a következményes fenotípus) adatait elküldtük a Mouse Genome Informatics adatbázisba (www.informatics.jax.org).



Jeffrey Settleman munkacsoportja Western-blottal kimutatta, hogy egy, a

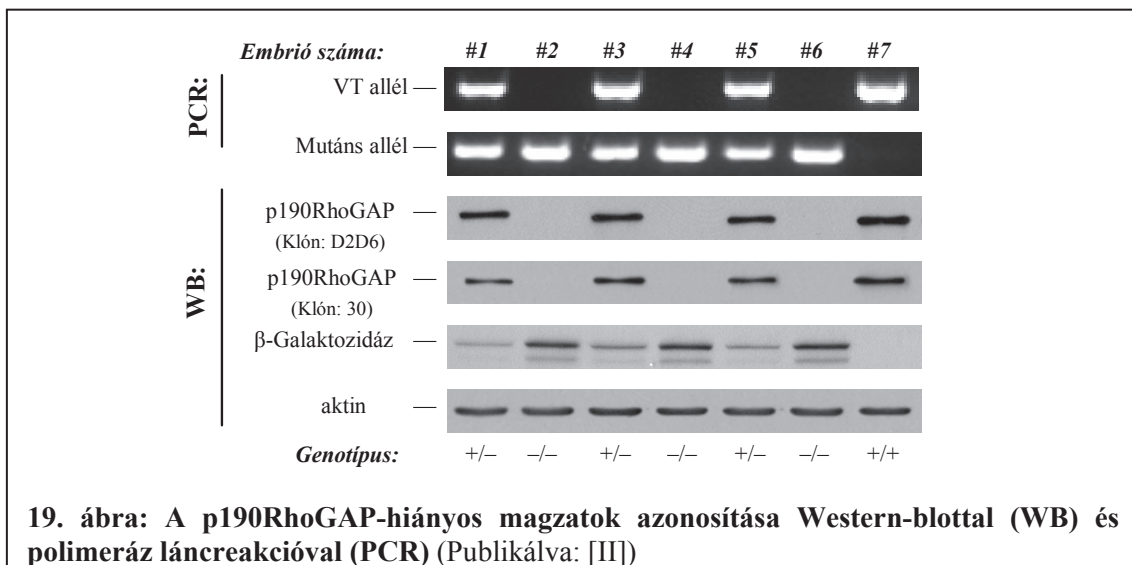


p190RhoGAP középső részét felismerő antitest segítségével a null mutáns allélt hordozó sejtekben a hipomorf variáns homozigóta formában hordozó sejtekkel szemben

nem volt jelen a hipomorf mutánsra jellemző csökevényes p190RhoGAP (18. ábra). Ezek alapján úgy tűnt, hogy az új p190RhoGAP mutáció a fehérje teljes hiányát eredményezte.

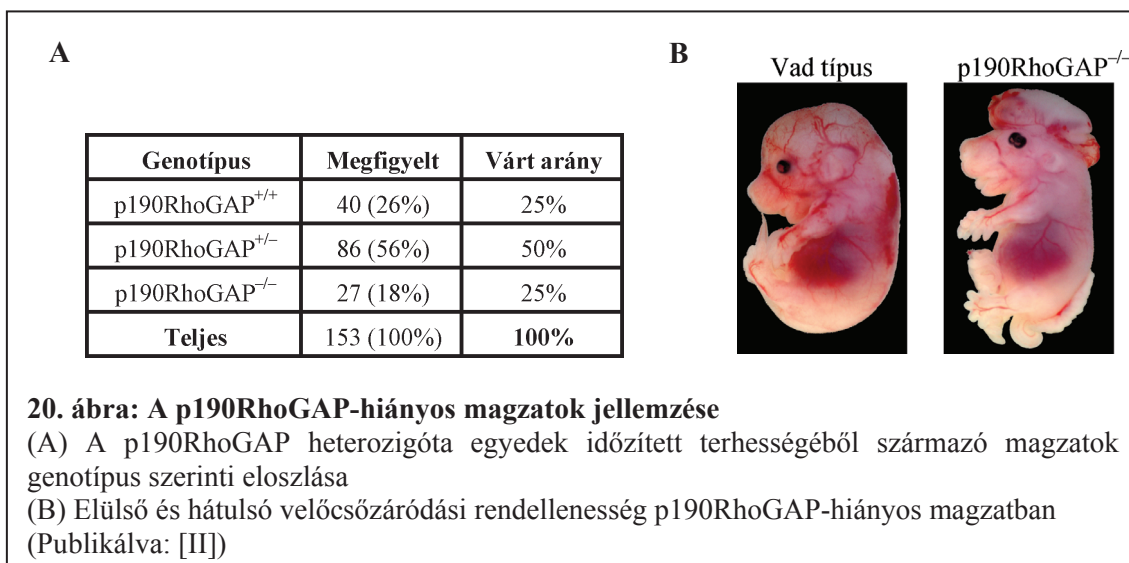
### 6.1.3. A p190RhoGAP<sup>-/-</sup> egyedek jellemzése

Míg a p190RhoGAP heterozigóta egerek a mendeli öröklődésnek megfelelő arányban születtek és életképességük nem tért el lényegesen vad típusú társaiktól, utódaik között nem volt egy hetesnél idősebb p190RhoGAP-hiányos egyed, mutatva, hogy a hipomorf mutánshoz hasonlóan a p190RhoGAP teljes hiánya is perinatális letalitást okoz. A heterozigóta egyedek időzített terhességéből származó 15-18 napos magzatok genotípusát a magzati májsejtekből allélspecifikus PCR technikával, illetve a magas p190RhoGAP-expressziót mutató magzati agyszövetből Western-blottal határoztuk meg p190RhoGAP- és  $\beta$ -galaktozidáz-specifikus antitesttel (**19. ábra**). Ehhez a p190RhoGAP heterozigóta egerek időzített terhességéből származó 15-18 napos magzatokat a vemhes nőstény nyaki diszlokációját követően eltávolítottuk és jégre tettük. A magzatokat burkaiktól megszabadítottuk, intrakraniális szöveteiket tompává tett végű tüvel kinyertük és Triton-alapú feltáró oldatban lízáltuk. A mintákat a Triton-inszolubilis frakció kinyerését követően redukáló mintapufferben vettük fel. Rövid főzést követően a mintákat SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, a géleket átblottoltuk, a membránokat pedig Western-blot technikával hívtuk elő.



Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a génhányos magzatok aránya a várt 25 %-nál alacsonyabb érték volt (**20. ábra** A része). A p190RhoGAP<sup>-/-</sup> magzatok egy harmadánál továbbá megjelent a hipomorf mutánsnál is olykor fellelhető velőcsőzáródási rendellenesség két gyakori formája: az exencephalia és a spina bifida (**20. ábra** B része). Settleman és munkatársai a homozigóta egyedekben ezeken kívül abnormális vesefejlődést is találtak (mely az enyhe dysplasiától a teljes vese agenesiáig

terjedt), mi pedig egyes esetekben szemfejlődési zavarokat, colobomákat figyeltünk meg (nem mutatott eredmények).

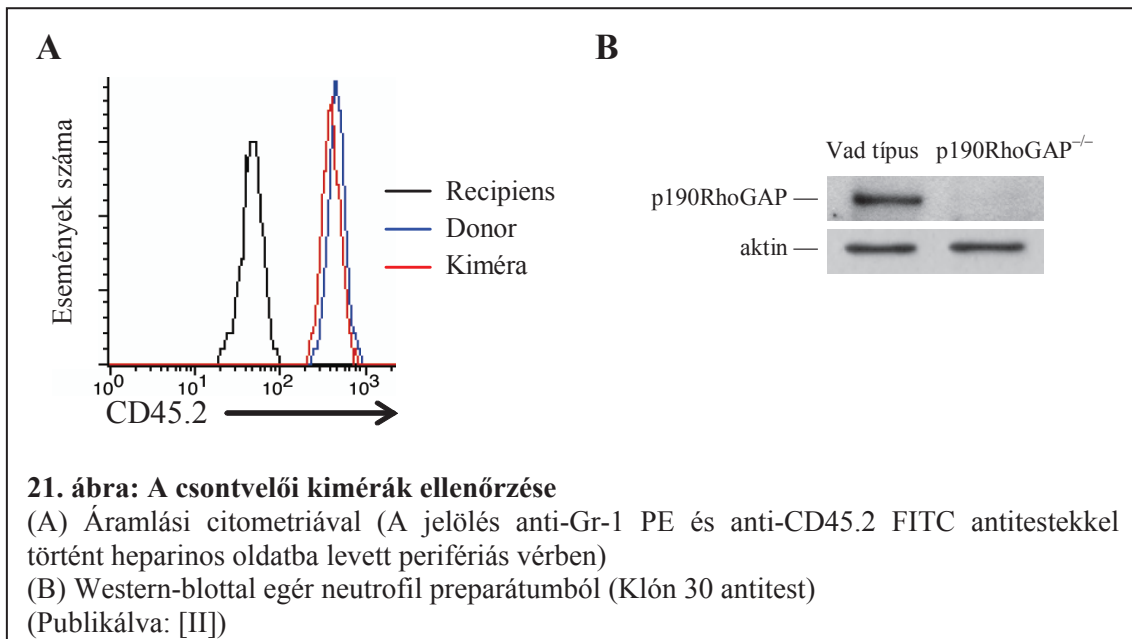


Röviden összefoglalva a null mutáns magzatok a hipomorf mutáns egyedekhez hasonlóan perinatális letalitást mutattak (valamint egyes esetekben a korábbi változatnak megfelelő velőcsőzáródási rendellenességet), mely jelentősen megnehezítette a p190RhoGAP neutrofil granulocitákban és az autoimmun ízületi gyulladásban betöltött szerepének vizsgálatát.

#### 6.1.4. A p190RhoGAP-hiányos csontvelői kimérák létrehozása

A perinatális letalitás okozta probléma áthidalására csontvelő-transzplantációt végeztünk. A p190RhoGAP heterozigóta egyedek időzített terhességéből származó magzatokat Western-blot segítségével azonosítottuk. Western-blotra azért volt szükség, mivel a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> magzatok korábban említett makroszkópos velőcsőzáródási rendellenességének penetranciája csupán 33 % körüli volt, így a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> magzatok a vad típusú allélt hordozóktól nem voltak minden esetben szabad szemmel elkülöníthetőek. A Western-blot mellett bizonyos esetekben a genotípust további PCR alapú technikával erősítettük meg. A p190RhoGAP-hiányos magzatok (és kontrollként a p190RhoGAP-ot expresszáló testvéreik) májából sejtszuspenziót készítettünk, melyet előzetesen letális besugárzáson (11,5-12 Gy) átesett recipiensekbe injektáltunk. Mivel a kérdéses magzati korban a máj a vérképzés fő szerve, a szuszpenzióban nagy mennyiségben voltak jelen hemopoetikus őssejtek és különféle progenitorsejtek, melyek a sugárzással elpusztított recipiens eredetű társaikat pótolni tudták.

A transzplantáció sikerességének ellenőrzésére a transzplantációt követő negyedik hét végén került sor. A recipiens, valamint donor eredetű sejtek elkülönítésére a kétféle sejtpopuláció eltérő CD45 allélja szolgált (a donor eredetűek CD45.2-t, a recipiensek CD45.1-t fejeztek ki a sejt felszínükön). Áramlási citometriás méréssel a két – Gr-1 kapuzásnak megfelelően döntően neutrofil – populáció jól elkülöníthető volt (**21. ábra A** része). A kimérák hemopoetikus rendszerének genotípusát Western-blot segítségével határoztuk meg. A csontvelőből neutrofil granulocitákat preparáltunk, a sejteket lizáltuk, majd a mintákat p190RhoGAP-ra hívtuk elő (**21. ábra B** része). A vad típusú neutrofilekkel szemben p190RhoGAP null mutáns allélt homozigóta formában hordozó p190RhoGAP<sup>-/-</sup> egér neutrofilekben nem expresszálódott a fehérje. Szerettük volna kimutatni, hogy a korábban már említett p190RhoGAP hipomorf mutáns allélt homozigóta formában tartalmazó egér neutrofilekben a p190RhoGAP a D2D6 antitesttel nem, viszont a Klón 30-as antitesttel a trunkálságnak megfelelően a 190 kDa magasság alatt detektálható, azonban a hipomorf törzs kísérleteink idejére már nem volt hozzáférhető. (Fontos hozzátenni, hogy az általunk használt új null mutációt homozigóta formában hordozó sejtekben egyik p190RhoGAP-specifikus antitesttel sem kaptunk jelet a membránokon a 190 kDa alatti régiókban.)



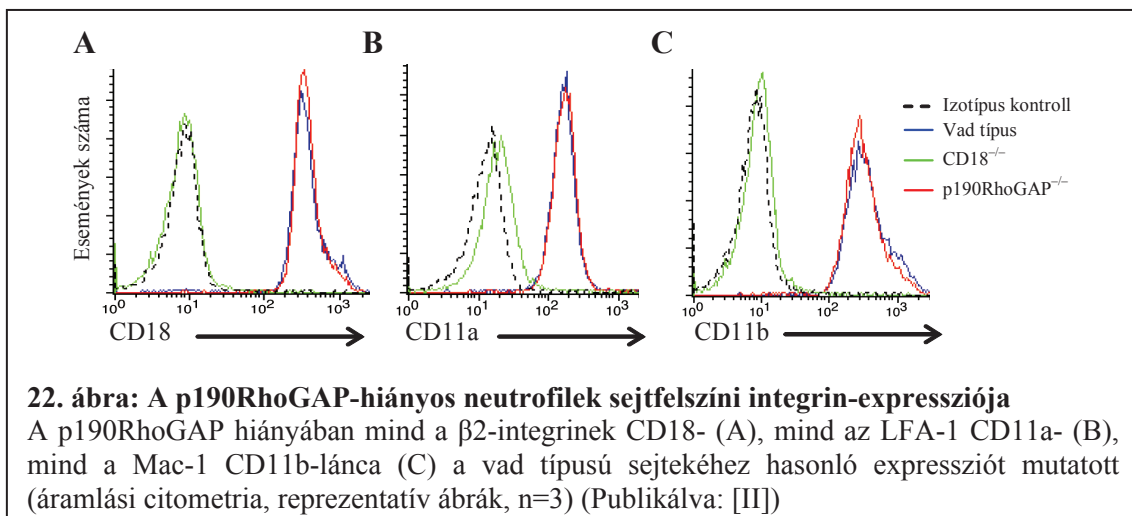
Kísérleteink során csak azokat a kiméráinkat használtuk, melyek neutrofil populációjának CD45.2-pozitivitása legalább 99%-os volt (n=70 alapján a vad típus



kimérák tisztasága  $99.7 \pm 0,2\%$ -nak, a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> kiméráké  $99,8 \pm 0,2\%$ -nak mutatkozott).

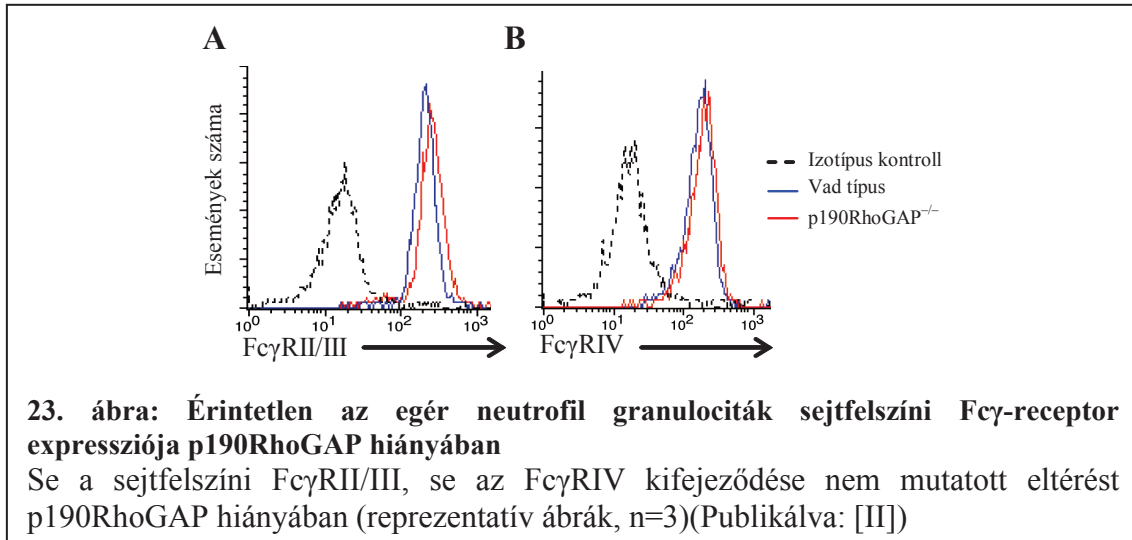
### 6.1.5. A p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilek sejtfelszíni integrin- és Fc $\gamma$ -receptorainak jellemzése

A p190RhoGAP-hiányos neutrofil granulociták a vad típusal megegyező mértékű érési marker Gr-1-expressziót mutattak, jelezve, hogy a fehérje hiánya nem okozott fejlődési defektust a sejtekben (nem mutatott eredmények). Mielőtt megvizsgáltuk volna a p190RhoGAP-hiányos neutrofil granulociták integrin-függő válaszképességét, megnéztük, hogy a vad típushoz képest a génhányos sejtek milyen sejtfelszíni  $\beta_2$ -integrin-kifejeződést mutattak. Áramlási citometriás méréssel azt találtuk, hogy mind a  $\beta_2$ -integrinek  $\beta$ -lánca, mind az LFA-1  $\alpha$ -lánca, mind pedig a Mac-1  $\alpha$ -lánca azonos mértékben fejeződött ki a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek felszínén (**22. ábra**). Referenciaként a korábban már említett, a humán LAD I egérmodelljének számító CD18<sup>-/-</sup> egerek csontvelőjéből preparált neutrofileket használtuk.



A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy miként alakul p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilek plazmamembránjában az IgG Fc-részét specifikusan megkötni képes Fc $\gamma$ -receptorok kifejeződése. Az egér neutrofilek felszínén nyugalomban kétféle aktiváló Fc $\gamma$ -receptor található: az Fc $\gamma$ RIII és az Fc $\gamma$ RIV, melyek funkciója jelentősen átfed [I]. (A harmadik aktiváló receptor, az Fc $\gamma$ RI csupán bizonyos stimulusokra, így pl. IFN- $\gamma$  hatására jelenik meg a felszínen.) Mivel nincs külön Fc $\gamma$ RIII-ellenes antitest, az Fc $\gamma$ RIII mellett a gátló

Fc $\gamma$ RII-t is felismerő antitesttel az említett két receptor együttes expresszióját, valamint az Fc $\gamma$ -receptor IV kifejeződését vizsgáltuk. Méréseink azt mutatták, hogy az Fc $\gamma$ -receptorok sejt felszíni kifejeződését a p190RhoGAP hiánya nem befolyásolta (**23. ábra**).

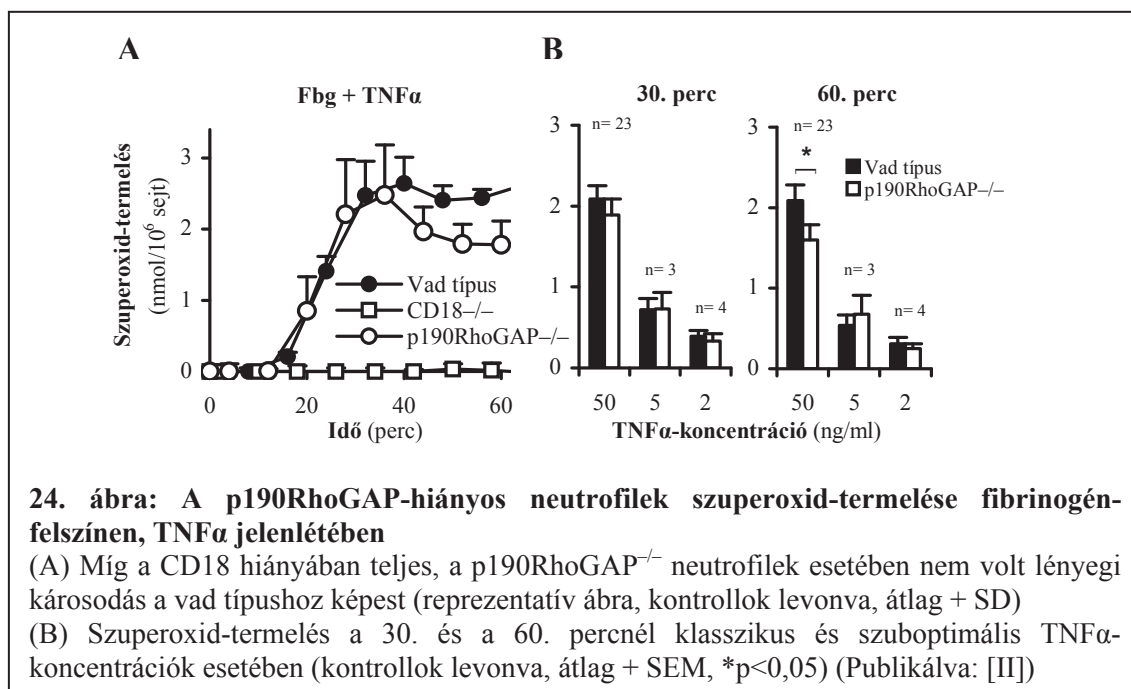


A p190RhoGAP hiánya tehát nem befolyásolta az egér neutrofilek érését, valamint a neutrofilek sejt felszíni  $\beta_2$ -integrin-, valamint Fc $\gamma$ -receptor-expresszióját.

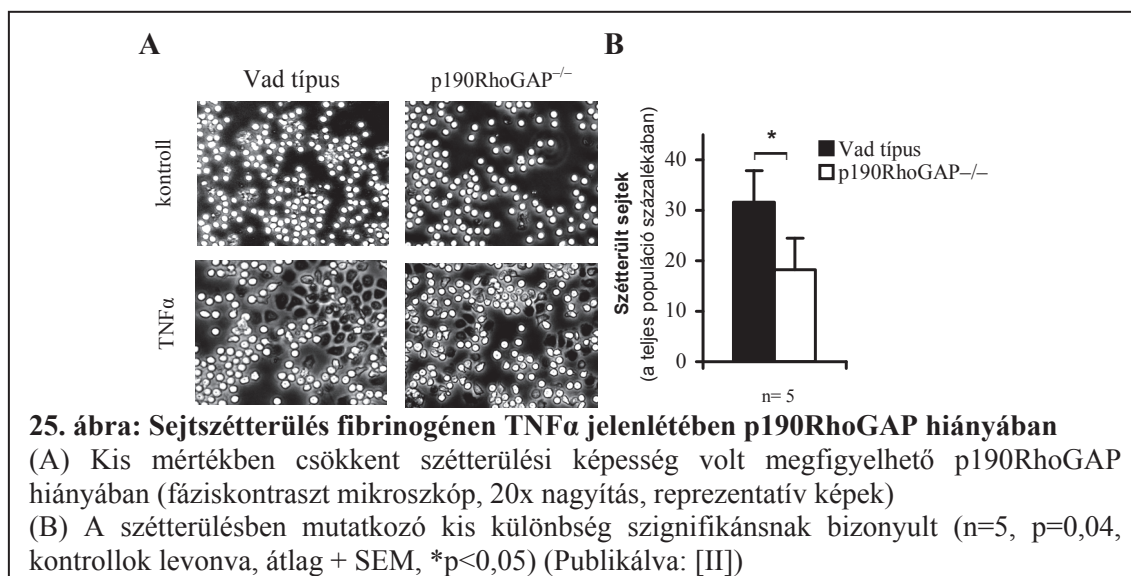
### 6.1.6. A p190RhoGAP-hiányos neutrofilek $\beta_2$ -integrin-függő szuperoxid-termelése és szétterülése

Mint azt a fejezet bevezetőjében említettem, nem-hemopoetikus és hemopoetikus sejtekkel kapcsolatos irodalmi adatok alapján felmerült a p190RhoGAP szerepe neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin-mediált folyamataiban. Ennek vizsgálatára elsőként fibrinogén felszínre helyeztük az egér csontvelőből preparált neutrofil granulocitákat és 50 ng/ml TNF $\alpha$  jelenlétében vizsgáltuk a szuperoxid-termelést. Míg a referenciaként használt CD18-hiányos sejtek képtelenek voltak szuperoxidot termelni, a p190RhoGAP teljes hiányával jellemezhető granulociták csupán enyhe és csak a fenntartó fázisban megjelenő eltérést mutattak vad típusú társaikhoz képest: míg a 30. percben a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos eredményeket összevetve nem tapasztaltunk eltérést ( $p=0,2$ ;  $n=23$ ), a 60. percre a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilek esetében egy kis mértékű, statisztikailag szignifikáns csökkenés jelent meg a vad típusúhoz képest ( $n=23$ ,  $p=0,004$ ; A két genotípus közötti különbség a 60-120. perces intervallumban már nem növekedett.)(**24. ábra**). Alacsonyabb (a sejtválasz szempontjából szuboptimális)

TNF $\alpha$ -koncentrációkat használva a válaszképesség tekintetében nem volt érdemi különbség a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos sejtek között, jelezve, hogy a fenti, lényeges különbséget nélkülöző eredményeket nem a neutrofil granulociták szupramaximális aktivációja eredményezte (24. ábra B része).

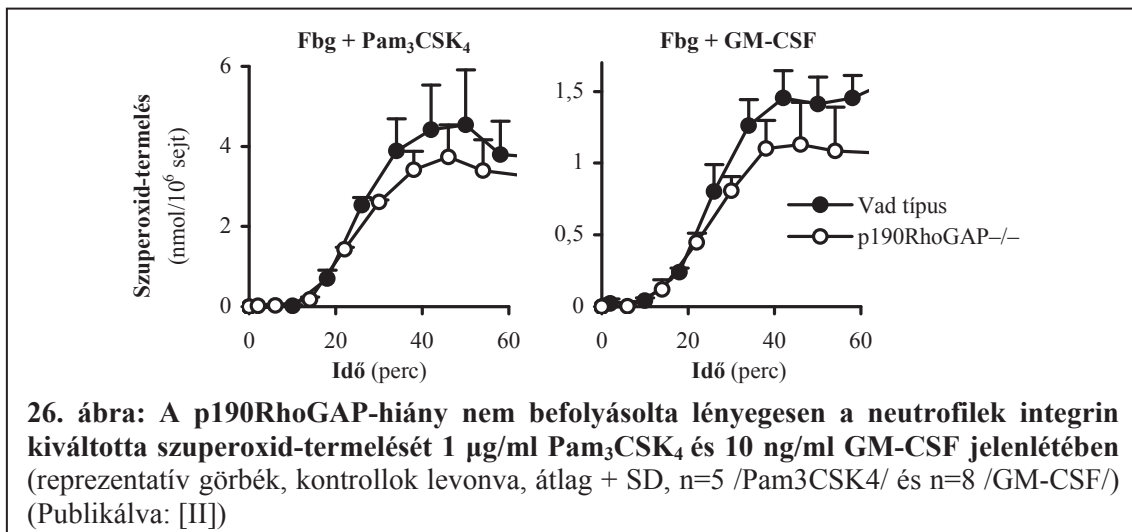


TNF $\alpha$  jelenlétében, integrin-ligand felületen a neutrofilek szétterültek: fáziskontraszt mikroszkóp segítségével jól detektálható volt, amint a sejtek poligonálissá váltak. Bár a p190RhoGAP-hiányos sejtek is képesnek mutatkoztak a sejtészterülésre, annak mértéke a vad típushoz képest kis mértékben ugyan, de szignifikánsan csökkent (p=0,04; n=5)(25. ábra), jelezve, hogy a p190RhoGAP



bizonyos mértékben szükséges a sejtek alakváltozásához (feltehetően a citoszkeletális aktin-átrendeződés regulációja révén).

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a p190RhoGAP hiány befolyásolta-e a fibrinogén-felszínen egyéb stimulusok hatására létrejövő szuperoxid-termelést. Sem a mintázatfelismerő receptorok közé tartozó Toll-like receptor 2 (TLR2) szintetikus agonistája (a Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>), sem a neutrofilek érésének és aktivációjának egyik fontos regulátor citokinje (a GM-CSF) jelenlétében nem tapasztaltunk lényegi károsodást p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilekben a vad típusú sejtekhez viszonyítva (26. ábra).

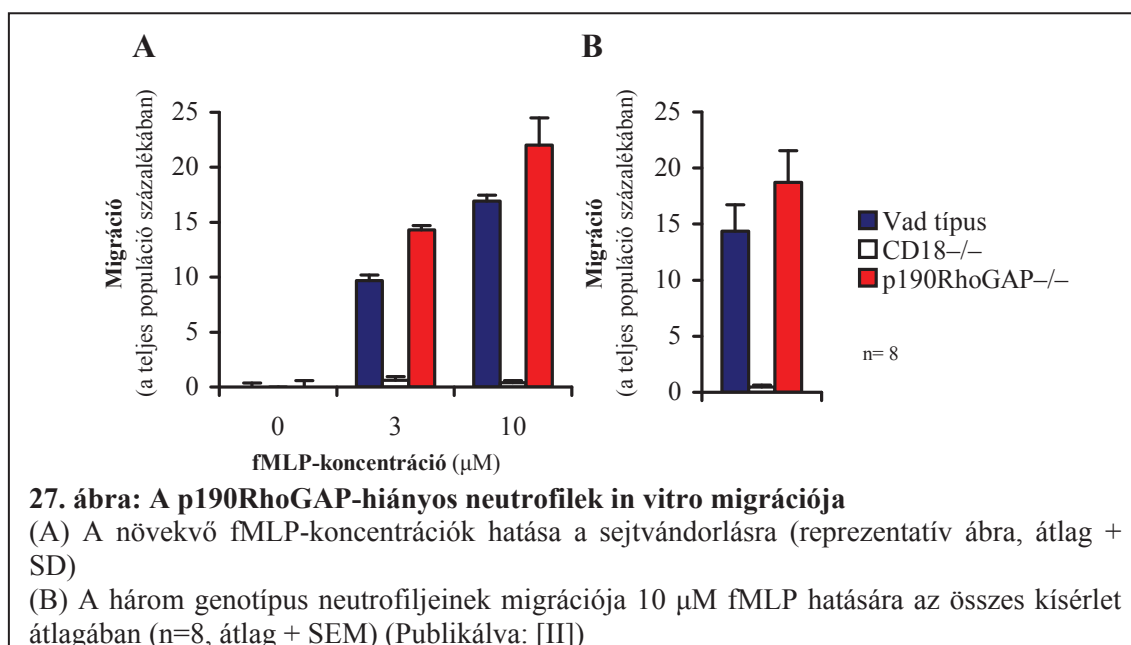


Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy míg a p190RhoGAP csekély mértékben, de hozzájárult a neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin-mediált szétterüléséhez, addig az integrin-ligand felszínen létrejövő szuperoxid-termelésben nem mutatkozott megkerülhetetlenül fontosnak. Mindez számunkra is igen meglepő volt, hiszen arra számítottunk, hogy a fibroblasztokban leírt módon a p190RhoGAP elengedhetetlen szerepet játszik a neutrofilek  $\beta_2$ -integrin-jelpályájában (azaz hiányában drasztikus különbségek jelentkeznek a sejtek válaszaiban). Ugyanakkor tisztában voltunk vele, hogy talán a p190RhoGAP a GAP-ok esetében oly sok esetben megfigyelhető módon esetleg csupán egy-két folyamatban vesz részt neutrofilekben. Ezen felbuzdulva kiterjesztettük vizsgálatainkat további – részben  $\beta_2$ -integrin-mediált, részben integrin-független – sejtválaszok irányába.

### 6.1.7. A p190RhoGAP szerepe a neutrofilek migrációjában

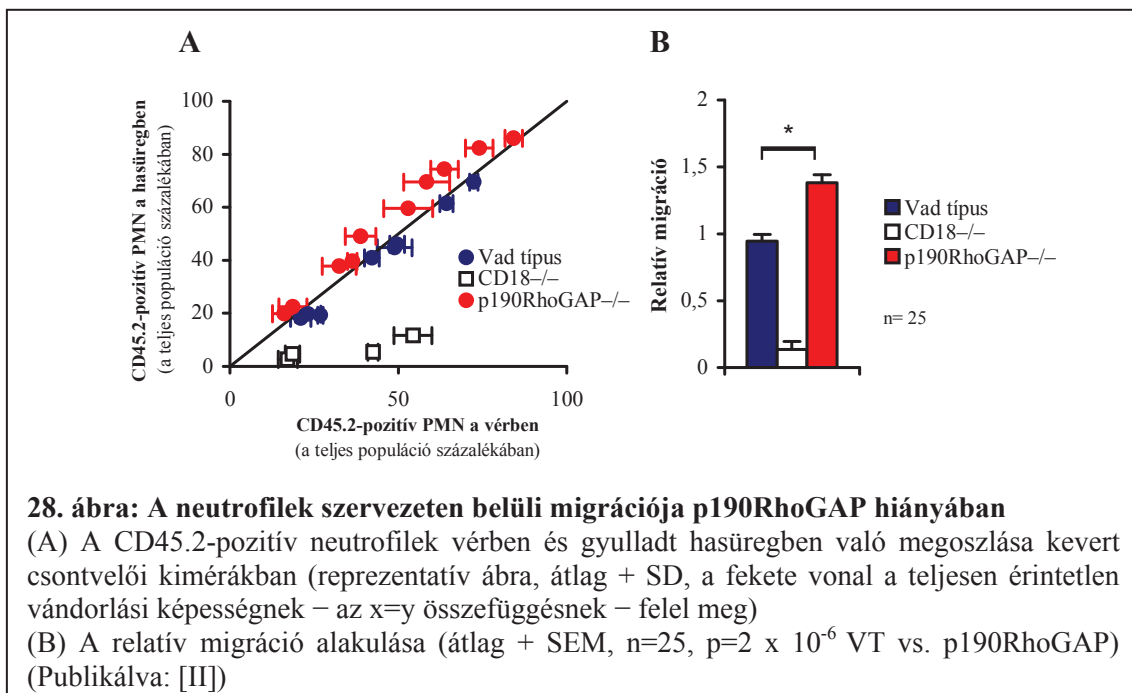
Mint a bevezetőben említettem, a Rho kis G-fehérje család tagjai fontos szerepet töltenek be bizonyos sejtek (pl. fibroblasztok) integrin-mediált migrációjában, ahol a p190RhoGAP, mint jelentős szabályozó fehérje jelenik meg [110]. A sejtváándorlás vizsgálatára *in vitro* és *in vivo* megközelítést is alkalmaztunk.

A **Transwell migrációs assay** során a neutrofil granulocitákat mindkét oldalán fibrinogénnel fedett 3  $\mu\text{m}$ -es pórusmérettel rendelkező membránnal borított inzertekbe helyeztük, majd az inzerteket egy fMLP-t vagy MIP-2-t (más néven CXCL2-t, a humán IL-8 egyik egér megfelelőjét) tartalmazó furatba helyeztük. Míg a CD18-hiányos neutrofilek képtelennek mutatkoztak az inzertből való aktív távozásra, a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> sejtek esetében nem volt megfigyelhető csökkenés a vad típusú sejtekkel szemben, sőt a neutrofilek inkább egy kis mértékben fokozott migrációs tendenciát mutattak p190RhoGAP hiányában ( $p=0,09$ ;  $n=8$ )(**27. ábra**). Hasonló eredményeket kaptunk 100 ng/ml MIP-2 alkalmazása esetén is ( $n=4$ , nem mutatott eredmény).



Az ***in vivo* migráció** vizsgálatára az egy szervezetben CD45.1-et expresszáló vad típusú, valamint CD45.2-pozitív p190RhoGAP-hiányos neutrofileket egyaránt tartalmazó kevert csontvelői kimérákat használtunk. A steril hashártya-gyulladást tioglikolát segítségével váltottuk ki, majd megvizsgáltuk, hogy a különböző CD45-epitópot a felszínükön kifejező neutrofil granulociták a vérben található arányuknak megfelelően jelennek-e meg a gyulladt hasüregben. Bár a folyamat CD18-függését

témavezetőm már egy korábbi közleményében bemutatta [69], a p190RhoGAP-hiányos kevert csontvelői kimérákkal párhuzamosan CD18<sup>-/-</sup> (továbbá kontrollként CD45.2-pozitív (tehát C57BL/6 genetikai háttérű) vad típusú) neutrofileket tartalmazó kevert csontvelői kimérákon is elvégeztük a kísérleteket. A p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilek migrációja ebben a tioglikolát-indukált peritonitisz modellben sem mutatott csökkenést a vad típusú sejtekkel összevetve, sőt – a Transwell rendszer esetében megfigyeltékhez hasonlóan – a neutrofilek migrációja még kis mértékben fokozott is volt p190RhoGAP hiányában (ami esetleg adódhat a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilek csökkent letapadási/szétterülési képességéből; **28. ábra**).



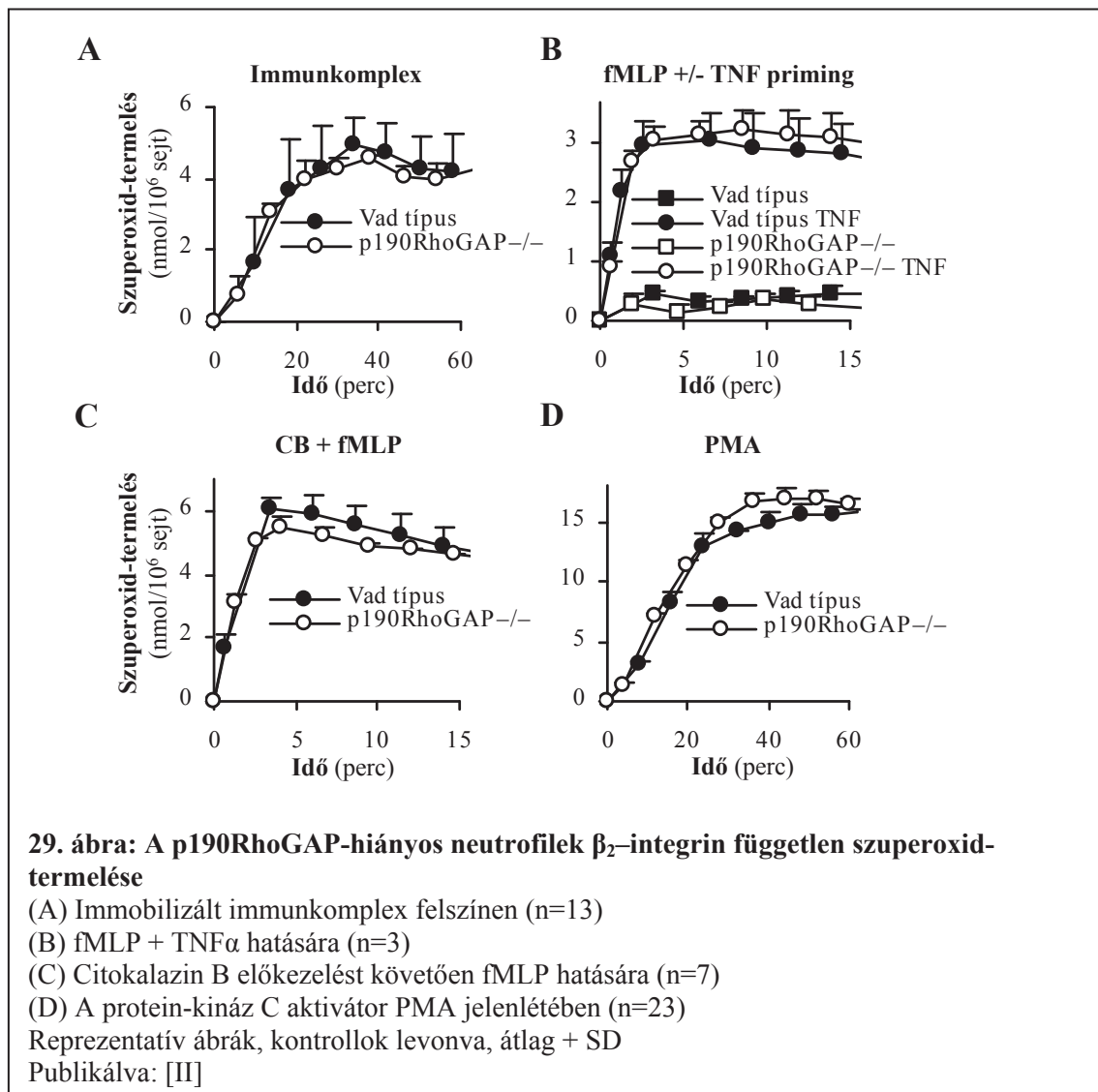
Kollaborátoraink – Barbara Walzog és munkatársai – megvizsgálták, hogy 10  $\mu$ M fMLP hatására hogyan alakul a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek vándorlása egy ugyancsak CD18-dependens folyamat során Zigmond-kamrában. Azt tapasztalták, hogy se a neutrofilek irányérzékelése, se az általuk megtett távolság, se a vándorlási sebesség nem változott p190RhoGAP hiányában videó-mikroszkóppal vizsgálva [II], ezzel is támogatva in vitro és in vivo migrációs eredményeinket.

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a p190RhoGAP a várakozásainkkal ellentétben nem elengedhetetlen egér neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin-függő vándorlásának szabályozásában.

### 6.1.8. A p190RhoGAP szerepe neutrofilek $\beta_2$ -integrin-független sejtválaszaiban

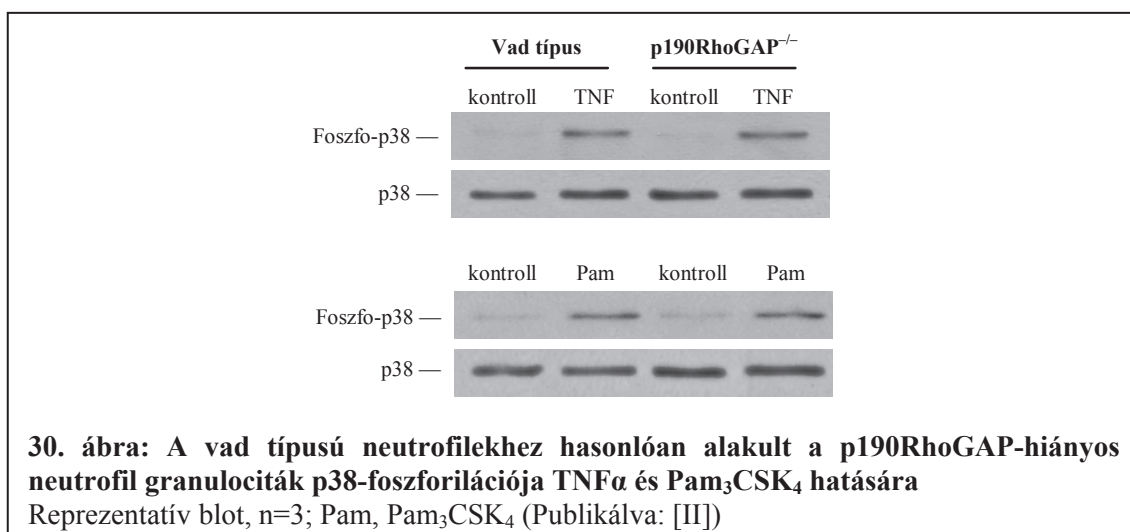
A következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy részt vesz-e a p190RhoGAP neutrofilek integrin-independens folyamataiban.

Az immobilizált immunkomplex-felszín Fc $\gamma$ -receptorokon keresztül a  $\beta_2$ -integrin-függő folyamatoknál nagyobb mértékű szuperoxid-termelést eredményez neutrofil granulociták esetében. Azt tapasztaltuk, hogy a p190RhoGAP hiánya nem befolyásolta a neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált szuperoxid-termelését a vad típusú sejtekéhez képest (29. ábra A része). A G-fehérje-kapcsolt receptorokon (G protein-coupled receptors, GPCR) keresztüli aktiváció nagyon fontos a neutrofil granulociták működésében: a migrációt irányító kemotaktikus hatású anyagok (pl. a bakteriális



tripeptid fMLP, a komplement-fragment C5a, a kemokin IL-8) receptorai mind hét transzmembrán régióval rendelkező receptorok (7-TM-receptorok). A 3  $\mu$ M fMLP kiváltotta szuperoxid-termelés (nem-adherens körülmények között) nem mutatott különbséget a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek között (29. ábra B része). Mivel a szervezetben a neutrofilek rendszerint több gyulladáshoz vezető mediátor együttes hatásának vannak kitéve, mely alapvetően befolyásolja aktivációs szintjüket, megvizsgáltuk, hogy az ezt modellező előaktivációs (priming) kísérleteinkben hogyan alakul a szuperoxid-termelés p190RhoGAP<sup>-/-</sup> sejtekben. Neutrofiljeinket 25 percen keresztül 50 ng/ml TNF $\alpha$  jelenlétében magnéziummentes (tehát az integrin-függő letapadást kizáró) környezetben előaktiváltuk, majd két mosási lépést követően a neutrofileket fMLP segítségével stimuláltuk. A p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilek a vad típusúval megegyező mértékben voltak képesek szuperoxid-termelésre (29. ábra B része). Hasonló eredményre vezetett az aktin-citoszkeleton struktúráját/ működését megzavaró citokalazin B-vel (CB-vel) való előinkubációt követő fMLP aktiváció is (29. ábra C része). A protein-kináz C alloszterikus aktivátor forbol-mirisztol acetát (PMA) által kiváltott sejtválasz sem mutatott lényegi eltérést p190RhoGAP hiányában (29. ábra D része).

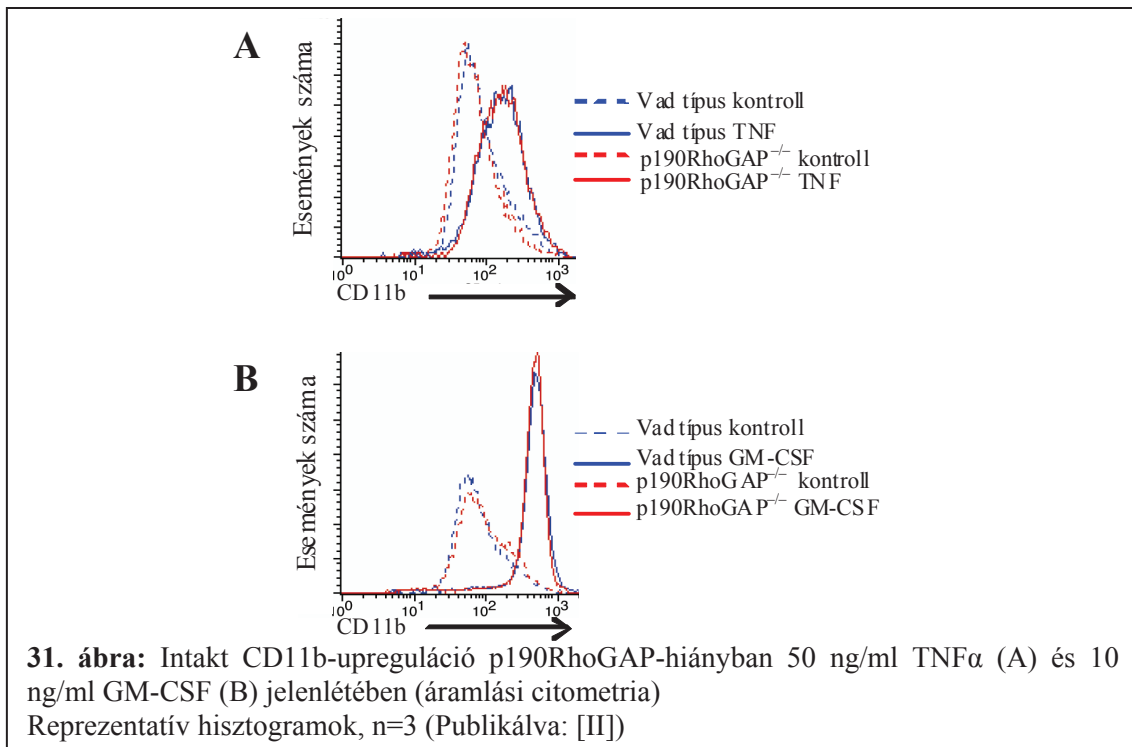
A neutrofilek működésében fontos szerepet tölt be a p38 MAP-kináz [199], melynek bizonyos típusú foszforilálódása a molekula aktivációjának fontos jelzője. Magnéziummentes szuszpenziós méréseink során a neutrofil granulocitákat TNF $\alpha$ , illetve a Toll-like receptor 2 agonista Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> segítségével aktiváltuk, majd a sejtek feltárását követően Western-blot révén vizsgáltuk a p38 MAP-kináz foszforilációját. A





p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofilekben nem tapasztaltunk lényeges különbséget a vad típusú sejtekkel összevetve sem a TNF $\alpha$ , sem a Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> hatására bekövetkező aktivációjelző p38 MAP-kináz foszforilációban (**30. ábra**).

A gyulladás helyszínére igyekvő neutrofilek érpálya-elhagyásában és szöveti aktivációjában lényeges mozzanat a sejtek felszínén található receptorok (pl. fMLP-receptor) és integrinek mennyiségének megnövekedése, upregulációja. A  $\beta_2$ -integrin Mac-1 (pontosabban a  $\beta$ -lánc, a CD11b) gyulladásos citokinek (kísérleteinkben a TNF $\alpha$  és a GM-CSF) hatására bekövetkező sejt felszíni upregulációjában nem volt különbség a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek között áramlási citometriás mérésünk során (**31. ábra**).



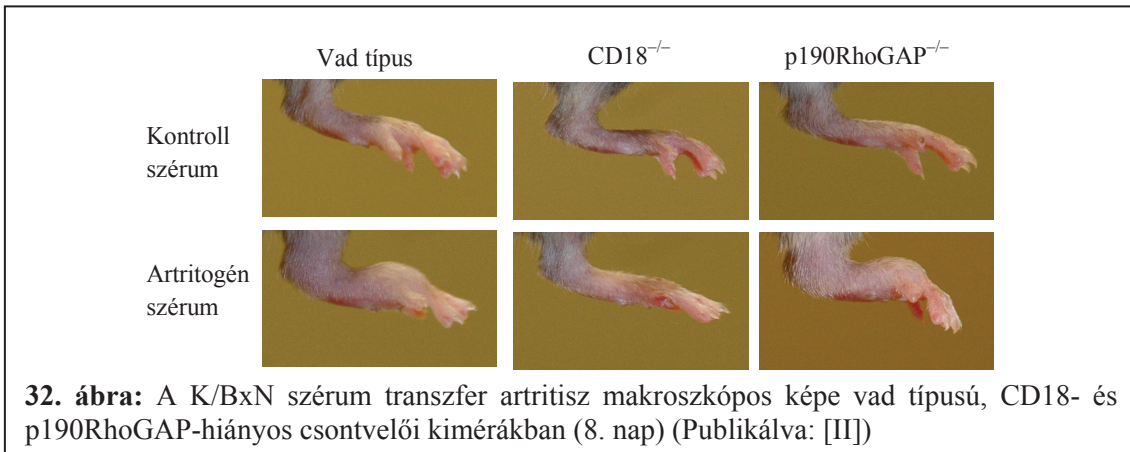
A p190RhoGAP tehát nem mutatkozott fontos szereplőnek a neutrofil granulociták ebben az alfejezetben bemutatott  $\beta_2$ -integrin-független folyamataiban.

### 6.1.9. Szükséges-e a p190RhoGAP a neutrofil- és CD18-függő K/BxN szérumszintézishez?

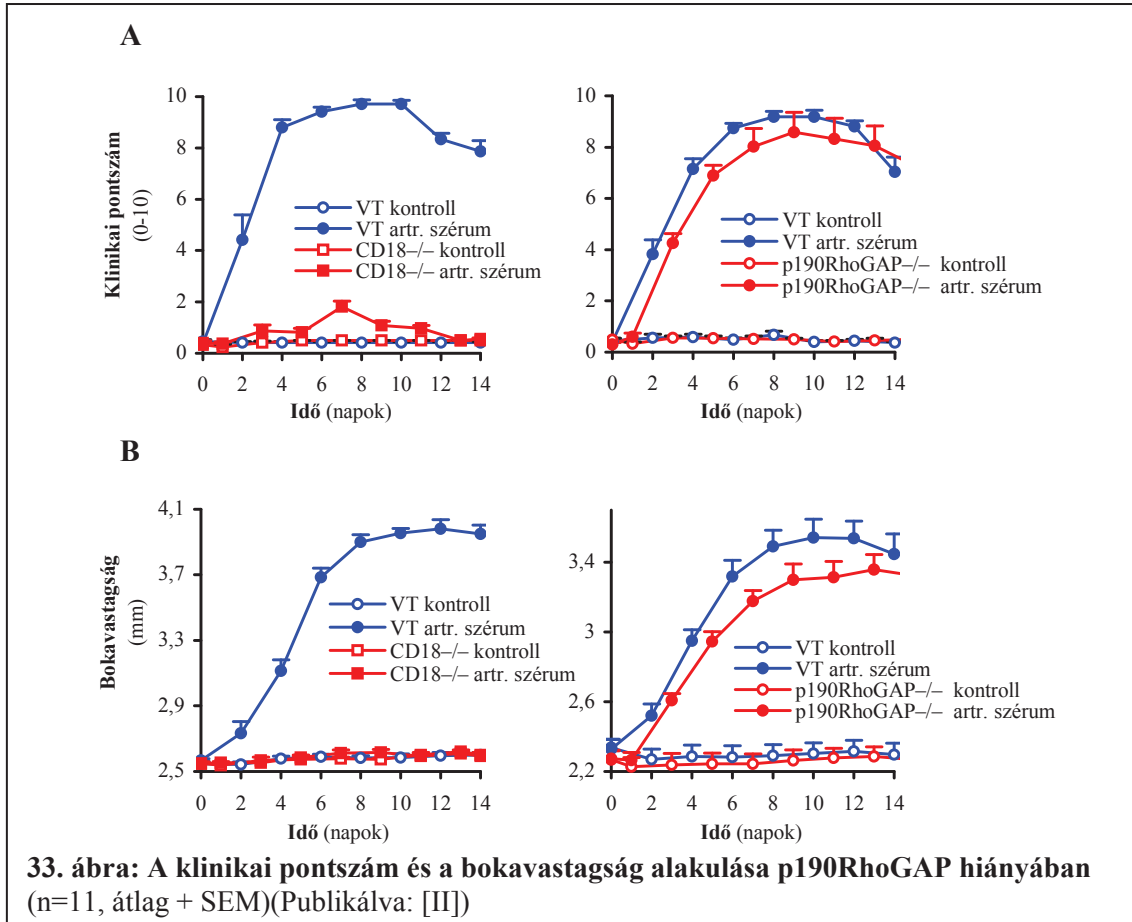
A neutrofil granulociták nem csupán a kórokozók elleni védelemben fontosak: nem megfelelő helyen és időben történő aktivációjuk autoimmun szövetkárosítást eredményezhet. A humán autoimmun ízületi gyulladások egérben többféle módon

modellezhetőek. A patomechanizmust tekintetében az emberi megbetegedéshez az egyik leghasonlóbb a K/BxN artritisz [152]. A K/BxN ízületi gyulladás a beteg egerek szérumával egészségesekre átvihető és az effektor fázis az immunizációs stádiumtól elkülönítve vizsgálható [154]. Mint a bevezetőben említettem, a K/BxN szérum transzfer artitisz kialakulásában és a gyulladás fenntartásában lényeges szereplők a neutrofil granulociták [159].

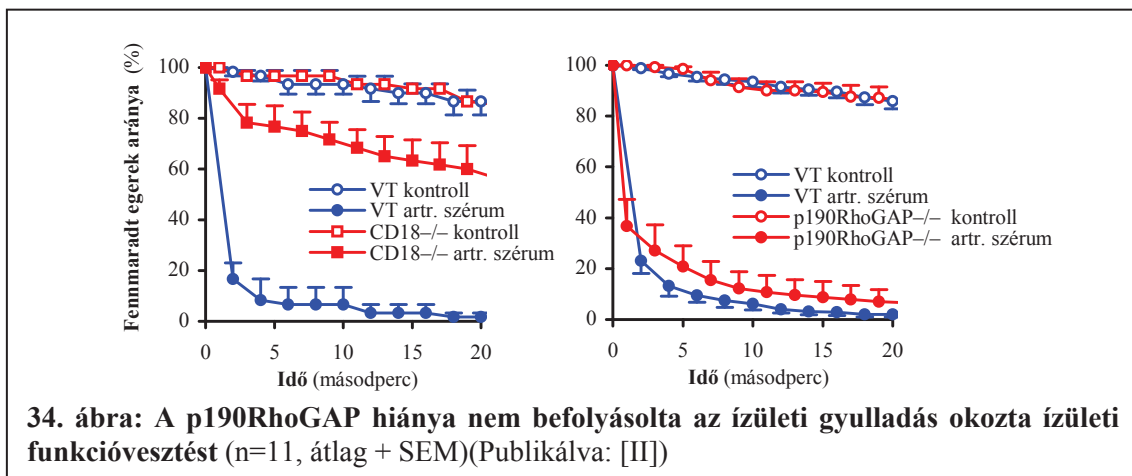
A K/BxN szérum transzfer artritiszes kísérleteink során kontroll és artritogén szérumot adtunk vad típusú és p190RhoGAP-hiányos csontvelői kiméráknak. Az artritogén szérummal kezelt vad típusú egyedekben jól megfigyelhető gyulladás alakult ki, mely a CD18-hiányos egerekben nem jött létre (**32. ábra**)(összhangban az irodalmi adatokkal [171]). Az artritogén szérummal kezelt p190RhoGAP<sup>-/-</sup> kimérákban a vad típuséhoz hasonló mértékű makroszkópos ízületi gyulladás jött létre (**32. ábra**).



Ezt a megfigyelést támasztotta alá a gyulladás kardinális jelein alapuló klinikai pontszám alakulása is: míg a CD18 hiánya gyakorlatilag teljes védeltséget biztosított a gyulladással szemben, addig a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> kimérák fenotípusa a vad típusú egyedekétől elkülöníthetetlen volt (n=11, p>0,05 /vad típus artr. versus p190RhoGAP<sup>-/-</sup> artr.)/(**33. ábra** A része). A bokavastagság változása hasonló tendenciákat mutatott: a CD18<sup>-/-</sup> kimérák teljes védeltségével szemben a p190RhoGAP<sup>-/-</sup> kimérák maximális gyulladást mutattak (n=11, p>0,05 /vad típus artr. vs. p190RhoGAP<sup>-/-</sup> artr.)/(**33. ábra** B része).



Az autoantitest kiváltotta autoimmun ízületi gyulladás ízületi funkcióvesztést is eredményez. Ennek vizsgálatára egereinket egy, a számukra mindennapos tesztnek vetettük alá: rácsra helyeztük az állatokat és lassan megfordítottuk a rácsot. Az egészséges egyedek több percig is képesek voltak megkapaszkodni (sőt olykor még a megfigyelési idő alatt többször helyet is váltottak), a gyulladt lábú egerek azonban rövid időn belül leestek a rácsról. Míg az artritogén szérumot kapott CD18<sup>-/-</sup> kimérák jelentős



védettséget élveztek a vad típusú gyulladt lábú társaikhoz képest, az arthritiszes p190RhoGAP-hiányos kimérák a vad típusú egyedekkel egy időben estek le a rácsról (n=11, p>0,05 /vad típus artr. vs. p190RhoGAP<sup>-/-</sup> artr./)(**34. ábra**).

Ennek megfelelően megállapíthatjuk, hogy a p190RhoGAP hemopoetikus sejtekben megfigyelhető hiánya nem befolyásolta az általunk vizsgált autoimmun ízületi gyulladás kialakulását.

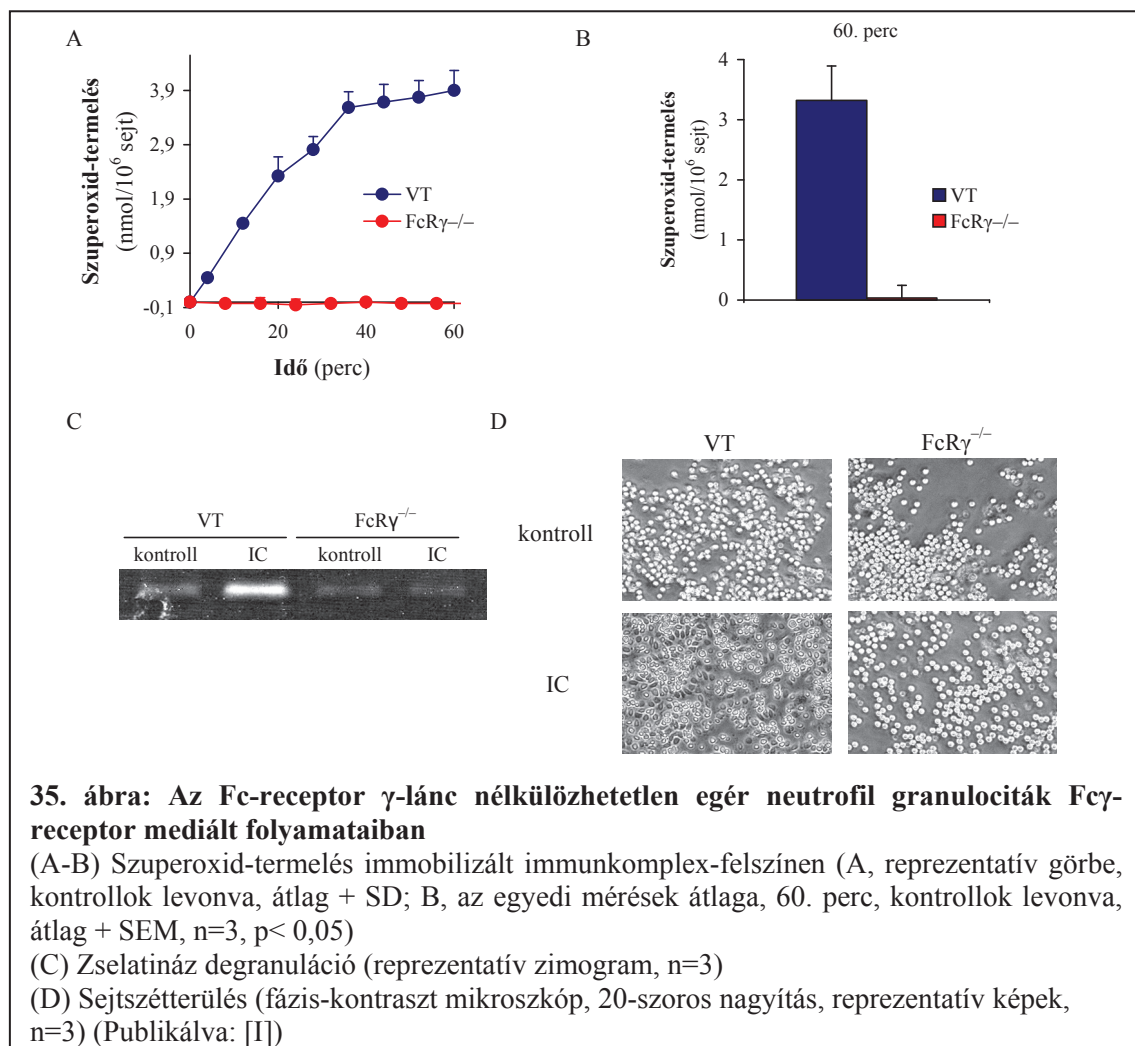
Összességében elmondhatjuk, hogy a p190RhoGAP nem bizonyult abszolút nélkülözhetetlennek neutrofil granulocitákban az általunk vizsgált  $\beta_2$ -integrin-függő és -független in vitro sejtválaszok során, valamint az in vivo ízületi gyulladás kialakulásában.

## 6.2. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc és ITAM-tirozinjainak szerepe neutrofil granulociták működésében és autoimmun ízületi gyulladásban

### 6.2.1. Az FcR $\gamma$ -lánc szerepe neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált folyamataiban

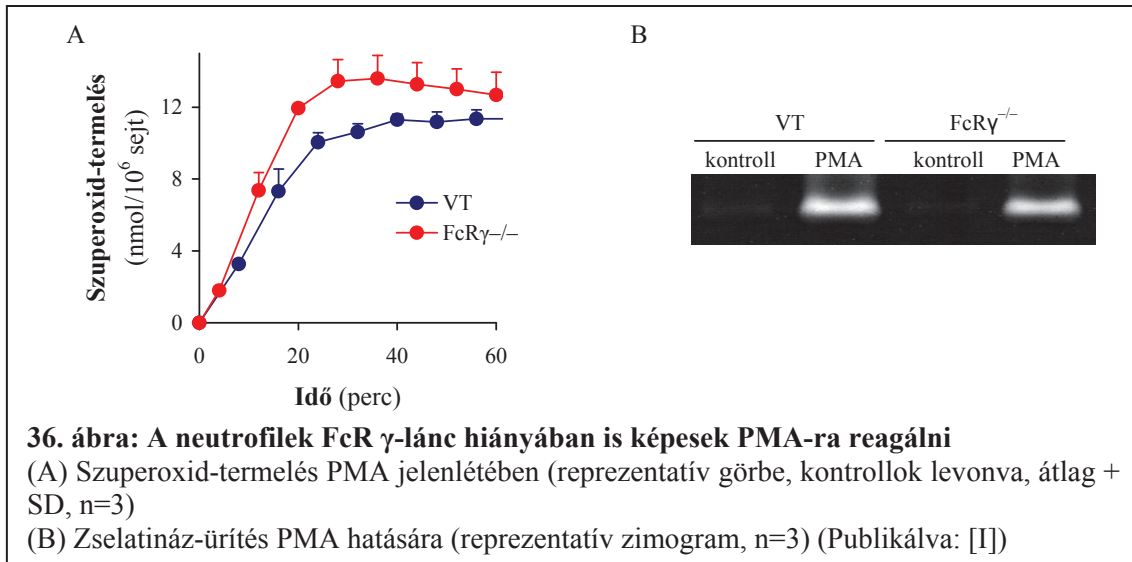
Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc szerepét neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált folyamataiban FcR $\gamma^{-/-}$  egerek felhasználásával vizsgáltuk. Az FcR $\gamma$ -hiányos neutrofilek ebben az alfejezetben tárgyalt karakterizálását Jakus Zoltán kollégámmal közösen vizsgáltuk és publikáltuk [1]. Az itt bemutatott eredmények azonban saját méréseimből származnak.

Immobilizált immunkomplex-felszínen a vad típusú egér neutrofilekkel szemben az FcR $\gamma$ -hiányos sejtek képtelenek voltak szuperoxid-termelésre (35. ábra A-B része). Hasonlóképpen elmaradt a neutrofil granulociták zselatináz-degranulációja az Fc $\gamma$ -receptorok stimulációja esetén (35. ábra C része). Immunkomplex-felszínen az FcR $\gamma$  kritikus szereplőnek bizonyult a sejtek szétterüléséhez is: hiányában a vad típussal



ellentétben nem jelentek meg a jellegzetes poligonális sejtek a fáziskontraszt mikroszkóp lencséje alatt (35. ábra D része).

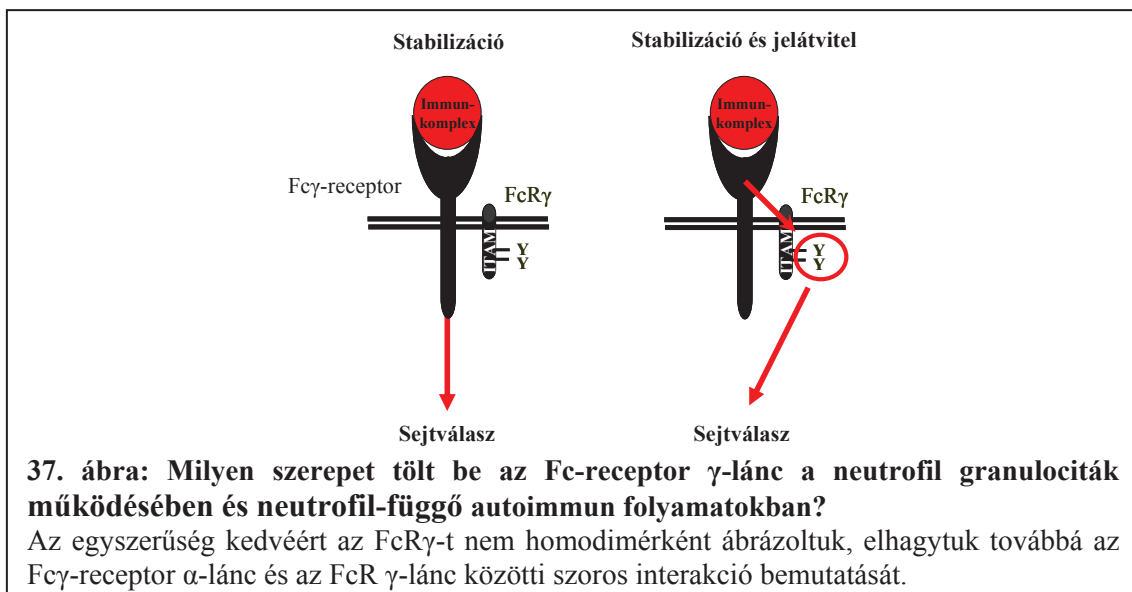
Ugyanakkor a protein-kináz C aktivátor PMA jelenlétében az FcR  $\gamma$ -lánc-hiányos neutrofilek a vad típusú sejtekkel azonos mértékben termeltek szuperoxidot és adták le a zselatinázt (36. ábra).



Összefoglalásként elmondható, hogy az FcR $\gamma$  esszenciális neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor-mediált sejtválaszaihoz.

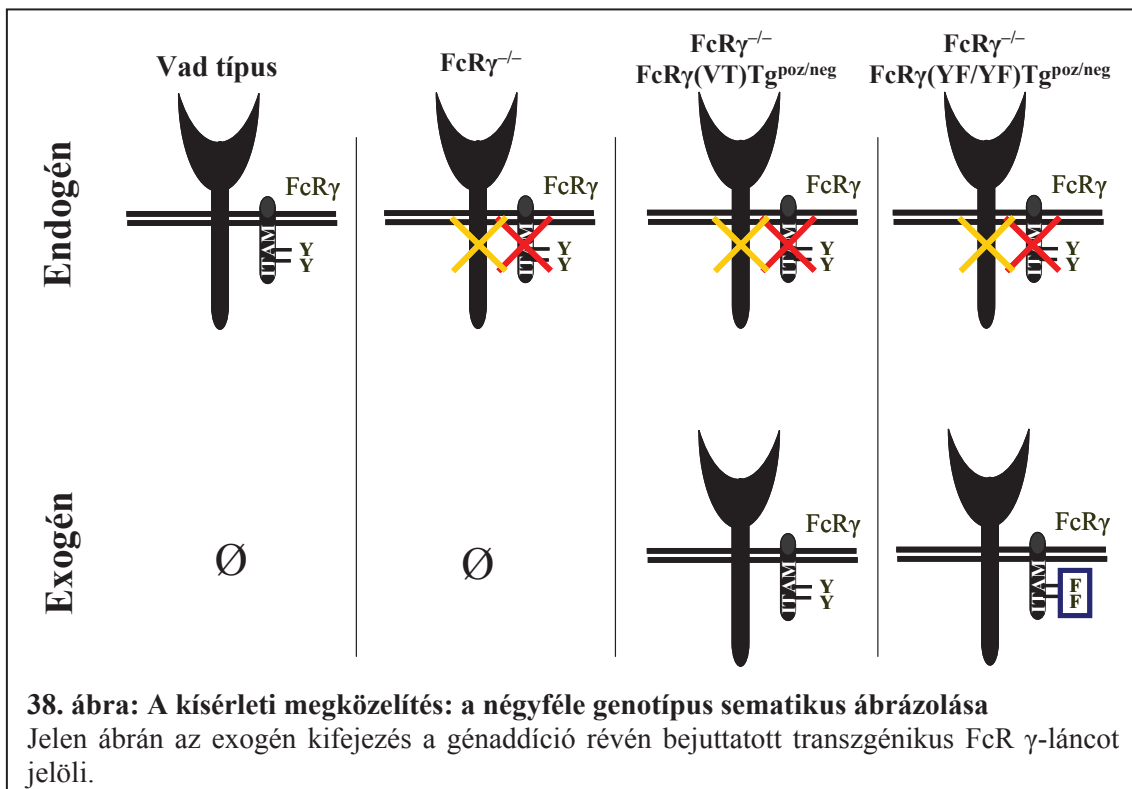
### 6.2.2. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok szerepének vizsgálati megközelítése

Mint azt az előző fejezetben bemutattam az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc hiányában



elmaradnak a neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált sejtválaszai. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy az FcR $\gamma$  hiányában valamennyi aktiváló Fc $\gamma$ -receptor hiányzik az egér neutrofilek felszínéről. Arra a kérdésre, hogy vajon az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc milyen további szerepet tölt be az Fc $\gamma$ -receptorok működésében a receptorok sejtfelszíni expressziójának biztosításán túl, a segédlánc intracelluláris (65-ös, illetve 76-os pozíciójú) ITAM-tirozinjainak fenilalaninra cserélt változatával kerestük a választ struktúra-funkció analízis révén (37. ábra).

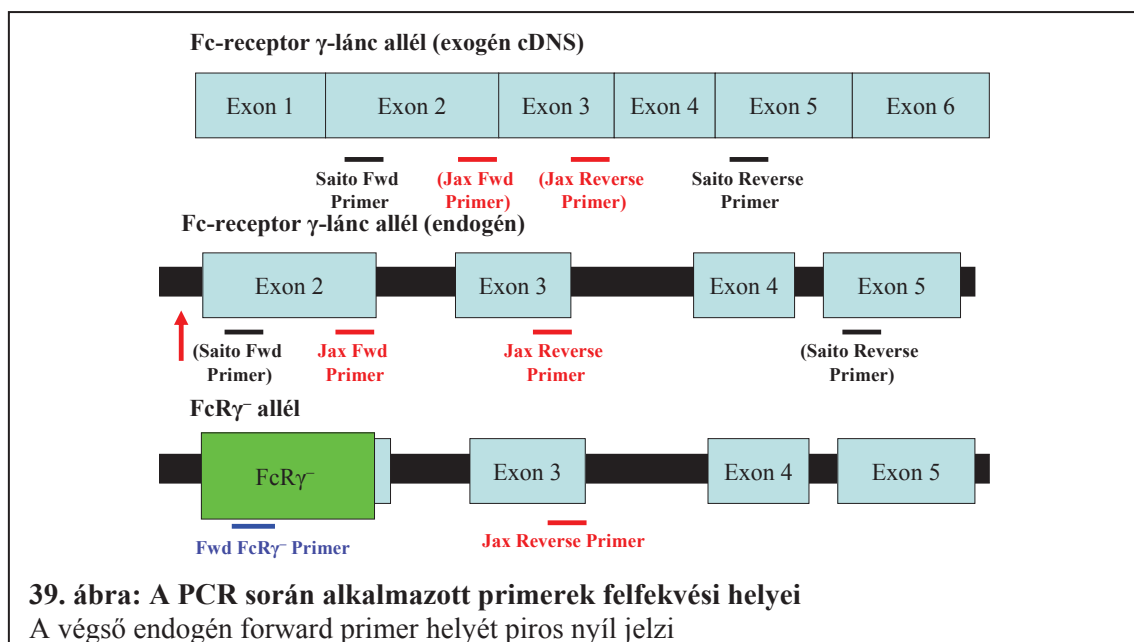
A 86 aminosavból álló Fc-receptor  $\gamma$ -lánc intracelluláris szakaszán ITAM-motívumot tartalmaz. Ezen szakaszon belül egymástól tíz aminosavval elválasztva (a 65-ös és a 76-os pozícióban) két foszforilálható tirozin található. A két ITAM-tirozin szerepének pontos tisztázásához egy, a mindkét tirozin helyett funkcionálisan semleges fenilalanint tartalmazó Fc-receptor  $\gamma$ -lánc mutánszt használtunk (Y65F/Y76F forma) [192]. A mutáns fehérjét kódoló, klasszikus génaddíciós technikával létrehozott, egér MHC-I promóterrel (H2-K<sup>d</sup>) meghajtott transzgén Fc-receptor  $\gamma$ -lánc-hiányos háttérre juttattuk (az egyedeket a továbbiakban az FcR $\gamma^{-/-}$  FcR $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/neg</sup> elnevezéssel jelölöm). Kontrollként módosítatlan exogén Fc-receptor  $\gamma$ -lánc gént transzgénként FcR $\gamma$ -hiányos háttéren tartalmazó egereket használtunk (a továbbiakban FcR $\gamma^{-/-}$  FcR $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz/neg</sup>). Méréseink során az alapvonalak felvétele végett a két exogén FcR $\gamma$ -



t tartalmazó törzs mellett vad típusú (genetikai módosításoktól mentes) és Fc-receptor  $\gamma$ -lánc hiányos egyedeket (a továbbiakban  $\text{FcR}\gamma^{-/-}$ ) is vizsgáltunk (**38. ábra**).

### 6.2.3. A projekthez használt egerek fenntartása és genotipizálása

Az  $\text{FcR}\gamma(\text{VT})\text{Tg}^{\text{poz/neg}}$  és  $\text{FcR}\gamma(\text{YF/YF})\text{Tg}^{\text{poz/neg}}$  embriók fagyasztott formában kerültek hozzánk Takashi Saito laborjából. Itthon történt a recipiens vemhes nőtényekbe való ültetésük és felszaporításuk. Ezeket követően az utódokat Fc-receptor  $\gamma$ -lánc-hiányos egerekkel kereszteztük. Tenyésztési stratégiánk során az  $\text{FcR}\gamma$ -lánc-hiányos háttéren való tartás mellett kezdetben a transzgén hemizigótaság fenntartása volt lényeges szempont. Az egyes genotípusok azonosításához allélspecifikus PCR technikát használtunk. Az első lépések során három primerpárt használtunk: az egyiket az endogén  $\text{FcR}\gamma$  (Jax primer), a másikat az exogén  $\text{FcR}\gamma$  (Saito primer), a harmadikat az  $\text{FcR}\gamma^{-/-}$  allél kimutatására (ez utóbbi esetben a primerpár második tagja a Jax reverz primer volt) (**39. ábra**).

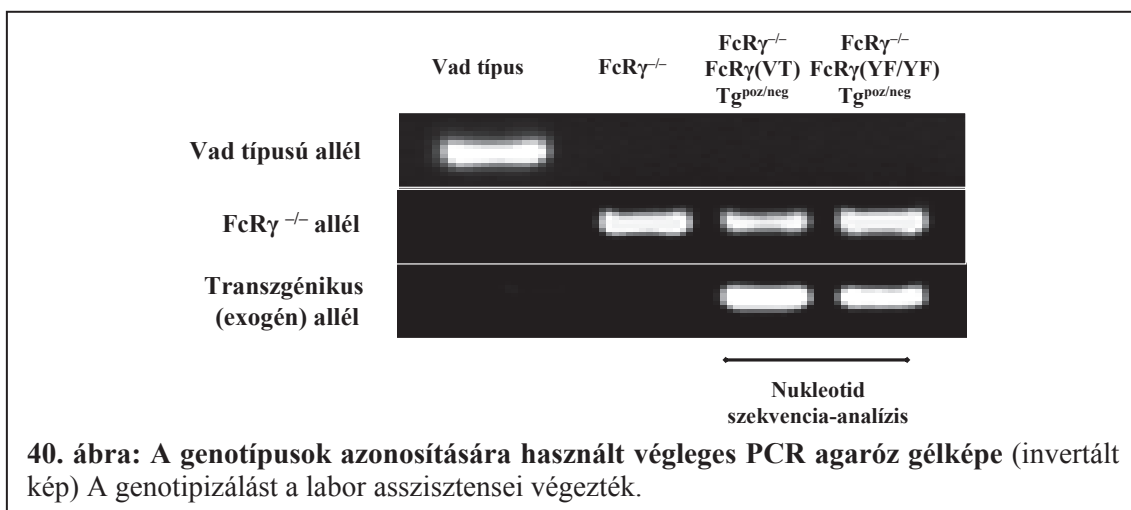


Gyorsan kiderült azonban, hogy az exogén és endogén  $\text{FcR}\gamma$  allélok primer-felismerése interferált: az intronok nélküli transzgénikus  $\text{FcR}\gamma$  szekvenciák túlzott közelsége miatt a vad típusú  $\text{FcR}\gamma$  primerek jobb hatékonysággal erősítették fel az exogén, mint az endogén  $\text{FcR}\gamma$  allélt. Ennek megfelelően az  $\text{FcR}\gamma$  transzgén-pozitivitás a vad típusú allélok látszólagos hiányával korrelált. A PCR tökéletesítéséhez az endogén vad típusú  $\text{FcR}\gamma$  allélt felismerő forward primert terveztünk 5' irányba az 2-es



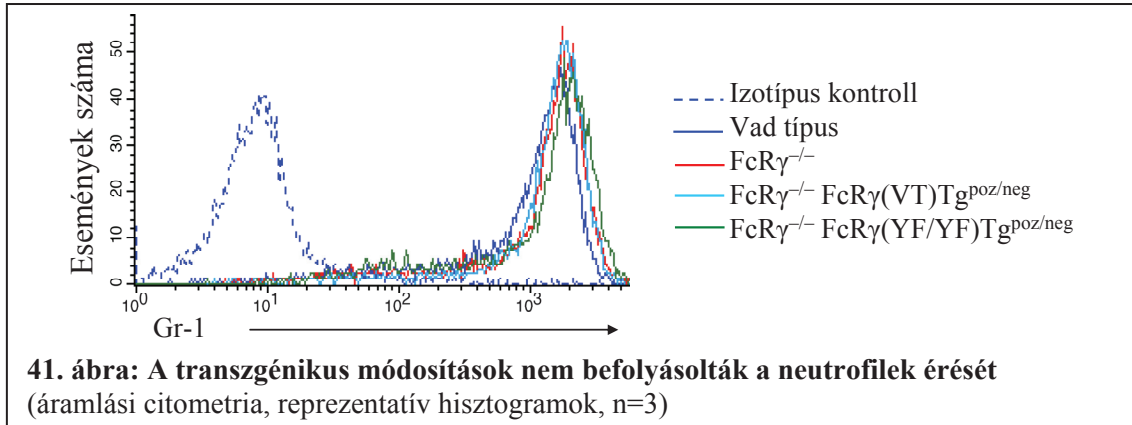
exont megelőző intronba. Erre azért volt szükség, mivel az  $FcR\gamma^{-/-}$  mutáció elkészítése során a 2-es exon 5' végén történt az inzerció, a 2-es exon 3' végének érintetlenségével [34], ennek megfelelően az endogén forward primer 3' irányú újratervezése azt eredményezhette volna, hogy az endogén  $FcR\gamma$  PCR során felerősödik a knockout allél is. Az intronba tervezett vad típusú primerekkel a vad típusú és az  $FcR\gamma^{-}$  allélok között méret alapján különbséget tudtunk tenni, a csak exonokból álló exogén  $FcR\gamma$  allél zavaró hatása nélkül.

A végső genotipizálási protokoll során három reakciót használtunk az egerek allél-hordozásának azonosítására: az exogén  $FcR\gamma$ , az endogén  $FcR\gamma$  és a  $FcR\gamma^{-/-}$  primerek segítségével (40. ábra). Az  $FcR\gamma^{-/-}$   $FcR\gamma(VT)Tg^{poz/neg}$  és az  $FcR\gamma^{-/-}$   $FcR\gamma(YF/YF)Tg^{poz/neg}$  egyedek további elkülönítéséhez nukleotid szekvencia-analízist végeztünk (a Eurofins MWG Operon cég segítségével) és azt találtuk, hogy a vad típusú  $FcR$   $\gamma$ -lánc esetében egymástól 30 nukleotid távolságra elhelyezkedő tirozin-pozíciók (TAC) a mutáns allélok esetében fenilalanint kódoló tripletre cserélődtek (TTC).

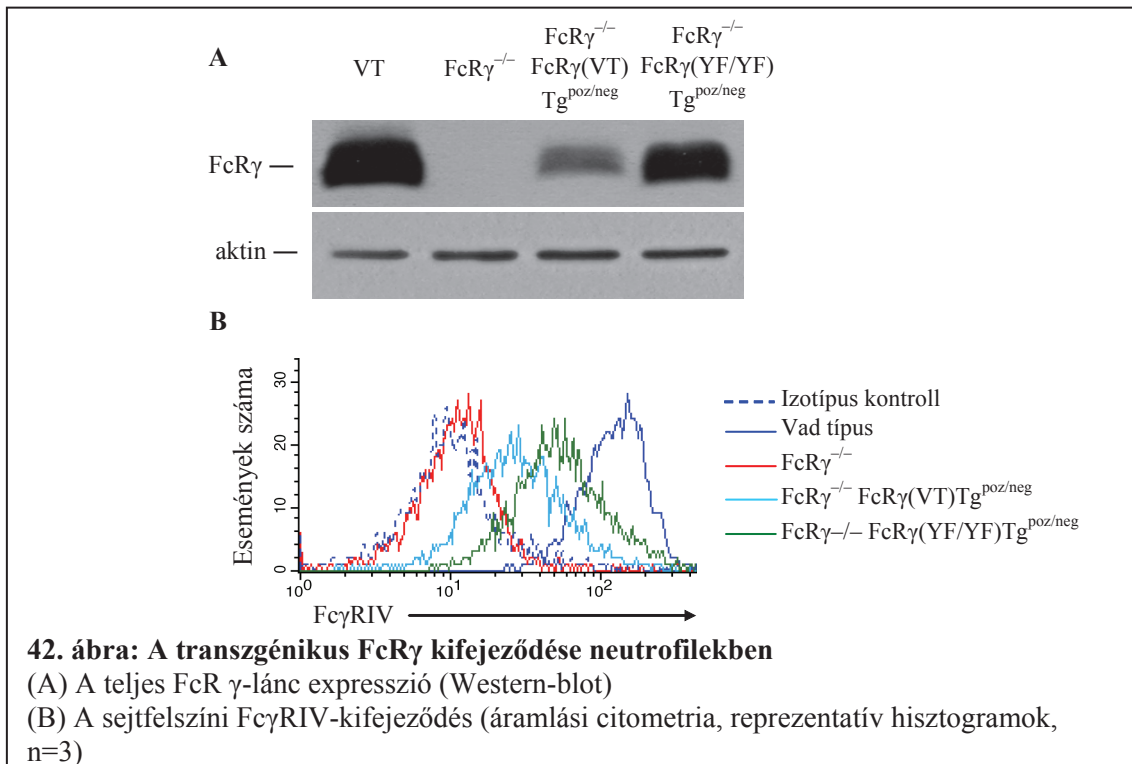


#### 6.2.4. Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc tirozinmutáns neutrofilek jellemzése

Első lépésként arra voltunk kíváncsiak, hogy a fent említett transzgénikus változtatások befolyásolták-e a neutrofil granulociták érését. Vad típusú,  $FcR\gamma$ -hiányos, valamint  $FcR\gamma$ -hiányos háttéren egy allélnyi vad típusú vagy ITAM-tirozinmutáns  $FcR\gamma$ -t tartalmazó egerek csontvelőjéből Percoll-gradienszen neutrofileket izoláltunk. Ezt követően a sejteket az Ly-6G és Ly-6C érési markereket egyaránt felismerő anti-Gr-1 antitesttel jelöltük. Áramlási citometriás méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a genetikai módosítások nem befolyásolták a sejtek végső fejlődését, érését (41. ábra).



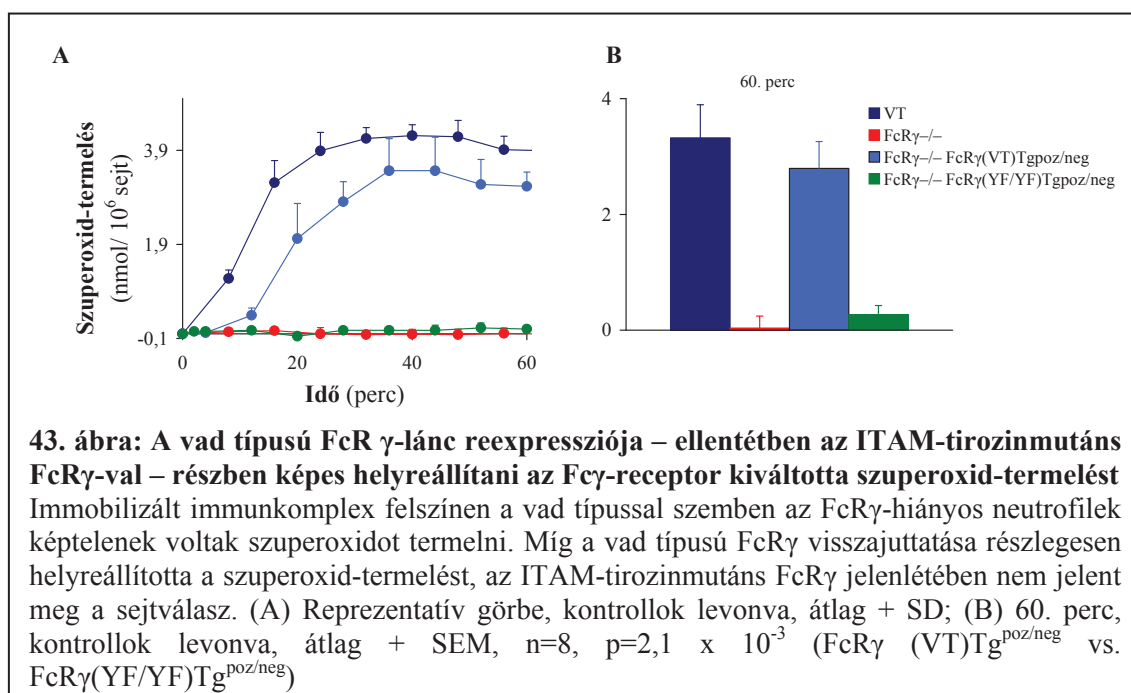
A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a transzgénikus FcR  $\gamma$ -lánc FcR $\gamma$ -hiányos háttére való visszajuttatása helyre tudta-e állítani az FcR $\gamma$ -expressziót. Western-blot segítségével jól látható volt, hogy az FcR $\gamma$ -hiányos egér neutrofilekben nem fejeződött ki a segédlánc, ugyanakkor az FcR $\gamma^{-/-}$  háttérre visszajuttatott vad típusú, valamint az ITAM-tirozinmutáns FcR $\gamma$ -t kifejező neutrofilekben újból megjelent a fehérje (**42. ábra** A része). Annak eldöntésére, hogy a vad típusú, illetve az ITAM-tirozinmutáns FcR $\gamma$  képes volt-e visszaállítani a neutrofilek sejt felszíni FcR $\gamma$ - expresszióját, ugyancsak áramlási citometriás mérést alkalmaztunk. Mivel az FcR $\gamma$  extracelluláris része kicsiny és nem immunogén, ellene gyakorlatilag nem lehet antitestet termeltetni. A segédláncot felismerő (a korábban bemutatott Western-blothoz is használt) antitest a molekula



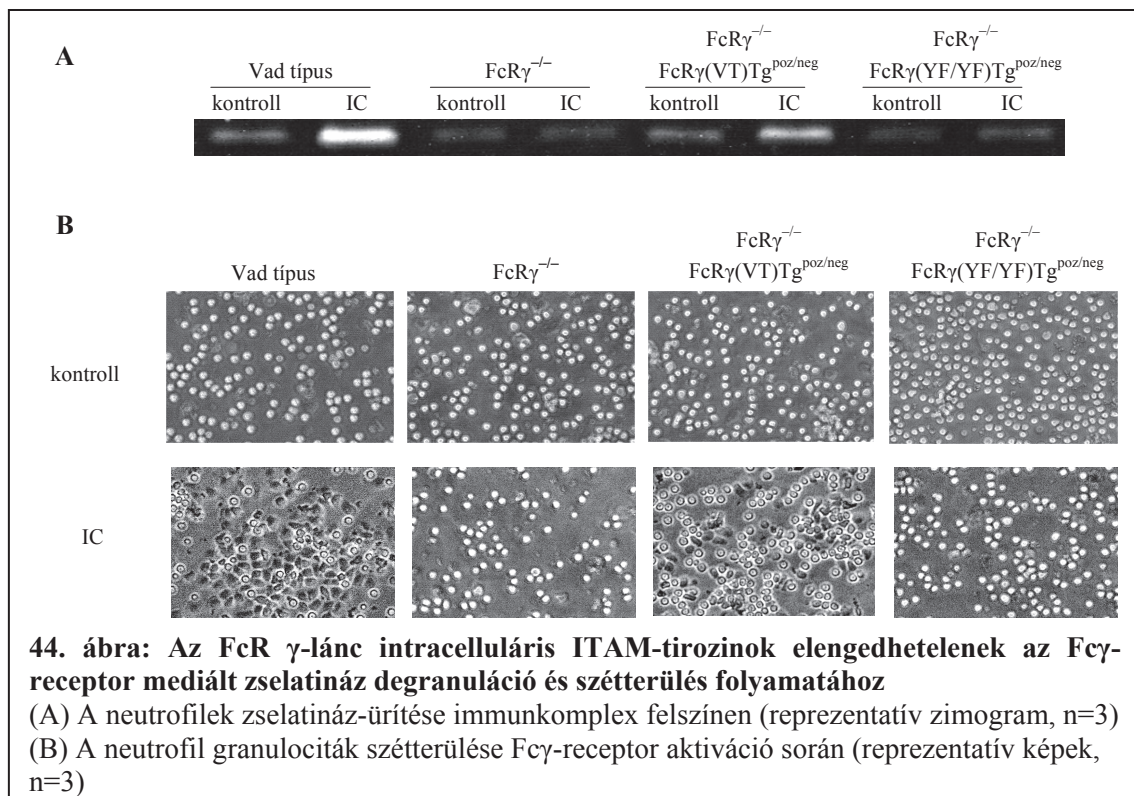
hosszabb intracelluláris régióját ismeri fel, tehát nem alkalmas áramlási citometriás vizsgálatra (nem permeabilizált sejteken). Ezért a sejtfelszíni FcR $\gamma$ -expresszió megítéléséhez az FcR $\gamma$ -asszociált Fc $\gamma$ -receptor IV külső szakaszát felismerő antitesttel jelöltük a neutrofileket (indirekt megközelítés). Azt tapasztaltuk, hogy míg az FcR  $\gamma$ -lánc-hiányos neutrofilek felszínén nem volt megtalálható az Fc $\gamma$ RIV, a vad típusú és az ITAM-tirozinmutáns mutáns FcR $\gamma$ -t FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> háttéren hordozók újból képesek voltak a receptor kifejezésére (42. ábra B része). A Western-blottal és az áramlási citometriával kapott expressziós adatok jól korreláltak.

### 6.2.5. Az FcR $\gamma$ ITAM-tirozinjainak szerepe neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor kiváltotta sejtválaszaiban

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy szükségesek-e az FcR $\gamma$  intracelluláris ITAM-tirozinjai neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor-mediált válaszaiban. A csontvelőből preparált neutrofileket immobilizált immunkomplex-felületre helyeztük és mértük a kiváltott sejtválaszokat. A szuperoxid-termelés vad típusú neutrofil granulociták esetében gyors emelkedést mutatott, Fc-receptor  $\gamma$ -lánc hiányában azonban a sejtválasz teljes mértékben elmaradt. Míg a vad típusú FcR $\gamma$  visszajuttatása helyreállította a szuperoxid-termelést, az ITAM-tirozinmutáns FcR $\gamma$  jelenlétében nem jelent meg a sejtválasz (43. ábra).



Az Fc $\gamma$ -receptorok stimulációja nem csupán szuperoxid-termelést, hanem egyéb sejtválaszokat is kivált. A tercier granulomok nagy mennyiségben tartalmaznak az extracelluláris mátrix lebontására szolgáló zselatinázt. Ezen enzim jelenlétének kimutatásához a neutrofilek stimulációját követően a sejtek felülűsóját olyan poliakrilamid gélen futtattuk meg, melybe előzetesen a szubsztrát zselatinat polimerizáltuk. A vad típusú, genetikai módosítástól mentes sejtek jelentős mennyiségű zselatin-leadása határozott jelet eredményezett a zselatináz zimogramon, mely folyamat egyértelműen Fc-receptor  $\gamma$ -lánc függőnek bizonyult. A vad típusú FcR  $\gamma$ -lánc reexpressziója részlegesen helyreállította a választ, az azonban elmaradt az intracelluláris tirozinok módosítása esetén (**44. ábra A része**). Hasonlóképpen alakult a



sejtek szétterülése is. Míg a vad típusú sejtek jelentős hányada szétterült az immunkomplex-felszínen, az FcR  $\gamma$ -lánc-hiányosak egyáltalán nem. A vad típusú FcR  $\gamma$ -lánc visszajuttatása esetén újból megjelentek a jellegzetes morfológiát mutató aktivált neutrofil granulociták, az FcR $\gamma$  ITAM-tirozinmutáns sejtek ellenben továbbra is kerekded formát mutattak (**44. ábra B része**).

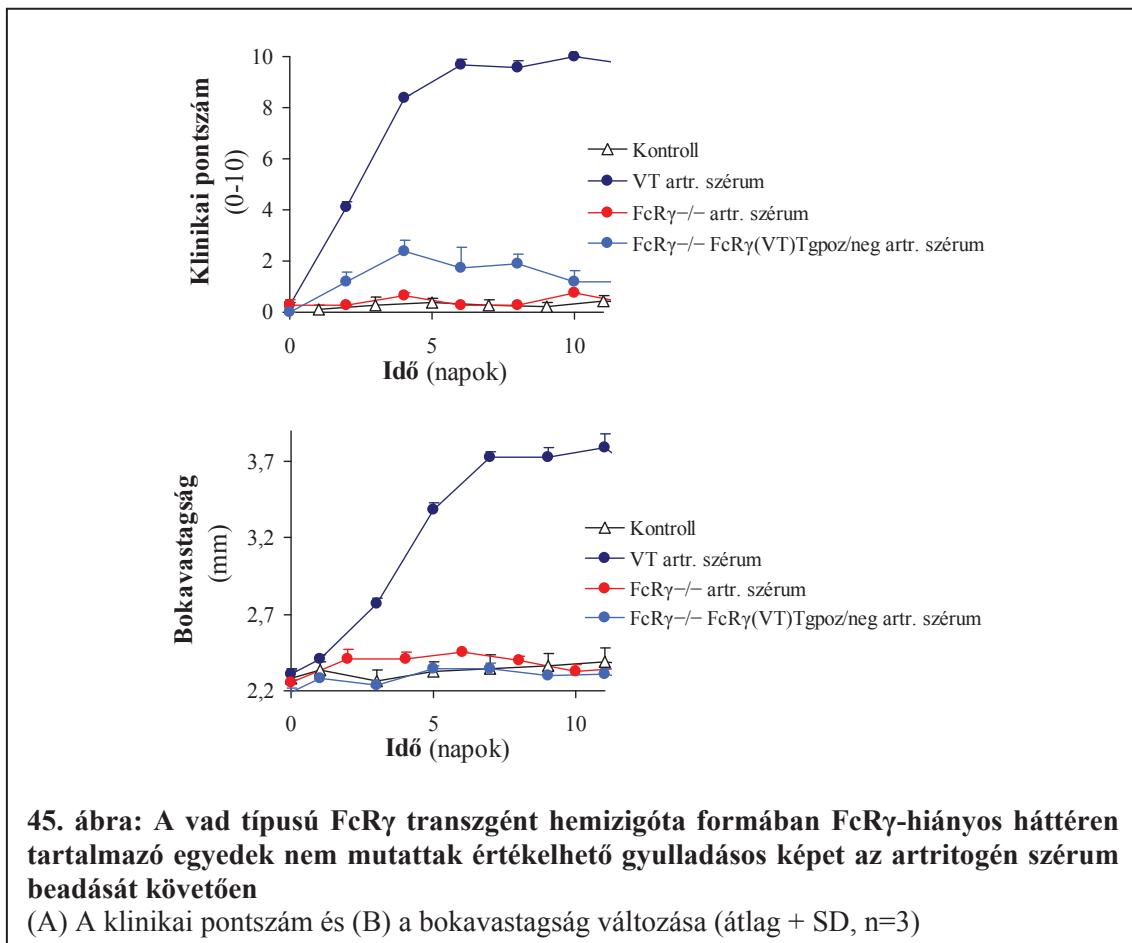
Fontos kiemelni, hogy mind a négy genotípus azonos mértékben volt képes szuperoxidot termelni és zselatinázt üríteni PMA jelenlétében (nem mutatott saját eredmények).

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a neutrofil granulociták általunk vizsgált Fc $\gamma$ -receptor mediált folyamatai során elengedhetetlenek az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc intracitoplazmatikus szakaszán található ITAM-tirozinok. Kiemelendő, hogy az általunk vizsgált folyamatokban az FcR $\gamma^{-/-}$  háttérre bejuttatott ITAM-tirozinmutáns FcR $\gamma$  az FcR $\gamma^{-/-}$  háttéren reexpresszált vad típusú FcR $\gamma$ -nál nagyobb mértékű expressziója ellenére sem volt képes helyreállítani a sejtválaszokat.

### 6.2.6. Az FcR $\gamma$ ITAM-tirozinok szerepe az autoimmun artritisz effektor fázisában

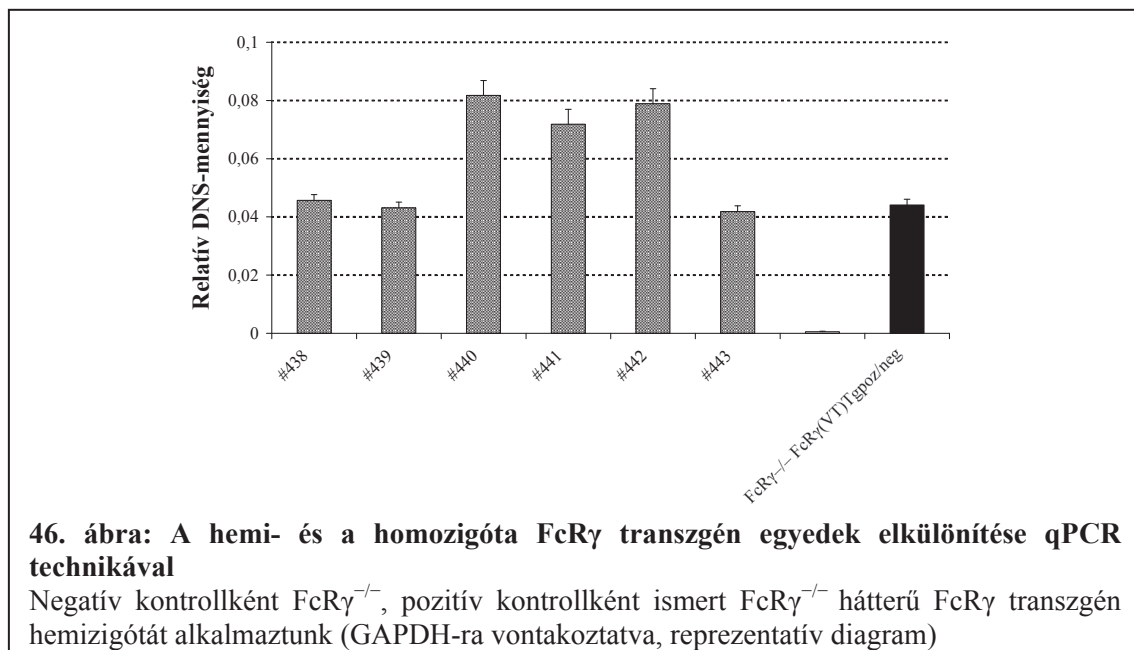
Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy szükséges-e az FcR  $\gamma$ -lánc két ITAM-tirozinja a K/BxN szérumsztransfer artritisz kialakulásához. Kísérleteinkben az egereknek intraperitoneálisan kontroll, valamint artritogén szérumot adtunk. Ezt követően a kialakult gyulladást a kardinális jegeken (pl. pirosság, duzzadság) alapuló klinikai pontszám, valamint a bokavastagság mérése alapján értékeltük.

Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a vad típusú FcR  $\gamma$ -lánc reexpressziója



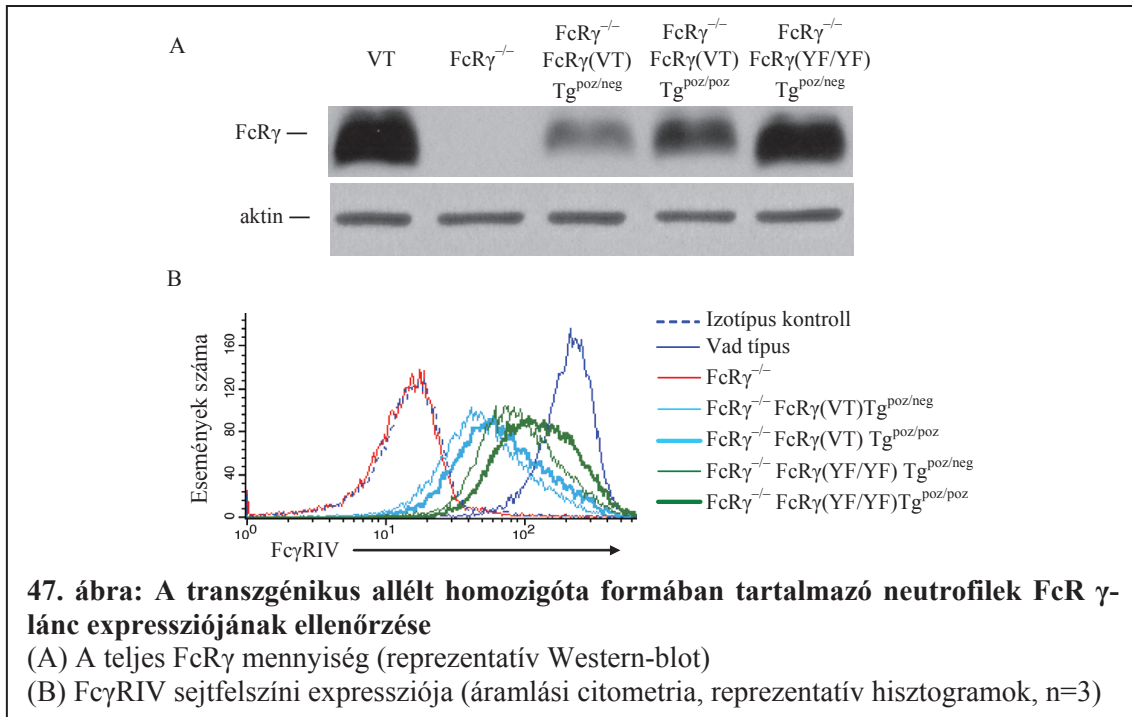
FcR $\gamma^{-/-}$  háttéren képes-e helyreállítani az ízületi gyulladást. Az artritogén szérummal kezelt vad típusú egyedekkel szemben az FcR $\gamma$ -hiányos állatok védettek voltak a betegséggel szemben (ld. korábbi irodalmi adatok, [50]). Ugyanakkor a vad típusú FcR  $\gamma$ -lánc reexpressziója csupán gyenge, alig értékelhető gyulladáscsökkentő fenotípust eredményezett az érzékeny klinikai pontszám esetében és nem okozott kimérhető bokavastagság-növekedést (**45. ábra**).

Az alacsony jel háttérben két ok állhatott: az alacsony K/BxN szérum dózis és/vagy az FcR  $\gamma$ -lánc elégtelen reexpressziója. A jel növelésére így két elméleti lehetőség mutatkozott: emelni a beadott artritogén szérum mennyiségét és/vagy növelni az FcR $\gamma$ (VT)Tg expresszióját transzgénre homozigóta egyedek révén. Mivel kísérleteink során már a maximális szérummennyiséget használtuk, számunkra a második lehetőség maradt. A transzgénikus FcR $\gamma$  allélt hemizigóta formában tartalmazó egerek pároztatásából származó egyedek azonosítására (mivel a hagyományos PCR nem tudott az expressziós szintek között különbséget tenni) kvantitatív PCR-t (qPCR-t) alkalmaztunk. Az egérfarokból izolált DNS-tartalmú oldatok koncentrációját Nanodrop készülék segítségével határoztuk meg, majd az oldatokat egységesen 80 ng/ml koncentrációra hígítottuk. Ezt követően végeztük el a SYBR Green-alapú qPCR-reakciót az exogén FcR $\gamma$ , valamint a háztartási gén gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) megfelelő primerpárjaival. Az **46. ábra** mutatja a hemizigóták és homozigóták elkülönülő relatív DNS-mennyiségét. (A qPCR pontosságát mutatta, hogy



homozigóta egyedek pároztatásával csak homozigóta utódokat kaptunk.)

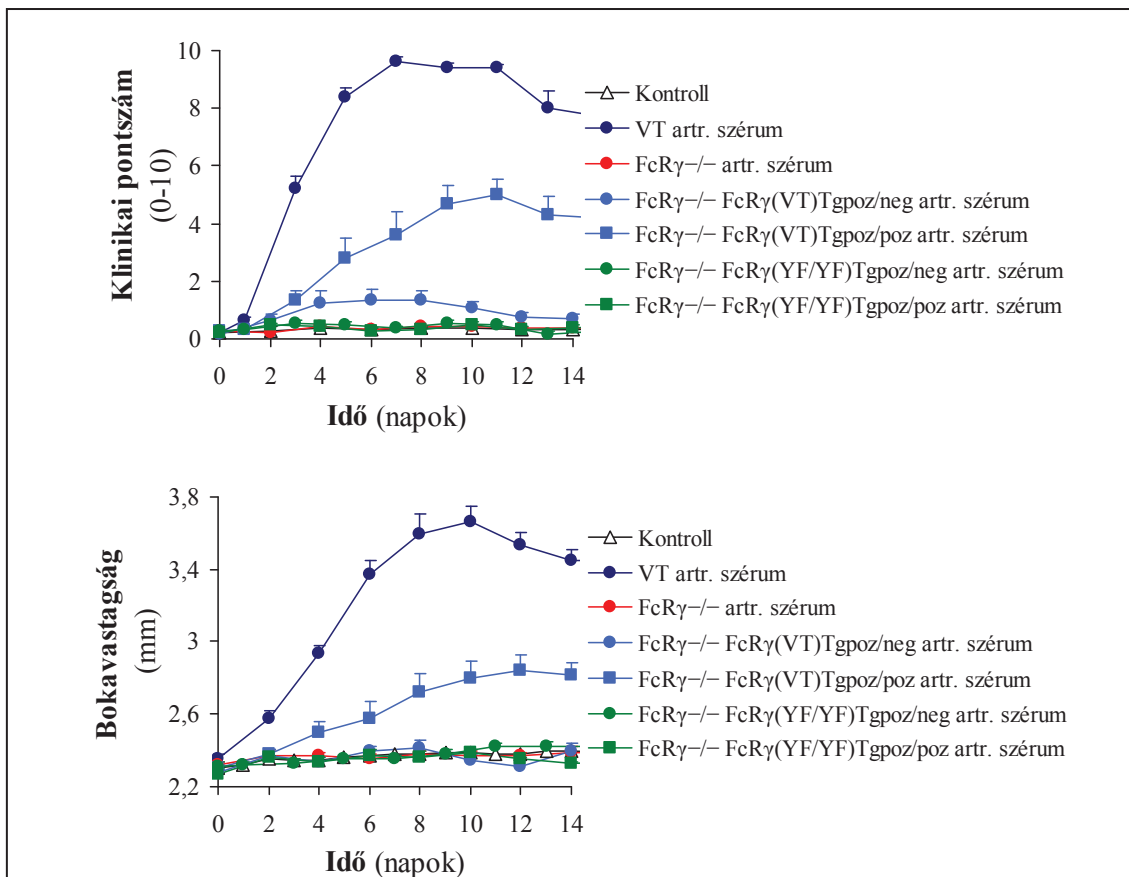
A kvantitatív PCR során nyert adatokat Western-blottal és áramlási citometriával ellenőriztük le. Mind a neutrofilek teljes FcR  $\gamma$ -lánc mennyiségében, mind a sejtek sejtfelszíni Fc $\gamma$ RIV-expressziójában jól nyomon követhető volt a homozigóták megnövekedett Fc $\gamma$ -mennyisége (**47. ábra**).



Ezt követően megvizsgáltuk, hogy miként viselkednek az Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup> Fc $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz/poz</sup> és az Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup> Fc $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/poz</sup> egerek az artritogén szérumbeadását követően. A homozigóta vad típusú Fc $\gamma$  transzgén Fc $\gamma$ -hiányos háttérben tartalmazó egerekben kialakult egy köztes erősségű ízületi gyulladás, mely már kimérhető volt. Ugyanakkor mind az Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup> Fc $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/neg</sup>, mind az Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup> Fc $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/poz</sup> állatok védettnek bizonyultak az ízületi gyulladással szemben (**48. ábra**).

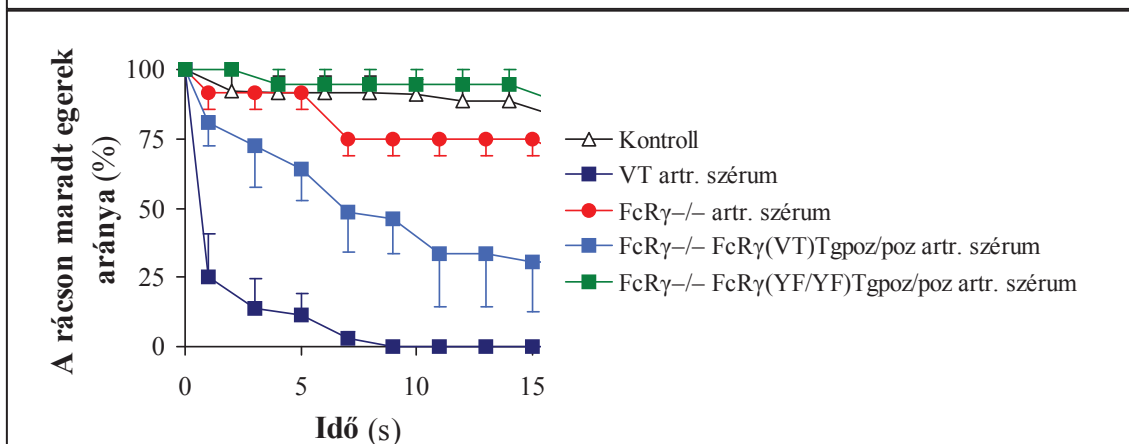
Az Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup> Fc $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz/poz</sup> egyedekben kialakult az ízületi diszfunkció, az ITAM-tirozinok hiánya azonban védettséget eredményezett, mutatva, hogy az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinjai esszenciálisak az autoimmun ízületi gyulladás effektor fázisában (**49. ábra**).

Összességében elmondhatjuk, hogy az Fc $\gamma$  intracelluláris ITAM-tirozinjai elengedhetelen szereplői a kísérletes autoimmun ízületi gyulladásnak.



**48. ábra: A vad típusú homozigóta FcR $\gamma$  transzgén egyedekben kialakult az autoimmun gyulladás**

Az artritogén szérum szignifikáns jelet okozott mind a klinikai pontszám, mind a bokavastagság tekintetében FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> FcR $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz/poz</sup> egyedekben. Mind a hemizigóta, mind a homozigóta ITAM-tirozinmutáns FcR $\gamma$  egyedek védettek voltak a gyulladással szemben (a csontvelői kimérák is!). (Átlag + SEM, n=8, p<0,05 /FcR $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz/poz</sup> artr. vs. FcR $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/poz</sup> artr./)



**49. ábra: Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc intracelluláris tirozinjai esszenciálisak az ízületi gyulladás okozta funkciócsökkenés kialakulásában**

Míg a vad típusú FcR $\gamma$  transzgén jelenléte képes volt az ízületi funkciócsökkenés bizonyos mértékű visszaállítására, az ITAM-tirozinmutáció jelenléte meggátolta a kialakulást. (Átlag + SEM, n=4)



### **6.3. A CARD9 szerepének vizsgálata primer fagocitasejtekben és autoantitest-mediált ízületi gyulladásban**

További kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a makrofágok és a dendritikus sejtek ITAM(-szerű) jelátvitelében szerepet játszó intracelluláris adapter fehérje, a CARD9 szerepel-e neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében, valamint autoimmun ízületi gyulladásban. Az ebben a fejezettrészben ismertetett adatok publikálás előtt állnak, így átmenetileg titkosítva lettek.

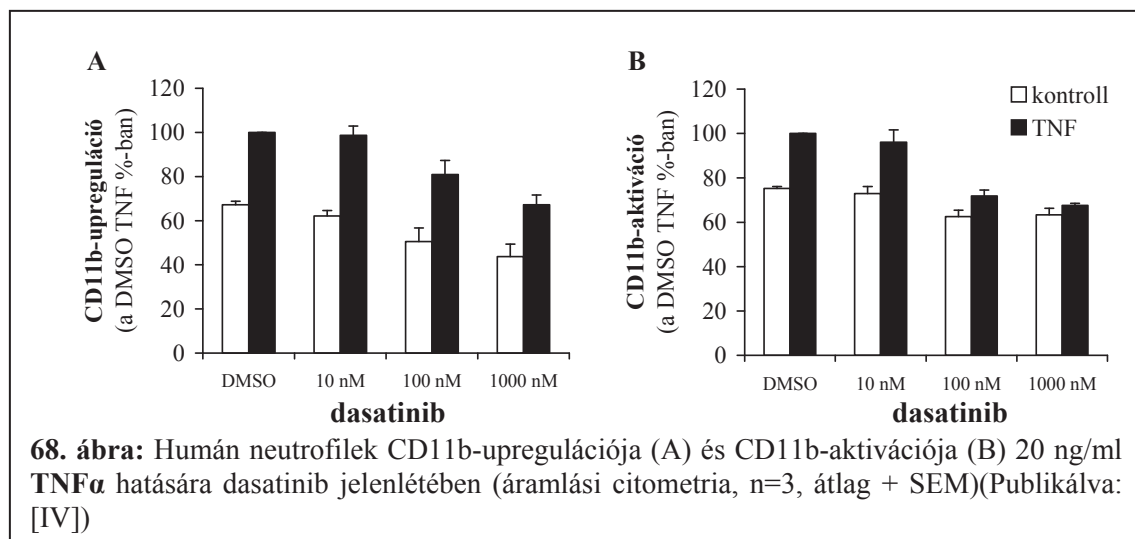
További információ: [nemeth.tamas@med.semmelweis-univ.hu](mailto:nemeth.tamas@med.semmelweis-univ.hu)

## 6.4. A dasatinib néhány neutrofil sejtválaszra gyakorolt hatásának vizsgálata

### 6.4.1. A dasatinib hatása neutrofilek $\beta_2$ -integrin inside-out szignalizációjára

Mint azt a 3.5.3. alfejezetben említettem, Futosi Krisztina kísérleteiben a dasatinib már alacsony, nanomoláros koncentrációban gátolta a humán neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin-függő válaszait. Ezekhez az integrin ligand felszínen vizsgált in vitro neutrofil aktivációkhoz azonban a  $\beta_2$ -integrin ligandon kívül – az integrin-konformáció megfelelő kialakítása végett – szükség volt szolubilis agonista (pl. TNF $\alpha$ ) jelenlétére is. Így megvizsgáltuk, hogy a dasatinib kizárólag az integrinek outside-in vagy ezen túlmenően az inside-out szignalizációját is gátolta-e. Az itt közölt adatainkat a IV-es számú publikációban közöltük.

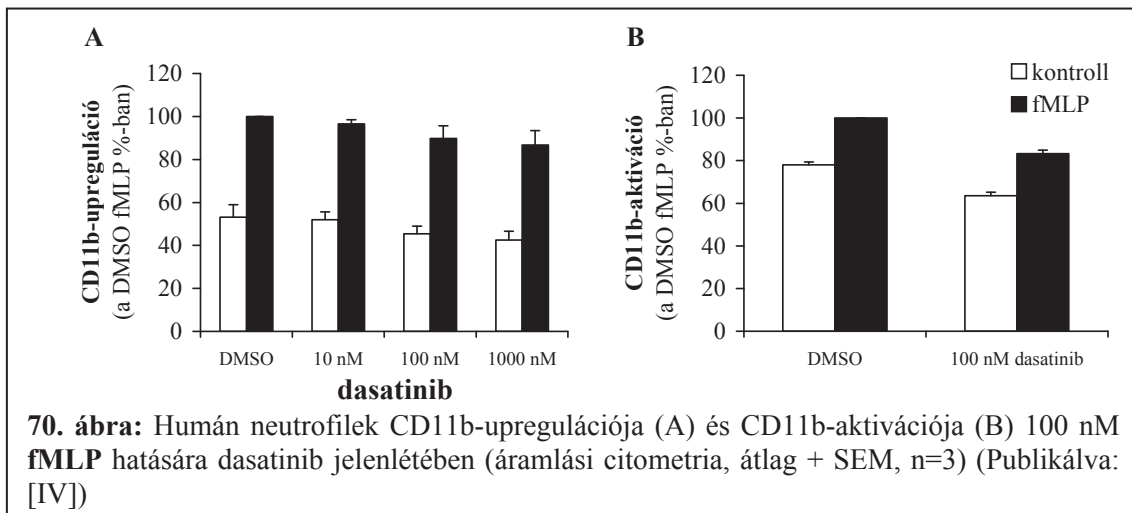
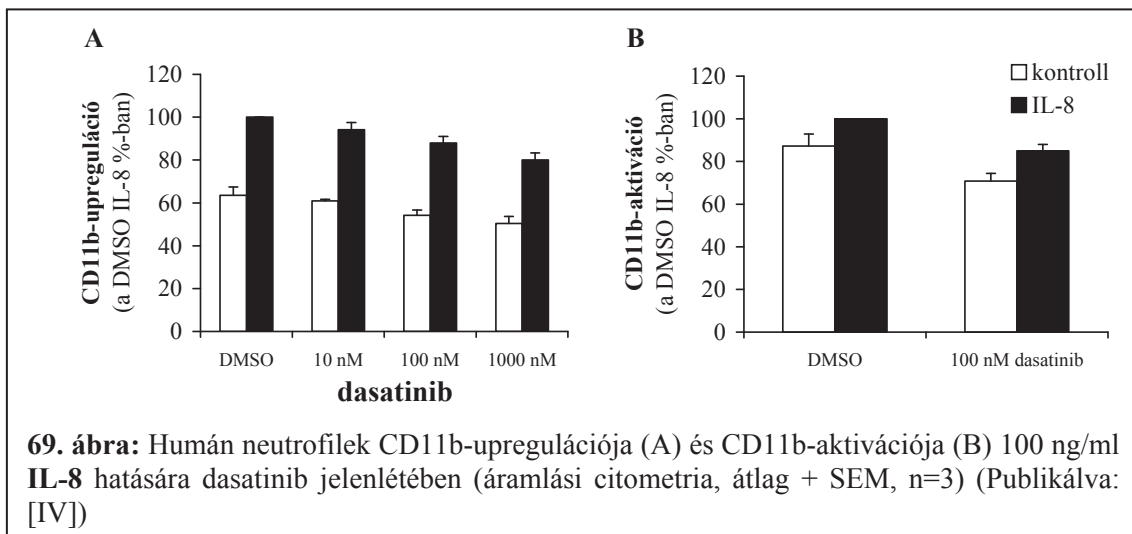
Az egészséges egyének perifériás véréből származó neutrofileket különböző koncentrációban előinkubáltuk a tirozin-kináz gátló dasatinibbel, majd  $\beta_2$ -integrin-független módokon aktiváltuk a sejteket. Első körben arra voltunk kíváncsiak, hogy miként alakul a  $\beta_2$ -integrin Mac-1 CD11b-láncának TNF $\alpha$  hatására bekövetkező upregulációja és konformáció-változás okozta aktivációja. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib nem befolyásolta lényegesen a CD11b upregulációját, az aktivációt is csak a magasabb dózis esetén gátolta (68. ábra)<sup>28</sup>. Mivel a gátlószer félgátló koncentrációja (IC<sub>50</sub>)  $\beta_2$ -integrin-mediált folyamatokban 9-35 nM között változott a stimulustól függően, megállapíthattuk, hogy az ebben a koncentráció-



<sup>28</sup> TNF $\alpha$ : CD11b-upreguláció: n=3, p=0,81 /DMSO vs. 100 nM dasatinib/, CD11b-aktiváció: n=3, p=0,04/DMSO vs. 100 nM dasatinib/

tartományban a dasatinib jelenlétében megfigyelt sejtválasz-károsodásban az inside-out szignalizáció gátlásának nem volt lényegi szerepe.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy miként alakul a CD11b-upreguláció és -aktiváció egyéb stimulusok hatására dasatinib jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib nem befolyásolta lényegesen se a G-fehérje-kapcsolt receptorral rendelkező interleukin-8 (IL-8)(**69. ábra**), se az fMLP hatására létrejövő CD11b-upregulációt és -aktivációt (**70. ábra**).<sup>29</sup>

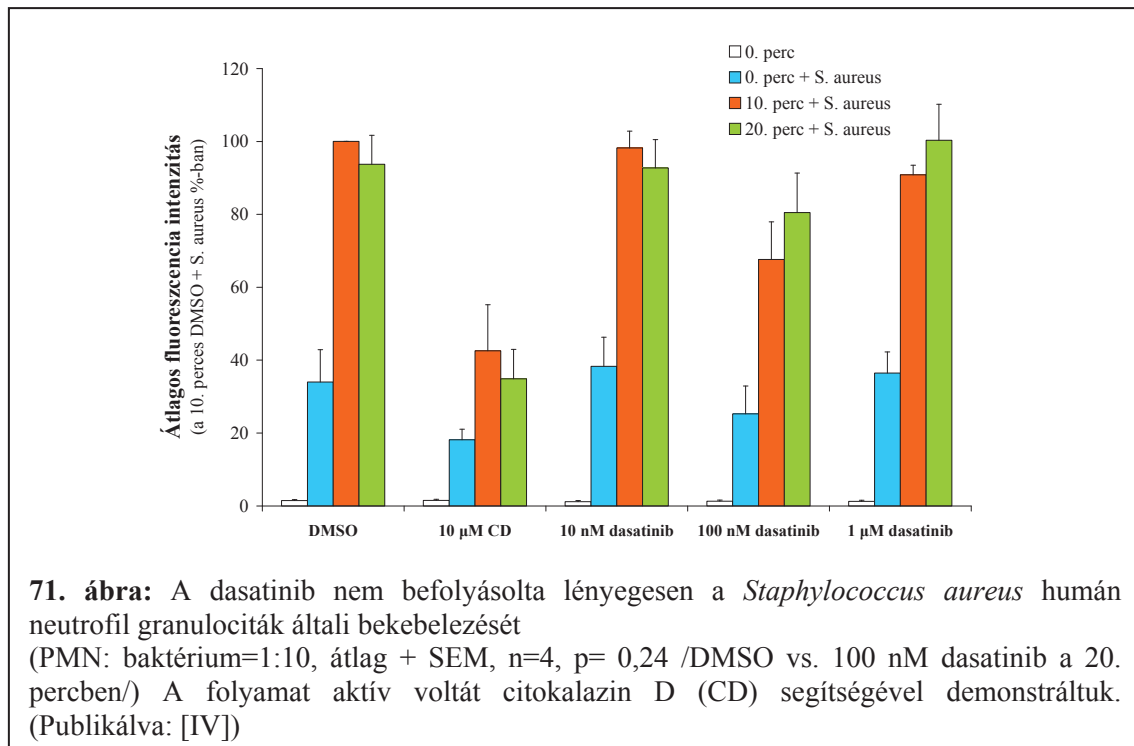


<sup>29</sup> IL-8: CD11b-upreguláció, n=3, p=0,54 /DMSO vs. 100 nM dasatinib/; CD11b-aktiváció: n=3, p=0,81; fMLP: CD11b-aktiváció: n=3, p=0,8 /DMSO vs. 100 nM dasatinib/; CD11b-aktiváció: n=3, p=0,3

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a tirozin-kináz gátló dasatinib nem befolyásolta drasztikus mértékben a humán neutrofilek  $\beta_2$ -integrinjének inside-out szignalizációját.

#### 6.4.2. Érintetlen $\beta_2$ -integrin-függő fagocitózis dasatinib jelenlétében

Kollégám, Futosi Krisztina mérései alapján a dasatinib – ellentétben a  $\beta_2$ -integrin-mediált szuperoxid-termeléssel – nem befolyásolta lényegesen a  $\beta_2$ -integrin-függő baktérium-ölést [IV]. Ezen a nyomvonalon maradván megvizsgáltuk a baktériumok neutrofilek általi fagocitózisát dasatinib jelenlétében. A kevert humán szérummal opsonizált GFP-jelölt baktériumokat adott ideig humán neutrofilekkel hoztuk össze 37 ° C-on. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib nem befolyásolta a *Staphylococcus aureus* neutrofil granulociták általi fagocitózisát (**71. ábra**). Mivel a baktériumok a neutrofilek külső felszínére nagy mennyiségben kitapadtak, a ténylegesen bekebelezett baktériumok mennyiségének meghatározásához egy mintát az aktin-polimerizációt gátló citokalazin D-vel inkubáltunk elő.



Fontos szempont, hogy míg a dasatinib jelentősen gátolt egyes  $\beta_2$ -integrin-függő (és Fc $\gamma$ -receptor-mediált) folyamatokat neutrofilek esetében (Futosi Krisztina eredményei, ld. a bevezetőt), a közvetlen antimikrobiális sejtválaszokat nem

befolyásolta. Mindez felveti a molekulának és származékainak esetleges terápiás alkalmazásának lehetőségét a neutrofil granulociták túlműködésével járó autoimmun kórképekben.

## 7. Megbeszélés

PhD-munkám során – egy projekt kivételével – egér neutrofil granulociták jelátviteli folyamatainak vizsgálatával, valamint a kérdéses fehérjék egy neutrofil-függő kísérletes autoimmun ízületi gyulladásban, a K/BxN szérum transzfer artritiszben betöltött szerepének leírásával foglalkoztam génhányos egerek felhasználásával. Kísérleteimet négy téma köré csoportosítottam. Vizsgáltam (1) az irodalmi adatok alapján potenciális integrin-hírvivő p190RhoGAP (Publikálva: [II]), (2) az Fc $\gamma$ -receptorok sejtfelszíni expresszióját stabilizáló Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ) ITAM-tirozinjainak (Az FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> neutrofilek in vitro sejtválaszai publikálva: [I]) és (3) egy, a makrofágok és dendritikus sejtek ITAM(-szerű) jelátvitelében szereplő intracelluláris adapter molekula, a CARD9 szerepét a fenti folyamatokban. Megvizsgáltam továbbá, hogy (4) az antileukémiás szer tirozin-kináz gátló dasatinib miként befolyásolja neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin inside-out szignalizációját, valamint bakteriális fagocitózist (Publikálva: [IV]).

A PhD-munkám első részében vizsgált **p190RhoGAP** fontos szabályozója egyes sejtek (így neuronok és fibroblasztok) integrin-mediált jelátvitelének, ahol aktivációja Src-kináz-függő módon zajlik és hatását részben a kis mértékű intrinsic GTP-áz aktivitással rendelkező kis G-fehérjéken (pl. a Rho család tagjain) keresztül fejt ki. Tekintettel a  $\beta_2$ -integrinek, az Src-kinázok és a kis G-fehérjék neutrofil granulociták működésében betöltött szerepére, továbbá a p190RhoGAP  $\beta_2$ -integrin-mediált aktivációjára humán neutrofilekben, megvizsgáltuk, hogy a p190RhoGAP milyen szerepet tölt be egér neutrofilek  $\beta_2$ -integrin-függő (és a teljesség kedvéért  $\beta_2$ -integrin független) sejtválaszaiban. Vizsgálataink során egy, a korábbi hipomorf mutánstól (*Gr1fl*<sup>tm1JSet</sup>) eltérő null mutáns allélt (*Gr1fl*<sup>tm2JSet</sup>) hordozó egértörzset használtunk. Mivel a mutációt előállító munkacsoportban időközben bizonyos mértékű profilváltás történt, az új egértörzs jellemzőinek leírása részben ránk maradt. Kísérleteink során rekonstruáltuk az új mutáció létrehozásának módját. A p190RhoGAP null mutációt homozigóta formában hordozó egyedek a hipomorf variánshoz hasonlóan perinatális letalitást mutattak. Ennek áthidalására p190RhoGAP<sup>-/-</sup> magzati hemopoetikus sejtek vad típusú egyedekbe történő transzplantációját végeztük (mely által csontvelői kimérákat hoztunk létre). A transzplantáció során az egérmagzatok genotípusát

Western-blot (olykor még további PCR technika) segítségével a magas p190RhoGAP-expressziót mutató agyból határoztuk meg.

Az p190RhoGAP<sup>-/-</sup> csontvelői kimérákból származó neutrofilek sem számban, sem érettségben nem mutattak eltérést a vad típusú sejtekkel szemben. Humán neutrofil granulociták fokozott tisztítással és eger neutrofilek hagyományos eljárással előállított populációjában kimutattuk, hogy a p190RhoGAP kifejeződött ezen sejtekben. Várakozásainkkal ellentétben a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek azonban nem mutattak lényegi eltérést a  $\beta_2$ -integrin-mediált sejtválaszokban: képesek voltak különböző kostimulusok jelenlétében szuperoxid-termelésre (mely ellentétben állt az előzetes adatok alapján felmerülő negatív regulátor szereppel [112]), integrin-ligand felszínen szétterültek és kemotaktikus anyagok hatására megfelelően vándoroltak. A p190RhoGAP ugyancsak nem bizonyult nélkülözhetetlen elemnek a neutrofil- és  $\beta_2$ -integrin-dependens K/BxN szérum transzfer arthritisz során. A neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor- és G-fehérje kapcsolt receptor-mediált folyamatai is intaktnak bizonyultak p190RhoGAP hiányában. Összefoglalásként tehát megállapíthattuk, hogy a p190RhoGAP nem esszenciális komponens a neutrofil granulociták általunk vizsgált folyamataiban.

Eredményeink magyarázatára több elméleti lehetőség is kínálkozik. Egyes, a neutrofilek működésében fontos kis G-fehérje (pl. a Rac1, a Rac2, a Cdc42, a Rho) bizonyos sejtekben és esetekben egymással ellentétes hatásokat fejthet ki a sejtek aktivációja során, így a p190RhoGAP hiánya összességében relatíve érintetlen sejtválaszokat eredményezhet [207,208]. A neutrofilekben továbbá jó néhány egyéb RhoGAP is megtalálható (pl. a Bcr, a p50RhoGAP) [115,209], melyek esetleg kompenzálhatták a p190RhoGAP hiányát. Külön kiemelendő ezen molekulák közül a p190RhoGAP-hoz szerkezetileg sokban hasonló p190-B. Számos adat utal azonban a két molekula közötti funkcionális különbségre. Bár a p190-B hiánya a p190RhoGAP-hiányhoz hasonlóan ugyancsak perinatális letalitást eredményez egerekben, a megjelenő általános fenotípus azonban eltér a p190RhoGAP-hiánynál megfigyelttől [210-212]. Ezen túlmenően a p190-B hiányában sokban hasonló, de a p190RhoGAP-hiánnyal nem teljesen megegyező idegrendszeri fenotípus alakul ki [213]. A p190-B a p190RhoGAP-pal ellentétben nem képes fibroblasztokban két, az integrin-jelpálya során megfigyelhető mozzanatra: nem képes Src-kinázok általi foszforilációra és nem tud a

p120RasGAP-pal asszociálódni [213]. Az esetleges funkcionális kompenzáció ellen szól az is, hogy a p190RhoGAP-hiányos egér embrionális fibroblasztok határozott migrációs károsodást mutattak [214] a p190-B jelenléte mellett [210,215]. Mindezek mellett a p190-B-ben a p190RhoGAP-pal szemben nem találhatóak meg a polarizált sejtvándorlásban fontos C-terminális foszforilációs helyek, valamint a protein-kináz C általi szabályozásban lényeges foszforilálható aminosavak [109,214]. A funkcionális kompenzáció formális kizárására a p190RhoGAP/p190-B kettős génhányos egyedek lettek volna a legalkalmasabbak, de nem találtunk a p190RhoGAP<sup>+/-</sup>p190-B<sup>+/-</sup> egyedek időzített terhességéből származó 15-18 napos magzatok között ilyen genotípusút, mely kizárta a csontvelő transzplantáció lehetőségét (Ezzel összhangban Jeffrey Settleman munkacsoportja sem talált p190RhoGAP/p190-B kettős génhányos magzatot az időzített terhesség 10. napja előtt (jóval a csontvelő transzplantációt biztosító életkor előtt.) [213]). Csupán elvi lehetőségként merült fel tapasztalat hiányában a rengeteg idő- és pénzráfordítási igénnyel rendelkező p190-B shRNS technika p190RhoGAP-hiányos csontvelői kimérákban megközelítés). Fontos ugyanakkor hozzátenni, hogy a négy allélból három törlése (p190RhoGAP<sup>-/-</sup>p190-B<sup>+/-</sup> genotípus) esetén a neutrofilek integrin-függő folyamataiban nem találtunk lényegi eltérést a vad típusú egyedekhez képest, ugyanígy nem volt károsodás p190-B<sup>-/-</sup> neutrofilekben sem (nem mutatott saját adatok). A p190-B szintjét sem befolyásolta a p190RhoGAP hiánya neutrofilekben (nem mutatott saját adat). Természetesen azzal is tisztában vagyunk, hogy a p190RhoGAP talán olyan neutrofil folyamat(ok)ban vesz részt, melye(ke)t kísérleteink során nem vizsgáltunk. Részletesebb analízissel esetleg – az integrin-mediált sejtszétterüléshez és migrációhoz hasonló – további finom eltérések lesznek majd felfedezhetőek a jövőben a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek között.

PhD-munkám következő részében az **Fc-receptor  $\gamma$ -lánc és két ITAM-tirozinjának** szerepét vizsgáltam egér neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében és autoimmun ízületi gyulladásban. Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc (FcR $\gamma$ ) hiányában jelentősen károsodtak az egér neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált in vitro sejtválaszai. Mivel az FcR  $\gamma$ -lánc hiányában nem található aktiváló Fc $\gamma$ -receptor az egér neutrofilek felszínén, felmerült a kérdés, hogy az FcR  $\gamma$ -lánc csupán a receptorok plazmamembránban történő stabilizációjában, vagy azon túlmenően esetleg további folyamatokhoz is szükséges-e. Az FcR  $\gamma$ -lánc intracelluláris ITAM-tirozinjainak szerepét úgy vizsgáltuk neutrofil



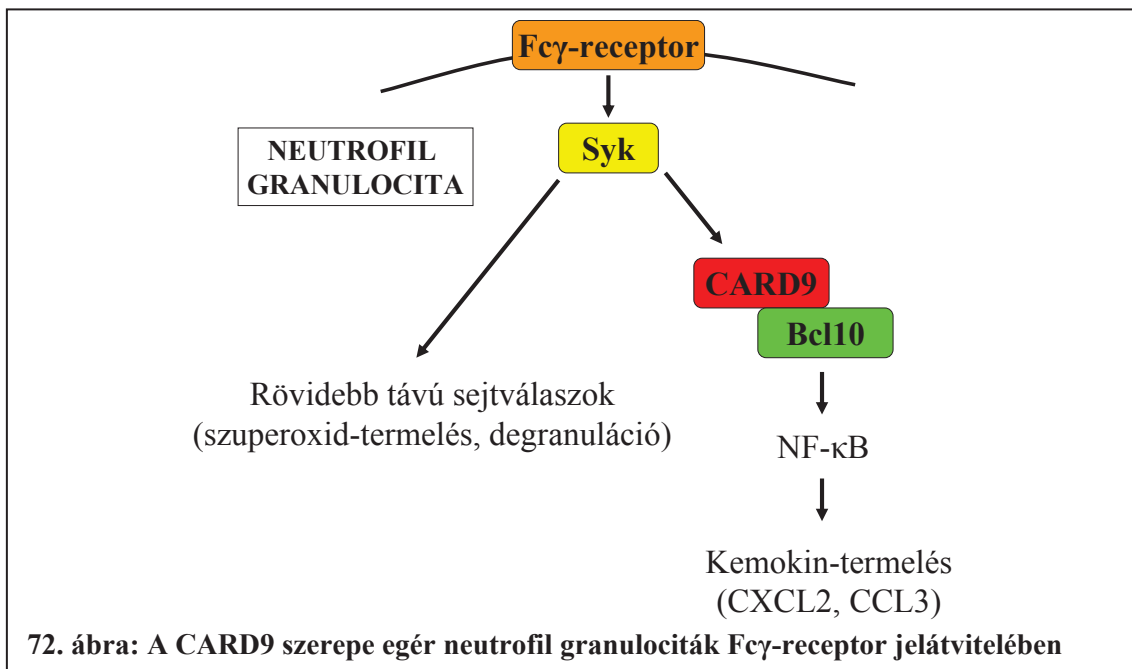
granulocitákban és az autoimmun ízületi gyulladás végrehajtó fázisában, hogy vad típusú vagy ITAM-tirozinok helyett funkcionálisan semleges fenilalanint kódoló Y65F/Y76F mutáns FcR  $\gamma$ -lánc gént juttattunk vissza FcR  $\gamma$ -lánc-hiányos háttérre. Struktúra-funkció analízisünk során megállapítottuk, hogy míg mindkét transzgénikus FcR  $\gamma$ -lánc képesnek bizonyult a neutrofil granulociták sejtfelszíni Fc $\gamma$ -receptor expressziójának részleges visszaállítására (sőt az ITAM-mutáns FcR $\gamma$  még a vad típusú FcR $\gamma$  transzgénénél fokozottabb mértékben is). A mutáns FcR  $\gamma$ -lánc FcR $\gamma^{-/-}$  háttéren való reexpressziója ugyanakkor nem tudott Fc $\gamma$ -receptor-mediált funkcionális válaszokat létrehozni. Így az FcR  $\gamma$ -lánc-hiányos sejtekéhez hasonlóan elmaradt a szuperoxid-termelés, a zselatináz-degranuláció és a sejtészterülés FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinmutáns neutrofilek esetén. Az autoantitest-mediált ízületi gyulladás során ugyanakkor a vad típusú transzgénikus FcR  $\gamma$ -láncot hemizigóta formában hordozó egyedek csupán kis mértékű, szabad szemmel éppen, hogy érzékelhető gyulladást tudtak csak kialakítani, mely azonban nem okozott kimérhető bokavastagodást. Az FcR $\gamma^{-/-}$  FcR $\gamma$ (VT)Tg<sup>poz/neg</sup> egyedekben azonban már jól detektálható (a genetikai módosításoktól mentes vad típusú egyedekkel összevetve intermedier) K/BxN szérum transzfer artritisz fenotípus alakult ki. További kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy ezen ízületi gyulladásban elengedhetetlenek a  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok: hiányukban nem alakult ki makroszkópos gyulladás, elmaradt a bokavastagság növekedése és nem jött létre ízületi funkciókárosodás (se az FcR $\gamma^{-/-}$  FcR $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/neg</sup>, se az FcR $\gamma^{-/-}$  FcR $\gamma$ (YF/YF)Tg<sup>poz/poz</sup> egyedekben; annak ellenére, hogy a mutáns molekula kifejeződése nagyobbak mutatkozott vad típusú társáénál). Mivel a tárgyalt fenotípus csontvelői kimérákban is megfigyelhető volt, a jelenség hátterében a hemopoetikus kompartment áll. Azt, hogy pontosan ezen belül az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok mely sejttípus(ok)ban szükségesek, további vizsgálatoknak kell tisztáznia. Mivel kevert kimérákban azt találták, hogy az FcR $\gamma$  a neutrofilek felszínén nem szükséges a sejtek gyulladt ízületbe történő vándorlásához [51], az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok szerepe feltehetően a szövetekben aktiválódó sejtek direkt és indirekt szövetkárosító hatásának szabályozásában rejlik. Kiemelendő, hogy az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc nem csak az IgG-megkötésben jelentős aktiváló Fc $\gamma$ -receptorokkal képes egér sejteken asszociálódni, hanem további receptorokkal is kapcsolódhat (ld. a bevezető 3.2.3. alfejezetét), így in

vivo eredményeink nem jelentik az *in vitro* kísérletek során nyert adatok egyszerű, csupán az Fc $\gamma$ -receptorok szerepére vonatkozó) extrapolálhatóságát.

Az Fc-receptor  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinjainak szerepét néhány egyéb folyamatban már azonosították. Így ezek az intracelluláris tirozinok fontos szereplőnek tűntek hízósejtek *in vitro* folyamataiban, így az IgE-immunkomplex-indukált  $\beta$ -hexózáminidáz-leadásban, valamint interleukin-6-, TNF $\alpha$ - és prosztaglandin D<sub>2</sub>-termelésben, továbbá esszenciálisak voltak a passzív szisztémás anafilaxis kialakulásában *in vivo* [192]. Érdekesség, hogy míg hízósejtek IgE-mediált túlélése FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozin-dependensnek mutatkozott, a sejtek IgE-indukált Fc $\epsilon$ -receptor upregulációjához nem volt szükség az intracelluláris tirozinok jelenlétére [192]. Az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok foszforilációját továbbá kimutatták neutrofil granulociták integrin-mediált folyamatai során [13]. Mindezek mellett eredményeink fontos új információkkal szolgálnak az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinoknak mind a neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében, mind az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában betöltött szerepével kapcsolatban.

PhD-munkám harmadik szakaszában a makrofágok és dendritikus sejtek ITAM- és ITAM-szerű (pl. Dektin-1) jelátvitelében fontos **CARD9** intracelluláris adapter fehérjével foglalkoztam. Az irodalomban fellelhető mRNS adatoknak megfelelően a CARD9 kifejezett expressziót mutatott egér neutrofil granulocitákban és hiánya sem a neutrofilek érését, sem a sejtfelszíni Fc $\gamma$ -receptor kifejeződését nem befolyásolta. Kísérleteinkben először mutattuk ki, hogy immobilizált immunkomplex-felületen a CARD9-hiányos neutrofilek érintetlen rövidebb távú (az aktivációtól számított első 30 percben megjelenő), de jelentősen károsodott hosszabb távú sejtválaszokat (pl. CXCL2- és CCL3-termelést) mutattak. A csökkent kemokin-termelés hátterében a CARD9-hiányos neutrofilek károsodott I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B jelpályáját valószínűsítettük. Mivel az ITAM-jelpályákban fontos, az ITAM-tirozinokkal közvetlenül kapcsolódni képes Syk tirozin-kináz hiányában mind a rövidebb, mind a hosszabb távú sejtválaszok elmaradtak, a makrofágok és dendritikus sejtek hasonló folyamatainak analógiájára a CARD9-et, mint a Syktól disztálisan elhelyezkedő molekulát feltételeztük. Ezt a hipotézisünket tovább erősítette a CARD9-hiányos neutrofilekben megfigyelhető érintetlen Fc $\gamma$ -receptor-mediált Syk-foszforiláció. A CARD9 adapter fehérjével közvetlen interakcióra képes fehérje, a Bcl10 hiányában a CARD9<sup>-/-</sup> neutrofilek

fenotípusához hasonló szelektív sejtválasz-károsodás figyelhető meg. Bár a CARD9-Bcl10 interakció neutrofilekben történő stimulus-függő detektálása még várat magára, a következő Fc $\gamma$ -receptor jelpálya-sémát állítottuk fel. Neutrofil granulocitákban az Fc $\gamma$ -receptorok ligandkötését követően aktiválódó Syk tirozin-kináztól disztálisan a jelpálya szétválik: egy CARD9-független rövidebb távú és egy CARD9-függő hosszabb távú jelátviteli útra. Ez utóbbi során a CARD9 feltehetően a Bcl10-en keresztül befolyásolja az NF- $\kappa$ B-alegységek magi áthelyeződését (72. ábra). Természetesen formálisan nem

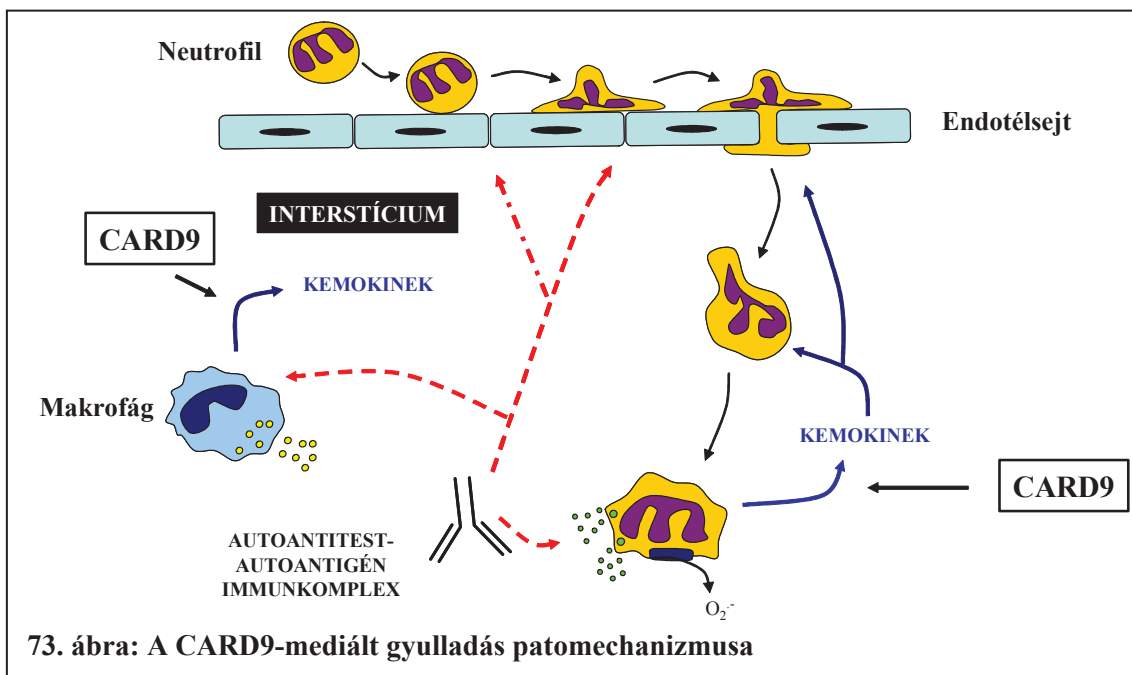


zárhatjuk ki, hogy a Syk külön-külön vesz részt a rövidebb, valamint a hosszabb távú sejtválaszokhoz vezető jelpályákban. További kérdés lehet a Syk<sup>-/-</sup> és a CARD9<sup>-/-</sup> neutrofilek maradék kemokin-termelése közötti különbség, melynek hátterében talán egyéb faktorok (pl. immunkomplex-mediált autokrin/parakrin leukotrién B<sub>4</sub>-termelés) állhatnak. A trimerikus komplex harmadik tagjának, a Malt1-nek a neutrofilekben betöltött szerepét további kísérleteknek kell tisztáznia. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a fent említett adatok az elsők a CARD9 neutrofil granulocitákban betöltött szerepével kapcsolatban.

A CARD9 szerepével kapcsolatos in vivo funkcionális adatok kevés kivételtől (ld. [216]) eltekintve elsősorban fertőzőes gyulladással kapcsolatosak [59-61,68,217]. Csupán az elmúlt időszakban merült fel genetikai asszociációs vizsgálatok alapján a molekula szerepe humán autoimmun betegségekben (pl. spondylitis ankylopoetica-ban (Bechterew-kórban)[122,218]). Autoimmun ízületi gyulladás indukcióját követően azt

tapasztaltuk, hogy CARD9-hiányos egerek a vad típusú egyedekkel összevetve egy szignifikánsan csökkent köztes gyulladási képet mutattak, a bokavastagság tekintetében körülbelül 50%-os károsodást figyelhettünk meg. Mindezek mellett a CARD9 hiányában részlegesen csökkent a gyulladás okozta funkciócsökkenés is. (Hasonló eredményre vezetett egy másik autoantitest-mediált autoimmun betegség, a kísérletes epidermolysis bullosa acquisita (EBA) passzív formájának CARD9-függőség vizsgálata is.)

Mivel a CARD9 hiányában megjelenő fenotípus csontvelői kimérák esetében is megfigyelhető volt, a jelenség hátterében a hemopoetikus sejtek működésében bekövetkező változás áll. A CARD9 a hemopoetikus sejtek közül feltehetően elsősorban a modellben esszenciális makrofágok és neutrofilek működésében jelentős (mivel a hízósejtek nem fejezik ki a CARD9-et). Míg a CARD9-hiányos neutrofilek szinoviális területre történő vándorlása érintetlennek bizonyult, a bokaízületben csökkent CXCL2 kemokin-szintet detektáltunk. In vitro neutrofil és makrofág eredményeink alapján az in vivo rendszerre az alábbi sémát extrapoláltuk. Az autoantitestek ízületi depozícióját követően a lokálisan létrejövő immunkomplexek által kiváltott immunsejt-aktiváció direkt szövetkárosító folyamatai (pl. a degranuláció) CARD9-független módon zajlanak. A CARD9 szerepe feltehetően az NF- $\kappa$ B-mediált citokin/kemokin-termelés szabályozásában, a lokális gyulladási citokin-környezet kialakításában és ezáltal



további immunsejtek (pl. neutrofilek CXCL2 révén történő) helyszínre toborzásában rejlik (**73. ábra**).

Természetesen az *in vitro* és *in vivo* adatok pontosabb összekapcsolásához további citokinek (pl. IL-1 $\beta$ , CCL3, CXCL1) szintjének meghatározására is szükség van. További kérdés a trimerikus komplex másik két tagjának, a Bcl10-nek és a Malt1-nek a kísérletes ízületi gyulladásban betöltött szerepének vizsgálata. Kiemelendő azonban, hogy *in vivo* adataink elsőként mutatják a CARD9 szerepét autoimmun betegség effektor fázisában.

PhD-munkám negyedik szakaszában a tirozin-kináz gátló **dasatinib** humán neutrofil granulociták egyes funkcióira kifejtett hatását vizsgáltam. A tirozin-kináz gátlók fontos szereplők bizonyos malignus hematológiai betegségek terápiájában, hatásukat továbbá vizsgálják egyes autoimmun ízületi gyulladások kezelésében. Rheumatoid artritiszben jelenleg két klinikai fázisvizsgálatban résztvevő kismolekulájú tirozin-kináz gátlót tesztelnek, ezek a tofacitinib (korábbi nevén tasocitinib) és a fostamatinib. A krónikus mieloid leukémia kezelésében használt második generációs tirozin-kináz gátló dasatinib az Abl-Bcr fúziós fehérje mellett az Abl-t, az Src-kinázokat, a Btk molekulacsalád tagjait, a c-Kitet, a PDGF- és Eph-receptort is gátolja. Mivel az említett molekulák közül több (így pl. az Src-kinázok, illetve az Abl) jelentős szerepet tölt be a neutrofil granulociták működésében, felmerült, hogy a dasatinib esetleg befolyásolhatja egészséges humán neutrofilek működését. Kollégám, Futosi Krisztina azt tapasztalta, hogy a dasatinib drasztikusan gátolta érett neutrofilek  $\beta_2$ -integrin-dependens folyamatait. Annak eldöntésére, hogy ezekben a folyamatokban a dasatinib csupán az integrinek outside-in vagy ezen túlmenően az inside-out szignalizációját is befolyásolja-e, humán neutrofil granulocitákat szolubilis agonistákkal kezeltém adhézió-független módon dasatinib jelenlétében. Azt találtam, hogy a dasatinib nem befolyásolta lényegesen a neutrofilek gyulladásos mediátorok (TNF $\alpha$ , IL-8, fMLP) által kiváltott CD11b-upregulációját és CD11b-aktivációját. A továbbiakban megvizsgáltam, hogy gátolja-e az inhibitor a bakteriális fagocitózis folyamatát. Azt tapasztaltam, hogy a dasatinib emelkedő koncentrációban sem befolyásolta lényegesen a baktériumok bekebelezését. Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a dasatinib a  $\beta_2$ -integrin- és Fc $\gamma$ -receptor-függő egyéb folyamatokkal ellentétben nem befolyásolta lényegesen az *in vitro* antimikrobiális válaszokat. Mindez határozottan felveti a

dasatinib-származékok esetleges terápiás alkalmazhatóságának lehetőségét egyes autoimmun folyamatok gyógyításában.

## 8. Következtetések

A célkitűzéseknek megfelelően következtetéseimet is négy pontban szedtem össze.

1. A potenciális  $\beta_2$ -integrin jelpálya alkotó p190RhoGAP teljes hiányával jellemezhető egértörzset a mutáció tekintetében és a fenotípust illetően karakterizáltuk. A p190RhoGAP<sup>-/-</sup> neutrofil granulociták nem mutattak lényeges károsodást az általunk vizsgált  $\beta_2$ -integrin-függő és -független in vitro folyamatokban. Hasonlóképpen a p190RhoGAP nem bizonyult nélkülözhetetlennek a  $\beta_2$ -integrin-függő autoantitest-mediált autoimmun ízületi gyulladásban sem.

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

3. A CARD9 neutrofil granulociták Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében betöltött szerepének vizsgálata kapcsán azt találtuk, hogy a molekula nem szükséges az aktivációt követően gyorsan megjelenő rövidebb távú, ellenben esszenciális egyes hosszabb távú sejtválaszok (pl kemokin-termelés) kialakulásához. Ez utóbbi során a CARD9 a Syktől disztálisan helyezkedik el és feltehetően a Bcl10 nevű fehérjén keresztül befolyásolja a transzkripciós faktor NF- $\kappa$ B alegységeinek nukleáris transzlokációját. CARD9 hiányában részleges károsodást figyeltünk meg autoantitest-mediált autoimmun betegségekben, melynek hátterében nagy valószínűséggel a kemokinek (neutrofilek és makrofágok általi) csökkent termelése állhat.

4. A kis molekulású dasatinib nem gátolta lényegesen a humán neutrofil granulociták  $\beta_2$ -integrin inside-out szignalizációját, valamint a kevert humán szérummal opsonizált baktériumok fagocitózisát. A munkacsoport dasatinibbel kapcsolatos további eredményeivel karöltve ez felveti a dasatinib-származékok potenciális terápiás alkalmazhatóságát egyes autoimmun folyamatok terápiájában.

## 9. Összefoglalás

A neutrofil granulociták működése nélkülözhetetlen az egészséges immunvédekezéshez. Ugyanakkor a térben és időben nem megfelelően aktiválódott sejtek – például egyes autoimmun kórképekben – a szervezet jelentős károsodását eredményezhetik. PhD-munkám során neutrofil granulociták jelátvitelével és a vizsgált molekulák autoimmun ízületi gyulladásban betöltött szerepével foglalkoztam.

Első kísérleteimben egy először általunk jellemzett új p190RhoGAP-hiányos egértörzs segítségével kimutattam, hogy az irodalmi adatokon alapuló várakozásokkal ellentétben a p190RhoGAP nem nélkülözhetetlen résztvevője a neutrofilek általunk vizsgált  $\beta_2$ -integrin-függő és -független folyamatainak. A p190RhoGAP nem elengedhetetlen a neutrofil- és  $\beta_2$ -integrin-függő autoimmun ízületi gyulladásban sem.

További vizsgálataim során azt találtam, hogy az FcR  $\gamma$ -lánc hiányában, valamint az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinjainak mutációja esetén jelentősen károsodnak a neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált in vitro sejtválaszai. Az FcR  $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok elengedhetelenek a neutrofil- és Fc $\gamma$ -receptor-függő autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában is.

További eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor jelpályája a Syk tirozin-kináztól disztálisan kettéválk egy CARD9-független, korai és egy CARD9-dependens, késői sejtválaszokhoz vezető útvonalra. Ez utóbbi során a CARD9 hatását (feltehetően a Bcl10 közvetítésével) a transzkripciós faktor NF- $\kappa$ B alegységek nukleáris transzlokációja révén hozza létre. A CARD9 fontos résztvevője az autoantitest-indukált ízületi gyulladásnak. In vivo hatását feltehetően a neutrofilek (és a makrofágok) hosszabb távú sejtválaszainak befolyásolásán keresztül fejt ki.

Végül kimutattam, hogy a tirozin-kináz gátló dasatinib nem befolyásolja lényegesen a  $\beta_2$ -integrinek inside-out szignalizációját és a baktériumok neutrofilek általi fagocitózist. Mindezek a munkacsoport dasatinibbel kapcsolatos eredményeivel karöltve felvetik a dasatinib származékainak az autoimmun gyulladások terápiájában való alkalmazhatóságát.

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



## 10. Summary

Neutrophils are crucial players of innate immunity. Besides the essential antimicrobial effects, their overactivation – e.g. in some autoimmune diseases – leads to significant damage to the host. During my Ph.D. work, I investigated neutrophil signaling and the role of some signaling molecules in the initiation and progression of autoantibody-induced autoimmune arthritis.

During my first experiments, by the help of a novel null mutation, I showed that p190RhoGAP does not play a major indispensable role in the investigated  $\beta_2$  integrin-dependent and -independent in vitro neutrophil functions. The molecule is also dispensable in the effector phase of a neutrophil-dependent autoimmune arthritis.

My further experiments revealed an important role for Fc receptor  $\gamma$ -chain (FcR $\gamma$ ) and its ITAM tyrosines in Fc $\gamma$  receptor-mediated in vitro neutrophil functions. The ITAM tyrosines also seemed to be crucial players in the development of the effector phase of autoantibody-induced autoimmune arthritis.

Our further results indicate that neutrophil Fc $\gamma$  receptor signaling divides into two distinct signaling routes downstream of Syk: to a CARD9-independent pathway leading to short-term cell responses and to a CARD9-dependent pathway resulting in long-term responses. During this latter route CARD9 exerts its effects by the nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B dimers, possible through interacting with Bcl10. The absence of CARD9 resulted in an intermediate phenotype of autoimmune arthritis, behind of those we propose a role for altered neutrophil and macrophage long-term responses.

Finally, I found that the tyrosine kinase inhibitor dasatinib did not significantly influence the inside-out signaling of neutrophil  $\beta_2$  integrins. Dasatinib also did not alter bacterial phagocytosis by mature human neutrophils. These data – with additional results of our workgroup – indicate that dasatinib derivatives perhaps could be used in the therapy of autoimmune arthritis in the future.

Our results provide further insights into the signaling of neutrophils and into the pathogenesis of autoimmune arthritis. The identified molecules can contribute to the development of a more efficient therapy in several inflammatory diseases (e.g. in autoimmune inflammation) in the future.

## 11. Irodalomjegyzék

- [1] Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils - Forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:500-510.
- [2] Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:427-439.
- [3] Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol* 2011;23:317-326.
- [4] Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:397-403.
- [5] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-1535.
- [6] Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005;22:285-294.
- [7] Mei J, Liu Y, Dai N, Hoffmann C, Hudock KM, Zhang P, Guttentag SH, Kolls JK, Oliver PM, Bushman FD, Worthen GS. Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest* 2012;122:974-986.
- [8] Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving  $\beta_2$  integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* 2002;9:30-35.
- [9] Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000;343:1703-1714.
- [10] Grande SM, Bannish G, Fuentes-Panana EM, Katz E, Monroe JG. Tonic B-cell and viral ITAM signaling: context is everything. *Immunol Rev* 2007;218:214-234.
- [11] Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA, Mócsai A. Immunoreceptor-like signaling by  $\beta_2$  and  $\beta_3$  integrins. *Trends Cell Biol* 2007;17:493-501.

- [12] Hara H, Saito T. CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2009;30:234-242.
- [13] Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 2006;7:1326-1333.
- [14] Graham DB, Stephenson LM, Lam SK, Brim K, Lee HM, Bautista J, Gilfillan S, Akilesh S, Fujikawa K, Swat W. An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:2889-2897.
- [15] Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor  $\gamma$ -chain (FcR $\gamma$ ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6158-6163.
- [16] Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML, Koretzky GA. Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:6936-6949.
- [17] Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 2008;28:8138-8143.
- [18] Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 2005;22:539-550.
- [19] Swanson JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2004;76:1093-1103.
- [20] Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-393.
- [21] Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fc $\gamma$  receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999;189:371-380.

- [22] Bolland S, Ravetch JV. Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. *Adv Immunol* 1999;72:149-177.
- [23] Nimmerjahn F. Activating and inhibitory FcγRs in autoimmune disorders. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28:305-319.
- [24] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008;8:34-47.
- [25] Petroni KC, Shen L, Guyre PM. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-γ and glucocorticoids. *J Immunol* 1988;140:3467-3472.
- [26] Guyre PM, Campbell AS, Kniffin WD, Fanger MW. Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. *J Clin Invest* 1990;86:1892-1896.
- [27] Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, Platzer E. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (FcγRI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991;78:885-889.
- [28] Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 1998;18:4209-4220.
- [29] Elliott ER, Van Ziffle JA, Scapini P, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA. Deletion of Syk in Neutrophils Prevents Immune Complex Arthritis. *J Immunol* 2011.
- [30] Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. Critical role of phospholipase Cγ2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2009;206:577-593.
- [31] Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mócsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR, Hawkins PT. PI3Kβ plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal* 2011;4:ra23.

- [32] Boross P, Verbeek JS. The complex role of Fc $\gamma$  receptors in the pathology of arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28:339-350.
- [33] van Vugt MJ, Heijnen AF, Capel PJ, Park SY, Ra C, Saito T, Verbeek JS, van de Winkel JG. FcR  $\gamma$ -chain is essential for both surface expression and function of human Fc gamma RI (CD64) in vivo. *Blood* 1996;87:3593-3599.
- [34] Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR  $\gamma$ -chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 1994;76:519-529.
- [35] Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. Fc $\gamma$ RIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005;23:41-51.
- [36] Kurosaki T, Gander I, Ravetch JV. A subunit common to an IgG Fc receptor and the T-cell receptor mediates assembly through different interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3837-3841.
- [37] Ono M, Yuasa T, Ra C, Takai T. Stimulatory function of paired immunoglobulin-like receptor-A in mast cell line by associating with subunits common to Fc receptors. *J Biol Chem* 1999;274:30288-30296.
- [38] Kubagawa H, Chen CC, Ho LH, Shimada TS, Gartland L, Mashburn C, Uehara T, Ravetch JV, Cooper MD. Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B. *J Exp Med* 1999;189:309-318.
- [39] Kubagawa H, Burrows PD, Cooper MD. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5261-5266.
- [40] Maeda A, Kurosaki M, Kurosaki T. Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A is involved in activating mast cells through its association with Fc receptor  $\gamma$  chain. *J Exp Med* 1998;188:991-995.
- [41] Hoelsbrekken SE, Fossum S, Dissen E. Molecular cloning of LILRC1 and LILRC2 in the mouse and the rat, two novel immunoglobulin-like receptors encoded by the leukocyte receptor gene complex. *Immunogenetics* 2005;57:479-486.
- [42] Merck E, Gaillard C, Scullier M, Scapini P, Cassatella MA, Trinchieri G, Bates EE. Ligation of the FcR  $\gamma$ -chain-associated human osteoclast-associated receptor

- enhances the proinflammatory responses of human monocytes and neutrophils. *J Immunol* 2006;176:3149-3156.
- [43] Graham LM, Brown GD. The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine* 2009;48:148-155.
- [44] van Egmond M, van Vuuren AJ, Morton HC, van Spruiel AB, Shen L, Hofhuis FM, Saito T, Mayadas TN, Verbeek JS, van de Winkel JG. Human immunoglobulin A receptor (FcαRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR g chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood* 1999;93:4387-4394.
- [45] Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor γ-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* 1997;272:23528-23531.
- [46] Park SY, Ueda S, Ohno H, Hamano Y, Tanaka M, Shiratori T, Yamazaki T, Arase H, Arase N, Karasawa A, Sato S, Ledermann B, Kondo Y, Okumura K, Ra C, Saito T. Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1998;102:1229-1238.
- [47] Kleinau S, Martinsson P, Heyman B. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fcγ receptors. *J Exp Med* 2000;191:1611-1616.
- [48] Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* 2004;172:4503-4509.
- [49] Nandakumar KS, Andren M, Martinsson P, Bajtner E, Hellstrom S, Holmdahl R, Kleinau S. Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB. *Eur J Immunol* 2003;33:2269-2277.
- [50] Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 2002;16:157-168.
- [51] Monach PA, Nigrovic PA, Chen M, Hock H, Lee DM, Benoist C, Mathis D. Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis: critical

- producers of Fc receptor  $\gamma$ , the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1. *Arthritis Rheum* 2010;62:753-764.
- [52] Hara H, Wada T, Bakal C, Kozieradzki I, Suzuki S, Suzuki N, Nghiem M, Griffiths EK, Krawczyk C, Bauer B, D'Acquisto F, Ghosh S, Yeh WC, Baier G, Rottapel R, Penninger JM. The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity* 2003;18:763-775.
- [53] Wang D, You Y, Case SM, McAllister-Lucas LM, Wang L, DiStefano PS, Nunez G, Bertin J, Lin X. A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat Immunol* 2002;3:830-835.
- [54] Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene* 2006;25:6758-6780.
- [55] Blonska M, Lin X. NF- $\kappa$ B signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. *Cell Res* 2011;21:55-70.
- [56] Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680-6684.
- [57] Ruland J. CARD9 signaling in the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:35-44.
- [58] Bertin J, Guo Y, Wang L, Srinivasula SM, Jacobson MD, Poyet JL, Merriam S, Du MQ, Dyer MJ, Robison KE, DiStefano PS, Alnemri ES. CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2000;275:41082-41086.
- [59] Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, Ruland J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 2006;442:651-656.
- [60] Hsu YM, Zhang Y, You Y, Wang D, Li H, Duramad O, Qin XF, Dong C, Lin X. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* 2007;8:198-205.
- [61] Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger JM, Saito T. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2007;8:619-629.

- [62] Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, Hanneschlager N, Schlee M, Rothenfusser S, Barchet W, Kato H, Akira S, Inoue S, Endres S, Peschel C, Hartmann G, Hornung V, Ruland J. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 $\beta$  production. *Nat Immunol* 2009.
- [63] Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010;10:387-402.
- [64] Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005;22:507-517.
- [65] LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, Reis e Sousa C. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 2007;8:630-638.
- [66] Strasser D, Neumann K, Bergmann H, Marakalala MJ, Guler R, Rojowska A, Hopfner KP, Brombacher F, Urlaub H, Baier G, Brown GD, Leitges M, Ruland J. Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C- $\delta$  to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity. *Immunity* 2012;36:32-42.
- [67] Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 2009;206:2037-2051.
- [68] Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, Salzer U, Pfeifer D, Veelken H, Warnatz K, Tahami F, Jamal S, Manguiat A, Rezaei N, Amirzargar AA, Plebani A, Hanneschlager N, Gross O, Ruland J, Grimbacher B. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009;361:1727-1735.
- [69] Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002;16:547-558.
- [70] Jakus Z, Simon E, Balázs B, Mócsai A. Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1899-1910.



- [71] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-687.
- [72] Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* 2004;2:e169.
- [73] Ffrench-Constant C, Colognato H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 2004;14:678-686.
- [74] Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 1998;188:119-131.
- [75] Shappell SB, Toman C, Anderson DC, Taylor AA, Entman ML, Smith CW. Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J Immunol* 1990;144:2702-2711.
- [76] Wilson RW, Ballantyne CM, Smith CW, Montgomery C, Bradley A, O'Brien WE, Beaudet AL. Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol* 1993;151:1571-1578.
- [77] Ferrante A, Martin AJ, Bates EJ, Goh DH, Harvey DP, Parsons D, Rathjen DA, Russ G, Dayer JM. Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated neutrophils. The role of serum opsonins, integrin receptors, respiratory burst, and degranulation. *J Immunol* 1993;151:4821-4828.
- [78] Lowell CA, Fumagalli L, Berton G. Deficiency of Src family kinases p59/61<sup>hck</sup> and p58<sup>c-fgr</sup> results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol* 1996;133:895-910.
- [79] Suen PW, Ilic D, Cavegion E, Berton G, Damsky CH, Lowell CA. Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck/Fgr deficient macrophages. *J Cell Sci* 1999;112 ( Pt 22):4067-4078.
- [80] Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol* 1999;162:1120-1126.
- [81] Vines CM, Potter JW, Xu Y, Geahlen RL, Costello PS, Tybulewicz VL, Lowell CA, Chang PW, Gresham HD, Willman CL. Inhibition of  $\beta_2$  integrin receptor

- and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* 2001;15:507-519.
- [82] Newbrough SA, Mócsai A, Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, Lowell CA, Koretzky GA. SLP-76 regulates Fc $\gamma$  receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2003;19:761-769.
- [83] Graham DB, Robertson CM, Bautista J, Mascarenhas F, Diacovo MJ, Montgrain V, Lam SK, Cremasco V, Dunne WM, Faccio R, Coopersmith CM, Swat W. Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC $\gamma$ 2 signaling axis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3445-3452.
- [84] Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Sieftring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 2003;302:445-449.
- [85] Sun CX, Downey GP, Zhu F, Koh AL, Thang H, Glogauer M. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood* 2004;104:3758-3765.
- [86] Szczur K, Zheng Y, Filippi MD. The small Rho GTPase Cdc42 regulates neutrophil polarity via CD11b integrin signaling. *Blood* 2009;114:4527-4537.
- [87] Pestonjamas KN, Forster C, Sun C, Gardiner EM, Bohl B, Weiner O, Bokoch GM, Glogauer M. Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis. *Blood* 2006;108:2814-2820.
- [88] Filippi MD, Szczur K, Harris CE, Berclaz PY. Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung. *Blood* 2007;109:1257-1264.
- [89] Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA, Dinauer MC, Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood* 2004;104:832-839.
- [90] Kim C, Dinauer MC. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol* 2001;166:1223-1232.
- [91] Kim C, Dinauer MC. Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47phox and

- p67phox and can be rescued by exogenous arachidonic acid. *J Leukoc Biol* 2006;79:223-234.
- [92] Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, Spaetti A, Pollock JD, Borneo JB, Bradford GB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Williams DA. Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* 1999;10:183-196.
- [93] Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, Gonzalez-Aller C, Hiester A, deBoer M, Harbeck RJ, Oyer R, Johnson GL, Roos D. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4654-4659.
- [94] Williams DA, Tao W, Yang F, Kim C, Gu Y, Mansfield P, Levine JE, Petryniak B, Derrow CW, Harris C, Jia B, Zheng Y, Ambruso DR, Lowe JB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Boxer L. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* 2000;96:1646-1654.
- [95] Pai SY, Kim C, Williams DA. Rac GTPases in human diseases. *Dis Markers* 2010;29:177-187.
- [96] Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 2003;114:201-214.
- [97] Huvneers S, Danen EH. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 2009;122:1059-1069.
- [98] DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:572-582.
- [99] Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 1990;343:377-381.
- [100] Moran MF, Polakis P, McCormick F, Pawson T, Ellis C. Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular

- distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* 1991;11:1804-1812.
- [101] Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ. c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* 1995;130:355-368.
- [102] Settleman J, Narasimhan V, Foster LC, Weinberg RA. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* 1992;69:539-549.
- [103] Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. p190RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* 2001;3:361-367.
- [104] Nakahara H, Mueller SC, Nomizu M, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT. Activation of  $\beta_1$  integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem* 1998;273:9-12.
- [105] Hernandez SE, Settleman J, Koleske AJ. Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr Biol* 2004;14:691-696.
- [106] Bass MD, Morgan MR, Roach KA, Settleman J, Goryachev AB, Humphries MJ. p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from  $\alpha_5\beta_1$  integrin and syndecan-4. *J Cell Biol* 2008;181:1013-1026.
- [107] Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* 1992;359:153-154.
- [108] Ridley AJ, Self AJ, Kasmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, Ellis C. Rho family GTPase activating proteins p190, Bcr and RhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* 1993;12:5151-5160.
- [109] Lévy M, Settleman J, Ligeti E. Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry* 2009;48:8615-8623.
- [110] Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* 2001;12:2711-2720.

- [111] Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT, Settleman J. The adhesion signaling molecule p190RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* 2000;127:4891-4903.
- [112] Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell* 1993;4:1217-1223.
- [113] Dusi S, Donini M, Wientjes F, Rossi F. Translocation of p190rho guanosine triphosphatase-activating protein from cytosol to the membrane in human neutrophils stimulated with different agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:859-862.
- [114] Dib K, Melander F, Andersson T. Role of p190RhoGAP in  $\beta_2$  integrin regulation of RhoA in human neutrophils. *J Immunol* 2001;166:6311-6322.
- [115] Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J* 2001;355:851-858.
- [116] Baruzzi A, Cavegion E, Berton G. Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2175-2190.
- [117] Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:223-243.
- [118] Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2003;2:119-125.
- [119] Czirjak L, Szegedi G. Patient care management in autoimmune disorders--the structure of treatment. *Orv Hetil* 2007;148 Suppl 1:78-80.
- [120] Thomas SL, Griffiths C, Smeeth L, Rooney C, Hall AJ. Burden of mortality associated with autoimmune diseases among females in the United Kingdom. *Am J Public Health* 2010;100:2279-2287.
- [121] Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340-350.

- [122] Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, Oppermann U, Dilthey A, Pirinen M, Stone MA, Appleton L, Moutsianas L, Leslie S, Wordsworth T, Kenna TJ, Karaderi T, Thomas GP, Ward MM, Weisman MH, Farrar C, Bradbury LA, Danoy P, Inman RD, Maksymowych W, Gladman D, Rahman P, Morgan A, Marzo-Ortega H, Bowness P, Gaffney K, Gaston JS, Smith M, Bruges-Armas J, Couto AR, Sorrentino R, Paladini F, Ferreira MA, Xu H, Liu Y, Jiang L, Lopez-Larrea C, Diaz-Pena R, Lopez-Vazquez A, Zayats T, Band G, Bellenguez C, Blackburn H, Blackwell JM, Bramon E, Bumpstead SJ, Casas JP, Corvin A, Craddock N, Deloukas P, Dronov S, Duncanson A, Edkins S, Freeman C, Gillman M, Gray E, Gwilliam R, Hammond N, Hunt SE, Jankowski J, Jayakumar A, Langford C, Liddle J, Markus HS, Mathew CG, McCann OT, McCarthy MI, Palmer CN, Peltonen L, Plomin R, Potter SC, Rautanen A, Ravindrarajah R, Ricketts M, Samani N, Sawcer SJ, Strange A, Trembath RC, Viswanathan AC, Waller M, Weston P, Whittaker P, Widaa S, Wood NW, McVean G, Reveille JD, Wordsworth BP, Brown MA, Donnelly P. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 2011;43:761-767.
- [123] Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4371-4378.
- [124] Hardy TA, Blum S, McCombe PA, Reddel SW. Guillain-Barré syndrome: modern theories of etiology. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11:197-204.
- [125] Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion* 1999;39:1239-1246.
- [126] Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903-911.
- [127] Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009;373:659-672.
- [128] Kiss CG, Lovei C, Suto G, Varju C, Nagy Z, Fuzesi Z, Illes T, Czirjak L. Prevalence of rheumatoid arthritis in the South-Transdanubian region of Hungary based on a representative survey of 10,000 inhabitants. *J Rheumatol* 2005;32:1688-1690.

- [129] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094-1108.
- [130] Cooles FA, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:233-240.
- [131] Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 2011;343:289-302.
- [132] Kinne RW, Stuhlmuller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Macrophages. Arthritis Res Ther* 2007;9:224.
- [133] Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984;27:845-851.
- [134] Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010;327:580-583.
- [135] Cascao R. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 2010;9:531-535.
- [136] Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1997;18:320-324.
- [137] Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010;49:1618-1631.
- [138] Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra19.
- [139] Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra20.
- [140] Binstadt BA, Patel PR, Alencar H, Nigrovic PA, Lee DM, Mahmood U, Weissleder R, Mathis D, Benoist C. Particularities of the vasculature can

- promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nat Immunol* 2006;7:284-292.
- [141] Wipke BT, Wang Z, Nagengast W, Reichert DE, Allen PM. Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes. *J Immunol* 2004;172:7694-7702.
- [142] Mohr W, Westerhellweg H, Wessinghage D. Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. An electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1981;40:396-399.
- [143] Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002;118:664-671.
- [144] Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Till GO, Diaz LA. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997;100:1256-1263.
- [145] Chen R, Fairley JA, Zhao ML, Giudice GJ, Zillikens D, Diaz LA, Liu Z. Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. *J Immunol* 2002;169:3987-3992.
- [146] Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc $\gamma$ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol* 2002;161:301-311.
- [147] Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol* 2007;212:56-65.
- [148] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15:623-625.
- [149] Quayle JA, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity



- immunoglobulin G receptor, Fc $\gamma$ RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology* 1997;91:266-273.
- [150] Ohara M, Saniabadi AR, Kokuma S, Hirata I, Adachi M, Agishi T, Kasukawa R. Granulocytapheresis in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Artif Organs* 1997;21:989-994.
- [151] Sanmarti R, Marsal S, Valverde J, Casado E, Lafuente R, Kashiwagi N, Rodriguez-Cros JR, Erra A, Reina D, Gratacos J. Adsorptive granulocyte/monocyte apheresis for the treatment of refractory rheumatoid arthritis: an open pilot multicentre trial. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1140-1144.
- [152] Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996;87:811-822.
- [153] Nandakumar KS, Holmdahl R. Collagen antibody induced arthritis. *Methods Mol Med* 2007;136:215-223.
- [154] Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451-461.
- [155] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslari E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025-4031.
- [156] Taylor PC. Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:164-169.
- [157] McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-442.
- [158] Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother* 2006;60:648-655.
- [159] Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001;167:1601-1608.

- [160] Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, Orkin SH. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 2003;18:109-120.
- [161] Jonsson H, Allen P, Peng SL. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat Med* 2005;11:666-671.
- [162] Dzhagalov I, St John A, He YW. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* 2007;109:1620-1626.
- [163] Steimer DA, Boyd K, Takeuchi O, Fisher JK, Zambetti GP, Opferman JT. Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood* 2009;113:2805-2815.
- [164] Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, Wicks IP. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11398-11403.
- [165] Eyles JL, Hickey MJ, Norman MU, Croker BA, Roberts AW, Drake SF, James WG, Metcalf D, Campbell IK, Wicks IP. A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood* 2008;112:5193-5201.
- [166] Kagari T, Doi H, Shimoizato T. The importance of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol* 2002;169:1459-1466.
- [167] Sehnert B, Cavcic A, Bohm B, Kalden JR, Nandakumar KS, Holmdahl R, Burkhardt H. Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2347-2359.
- [168] Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, Daron M, Bruhns P. Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor Fc $\gamma$ RIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011;186:1899-1903.
- [169] Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, Mathis D, Benoist C. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 2002;3:360-365.

- [170] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res* 2010;339:269-280.
- [171] Watts GM, Beurskens FJ, Martin-Padura I, Ballantyne CM, Klickstein LB, Brenner MB, Lee DM. Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1. *J Immunol* 2005;174:3668-3675.
- [172] Schwab N, Ulzheimer JC, Fox RJ, Schneider-Hohendorf T, Kieseier BC, Monoranu CM, Staugaitis SM, Welch W, Jilek S, Du Pasquier RA, Bruck W, Toyka KV, Ransohoff RM, Wiendl H. Fatal PML associated with efalizumab therapy: Insights into integrin  $\alpha_L\beta_2$  in JC virus control. *Neurology* 2012;78:458-467.
- [173] Jurgens MS, Jacobs JW, Bijlsma JW. The use of conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs in established RA. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011;25:523-533.
- [174] Borchers AT, Keen CL, Cheema GS, Gershwin ME. The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:465-483.
- [175] Scott DL. Biologics-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91:30-43.
- [176] Torgerson SR, Haddad RY, Atallah E. Chronic myelogenous leukemia for primary care physicians. *Dis Mon* 2012;58:168-176.
- [177] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:164-172.
- [178] Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451-1464.
- [179] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355:2408-2417.

- [180] O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:2242-2249.
- [181] Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boque C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Sztatrowski T, Shapiro D, Baccarani M. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362:2260-2270.
- [182] Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362:2251-2259.
- [183] Fleischmann R. Novel small-molecular therapeutics for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:335-341.
- [184] Kremer JM, Cohen S, Wilkinson BE, Connell CA, French JL, Gomez-Reino J, Gruben D, Kanik KS, Krishnaswami S, Pascual-Ramos V, Wallenstein G, Zwillich SH. A phase IIb dose-ranging study of the oral JAK inhibitor tofacitinib (CP-690,550) versus placebo in combination with background methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate alone. *Arthritis Rheum* 2012;64:970-981.
- [185] Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, Grossbard E. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2008;58:3309-3318.
- [186] Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2010;363:1303-1312.
- [187] Pereira I, Fialho S, Castro G, Zimmermann A. Imatinib mesylate induces clinical remission in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2010;77:372-373.
- [188] Lindauer M, Hochhaus A. Dasatinib. *Recent Results Cancer Res* 2010;184:83-102.

- [189] Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004;305:399-401.
- [190] Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2007;7:345-356.
- [191] Steinberg M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther* 2007;29:2289-2308.
- [192] Sakurai D, Yamasaki S, Arase K, Park SY, Arase H, Konno A, Saito T. FcεRIγ-ITAM is differentially required for mast cell function in vivo. *J Immunol* 2004;172:2374-2381.
- [193] Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, Plyte S, Millar DG, Bouchard D, Wakeham A, Ohashi PS, Mak TW. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 2001;104:33-42.
- [194] Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995;378:298-302.
- [195] Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mócsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn ML. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 2003;299:247-251.
- [196] Pang YY, Schwartz J, Thoendel M, Ackermann LW, Horswill AR, Nauseef WM. agr-Dependent interactions of *Staphylococcus aureus* USA300 with human polymorphonuclear neutrophils. *J Innate Immun* 2010;2:546-559.
- [197] Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2000;15:1477-1488.
- [198] Davoine F, Lavigne S, Chakir J, Ferland C, Boulay ME, Laviolette M. Expression of FcγRIII (CD16) on human peripheral blood eosinophils increases in allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:463-469.

- [199] Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol* 2000;164:4321-4331.
- [200] Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280-288.
- [201] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
- [202] Jacobs JP, Ortiz-Lopez A, Campbell JJ, Gerard CJ, Mathis D, Benoist C. Deficiency of CXCR2, but not other chemokine receptors, attenuates autoantibody-mediated arthritis in a murine model. *Arthritis Rheum* 2010;62:1921-1932.
- [203] Solomon S, Rajasekaran N, Jeisy-Walder E, Snapper SB, Illges H. A crucial role for macrophages in the pathology of K/BxN serum-induced arthritis. *Eur J Immunol* 2005;35:3064-3073.
- [204] Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* 2010;33:266-278.
- [205] Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: A cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002;297:1689-1692.
- [206] Zhou JS, Xing W, Friend DS, Austen KF, Katz HR. Mast cell deficiency in Kit<sup>W-sh</sup> mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J Exp Med* 2007;204:2797-2802.
- [207] Ory S, Munari-Silem Y, Fort P, Jurdic P. Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J Cell Sci* 2000;113:1177-1188.
- [208] Diebold BA, Fowler B, Lu J, Dinauer MC, Bokoch GM. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2004;279:28136-28142.

- [209] Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, O. D, Bokoch GM, Groffen J, Heisterkamp N. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 1995;80:719-728.
- [210] Sordella R, Classon M, Hu KQ, Matheson SF, Brouns MR, Fine B, Zhang L, Takami H, Yamada Y, Settleman J. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev Cell* 2002;2:553-565.
- [211] Chakravarty G, Hadsell D, Buitrago W, Settleman J, Rosen JM. p190-B RhoGAP regulates mammary ductal morphogenesis. *Mol Endocrinol* 2003;17:1054-1065.
- [212] Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* 2003;113:147-158.
- [213] Matheson SF, Hu KQ, Brouns MR, Sordella R, VanderHeide JD, Settleman J. Distinct but overlapping functions for the closely related p190RhoGAPs in neural development. *Dev Neurosci* 2006;28:538-550.
- [214] Jiang W, Betson M, Mulloy R, Foster R, Levay M, Ligeti E, Settleman J. p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3- $\beta$  substrate required for polarized cell migration. *J Biol Chem* 2008;283:20978-20988.
- [215] Vincent S, Settleman J. Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur J Cell Biol* 1999;78:539-548.
- [216] Ren J, Yang M, Qi G, Zheng J, Jia L, Cheng J, Tian C, Li H, Lin X, Du J. Proinflammatory protein CARD9 is essential for infiltration of monocytic fibroblast precursors and cardiac fibrosis caused by Angiotensin II infusion. *Am J Hypertens* 2011;24:701-707.
- [217] Dorhoi A, Desel C, Yermeev V, Pradl L, Brinkmann V, Mollenkopf HJ, Hanke K, Gross O, Ruland J, Kaufmann SH. The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. *J Exp Med* 2010;207:777-792.

- [218] Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T, Appleton LH, Farrar C, Stone MA, Sturrock RD, Brown MA, Wordsworth BP. Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene. *Genes Immun* 2010;11:490-496.



## 12. Saját publikációk jegyzéke

### A tézisek alapjául szolgáló közlemények (időrendben):

- [I] Jakus Z, **Németh T**, Verbeek JS, Mócsai A.  
Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes.  
*J Immunol* 2008;180:618-629.  
Impakt faktor: 6,0
- [II] **Németh T**, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Z, Walzog B, Settleman J, Mócsai A.  
Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice.  
*J Immunol* 2010;185:3064-3075.  
Impakt faktor: 5,7
- [III] **Németh T**, Mócsai A.  
The role of neutrophils in autoimmune diseases.  
*Immunol Lett* 2012;143:9-19., Review  
Impakt faktor: 2,5
- [IV] Futosi K, **Németh T**, Pick R, Vántus T, Walzog B, Mócsai A  
Dasatinib inhibits pro-inflammatory functions of mature human neutrophils.  
*Blood* 2012; 119(21):4981-4991.  
Impakt faktor: 10,6

Dolgozatomban a fenti publikációkra a zárójelben feltüntetett római számokkal utalok.

### Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

- [V] Csölle C, Andó RD, Kittel A, Gölöncser F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, **Németh T**, Mócsai A, Sperlágh B.  
The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice.  
*Int J Neuropsychopharmacol* 2012:1-21.  
(Nyomdában, DOI: 10.1017/S1461145711001933)  
Impakt faktor: 4,7

### 13. A társszerzők közötti munkamegosztás

A doktori értekezésemben bemutatott projektek során több kutatótársam is segítségemre volt. A közleményekben a munkamegosztás az alábbiak szerint alakult (különös tekintettel más PhD-hallgatókra).

#### **A p190RhoGAP szerepe neutrofil granulocitákban és az autoimmun artritisz effektor fázisában**

Németh at al., *J Immunol* 2010

Ezért a projektért elsősorban én voltam a felelős. A p190RhoGAP null mutáns allélt Jeffrey Settleman munkacsoportja hozta létre. A p190RhoGAP-hiányos magzatok hemopoetikus rendszerének transzplantációjával kapcsolatos kezdeti beállításokat Kertész Zsuzsanna és Kovács Miklós végezte. A p190RhoGAP neutrofil granulocitákban betöltött in vitro szerepével – néhány kísérlet erejéig – Kovács Miklós kezdett TDK-hallgató korában foglalkozni, majd kezdő PhD-hallgatóként a projekt témavezetőm döntése alapján hozzám került. A cikkben közölt mérések döntő részét (beleértve a mutáció jellemzését, a p190RhoGAP neutrofil granulocitákban és az autoimmun artritiszben betöltött szerepének vizsgálatát) én végeztem; a publikációban nem szerepelnek a projektfelelős-váltás előtti időszakból adatok. A p190RhoGAP magzatok PCR-alapú elkülönítésében, az adhézió-független zselatináz-ürítés vizsgálatában és a CD18-hiányos egerek K/BxN szérumszfer artritiszben történő lemérésében fontos segítőm volt Futosi Krisztina. A p190RhoGAP-hiányos egerek Zsigmond-kamrában történő migrációjának vizsgálatát Barbara Walzog müncheni munkacsoportja, a baktériumöléssel kapcsolatos – a dolgozatban nem tárgyalt – kísérleteket Hably Csilla végezte.

#### **Az Fc-receptor $\gamma$ -lánc ITAM-tirozinok szerepe neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében és az autoimmun artritisz effektor fázisában**

Az ebben a témában bemutatott eredmények döntően saját méréseimből származnak. A 6.2.1. alfejezetben bemutatott FcR  $\gamma$ -lánc hiányos in vitro karakterizálást Jakus Zoltánnal közösen végeztük és publikáltuk [I], azonban az alfejezetben bemutatott

eredmények saját méréseimből származnak. Az arthritiszes méréseket Futosi Krisztinával együtt végeztem.

**Az CARD9 szerepe neutrofilek és makrofágok Fc $\gamma$ -receptor jelátvitelében, valamint az autoimmun arthritisz effektor fázisában**

A CARD9 projekttel (beleértve a Syk<sup>30</sup> és Bcl10 szerepének vizsgálatát) elsősorban én foglalkoztam. Az arthritiszes mérésekben Futosi Krisztina segített. Az EBA Cassian Sitaru munkacsoportjával kollaborációban (az én részvételemmel) történt.

**A tirozin-kináz gátló dasatinib hatásának vizsgálata érett humán neutrofilekben**

Futosi et al., *Blood* 2012

A dasatinib hatásainak egészséges humán neutrofilekben történő leírásáért Futosi Krisztina volt felelős. A projekt során az én részfeladatomban bemutatott  $\beta_2$ -integrin inside-out szignalizáció és bakteriális fagocitózis dasatinib-érzékenységének vizsgálata volt.

*Az értekezésem eredmény fejezetében bemutatott ábrák nem szerepelnek más PhD-dolgozatban.*

---

<sup>30</sup> A Syk<sup>-/-</sup> neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor-mediált rövidebb távú sejtválaszait Jakus Zoltánnal közösen vizsgáltuk, azonban a dolgozatban bemutatott eredmények saját méréseimből származnak.

## 14. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, dr. Mócsai Attilának, aki TDK-hallgató korom óta követi figyelemmel, segíti és irányítja munkámat. Kutatói példája lenyűgöző és követendő; kulcs egy olyan világhoz, melyben nincsenek lehetetlenek és ahol minden kopogtatásra „Szabad!” a válasz. Hálával tartozom dr. Jakus Zoltánnak azért a fáradhatatlan kitartásért és lankadatlan türelméért, mellyel a kísérletezés kemény, de hallatlanul szép és izgalmas világába vezetett.

Külön köszönöm dr. Hunyady László professzor úrnak, aki intézetvezetőként és dr. Ligeti Erzsébet professzor asszonynak, aki doktori programvezetőként lehetővé tette és segítette munkámat. Köszönet illeti az Élettani Intézet minden munkatársát egy olyan barátságos szakmai és mindennapi légkör megteremtéséért, melyben öröm dolgozni. Külön köszönet dr. Petheő Gábornak a humán neutrofilek tisztítása és dr. Geiszt Miklós munkatársainak a kvantitatív PCR során nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom továbbá állandó segítőimnek, saját korábbi és jelenlegi TDK-hallgatóimnak: dr. Szabó Marcellnek, Weisinger Júliának, Tóth Gergelynek és Vulinovszki Olivérnek a kitartó lelkesedésért és a szorgalmas munkáért. Köszönöm a laborban tevékenykedő összes volt és jelenlegi asszisztensnek, így Benyó Fruzsínának, Duleba Mónikának, Koncz Annának, Simon Edinának és Tóth Annának az értékes háttérmunkát. Köszönöm továbbá a laborban kutató valamennyi munkatársamnak a munkámhoz nyújtott segítségét, valamint Mayer Mátyásnak a p190RhoGAP mutáció leírásához nyújtott segítségét. Külön hálával tartozom Felix Webernek, aki páratlan tájékozottságával és barátságával varázsolta felejthetlenné a mindennapokat.

Köszönetemet szeretném kifejezni dr. Jürgen Rulandnak is, aki rövid időre befogadott laborjába, ahol elkezdhettem a CARD9 fehérjével kapcsolatos vizsgálataimat. Hálával tartozom továbbá munkatársainak mindazért az önzetlenségért, amit irányomban tanúsítottak.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a határtalan türelmet, támogatást, szakmai segítséget és a megszámlálhatatlan sok jót feleségemnek, Futosi Krisztinának, akihez fogható csodát csupán egyetlen egyet kap életében a földi halandó. Köszönöm a szerető támogatást Édesanyámnak, anyai Nagyszüleimnek, Testvéreimnek, Családom minden tagjának.