

# NADPH-oxidáz és protoncsatorna működés vizsgálata immunsejtekben

Doktori értekezés

**Dr. Kovács István**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora, egyetemi docens  
Dr. Petheő Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Hamar Péter, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Koncz Gábor, Ph.D.

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens,

Budapest  
2015

# 1. Tartalomjegyzék

<b>1. Tartalomjegyzék</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Rövidítésjegyzék</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Bevezetés</b> .....	<b>7</b>
3.1 A Nox2 enzimkomplex felépítése, működése és szabályozása .....	8
3.1.1 Nox2 .....	9
3.1.2. p22 <sup>phox</sup> .....	10
3.1.3. p47 <sup>phox</sup> .....	12
3.1.4. p67 <sup>phox</sup> .....	14
3.1.5. p40 <sup>phox</sup> .....	15
3.1.6. Rac .....	16
3.1.7. A phox aktivitáció és aktivitás molekuláris szabályozása.....	16
3.1.8. A phox sejtszinű szabályozása .....	20
3.1.9. A phox-ra ható legfontosabb farmakonok .....	22
3.2. A NADPH-oxidázok aktivitásának mérésére használt leggyakoribb módszerek	23
3.3. A phox-kifejeződés és -aktivitás mennyiségi viszonyai különböző fehérvérsejtekben.....	26
3.4. A phox sejten belüli elhelyezkedése fehérvérsejtekben .....	28
3.5. A Nox2-komplex működésének élettani hatásai .....	29
3.5.1. Antimikrobiális hatások.....	29
3.5.2. Az antigén-prezentációra kifejtett hatások .....	30
3.5.3. Jelátviteli hatások .....	32
3.5.4. Immunmodulációs hatások.....	34
3.6. Egyéb NADPH-oxidáz izotípusok fehérvérsejtekben .....	36
3.7. A feszültségfüggő protoncsatorna felépítése, működése és szabályozása .....	37
3.7.1. A Hv1-re ható legfontosabb farmakonok .....	44
3.8. A feszültségfüggő protoncsatorna kifejeződése fehérvérsejtekben.....	44
3.9. A feszültségfüggő protoncsatorna szerepe fehérvérsejtekben.....	46
<b>4. Célkitűzések</b> .....	<b>50</b>
<b>5. Módszerek</b> .....	<b>51</b>

5.1. Oldatok .....	51
5.2. Egerek.....	52
5.3. Antitestek.....	52
5.4. Sejttenyészet és transzfekció .....	53
5.5. Sejtizolálás.....	54
5.6. Western-blot kísérletek.....	55
5.7. Immuncitokémia.....	56
5.8. Konfokális mikroszkópia és kolokalizációs analízis .....	57
5.9. Fagocitózis vizsgálata.....	58
5.10. A ROS-termelés mérése .....	58
5.11. Nitroblue-tetrazólium (NBT) teszt .....	59
5.12. Az oxigénfogyasztás és pH-változás meghatározása .....	59
5.13. Molekuláris biológia.....	60
5.14. Patch-clamp mérések.....	60
5.15. Az intracelluláris ölési képesség vizsgálata.....	61
5.16. Adatok kiértékelése .....	61
<b>6. Eredmények .....</b>	<b>63</b>
6.1. Emberi fehérvérsejtek Hv1 expressziója .....	63
6.2. A Hv1 emberi granulocitákban stabil dimert alkot .....	64
6.3. A Hv1 granulocitákban elsősorban intracelluláris membránokban helyezkedik el. .....	68
6.4. A fagocitózis során a Hv1 a fagoszómába vándorol .....	70
6.5. PLB-985 sejtekben a protonáram denzitása egyenesen arányos a Hv1 expressziójával.....	72
6.6. A Hv1 és a Nox2 kifejeződése párhuzamosan emelkedik a granulocita fejlődés folyamán. ....	74
6.7. A Hv1 csökkent kifejeződése gátolja az intenzív szuperoxid-termelést .....	75
6.8. Eozinofil granulocitákban magasabb a Hv1 kifejeződése, mint neutrofilekben, míg a phox alegységek mennyisége a két sejtípusban nem tér el lényegesen.....	77
6.9. Eozinofil granulocitákban a Hv1 kifejeződése korrelál a Nox2-ével.....	79
6.10. A ROS-termelés legmagasabb mérhető intenzitása az alkalmazott stimulus és mérési módszer függvénye .....	81

6.11. A két granulocita-típus légzési robbanása során mutatott oxigénfogyasztásában nincs érdemi különbség .....	83
6.12. Az egér peritoneális B-sejtek relatíve intenzív légzési robbanásának háttérében magas cytb <sub>558</sub> expresszió mutatható ki.....	86
6.13. A peritoneális B-sejtek ROS-termeléséért a phox felelős .....	88
6.14. A phox a fagocitózis során a fagoszómában aktiválódik, és hozzájárul a B-limfociták antimikrobiális aktivitásához .....	89
<b>7. Megbeszélés .....</b>	<b>91</b>
7.1. A Hv1 emberi fehérvérsejtekben feszültségfüggő protoncsatoraként működik..	92
7.2. A Hv1 emberi granulocitákban stabil dimereket alkot.....	93
7.3. Emberi granulocitákban a Hv1 a granulumok membránjában és a sejtfelszínen is megtalálható.....	94
7.4. A Hv1 és Nox2 kifejeződése egymástól független.....	95
7.5. A Hv1 a neutrofil granulociták egyedüli protoncsatornája?.....	96
7.6. Az eozinofil granulociták a neutrofileknél több Hv1-et tartalmaznak, a phox alegységek mennyisége azonban a két sejtípustban megegyezik.....	97
7.7. Az eozinofilekben az extracelluláris ROS-termelés dominál, míg neutrofilekben intracellulárisan keletkeznek nagyobb arányban szabadgyökök .....	98
7.8. Az eozinofilek légzési robbanásának összintenzitása kissé magasabb, mint a neutrofileké.....	99
7.9. Emberi fehérvérsejteken nyert adatok összegzése.....	99
7.10. A phox szükséges a peritoneális B-sejtek hatékony baktériumöléséhez.....	101
<b>8. Következtetések .....</b>	<b>103</b>
<b>9. Összefoglalás .....</b>	<b>104</b>
<b>10. Summary .....</b>	<b>105</b>
<b>11. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>106</b>
<b>12. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>126</b>
<b>13. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>127</b>

## 2. Rövidítésjegyzék

AD	aktivációs domén
AIR	autoinhibitoros régió
APC	antigénprezentáló sejt (antigen presenting cell)
ARHGAP	Rho GTP-áz aktiváló protein
BCR	B-sejt receptor (B-cell receptor)
BSA	bovin szérumalbumin
CD	differenciációs marker (cluster of differentiation)
CGD	krónikus granulomatózis (chronic granulomatous disease)
cyt c	citokróm c
cytb <sub>558</sub>	citokróm b <sub>558</sub>
DC	dendritikus sejt (dendritic cell)
DFP	diizopropil-fluorofoszfát
DMFA	dimetilformamid
DPI	difenil-jodónium (diphenyl-iodonium)
DSS	diszukcimidil-szuberát
Duox	Dual oxidase
EC	extracelluláris
ECAR	extracelluláris savanyodási ráta (extracellular acidification rate)
Em	membránpotenciál
Eo/Ne	eozinofil/neutrofil hányados
ER	endoplazmás retikulum
ERK	extraelluláris szignál-szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase)
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FBS	fötális borjúsérum (fetal bovine serum)
fMLP	N-formil-methionil-leucil-phenilalanin
GAP	GTP-áz aktiváló protein
GDI	guanilil disszociáció inhibitor
GEF	guanozin nukleotid cserélő fehérje (guanosin exchange factor)
g <sub>H</sub>	protonkonduktancia
GI puffer	granulocita izoláló puffer
GM-CSF	granulocita-monocita kolóniastimuláló faktor
HBC	hydrogen-bonded chain (hidrogénhid-lánc)
HMS	hexóz-monofoszfát-shunt
HRP	tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
Hv1	feszültségfüggő protoncsatorna
HVCN1	a feszültségfüggő protoncsatorna génjének megjelölése (Hydrogen

	Voltage-gated channel 1)
IC	intracelluláris
IF	immunfluoreszcencia
IFN $\gamma$	interferon- $\gamma$
IL-8	interleukin-8
KO	knock out
LCL	luminol kemilumineszcencia (luminol chemiluminescence)
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén-aktivált proteín kináz
MC	mononukleáris sejt (mononuclear cell)
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
mHv1	a Hv1 egér homológja (mouse Hv1)
MPO	mieloperoxidáz
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát
NBT	nitroblue-tetrazólium
NEM	N-metilmaleimid
NET	neutrofil extracelluláris csapda (neutrophil extracellular trap)
NGS	normál kecskeszérum (normal goat serum)
Nox	NADPH-oxidáz
OCR	oxigénfogyasztási ráta (oxygen consumption rate)
Orai	Orai kalcium felszabadulás-aktivált kalcium modulátor
PB1	phox és Bem1 domén
PBS	pufferként foszfátot tartalmazó sóoldat (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain-reaction)
PDI	proteín-diszulfid-izomeráz
PDM	N'N'-femiléndimaleimid
PerC	hasüreg (peritoneal cavity)
phox	fagocita oxidáz (phagocyte oxidase)
PI(3)P	foszfatidil-inozitol-(3)-foszfát
PI(3,4)P <sub>2</sub>	foszfatidil-inozitol-(3,4)-biszfoszfát
PKC	proteín kináz C
PKD	proteín kináz D
PMA	forbol-mirisztát-acetát (phorbol-myristate-acetate)
PMN	polimorfonukleáris sejt
PMSF	fenilmetánszulfonil-fluorid
PRR	prolingazdag régió (proline-rich region)
PTP	proteín tirozin foszfatáz (protein tyrosine phosphatase)
PX	phox homológ
ROS	reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)
SDS	nátrium dodecyl szulfát (sodium dodecyl sulfate)
SH3	src homológia 3 domén
siRNS	kis interferáló RNS (small interfering RNA)

SOCE	kapacitív Ca <sup>2+</sup> - (belépésstore-operated Ca <sup>2+</sup> -entry)
STIM	stromális kölcsönhatás fehérje (stromal interaction molecule)
STZ	szérum opsonizált zimosán (serum-treated zymosan)
TAT	transzaktivátor protein
TM	transzmembrán szegmens
TNF $\alpha$	tumornekrózis faktor $\alpha$
TPR	tetratrikopeptid ismétlődés (tetratricopeptide repeat)
VSD	feszültségérzékelő domén (voltage sensing domain)
VT	vad típus
WB	Western blot
XF	extracelluláris áramlás (extracellular flux)
$\beta$ -ME	$\beta$ -merkaptóetanol

### 3. Bevezetés

A nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát (NADPH)-oxidáz enzimcsaládba tartozó fehérjék elektronok transzportját katalizálják a sejtmembránon keresztül, melyek molekuláris oxigénnel egyesülve reaktív oxigén származékokat (reactive oxygen species, ROS) képeznek. Noha ROS termelésére melléktermékként több enzimszisztéma is képes (mitokondriális légzési lánc, lipoxigenáz), a NADPH-oxidázok azon ritka enzimek közé tartoznak, amelyek a szabadgyökök szabályozott termelésére specializálódtak [1]. Az enzimcsalád tagjai többségében többkomponensű enzimkomplexek, melyek membránkötött és citoszolikus alegységekből épülnek fel. Az elektrontranszportért az előbbieket, azon belül is az ún. központi alegységeket felelősek. Emberben a NADPH-oxidázok hét központi alegysége ismert: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 és Duox2 [2]. Az enzimcsalád tagjai a legkülönbözőbb szövetekben fordulnak elő, és olyan élettani és kóros folyamatokban játszanak szerepet, mint a pajzsmirigyhormonok termelése [3], az otoconiumok szintézise [4], a spermiumok motilitásának szabályozása [5], vagy a magasvérnyomás betegség kialakulása [6]. A NADPH-oxidázok legjobban ismert és a legjelentősebbek közé tartozó funkciója azonban a Nox2 enzimkomplexhez köthető. Az Nox2 aktivitása kapcsán keletkező ROS ugyanis fagocitákban a kórokozók hatékony eliminálását segítik elő. Emiatt az irodalomban a Nox2 enzimkomplexet fagocita oxidázként (*phagocyte oxidase*, *phox*) is említik. A Nox2 komplex veleszületett defektusa visszatérő és elhúzódó bakteriális és gombás fertőzésekhez vezet. Ezt az állapotot krónikus granulomatózus betegségnek (*chronic granulomatous disease*, CGD) nevezik. A *phox* jelenlétét a mieloid eredetű fagocitózisra képes sejtek (pl. neutrofil és eozinofil granulociták, monociták, makrofágok és dendritikus sejtek) mellett B-limfocitákban is leírták. A fagocita oxidáz felépítését, működését, élettani és patológias folyamatokban betöltött szerepét számos összefoglaló közlemény tárgyalja [7–9]

A NADPH-oxidázok által katalizált elektrontranszport a membrán depolarizációjához vezet, a NADPH oxidációja következtében pedig az intracelluláris tér pH-jának csökkenése következik be. A fenti folyamatok mind gátolják a *phox* működését, ezért az enzim falósejtekben tapasztalható tartósan intenzív működéséhez



kompenzációs mechanizmusok szükségesek [7]. Az egyik leghatékonyabb kompenzáló mechanizmus a feszültségfüggő protoncsatornán (Hv1) keresztüli  $H^+$ -kiáramlás, amellyel mindkét imént említett probléma orvosolható. A Hv1 jelentőségét a phox-aktivitás támogatásában jelzi, hogy Hv1 hiányos egerek granulocitái 35-80%-kal kevesebb ROS-t termelnek [10].

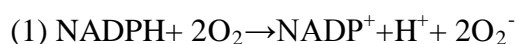
Jelen írás legfőképpen a Nox2-komplex és a feszültségfüggő protoncsatorna fehérvérsejtekben betöltött szerepének bemutatásával foglalkozik, röviden kitérve a fehérvérsejtekben leírt egyéb NADPH-oxidázokra is, a későbbi fejezetekben pedig a témával kapcsolatos saját kutatási eredmények kerülnek bemutatásra.

### 3.1 A Nox2 enzinkomplex felépítése, működése és szabályozása

Az aktív Nox2-komplex a következő alegységekből épül fel: Nox2, más néven gp91<sup>phox</sup> (a név a glikoprotein természetű, 91 kDa molekulatömegű phox alegység rövidítése), p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> és Rac. A Nox2 és a p22<sup>phox</sup> együttesen alkotják a komplex membránköötött részét, melyet citokróm b<sub>558</sub>-nak (cytb<sub>558</sub>) neveznek. A fennmaradó, ún citoszolikus alegységek közül a p67<sup>phox</sup>, a p47<sup>phox</sup> és a p40<sup>phox</sup> egymással 1:1:1 sztöchiometriájú komplexet képez, míg a Rac monomerként fordul elő a citoplazmában [11]. A citoszolikus alegységek aktiváló ingerek hatására kölcsönhatásba lépnek a cytb<sub>558</sub>-cal, megindítva ezzel az enzim működését.

A nemzetközi irodalomban a Nox2 megnevezés vonatkozhat a központi alegységre és a komplex egészére egyaránt. A konfúzió elkerülése végett a továbbiakban a központi alegységet Nox2-ként, vagy gp91<sup>phox</sup>-ként említem, míg a teljes komplexre a Nox2-(enzim)komplex, phox, esetleg oxidáz megnevezést használom.

Ahogy a bevezetőben már leírtam, a komplex működése során elektronokat transzportál a plazmamembránon keresztül az intracelluláris térből az extracelluláris vagy a fagoszómális térbe. Az enzim működése kizárólag a szubsztrátokat és a végtermékeket figyelembe véve az alábbi reakcióegyenlettel írható le [12]:



Amint az egyenlethől kitűnik, az enzim működése molekuláris oxigént igényel, ezáltal növelve a sejtek oxigénfogyasztását. A fagocitákban tapasztalható intenzív Nox2 aktivációt ezért légzési robbanásnak is nevezik [2].

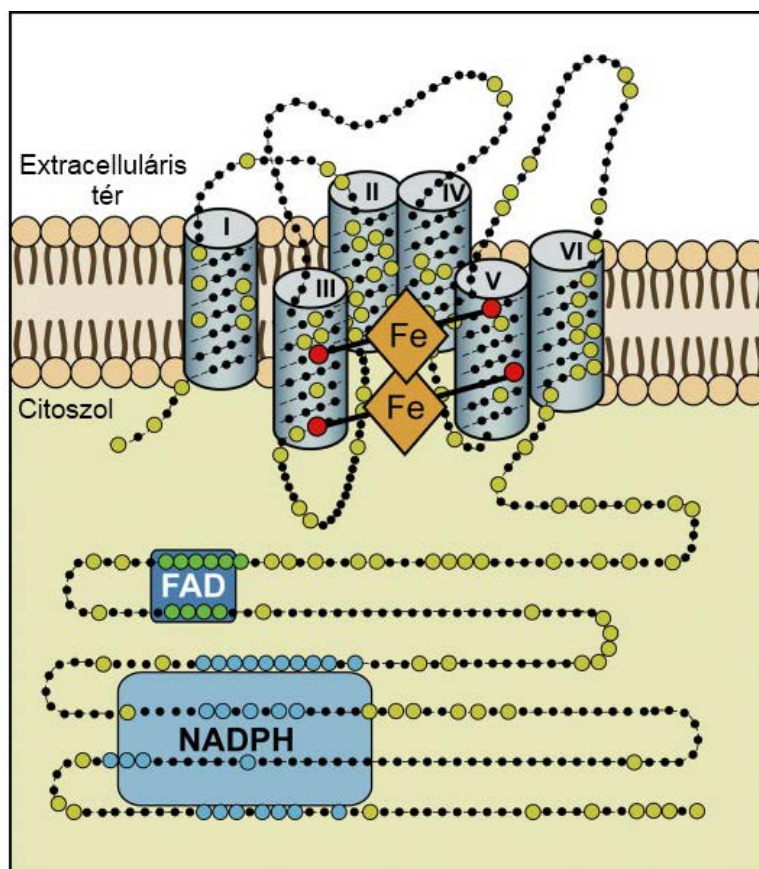
A reakció termékeként keletkező szuperoxid anion ( $O_2^-$ ) féléletideje rövid, mivel spontán vagy szuperoxid dizmutáz segítségével hidrogén peroxiddá ( $H_2O_2$ ), majd különböző peroxidázok által az erősen reaktív hipoklorittá (HOCl) alakul, mely vegyületek (egyebek mellett) mind a ROS csoportjába tartoznak. A fenti vegyületek valamennyi hatásukat különböző molekulák (per)oxidálásán keresztül fejtik ki, mely hatások közül falósejtekben a kórokozók károsítását tartják a legfontosabbnak. Az oxigén származékok szerepének részletes leírása előtt azonban ismerkedjünk meg az egyes phox alegységekkel. A következő fejezetekben elsősorban az emberi fehérjéről esik szó, ahol indokolt, egyéb fajok homológ proteinjei is említésre kerülnek.

### 3.1.1 Nox2

A Nox2 génje az X kromoszómán található [13], defektusa a CGD-s esetek kétharmadáért felelős. A kromoszómális lokalizáció miatt a CGD ezen típusa fiúkban gyakoribb [14].

A Nox2 570 aminosavból épül fel, az érett fehérje erősen glikozilált, Western blottal megfigyelhető molekulatömege 70-90 kDa [15]. Szerkezetének hidropátiás elemzése alapján 6 transzmembrán szegmenssel (6-TM) rendelkezik, az N- és C-terminális egyaránt citoszolikusán található (1. ábra) [16–18]. Az elektrontranszport a fehérjén belül a következőképp valósul meg. Az elektron a C-terminális közelében található NADPH-, és flavin-adenin-dinukleotid (FAD)-kötő doméneken (ld. 1. ábra) megkötött NADPH-ról a FAD-ra vándorol. Ezt követően a hármas és ötös TM domén 1-1 pár hisztidinje által koordinált belső, majd külső hemre kerül, hogy ott  $O_2$ -vel egyesülve szuperoxidot képezzen [19].

A fenti folyamat katalizálására a Nox2 csak egyéb alegységekkel szorosan együttműködve képes:  $p22^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ , Rac [2]. A kölcsönhatások szerepére az egyes alegységeknél részletesen kitérek.



**1. ábra. A Nox2 feltételezett szerkezete.** A Nox2 kristályszerkezete nem ismert, a szerkezeti adatok indirekt bizonyítékokon alapulnak. A szuperoxidképzéshez szükséges elektrontranszport-lánc mind a 4 redox centrumát a Nox2 tartalmazza, illetve köti meg. Citoszolikusán találhatóak a NADPH- és FAD-kötő domének, az elektrontranszport az itt megkötött NADPH-n és FAD-on keresztül indul meg. A Nox2 6 transzmembrán szegmessel rendelkezik, melyek közül a III-as és az V-ös-ben található 2-2 hisztidin koordinálja az elektrontranszportban részt vevő két hemet. A lánc végén egy molekuláris oxigén-molekula található, melyet az extracelluláris tér felé néző hem köt meg. [2] alapján.

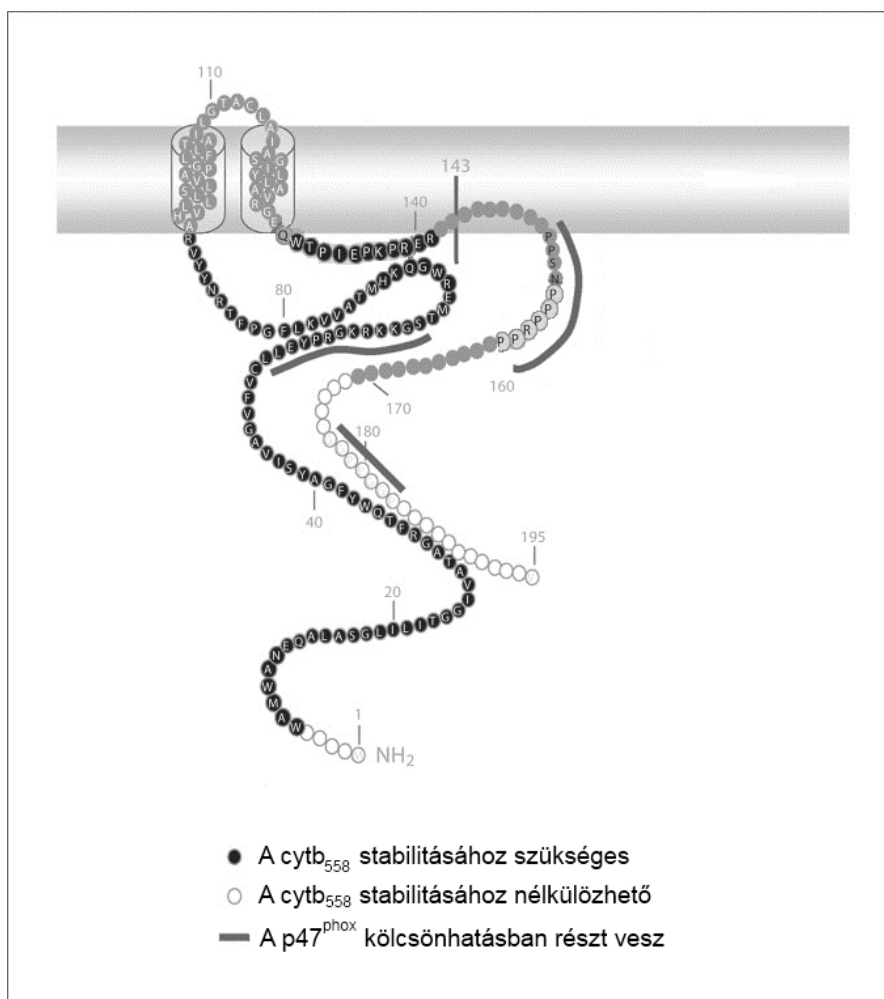
### 3.1.2. $p22^{phox}$

A  $p22^{phox}$ -ot kódoló gén defektusa autoszómális recesszív módon öröklődő CGD-t okoz, mely az összes eset kb. 5%-ért felelős [14]. A Nox2 mellett a  $p22^{phox}$  a Nox1, Nox3 és Nox4 izoformák stabilitásáért is felelős [20,21]. Noha egerekben  $p22^{phox}$

hiányában az immundefektus mellett egyéb, nem immunológiai jellegű tünetek is kialakultak (pl. egyensúlyzavar), embereken a CGD-re jellemző panaszok mellett egyéb eltérést nem találtak [22].

A p22<sup>phox</sup> 195 aminosavból épül fel, és nem glikozilálódik [23,24]. A Nox2-höz hasonlóan integráns membránfehérje, mely 2 TM szegmenssel rendelkezik (az N- és C-terminális egyaránt intracelluláris elhelyezkedésű, 2. ábra) [16].

A p22<sup>phox</sup> fehérje a Nox2-komplexen belül a következő funkciókkal rendelkezik: i) a Nox2 érésének elősegítése és membránban való stabilizálása, ii) citoszolikus alegységekkel való interakció. A Nox2-vel kialakított kapcsolatért a fehérje N- és C-terminálisán egy-egy domén felelős (2. ábra) [25]. A kölcsönhatás jelentőségét jelzi, hogy falósejtekben a cytb<sub>558</sub> alegységei csak heterodimerként stabilak, a monomerek a proteozómában lebomlanak [26]. Ennek megfelelően a Nox2 hiányos betegek fagocitáiban a p22<sup>phox</sup> sem található meg fehérjeszinten, és vica versa [27]. A p22<sup>phox</sup> C-terminális prolin-gazdag régiója (proline rich region - PRR) emellett a komplex aktivációja során a p47<sup>phox</sup>-szal is kölcsönhatásba lép [28], mely a normál működés elengedhetetlen feltétele [20]. Egyesek a p22<sup>phox</sup>-p67<sup>phox</sup> interakció létezésére is bizonyítékot találtak [29,30], mely kapcsolat a p22<sup>phox</sup>-p47<sup>phox</sup> kölcsönhatásnál kisebb affinitású. Feltehetően emiatt több szerző az interakciót aspecifikusnak tekinti [2,31].



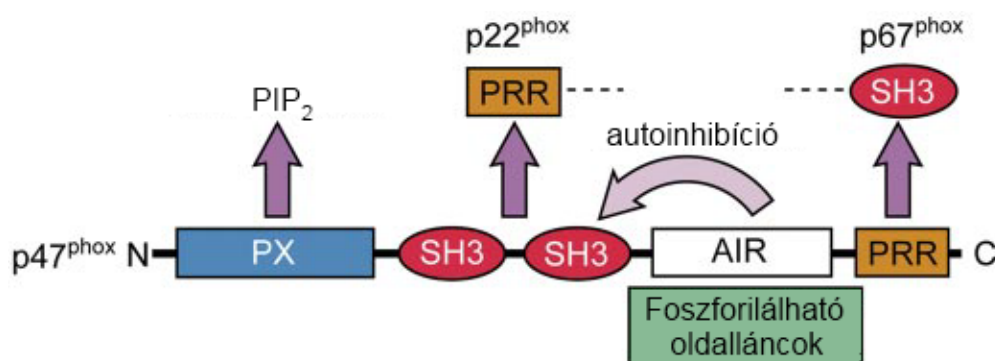
**2. ábra. A  $\text{p22}^{\text{phox}}$  feltételezett szerkezete.** Krisztallográfias eredmények hiányában a struktúrára indirekt adatok alapján következtettek. A  $\text{p22}^{\text{phox}}$  két transzmembrán doménnel rendelkezik. A fehérjének két fő feladata van. Az egyik a Nox2 stabilizálása a membránban. Az ehhez elengedhetetlen aminosavakat fekete körök jelölik, a nélkülözhetőket fehér karikák jelölik. A másik fontos feladat a komplex összeállása során a  $\text{p47}^{\text{phox}}$  kötése, melyben a szürke csíkkal jelölt (zömében prolinban gazdag) aminosavak vesznek részt. [32] alapján.

### 3.1.3. $\text{p47}^{\text{phox}}$

A  $\text{p47}^{\text{phox}}$  génje a 7-es kromoszómán található, hibája a CGD-k 20%-áért felelős, ezzel az autoszómális-recesszív módon öröklődő CGD leggyakoribb oka [14].

A  $\text{p47}^{\text{phox}}$  390 aminosavból épül fel, molekulatömege 44,7 kDa [33,34]. A fehérje a következő doménekel rendelkezik (3. ábra): N-terminálisan egy phox homológ (ún.

PX) domén található, mely a foszfatidil-inozitol (3,4) biszfoszfát [PI(3,4)P<sub>2</sub>] kötésért felelős. A PX domént két tandem Src homológia 3 (SH3) domén követi. Ezen régió feladata a p22<sup>phox</sup>-szal kialakuló kapcsolat létrehozása (3. ábra). Az autoinhibitoros régió (AIR) a p47<sup>phox</sup> saját SH3 doménjeihez kötődik, meggátolva azok működését. Az AIR több foszforilálható aminosav-oldalláncot is tartalmaz, mely megteremti a szabályozás lehetőségét. A foszforiláció hatására az AIR gátló működése megszűnik, lehetővé téve a p22<sup>phox</sup>-szal kialakuló kölcsönhatást. A fehérje C-terminálisán egy prolingazdag régió helyezkedik el, mely a p67<sup>phox</sup> SH3 doménjével alakít ki kapcsolatot [35]. Nyugalmi állapotban tehát az AIR nem foszforilált, így a p47<sup>phox</sup> SH3 doménjeinek gátlása miatt a p22<sup>phox</sup>-p47<sup>phox</sup> interakció nem alakulhat ki. Foszforiláció hatására az SH3 domének gátlása megszűnik, a p47<sup>phox</sup> a többi citoszolikus alegységgel együtt a membránhoz transzlokálódik, elősegítve az oxidáz aktivációját (részletesen lásd a phox szabályozása fejezetet) [36,37]. A fent leírt funkciója miatt a p47<sup>phox</sup>-ot a komplex organizátorának is nevezik [2].

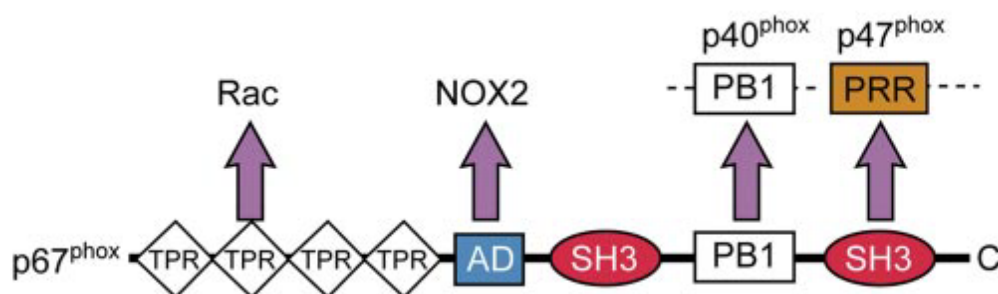


**3. ábra. A p47<sup>phox</sup> doménjei.** N-terminálisan a foszfatidil-inozitol biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) kötésért felelős PX domén található, ezt követik az src homológia 3 (SH3) domének, melyek a p22<sup>phox</sup>-szal kapcsolódnak, míg a C-terminális prolingazdag régió (PRR) a p67<sup>phox</sup>-szal hoz létre kapcsolatot. A Nox2 komplex összeszerelésében kulcsfontosságú az autoinhibitoros régió (AIR), mely foszforilálatlan állapotban a p47<sup>phox</sup> SH3 doménjeihez köt, megakadályozva a p22<sup>phox</sup>-szal létrejövő kölcsönhatást. Foszforiláció hatására az AIR leválik az SH3 doménekről lehetővé téve a komplex összeállítását. [2] alapján.

### 3.1.4. $p67^{\text{phox}}$

A  $p67^{\text{phox}}$  génjének hibája szintén CGD-t okoz, mely az esetek csupán töredékéért (~5%) felelős [14]. A  $p67^{\text{phox}}$  526 aminosavból felépülő fehérje [38], mely szintén több doménnel rendelkezik. N-terminálisan egy tetratricopeptid ismétlődéseket tartalmazó domén (tetratricopeptide repeat-TPR) [39] található, mely a Rac-kal létrejövő kölcsönhatásért felelős [40]. Az ún. aktivációs domén (AD) a  $gp91^{\text{phox}}$ -szal lép kapcsolatba, és az enzimaktivitás serkentésében játszik szerepet [41]. A kísérletes eredmények arra utalnak, hogy az AD a Nox2-n az elektron NADPH-ról FAD-ra történő transzportját segíti elő [42]. Emiatt a  $p67^{\text{phox}}$ -ot a komplex aktivátoraként is említik [2]. A fehérje „phox és Bem1” (PB1) doménje a  $p40^{\text{phox}}$ -szal kialakuló kapcsolatban játszik szerepet [43]. Végül a C-terminálisan elhelyezkedő SH3 domén a  $p47^{\text{phox}}$ -szal létrejövő interakcióban vesz részt [35] (4. ábra), mely kölcsönhatás nélkülözhetetlen a  $p67^{\text{phox}}$  aktivációra bekövetkező membrán-transzlokációjához [44].

A  $p67^{\text{phox}}$  stimulus hatására különböző kinázok által foszforilálódhat: protein kináz C (PKC) [45,46], extracelluláris szignál-regulált kináz 2 (ERK2), p38 mitogén-aktivált protein kináz (p38MAPK) [47]. A foszforiláció szerepe a  $p67^{\text{phox}}$  szabályozásában azonban még kevésbé ismert [11].



**4. ábra. A  $p67^{\text{phox}}$  sematikus szerkezete.** Az N-terminálisan elhelyezkedő tetratricopeptide-repeat (TPR) domének a kis G-fehérje Rac-kal alakítanak ki kölcsönhatást. Az AD-vel jelölt aktivációs domén a Nox2-vel lép interakcióba, ezáltal facilitálva a Nox2-n keresztül megvalósuló elektrontranszportot. A phox-Bem1 (PB1)

domén a p40<sup>phox</sup> hasonló nevű régióját köti, míg a C-terminális src homológia 3 (SH3) domén a p47<sup>phox</sup> kötéséért felelős. [2] alapján.

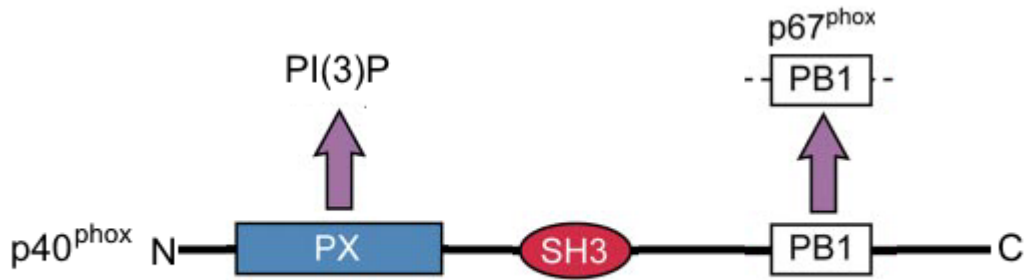
### 3.1.5. p40<sup>phox</sup>

A p40<sup>phox</sup> génje a 22. kromoszómán helyezkedik el [48]. Idáig egyetlen olyan esetet jelentettek, melyben a CGD háttérben a p40<sup>phox</sup> defektusa húzódik meg (ld. lentebb).

A p40<sup>phox</sup> 339 aminosavból épül fel [49], és a következő doménnel rendelkezik. Az N-terminális közelében egy PX-domén található (5. ábra), mely a foszfatidil-inozitol-(3)-foszfáthoz [PI(3)P] kötődik [50]. A domén a p47<sup>phox</sup> hasonló doménjével együttműködve szerepet játszhat a citoszolikus alegységek lokalizációjának szabályozásában [48]. A 175-225. aminosavak által alkotott SH3 domén a p47<sup>phox</sup> PRR-jével lép kapcsolatba, ezáltal versengve a p67<sup>phox</sup> SH3 doménjével [51]. Tekintettel arra, hogy a p47<sup>phox</sup> a p67<sup>phox</sup>-szal alakít ki erősebb kölcsönhatást, a p47<sup>phox</sup>-p40<sup>phox</sup> interakciónak alárendelt szerep jut a komplex kialakításában [52]. A C-terminálisan elhelyezkedő PB1 domén ezzel szemben nagyobb jelentőségű. Ahogy azt korábban leírtam, a fehérje ezen része felelős a p67<sup>phox</sup> kötéséért [43] (5 ábra). A kölcsönhatás fontosságát jól mutatja, hogy p67<sup>phox</sup> hiányában a p40<sup>phox</sup> sem detektálható, a kölcsönhatás tehát a fehérje stabilitását fokozza [53].

A p40<sup>phox</sup> Nox2-komplexben betöltött szerepe nem teljesen tisztázott. Sejtmentes közegben a p40<sup>phox</sup> nem szükséges a hatékony szuperoxid-termeléshez [49]. Intakt sejteken végzett vizsgálatok alapján egyes szerzők arra következtettek, hogy a p40<sup>phox</sup> gátolja a komplex működését [54,55], míg mások aktiváló hatásról számoltak be [56–58]. Az egyetlen olyan eseten keresztül, melyben a CGD háttérben a p40<sup>phox</sup> defektusa húzódik meg, közelebb kerülhetünk a fehérje szerepének megértéséhez. A szóban forgó beteg falósejtjei ugyanis csökkent fagoszómális ROS termeléssel rendelkeznek, míg az extracelluláris térbe irányuló szabadgyök-felszabadulásuk lényegében nem károsodott [59]. A p40<sup>phox</sup> jelentősége feltehetően abban áll, hogy PX-doménjének PI(3)P kötésén keresztül serkenti a komplex fagoszómális membránban történő összeépülését [60].





**5. ábra. A p40<sup>phox</sup> doménjei.** Az N-terminális PX domén a foszfatidil-inozitol-(3)-foszfát kötéséért felelős. A C-terminális phox-Bem1 (PB1) domén a p67<sup>phox</sup>-szal lép kölcsönhatásba. [2] alapján.

### 3.1.6. Rac

A kis G-fehérjék közé tartozó Rac fehérjecsaládnak összesen három tagja van, melyek közül a Rac1 és Rac2 található meg immunsejtekben. Általánosságban elmondható, hogy immunsejtekben a Rac2 a domináns forma, makrofágokban azonban mindkét izotípus megtalálható [60]. Nyugalomban a sejtekben a Rac GDP-kötött, inaktív formája található. A protein GDP-kötött alakját egy, az immunsejtekben jelenlévő fehérje, a Rho-GDI (Rho GDP disszociáció inhibitor) stabilizálja. Stimuláció hatására a guanozin nukleotid cserélő fehérjék (guanosine exchange factor, GEF) segítségével a Rac GTP-kötött, aktív formája alakul ki [61]. Az aktív fehérje prenilcsoportja, illetve polibázikus régiója segítségével a membránhoz köt, ahol kölcsönhatásba lép a Nox2-vel és a p67<sup>phox</sup>-szal [62,63], fokozva ezzel a p67<sup>phox</sup> aktiváló hatását [64].

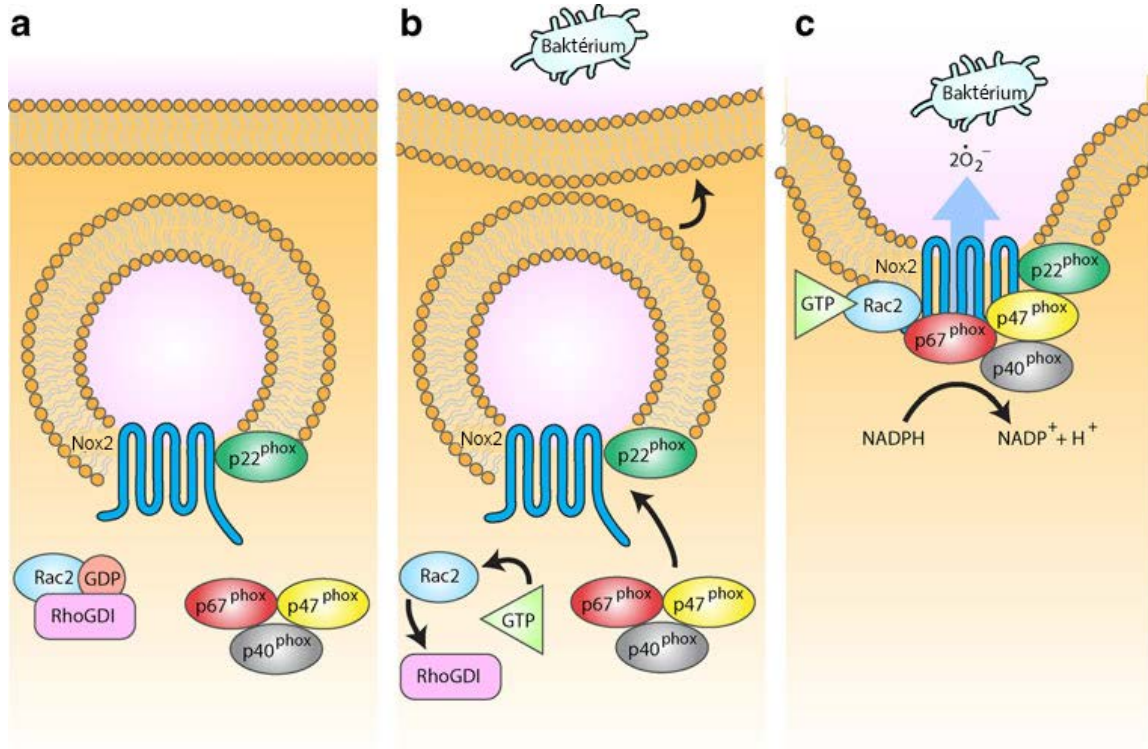
### 3.1.7. A phox aktiváció és aktivitás molekuláris szabályozása

A fentiekből kitűnik, hogy a phox működése számos különböző alegység koordinált együttműködését igényli. Egy ilyen komplexitású rendszer kifejlődése pl. akkor lehet indokolt, ha térben és időben nagyon pontosan szükséges az enzim

aktivitását szabályozni, amit indokolhat, hogy a masszív ROS-termelés potenciálisan a gazdaszerkezetet is veszélyezteti.

A phox aktivitása elméletileg a szubsztrátellátottságon ( $O_2$ , NADPH) keresztül is szabályozható. Az oxigénellátottság csak szélsőséges körülmények között befolyásolja az enzim működését, hiszen az oxidáz aktivitása csak akkor károsodik, ha az oxigén parciális nyomása a légköri 5%-a alá csökken (ilyen alacsony oxigéntenzió alakulhat ki pl. tályogok belsejében) [65]. A NADPH-utánpótlásról a hexóz-monofoszfát-shunt (HMS) enzimek gondoskodnak. A HMS és a phox közötti kapcsolatot jelzi, hogy irodalmi adatok alapján a phox és a HMS egyik tagja, a 6-foszfoglukonát dehidrogenáz az oxidáz citoszolikus alegységeivel ko-immunoprecipitálható. Ezen enzim hiányában a Nox2 NADPH iránti affinitása csökken [66]. Mindemellett a légzési robbanás NADPH-igénye meghaladhatja a HMS kapacitását, emiatt a NADPH ellátottság sebesség-meghatározó lehet, de ez a komplex finom szabályozásában nem játszik jelentős szerepet [65].

A jelenleg legelfogadottabb nézet szerint a phox a következőképp aktiválódik (6. ábra). Nyugalmi állapotban a membránban található alegységek elkülönülnek a citoszolikusaktól. Stimuláció hatására különböző kinázok foszforilálják a  $p47^{phox}$ -ot, ennek hatására az AIR leválik a fehérje egyéb doménjeiről, lehetővé téve a  $p22^{phox}$ -szal létrejövő kapcsolatot, ezáltal a  $p67^{phox}$ -ot és  $p40^{phox}$ -ot is a  $cytb_{558}$  közelébe szállítja. A  $p67^{phox}$  AD-je ezt követően a Rac segítségével aktiválja a Nox2 NADPH-oxidáz aktivitását [60]. Az aktiváció szabályozásának kulcsa tehát a  $p47^{phox}$  foszforiláltságának foka. A  $p47^{phox}$  C-terminálisának közelében tíz foszforilálható szerin oldallánc található. Stimuláció hatására a szerinek nagy része foszforilálódik, és létrejön a fent említett konformáció-változás. A fehérje mutációs analízise alapján a 379-es szerin önmagában, míg a 303 és 304, valamint a 359 és 370-es szerinek együttes jelenléte kritikus a komplex aktiválhatósága szempontjából [35].



**6. ábra. A phox aktiválódása a fagocitózis során.** (a) Nyugalmi állapotban a membránkötött alegységek (Nox2 és p22<sup>phox</sup>) nagy része a granulumokban található, és elkülönülnek a citoszolikus alegységektől, melyek közül a p47<sup>phox</sup>, a p67<sup>phox</sup> és a p40<sup>phox</sup> heterotrimert alkot. A Rac (ez esetben Rac2) ekkor GDP kötött formában a guanozin disszociáció-inhibitorához (RhoGDI) kötve található. (b) Az aktiváció hatására bekövetkező változások. A p47<sup>phox</sup> foszforilációjának hatására nyugalomban elfedett domének kerülnek felszínre, miáltal lehetővé válik a membránkötött alegységek megkötése. A Rac disszociál a RhoGDI-ről, és az aktiválódó guanozin kicserélő fehérjék hatására GTP-t köt, mely elősegíti komplexbe épülését. Emellett a citoszkeleton újraszerveződése megindítja a granulomok és a plazmamembrán (a későbbi fagoszóma) összeolvadását (c) Az aktív komplex felépítése. Az előbb említett változások hatására a phox alegységei egy komplexet alkotnak, ami lehetővé teszi az elektrontranszportot a Nox2-n keresztül, ezáltal megindítva a szuperoxid-termelést. [1] alapján.

A phox aktivációjára több fiziológias és farmakológiai ágens is képes. Előbbiek közé tartozik a komplement faktor C5a, a bakteriális peptid N-formil-methionil-leucil-phenilalanin (fMLP), valamint a mintázatfelismerő receptorokat aktiváló különböző gomba (pl. zimozán) és bakteriális sejtfal komponensek, melyek hatékonyságát az opszonizáció nagyban növeli (ekkor ugyanis a mintázatfelismerő receptorok mellett a komplement- és Fc-receptorok is aktiválódnak) [67]. A fenti anyagok közös jellemzője, hogy az általuk elindított jelválya hatására olyan kinázok aktiválódnak, melyek a  $p47^{\text{phox}}$  foszforilációját végzik, úgy mint a PKC, ERK1/2 és Akt, ezek közül fehérvérsejtekben a PKC jelentősége a legnagyobb [67].

Az oxidázkomplexnek az inaktív és aktív mellett létezik egy harmadik, ún. érzékenyített (primed) állapota is. Ennek lényege, hogy egyes, önmagukban szabadgyök-termelés kiváltására képtelen anyagok fokozzák más, a Nox2 komplexet egyébként is aktiváló ágensek hatását. Ilyen anyag pl. a tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), az interleukin 8 (IL-8) vagy a granulocita-monocita kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) [9]. A érzékenyítés jelenlegi ismereteink szerint úgy jön létre, hogy az érzékenyítő anyagok különböző mitogén-aktivált protein kinázokon keresztül a  $p47^{\text{phox}}$  345-ös pozícióban található szerinjét foszforilálják, mely a komplexet ugyan nem aktiválja, de elősegíti annak összeállítását [35].

Az enzimaktivitás leállításában két feltárt mechanizmus játszik szerepet, mindkettő a komplex széteséséhez vezet. Az egyik a Rac inaktív formájának kialakulása a GTP-áz aktiváló proteinek (GAP-ok) segítségével. Humán neutrofilekben négy GAP szabályozza a Rac aktivitását: a p50RhoGAP, a p190RhoGAP, a Bcr [68], valamint a közelmúltban felfedezett ARHGAP25 [69]. Szolubilis formában mind a négy GAP csökkenti a szuperoxid-termelést, azonban hatásuk csak akkor érvényesül, ha a GAP-okat még az oxidáz összeállása előtt adjuk a sejtekhez. A membránkötött GAP-ok (p50RhoGAP, p190RhoGAP, ARHGAP25) közül kettő - p50RhoGAP, ARHGAP25 - bizonyult hatásosnak a ROS-termelés csendesítésében, mely hatás a már összeállt komplex mellett is érvényesült [70]. A másik mechanizmus a komplex (elsősorban a  $p47^{\text{phox}}$ ) foszforiláltságának csökkenése a foszfatázok aktivitása következtében. A foszfatázok szerepét támasztja alá, hogy a foszfatázok gátlása aktiválja az oxidázt (a következményesen megnövekedett nyugalmi kinázaktivitás eredményeként), aktivált phox és gátolt foszfatázok mellett megnövekedik a ROS-termelés időtartama, valamint

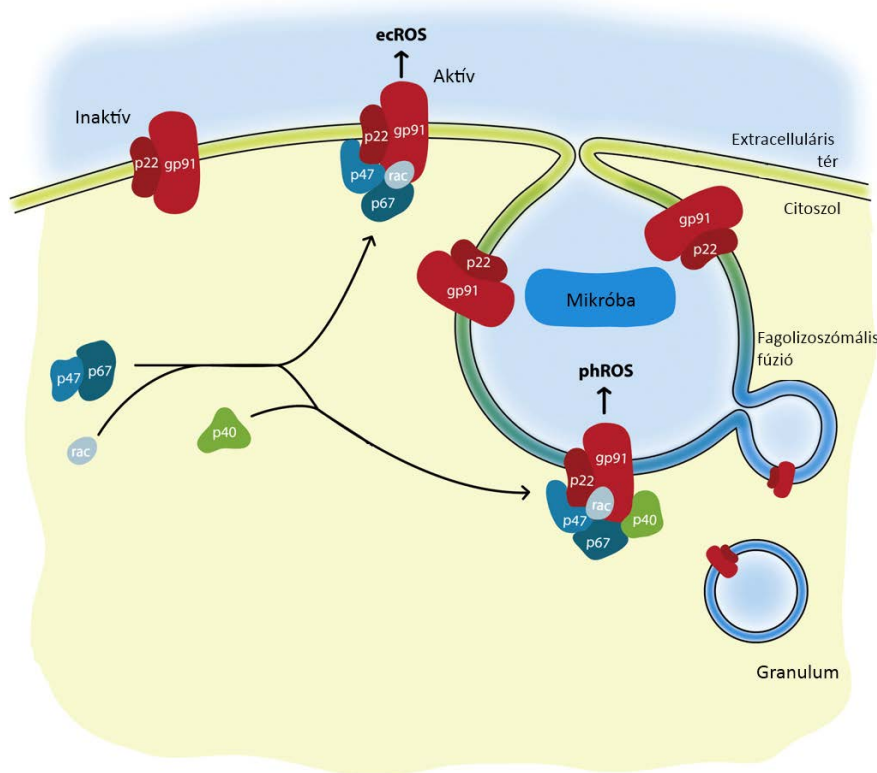
hogy a phox aktivációját követően adott kináz-gátlók csökkentik a légzési robbanás intenzitását [65].

### **3.1.8. A phox sejtszinű szabályozása**

A phox aktivációjának helye és intenzitása a fagocitákban szigorúan szabályozott, s alapvetően a kiváltó ingertől függ. Az egyes sejtekben a phox által termelt szuperoxid mennyisége az aktivált komplexek számától, a szabadgyök-termelés eloszlása (extra- vagy intracelluláris) pedig az aktív komplexek lokalizációjától függ.

A szabadgyök-termelés intenzitása mindenekelőtt az oxidáz-alegységek expressziójától függ (ld. a fehérvérsejtek phox alegység expressziója fejezetet), az aktív komplexek száma emellett természetesen függ az aktiváló ágenstől is. Kísérletes körülmények között a diacil-glicerol-analóg forbol mirisztát-acetátot (PMA – részletesen lásd később) tekintik a phox leghatékonyabb aktivátorának, míg egyéb anyagok (C5a, fMLP) kevésbé intenzív légzési robbanást váltanak ki [67]. Az eltérő farmakológiai hatékonyság másik eklatáns példája a zimozán, mely natív formában kisebb mértékű szuperoxid-termelést vált ki, mint opszonizált formában (ún. szérum opszonizált zimozán, serum treated zymosan, STZ) [71] Megjegyzendő, hogy egyes szerzők szerint a nem opszonizált zimozán csupán előaktivációt vált ki [67].

További fontos szempont a phox aktiválódásának lokalizációja. A komplex összeállhat a plazmamembránban és a fagoszóma felszínén (az összeszerelődés sejttípusonként eltérő tendenciát mutat, lásd később). Előbbi esetben az extracelluláris (EC) térbe, utóbbiban a fagoszóma lumenébe, vagyis intracellulárisan (IC) történik a szuperoxid-termelés (7. ábra). Nyugvó neutrofil granulocitákban a cytb<sub>558</sub> kis része a plazmamembránban, többsége a különböző granulomokban található (specifikus, zselatináz, szekretoros vezikulák) [72]. Az fMLP hatására kialakuló légzési robbanás során a komplexek jelentős hányada a plazmamembránba transzlokálódik, az oxigénszármazékok ebben az esetben döntően az EC térben keletkeznek. A zimozán részecskék azonban fagocitózisa kerülnek, így ebben az esetben főként IC ROS-termelés mérhető [73]. A fentiek ismerete az adott stimulushoz legmegfelelőbb ROS-mérési módszer kiválasztásához elengedhetetlen.



**7. ábra. A phox-aktivitás kompartmentalizációja.** Inaktív állapotban a phox membránkött alegységei (Nox2 és  $p22^{\text{phox}}$ ) a plazmamembránban, illetve a granulumok membránjában foglalnak helyet. Aktiváció hatására a citoszolikus alegységek is kapcsolódnak hozzájuk, minek hatására megindul a ROS termelés. A komplex összeszerelődésének helyétől függően a ROS-termelés történhet az extracelluláris tér felé (ecROS), valamint a fagoszómák irányába (phROS). A szabadgyök-képzés helye több szempontból sem közömbös. Fagoszómák esetében a ROS-produkció egy kis volumenű, zárt kompartmentbe történik, ezért az oxigénszármazékok magas koncentrációt érhetnek el, ami a bekebelezhető mikroorganizmusok esetén igen hatékony eliminációhoz vezet. A phROS detektálása azonban a sejtmembránok miatt nehezített, hatékonyan csak hidrofil anyagokkal lehetséges. Az extracelluláris térbe történő ROS-felszabadulás esetén a kompartment nagy térfogata miatt az elérhető ROS koncentráció alacsonyabb. Nagyméretű, ezért nem fagocitálható kórokozók (pl. férgek) esetén azonban az ecROS-termelés célravezető lehet. Az ecROS a legtöbb detektáló ágens által könnyen elérhető, ezért mérése is egyszerűbb. [74] alapján.

### 3.1.9. A *phox*-ra ható legfontosabb farmakonok

A farmakológias aktivátorok klasszikus képviselője a PMA, mely több fehérje aktivitását fokozza, például protein kináz C (PKC), egyes RAS GEF-ek (RASGRP<sub>1</sub>), protein kináz D (PKD). A felsoroltak közül a *phox* szempontjából a PKC-nek van kiemelt jelentősége [67].

A *phox* farmakológiai gátlásra az alábbi lehetőségek állnak rendelkezésre. A difenil-jodónium (DPI) a NADPH oxidázok nem specifikus, ám kis koncentrációban is hatásos gátlószere. Valamennyi elektrontranszportot lebonyolító flavoprotein gátlására képes, így többek között a mitokondriális komplex I-et [75] és a xantin oxidázt [76] is gátolja. Aspecifikus viselkedése miatt a DPI hatására létrejövő változásokat csak akkor tekintik NADP-oxidáz eredetűnek, ha az egyéb enzimek szerepe a folyamatban kizárható [2]. A növényi eredetű apocynint (kémiai nevén acetovanillon) a *phox* specifikus, kis affinitású inhibitoraként írták le [77]. Hatása kifejtéséhez egy peroxidálási lépés szükséges. Az így kialakuló vegyület a komplex összeszerelődését gátolja [78]. Alacsony affinitása és metabolizációs igénye miatt sem a kutatás sem a gyógyászat területén nem terjedt el a használata. Az apocynin mellett a komplex összeállása peptidok segítségével is gátolható. A peptidok rendszerint az egyes *phox* alegységek különböző funkcionális doménjeinek analógjai, és hatásukat kötőpartnerük kompetitív blokkolásán keresztül fejtik ki. Ez idáig a Nox2, a p22<sup>phox</sup>, a p47<sup>phox</sup> és a Rac1 fragmensei bizonyultak hatékonyak. Az enzim működése gátolható pl. a Nox2 NADPH-, vagy p47<sup>phox</sup>- kötő doménjének peptidjei segítségével. A p47<sup>phox</sup> eredetű fehérje-töredékek a PX- az SH3- vagy a PRR doménből származnak. Az ilyen molekulák hátránya, hogy nem hatolnak át a plazmamembránon, ezért csak sejtmertes körülmények között alkalmazhatók. Sejtes rendszerben a gátló peptidokat a membránon átjutni képes fehérjefragmensekkel kell kiegészíteni. Ilyen domén nyerhető pl. a HIV1 eredetű transzaktivátor protein (TAT), vagy a drozofilából származó penetratin egyes szakaszaiból. Az egyik legelterjedtebb *phox*-gátló peptid, a gp91ds-tat, szintén egy Nox2 fragmens és egy membránon áthatoló peptidszakasz ötvöze [79].

### **3.2. A NADPH-oxidázok aktivitásának mérésére használt leggyakoribb módszerek**

A NADPH-oxidázok aktivitása több módszerrel is meghatározható, az egyes eredmények pontos értelmezéséhez azonban szükséges a leggyakrabban használt eljárások legfontosabb jellemzőinek ismerete. Mivel a későbbiekben csak sejtes rendszerben végzett kísérleteket mutatok be, a sejtmentes közegben alkalmazható eljárásokról nem esik szó.

Az egyes enzimek aktivitása zárt rendszerben meghatározható a szubsztrátok mennyiségének csökkenése, és a keletkezett termék mennyiségének mérésén keresztül, emellett a NADPH oxidázok aktivitása a transzmembrán elektrontranszport mérésével is meghatározható, ez utóbbi módszer részletes ismertetése azonban meghaladja jelen írás kereteit. Az (1) egyenlet alapján mérhetjük a NADPH és az  $O_2$  koncentrációjának csökkenését, vagy a  $NADP^+$ -, a proton-, vagy a ROS-koncentráció emelkedését. A gyakorlatban a ROS-termelés és az oxigénfogyasztás mérése terjedt el.

A ROS-termelés kimutatására ún. „indikátor gyökfogókat” alkalmaznak, melyek oxigénygyökökkel reagálva detektálható terméket adnak. Az egyik legrégebben alkalmazott módszer a citokróm c (cyt c) redukciós eljárás, mely során a szuperoxid által redukált citokróm c 550 nm-nél megjelenő abszorpcióját mérik. A módszer előnye, hogy segítségével kvantifikálható a termelődött szuperoxid mennyisége, hátránya, hogy csak az extracelluláris térben detektál, és viszonylag alacsony az érzékenysége [73]. A membránpermeábilis nitroblue-tetrazólium (NBT) redukáló anyagok (pl. szuperoxid) hatására sötétkék vagy sötétlila formazánná alakul. A CGD diagnózisának felállításához korábban ezt az anyagot használták, a phox-hiányos fehérvérsejtek ugyanis egészséges egyének sejtjeivel szemben nem képeztek színes formazán precipitátumokat. A módszer hátránya, hogy alkalmazásával könnyedén csak a nagy koncentrációban keletkező szuperoxid mutatható ki, alacsonyabb intenzitású ROS-termelés kimutatása e módszerrel meglehetősen körülményes [80]. A szuperoxid kimutatásának további módszere a lucigenin-kemilumineszcencia. A lucigenin nagy érzékenységgel reagál a szuperoxiddal, melynek hatására kemilumineszcens termék keletkezik. A módszer alkalmazhatóságát korlátozza, hogy bizonyos körülmények között a lucigenin maga is elősegítheti a szuperoxid-képződést [73]. Az extracelluláris szuperoxid-felszabadulása

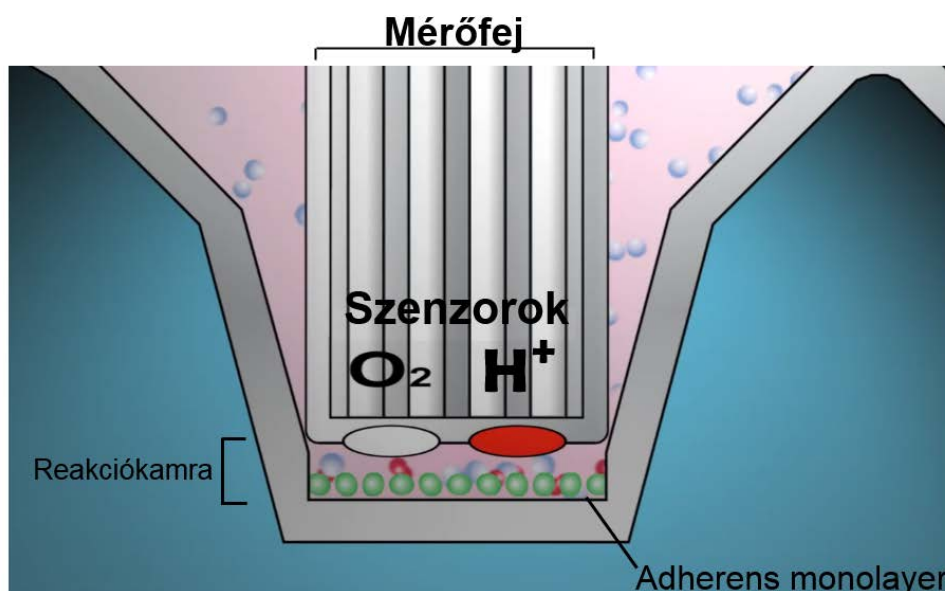


meghatározható az ún. Diogenes<sup>®</sup> esszével, mely egy luminol-alapú (ld. később) kemilumineszcens eljárást takar [81]. Előnye az igen nagyfokú érzékenység. További lehetőség a ROS termelés követésére az ún. Amplex Red<sup>®</sup> módszer. A mérés lényege, hogy a detektáló ágens (acetyl-dihydroxyphenoxazin) peroxidáz katalizálta reakció során H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel reagál, és színes terméket, resofurint képez. A kialakuló színreakció fluorimetriával követhető. Az eljárás a mérések alapján igen érzékenynek bizonyult, emellett kalibrációt követően a keletkezett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége kvantifikálható. Az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni, hogy a rendszer csak extracelluláris oldalon detektál [82]. Amennyiben a luminolt önmagában adjuk a sejtekhez, egy olyan ROS-érzékeny eljárást kapunk, mely elsősorban az intracelluláris térben detektál hatékonyan (ún. luminol kemilumineszcencia, angol rövidítése alapján LCL). A luminol detektálási érzékenysége peroxidáz jelenlétében nagyban fokozódik, ezért az endogén peroxidáz-expresszióval rendelkező granulocitákban a módszer jó hatásfokkal alkalmazható, továbbá hozzáadott peroxidáz (pl. tormaperoxidáz) jelenlétében az extracelluláris ROS is hatékonyabban kimutatható. A luminol ugyan az egyik legrégebben ismert ROS-érzékeny molekula, az érzékelt oxigényök(ök) mibenléte azonban a mai napig nem teljesen tisztázott [73].

A NADPH-oxidáz aktivitás meghatározásának másik lehetősége a sejtek oxigénfogyasztásának mérése. Az módszer korlátja, hogy a NADPH-oxidázok mellett minden egyéb oxigént felhasználó enzim aktivitása (xantin oxidáz, mitokondriális légzési lánc stb.) is növeli a sejtek oxigénfogyasztását, ezért az egyéb enzimek gátlása szükséges (pl. aziddal). Az eljárás a fent elmondottak miatt eozinofil és neutrofil granulociták kivételével fehérvérsejtekben korlátozottan alkalmazható. Granulocitákban a phox mellett nincs jelen egyéb érdemi oxigénfogyasztással rendelkező enzimrendszer, a mitokondriális légzési lánc ugyanis mindkét sejtípusban gyakorlatilag teljesen inaktív [83–86]. Granulocitákban az oxigénfogyasztás mérésének előnye, hogy segítségével a ROS-termelés mérésével ellentétben a phox össz-aktivitása követhető, függetlenül az enzim aktiválódásának helyétől.

Az oxigénfogyasztás mérésére két fő lehetőség nyílik. Az egyik az oxigénfogyasztás meghatározása polarometriás módszerrel, melyhez leggyakrabban az ún. Clark-elektrodát alkalmazzák. A Clark-elektrodát egy kálium-klorid oldatba merülő platina katódból és egy ezüst/ezüst-klorid anódból épül fel. A katódon redukálódó O<sub>2</sub>

molekula elektronokat vesz fel, melyet az anód felületéről leváló, oxidálódó ezüst ionok adnak le. Az így keletkező áram a parciális  $O_2$  tenzió függvénye [87]. A polarimetriás módszer magas sejt-igénye megnehezíti a mérés kivitelezését alacsony sejtszám esetén (emiat végeztek kevés mérést perifériás vérből izolált eozinofil granulocitákon). A fluorimetriás  $O_2$ -detektálási technológia fejlődése az elmúlt néhány évben lehetővé tette újabb oxigénfogyasztást analizáló rendszerek megalkotását. Az egyik ilyen, viszonylag elterjedt eljárást extracelluláris áramlás (extracellular flux-XF) analizátornak nevezik, mivel a készülék szenzorai az extracelluláris oxigén és proton „áramlását”, pontosabban koncentrációját mérik, melyből a készülék oxigénfogyasztási rátát (oxigen consumption rate, OCR) és extracelluláris savanyodási rátát (extracellular acidification rate, ECAR) kalkulál. A mérés kivitelezéséhez a sejtek adherens monolayer-e szükséges, mely felett a mérés idejére kis térfogatú (kevesebb, mint 7  $\mu$ l-es) kamra jön létre a szenzorok mozgása által. A mérés végeztével az eredeti (~200  $\mu$ l) terfogát áll vissza, lehetővé téve a metabolitok ekvibrációját (8. ábra). Az XF rendszer alkalmazásához a polarometriához szükségesnél jóval alacsonyabb sejtszám is elegendő (akár pár ezer sejt oxigénfogyasztása is megbízhatóan mérhető), mely megkönnyíti a nehezen izolálható sejtek vizsgálatát [88].



**8. ábra. A fluorimetriás oxigénfogyasztás és extracelluláris savanyodás mérésének háttere.** A mérőfej mozgása az inkubációs oldatból egy kis térfogatú (<math><7\mu\text{l}</math>) reakciókamrát választ le, melynek alján a vizsgált sejtek adherens monolayer-e található. A mérés az így kialakított reakciókamrában zajlik. A szenzorok speciális fluorofórok segítségével a parciális  $\text{O}_2$  tenziót és a médium pH-ját érzékelik, melyekből a rendszer oxigénfogyasztási rátát (oxygen consumption rate-OCR) és extracelluláris savanyodási rátát (extracellular acidification rate-ECAR) számol. A két mérési pont között a mérőfej felemelkedik, a sejtek ismételtan az inkubációs oldat teljes térfogatával érintkeznek, lehetővé téve az ekvilibrációt. Forrás: [www.seahorsebio.com](http://www.seahorsebio.com)

### 3.3. A phox-kifejeződés és -aktivitás mennyiségi viszonyai különböző fehérvérsejtekben

A T-limfociták és a bazofil granulociták kivételével fehérvérsejtekben a Nox2-komplex valamennyi alegysége megtalálható, az expresszió foka azonban sejttípusonként változó. A legmagasabb phox-kifejeződés eozinofil és neutrofil granulocitákban detektálható [89], emellett a monociták és a makrofágok rendelkeznek relatíve magas phox expresszióval [90], NADPH-oxidáz aktivitásuk a neutrofilek tizede [91]. A B-limfociták oxidáz-alegység kifejeződése viszonylag alacsony [92], és a

granulocitáknál kb. két nagyságrenddel kevesebb ROS-t termelnek [93]. A dendritikus sejtek (dendritic cell, DC) szintén kis mennyiségben fejezik ki az oxidáz alegységeit [94].

Magas phox-expressziójuk és intenzív ROS-termelésük miatt az eozinofil és neutrofil granulociták légzési robbanásának mennyiségi viszonyait részletesen vizsgálták. Az irodalomban megtalálható közlemények többsége arra a következtetésre jutott, hogy az eozinofil granulociták a neutrofileknél nagyobb phox alegység expresszióval rendelkeznek (Cytb<sub>558</sub> esetén kb. 1 [95] - 3 [96]-szoros különbség), és stimuláció hatására intenzívebb légzési robbanással válaszolnak (1 [97] - 4,7 [95]-szeres különbség). A fenti megfigyelések kritikus szemléletét azonban indokoltá teszik az alábbi megfontolások:

1. Technikai nehézségek miatt az eozinofil granulocitákat több közleményben is proliferatív, vagy inflammatorikus hipereozinofiliában szenvedő egyénekből nyerték [2,97–99]. Ezek az eredmények értelemszerűen nem extrapolálhatók az egészséges populációra.
2. A korábbi összehasonlítások során az eozinofilek és a neutrofilek kényszerűségből eltérő személyektől származtak. Ez és a gyakran igen kisszámú donor miatt az adatokat a személyek közötti különbségek torzíthatják.
3. Amennyiben egészséges egyének eozinofil és neutrofil granulocitáinak funkcióit hasonlították össze [85,100–102], a szerzők elsősorban a ROS-termelés összehasonlítására koncentráltak, és kevesebb energiát fektettek a phox alegységek expressziójának feltárására [100,102]. Megjegyzendő, hogy mikor normál sejtek légzési robbanását hasonlították össze, és/vagy a légzési robbanást pontosabb módszerrel mérték, a különbségek kisebbnek adódtak (~1 [97] és ~2,3 [103]-szoros különbség az eozinofilek javára).
4. A legtöbb összehasonlító közleményben a citokróm c redukciós esszét, alkalmazták, mely módszer az extracellulárisan keletkező szuperoxidra érzékeny. Mivel az eozinofilek a neutrofilekkel ellentétben a megtermelt szuperoxidot elsősorban az extracelluláris tér felé ürítik [97,103], a módszer túlbecsüli az eozinofilek ROS-termelő képességét a neutrofilekhez képest. A granulocitákban a légzési robbanás össz-

intenzitásának pontosabb meghatározása, egészen a legutóbbi időkig, az oxigénfogyasztás polarimetriás mérésével történhetett meg. A módszer magas sejtigénye miatt azonban egészséges egyének eozinofiljein összesen egy munkacsoport végzett hasonló kísérleteket [89].

A későbbiekben bemutatásra kerülő kísérleteim egy részében a fenti problémákat igyekeztem orvosolni egészséges donoroktól származó eozinofil és neutrofil granulociták phox alegység expressziójának és ROS-termelésének részletes vizsgálatán keresztül.

### **3.4. A phox sejten belüli elhelyezkedése fehérvérsejtekben**

A  $\text{cytb}_{558}$  sejtmembránok közötti megoszlása az egyes fehérvérsejtekben eltérő. Nyugvó neutrofilekben a teljes  $\text{cytb}_{558}$ -tartalom 5%-a a plazmamembránban, 95%-a különböző granulomokban (specifikus, zselatináz, szekretoros vezikulák) található [73,104]. Eozinofilekben a membránkötött alegység a plazmamembrán és a kis granulumok felszínén található, monocitákban a plazmamembránon, az endoszómaszerű kompartmentben, valamint a kis granulumok felszínén detektálható [104]. A citokróm elhelyezkedése B-sejtekben kevésbé felderített.

Aktiváció hatására a  $\text{cytb}_{558}$  transzlokálódhat a különböző kompartmentek között. A transzlokáció mértéke az egyes sejtípusokban nagyban függ az alkalmazott stimulustól (lásd a phox sejtszintű szabályozása fejezetet). A membránkötött alegységek nyugalmi eloszlása azonban befolyásolja az aktiváció során megfigyelhető ROS-termelés kompartmentalizációját. Míg a neutrofilek ugyanazon stimulusra (pl. forbolészter) intracellulárisan is jelentős ROS-termeléssel válaszolnak, addig az eozinofilek inkább az EC tér irányába ürítik a szabadgyököket [97,103].

### 3.5. A Nox2-komplex működésének élettani hatásai

#### 3.5.1. Antimikrobiális hatások

Ahogy korábban láthattuk, a phox működésének fehérvérsejtekben legprominensebb hatása a kórokozók elpusztítása azok oxidatív károsításán keresztül. A komplex genetikai defektusa ugyanis vezető tünetként a már említett CGD-hez vezet, melyben a betegek visszatérő bakteriális és gombás fertőzésektől szenvednek. Mindenképpen meg kell azonban jegyezni, hogy a fehérvérsejtek a phox mellett rendelkeznek ún. nem oxidázfüggő ölési mechanizmusokkal is (pl. proteolitikus enzimek), ezáltal az immunvédekezés számos patogén esetében a Nox2-komplex nélkül is hatásos lehet. Általánosságban elmondható, hogy a kataláz-pozitív mikroorganizmusok (pl. *Staphylococcus aureus*) elpusztítása működőképes oxidázt igényel [2]. Kiemelendő továbbá, hogy a kórokozók elpusztításának elméletileg legalább két alapvetően különböző célja lehet. Az első, nyilvánvalóbb cél, hogy a kórokozó pusztulásával a csíraszám csökkenjen és így a fertőzés kiterjedése közvetlenül korlátozható. Ez a funkció dominál az ún. professzionális falósejtekben. Másrészt viszont a patogén elpusztítása nélkül antigénjeinek hatékony bemutatása sem képzelhető el, ami indokoltá teszi a professzionális antigénprezentáló sejtek (antigen presenting cell, APC) szerepének vizsgálatát a CGD-hez vezető kórfolyamatokban (részletesen lásd később).

A kórokozók előlésében a különböző oxigényököknek eltérő jelentősége van. A legtöbb adat azt mutatja, hogy a phox által közvetlenül termelt  $O_2^-$  rövid féléletideje és relatíve alacsony reaktivitása miatt alárendelt szerepet játszik, míg a belőle keletkező  $H_2O_2$  in vitro már több baktériumfaj elpusztítására képes. Az immunsejtek többségében a  $H_2O_2$ -ből myeloperoxidáz (MPO) segítségével HOCl képződik, mely a felsorolt anyagok közül a legerősebb ölési képességgel rendelkezik [7]. Jól dokumentált hatása ellenére MPO hiányában ugyan valamelyest fokozódik a fertőzések iránti fogékonyság, a legtöbb érintett egyén azonban egészségesnek mondható. Valószínű tehát, hogy az MPO mellett egyéb mechanizmusok is részt vesznek a ROS hatásának fokozásában [2].

A direkt károsító hatás mellett a szabadgyököknek különböző bakteriális anyagok semlegesítésén keresztül közvetett hatása is van a kórokozókra. Az *Actinobacillus actinomycetemcomitans* legfőbb virulenciafaktora a makrofágok és neutrofilek apoptózisát indukáló leukotoxin. Kimutatták, hogy oxidáción keresztül a HOCl képes inaktiválni a toxint, ezzel rontva a baktérium túlélési esélyeit. A HOCl semlegesítő szerepe igazolódott továbbá a *Streptococcus pneumoniae* által termelt Pneumolysin és a *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O toxinja esetében is [105].

A phox aktivitása azonban a fentieknél áttételesebb módon is szerepet játszhat a kórokozók elleni védekezésben, melynek érdekes példája az ún. „Neutrofil extracelluláris csapdák” (neutrophil extracellular traps, NET). A megnevezés a neutrofilek egyik újabban leírt antimikrobiális mechanizmusát takarja, mely során különböző stimulusokra (PMA, fMLP, fizikai kapcsolat aktivált vérlemezkékkel) a sejtekből DNS távozik hisztonok és granulumfehérjék (elasztáz, MPO) kíséretében [106]. Az extracelluláris térbe jutott NET a DNS-szálak segítségével csapdába ejti a kórokozókat, az antimikrobiális hatású granulumfehérjék pedig hozzájárulnak azok elpusztításához [106]. A csapdák képzése oxidáz-függő folyamat, mivel CGD-s egyének neutrofiljei csökkent NET-képződést mutatnak, a jelenség hátterében a különböző protein kinázok ROS hiányában alacsonyabb fokú aktivációját feltételezik [107].

### **3.5.2. Az antigén-prezentációra kifejtett hatások**

A phox szerepe az antigén-prezentációban a fehérjekomplex egyik legújabb felfedezett hatása. Antigén-prezentáció alatt azt a folyamatot értjük, mely során a sejtek antigéneket mutatnak be a T-sejteknek. A prezentált antigén megkötése/felismerése a T-sejtek egyik legfontosabb aktivációs ingere. Az antigének bemutatása a sejtfelszínen található, az antigének kötéséért felelős fő hisztokompatibilitási fehérjekomplex (major histocompatibility complex, MHC) segítségével történik, és kétféleképp lehetséges. Az egyik lehetőség a sejt citoszolikus (endogén) fehérjefragmenseinek bemutatása az MHC I-en keresztül, melyre minden magvas sejt képes. E folyamat többek között elengedhetetlen a vírussal fertőzött sejtek felismerésében. Az antigén-prezentáció másik

típusa a bekebelezett (exogén) antigének bemutatása az MHC II segítségével. Az exogén antigének bemutatására csak az ún. antigén-prezentáló sejtek (APC-k - makrofágok, monociták, B-sejtek, dendritikus sejtek) képesek. A mechanizmus természetesen kulcsfontosságú a kórokozók T-sejt általi felismerésében [108]. A dendritikus sejtek eddig pontosan nem ismert mechanizmus segítségével a bekebelezett antigéneket MHC I-en keresztül (endogénként) is prezentálhatják (ún. kereszt-prezentáció), miáltal a T-limfociták szélesebb populációjának aktiválására képesek [109].

A hatékony antigén-prezentáció fontos előfeltétele, hogy az antigének megfelelő méretűek legyenek az MHC-n történő bemutatáshoz. Endogén antigéneknél ez kisebb probléma, mert azok bontását a proteoszóma végzi, mely a fehérjéket épp ideális hosszúságúra darabolja [108]. A bekebelezett antigének lebontása azonban a fagoszómában zajlik, ahol az optimálistól eltérő mértékű proteolízis gátat szabhat az antigének bemutatásának. Általánosságban elmondható, hogy a proteolízis mértéke egyenesen arányos a fehérjebontó enzimek és a protonok koncentrációjával (savas közegben a hasítási helyek jobban hozzáférhetőek a legtöbb enzim számára). Irodalmi adatok alapján dendritikus sejtekben a patogén bekebelezését követően a fagoszómákban relatíve alacsony a fehérjebontó enzimek mennyisége, és a lumen savanyodása is elmarad, teret engedve ezzel az antigének prezentációjához szükséges részleges proteolízisnek. A kísérletes adatok alapján a phox szerepet játszik a DC-k fagoszómáinak pH szabályozásában. A folyamat lényege, hogy a phox által termelt szuperoxid diszmutációja  $H_2O_2$ -vé protonfelvétellel jár, ezzel elősegítve a fagoszóma pH-jának emelkedését, illetve meggátolva annak savanyodását. Nox2 hiányos DC-k fagoszómái a vad típusú sejtek fagoszómáival szemben savanyodást mutatnak, rámutatva ezzel a phox fagoszómális pH szabályozásban játszott szerepére. [110].

DC-k mellett a B-sejtek antigén-prezentációjában is szerepet játszhat a Nox2-komplex által termelt ROS. Neutrofil granulocitákhoz hasonlóan a  $p40^{phox}$  hiányos B-sejtek is csökkent fagoszómális szabadgyök-termeléssel rendelkeznek, míg az EC termelés nem károsodik. Emellett a  $p40^{phox}$ -deficiens B-limfociták valószínűleg a fent említett ROS-termelési defektus következtében csökkent mennyiségű exogén antigént képesek prezentálni, az endogén antigének kereszt-prezentációja azonban változatlan maradt [111]. Fontos megjegyezni azonban, hogy jelenlegi ismereteink alapján az



antigének prezentálására képes naív B-sejtek nem alkotnak egységes populációt. Egerekben (és feltételezhetően emberben is) legalább két fő ilyen B-sejt típus létezik. Amíg egerekben a lépet elsősorban a konvencionálisnak is nevezett „klasszikus” B-sejtek, a B-2 sejtek népesítik be, addig pl. a peritoneum felszínén a veleszületett immunitás sejtjei elemeivel is több közös vonást mutató és az ún. innate-like B-sejtek közé sorolt B-1 sejtek is nagy számban (~50%) jelen vannak [112,113]. A közelmúltban három munkacsoport egymástól függetlenül kimutatta, hogy egerek B-1 sejtei képesek baktériumok fagocitózisára és elpusztítására [114–116]. Tisztázatlan azonban, hogy a B-1 sejtek baktériumölését miként befolyásolja a funkcióképes phox jelenléte.

Az emberi B-1 sejtek feltételezett immunfenotípusa CD27+, CD43+. A CD27 a memória B-sejtek felszíni markere is, vagyis egyaránt megtalálható a memória B-sejtek és a B-1 sejtek felszínén. Egyes vélemények szerint a jelenleg memória B-sejteknek tulajdonított funkciók (pl. hatékony allogén T-sejt stimuláció) egy része valójában a B-1 sejtekhez köthető [117].

### 3.5.3. Jelátviteli hatások

Jelenlegi elképzelésünk szerint a reaktív oxigén származékok közül a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stabilitásának és membrán-permeabilitásának köszönhetően második hírvivőként is működhet, és több sejtfunkciót is befolyásolhat [118]. A phox által termelt ROS fehérvérsejtekben kifejtett jelátviteli hatásainak pontos megítélése igen nehéz feladat, hiszen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> előállítására közvetve vagy közvetlenül más enzimek is képesek (pl. mitokondriális légzési lánc tagjai, lipoxigenáz), melyek sok esetben a phox-szal együtt aktiválódnak. Emiatt a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hatás hátterében álló ROS-forrás az esetek többségében nem egyértelmű. Leginkább a phox-hiányos sejteken kapott adatok megbízhatóak, melyekből azonban viszonylag kevés áll rendelkezésre. Megjegyzendő emellett, hogy az ismertetésre kerülő hatások többségét tumoros sejtvonalakon írták le, melyek több esetben nem immunsejt eredetűek voltak. Jelen fejezet ezért a fehérvérsejtekben is igazolt és releváns hatásokat kísérli meg részletesebben ismertetni.

**Foszforiláció.** A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jól dokumentált hatása, hogy bizonyos protein tirozin foszfátázok (PTP-k) aktív centrumában elhelyezkedő ciszteinek tiol-csoportjának

oxidációján keresztül képesek gátolni azok enzimaktivitását [119]. A foszfatázok gátlása következtében fokozott protein-foszforiláció tapasztalható. Primer fagocitákban a ROS elsődleges szerepének a mikroorganizmusok károsítását tartják, és jelenleg kevés adat támasztja alá az oxigéngyökök foszfatázok gátló hatását ezen sejtekben [2]. A fagocitózisra nem képes T-sejtekben ROS hatására fokozott adhéziót tapasztaltak, melynek háttérében csökkent PTP aktivitás és következményes fokozott kináz aktivitás állt [120]. Noha tumoros B-sejtvonalakban a ROS egyaránt fokozta a tirozin és szerin/treonin foszforilációt [121,122], vad típusú és p47<sup>phox</sup> KO primer B-limfociták között nem tapasztaltak különbséget a B-sejt receptor (B-cell receptor, BCR) aktivációja által kiváltott foszforilációban, és a Ca<sup>2+</sup>-szignál lefolyásában sem. [123]. Megjegyzendő azonban, hogy a phox hiányában kismértékben fokozódik a B-sejtek proliferációja és kismértékben nő az antitest-termelésük is (az antigén-prezentációra kifejlesztett hatásokat ld. fent) [123,124]. A tirozin foszfatázok gátlása mellett a ROS egyes mitogén-aktivált protein kinázok (MAP-kinázok) aktiválására is képesek, mely hatás makrofágokban szerepet játszhat több citokin (pl. TNF $\alpha$ , IL-12) termelésének fokozásában [125].

**Ca<sup>2+</sup>-jel.** A citoszol Ca<sup>2+</sup>-koncentrációja nyugvó sejtekben igen alacsony, mintegy 100 nM. Az intarcelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció megemelkedése fontos jelként szolgál a sejtek számára. A nyugalmi Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt a Ca<sup>2+</sup> ATP-ázok tartják alacsony szinten. A Ca<sup>2+</sup>-szignálhoz szükséges Ca<sup>2+</sup>-ionok származhatnak a raktárként szolgáló endoplazmás reticulumból (ER) és az EC térből egyaránt. Fehérvérsejtekben a kezdeti Ca<sup>2+</sup>-jel az endoplazmás reticumból származik, majd ezek kiürülése megindítja az ún. kapacitív Ca<sup>2+</sup>-belépés (store operated Ca<sup>2+</sup>-entry, SOCE) folyamatát [126]. A SOCE-nek két kulcsszereplője van a STIM1 és az Orai1. Az ER membránjában elhelyezkedő STIM1 Ca<sup>2+</sup>-szenzorként funkcionál. A raktárak kiürülésének hatására a STIM1 kölcsönhatásba lép és aktiválja a plazmamembránban található Orai1-et, mely Ca<sup>2+</sup>-csatornaként működik. A további STIM1 és Orai1 homológok (STIM2, Orai2 és 3) alárendelt szerepet játszanak a kapacitív Ca<sup>2+</sup>-influx szabályozásában [126].

A ROS szerepét több Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisban részt vevő molekula (pl. feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup>-csatornák) esetében is kimutatták. E hatásokat igazoló vizsgálatok azonban javarészt a keringési rendszerhez tartozó sejteken készültek, fehérvérsejtekben hasonló jelenségekről nem számoltak be [2]. A NADPH-oxidáz neutrofilekben is

igazolt hatása a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelre a membránpotenciál megváltoztatásán keresztül jön létre. Amint azt korábban leírtam, a phox aktivitása a membrán depolarizációját vonja maga után, ami csökkenti az EC térből kapacitatív influx-szal beáramló  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok hajtóerejét. Emiatt Nox2-komplex hiányos neutrofilek stimulációra kifejezettebb  $\text{Ca}^{2+}$ -szignállal reagálnak vad típusú (VT) társaikhoz képest [127,128].

**Programozott sejthalál.** A legtöbb primer fehérvérsejteken és sejtvonalakon végzett tanulmány a ROS proapoptotikus hatását mutatta ki. Makrofágokban az LPS által indukált ROS-termelés elősegíti a programozott sejthalál megindulását, mely hatás gyökfogyó vegyületek segítségével gátolhatónak bizonyult [129]. Fagocitózis során a CGD-ben szenvedő egyének neutrofil granulocitáiban az egészséges sejtekhez viszonyítva kisebb mértékben emelkedett a proapoptotikus BAX fehérje szintje. Ez hozzájárulhat a CGD-s sejtek nagyobb arányú túléléséhez [130]. Jurkat T-sejteken (kísérletekhez gyakran használt tumoros T-limfocita szerű sejtvonal) kapott eredmények alapján a konjugált linolénsav sejthalált kiváltó hatásához szintén hozzájárulhatnak az oxigéngyökök, DPI hatására ugyanis csökken a konjugált linolénsav által megindított apoptotikus kaszkád aktivitása [131].

### **3.5.4. Immunmodulációs hatások**

Az eddig tárgyaltakból kitűnik, hogy a ROS termelésén keresztül a phox igen komplex módon befolyásolhatja az immunrendszer egészének működését. A CGD-ben szenvedők panaszai nem kizárólag a visszatérő infekciókból erednek. Meglepő módon a tünetek jelentős hányada mögött autoimmun folyamatok állnak. A betegség nevét adó granulomákról ismeretes, hogy belőlük kórokozó legtöbbször nem tenyészthető ki [132], és számos egyéb, autoimmun gyulladáshoz vezető tünet is megjelenik a kórképben mint pl. gyulladáshoz vezető bélbetegség, szisztémás lupus erythematosus, chorioretinitis [133,134]. A fokozott gyulladáshoz vezető válasz hátterében több mechanizmust feltételeznek. ROS hiányában több molekula degradációja is károsodik [135], a bomlástermékek felhalmozódása pedig a gyulladáshoz vezető válasz további erősödéséhez vezethet [2]. Az oxigén gyökök jelátviteli hatásainak elmaradása következtében a proinflammatorikus folyamatok kerülnek előtérbe [2].

Egyre több adat szól a T-sejtek gyulladást erősítő szerepe mellett CGD-ben. Jóllehet primer T-sejtekben a phox kifejeződésének hiánya miatt nem mérhető érdemi ROS termelés [136], a környező immunsejtekből származó reaktív oxigén származékok azonban módosíthatják a T-sejtek aktiváló ingerre adott válaszát [137]. Nox2 knock out (KO) egereknél a vad típusú (VT) társaikhoz képest nagyobb valószínűséggel jelentkező arthritis és magasabb proinflammatorikus citokin (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) szérumkoncentráció háttérében például T-sejt fejlődési zavart feltételeznek. A KO állatokban a proinflammatorikus effektor T-sejtek száma megnőtt, míg az immunválasz csendesítésében részt vevő regulátoros T-sejt (Treg) populáció csökkenését tapasztalták [138]. Kísérletesen előidézett cocciooidosisban nem találtak érdemi különbséget a VT és a Nox2 KO egerek patogén-eliminációjában. A KO egereknél azonban csökkent túlélést tapasztaltak, melyet ebben az esetben is a megnövekedett proinflammatorikus citokinszintre vezettek vissza [139]. A p47<sup>phox</sup>-deficiens egerekben VT társaikkal összehasonlítva gyakrabban fejlődik ki arthritis és kísérletes autoimmun encephalomyelitis (a sclerosis multiplex állatmodellje), amely háttérében színén a T-limfociták megváltozott redox-homeosztázisa állhat. Érdekes emberi adat, hogy rheumatoid arthritisben szenvedő egyéneknél nagyobb valószínűséggel található funkcióképtelen p47<sup>phox</sup> gének [140]. A CGD-ben tapasztalt fokozott autoimmun hajlam háttérében a T-sejtek megváltozott redox homeosztázisa mellett egyéb sejtek működésének zavara is felmerül.

A CGD-ben megfigyelhető immunregulációs defektus további szereplői a B-sejtek lehetnek. CGD-ben szenvedő egyéneknél ugyanis megváltozik a B-sejt populáció összetétele: emelkedett a CD5+ B-sejtek száma a CD27+ sejtek pedig kisebb arányban voltak jelen. A CD27+ B-sejtek számának a CGD genotípusától függetlenül megfigyelhető csökkenése felveti, hogy a phox szerepet játszik a memória B-sejtek differenciálódásában [141]. A Nox2-hiánya miatt CGD-ben szenvedő páciensek csökkent memória B-sejt populációval rendelkeznek. Az ilyen egyénekből származó B-limfociták különböző stimulusokra csökkent proliferációval válaszolnak, ennek megfelelően a kanyaróvírus ellenes antitest-titer és az antitest-termelő sejtek száma is alacsonyabbnak adódott, mint egészséges egyének esetén [142]. A fentiekkel részben ellentmondó eredményekre jutott Moir és munkacsoportja. Eredményeik alapján a CGD-ben szenvedő egyének a CD27+ B-sejtek arányának csökkenése mellett kevesebb

IgG-szecernáló sejttel rendelkeznek, míg az influenzavírus specifikus antitesteket termelő B-sejtek száma és az antitest titere normálisnak bizonyult [143]. Az ellentmondás egyik magyarázata a különböző vírusokra adott eltérő immunválasz lehet. A rendelkezésre álló adatok alapján tehát jelenleg még nem világos, hogy a B-sejtek milyen szerepet játszanak a CGD patogenezisében.

A közelmúltban napvilágra került adatok a mononukleáris falósejtek (monocita, makrofág, dendritikus sejt) immunmodulációban játszott szerepére világítanak rá. A p47<sup>phox</sup> KO egerek CD68 promotor régiója után a vad típusú p47<sup>phox</sup> génjét klónozva olyan egyedekhez jutottak, melyek mononukleáris falósejtei normális phox aktivitással rendelkeztek (részleges KO egerek). Az ilyen egerek a p47<sup>phox</sup> KO egyedekhez képest fokozott patogén-ölési képességgel rendelkeznek és ritkábban szenvednek infekciós kórképekben. Emellett a részleges KO egerek a p47<sup>phox</sup> deficiensekhez képest mérsékelt proinflammatorikus citokin (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) koncentrációval rendelkeztek, és mérsékeltebb hiperinflammatorikus tüneteket mutattak [144,145].

### 3.6. Egyéb NADPH-oxidáz izotípusok fehérvérsejtekben

Míg fagocitákban a Nox2 egyértelműen a legfontosabb Nox izotípus (Nox2 hiányában teljesen elvész a szabadgyök-termelés [2]), egyes adatok a limfocitákban többféle NADPH-oxidáz jelenlétére utalnak.

Nyirokcsomókban és lépben magas Nox5 RNS-kifejeződést találtak, ez alapján feltételezték a Nox5 jelenlétét B- és T-sejtekben egyaránt, a keringő limfociták azonban nem tartalmazták a fehérjét [146].

T-sejt blaszt irányba differenciáltatott primer T-sejteken kisfokú Nox2 kifejeződést és ROS termelést tapasztaltak [147], emellett szintén T-sejt blasztokon és sejtvonalakon kimutatták a Duox1 jelenlétét [148]. Az felsorolt fehérjék jelenléte primer T-sejteken azonban erre vonatkozó közvetlen adatok hiányában kérdéses.

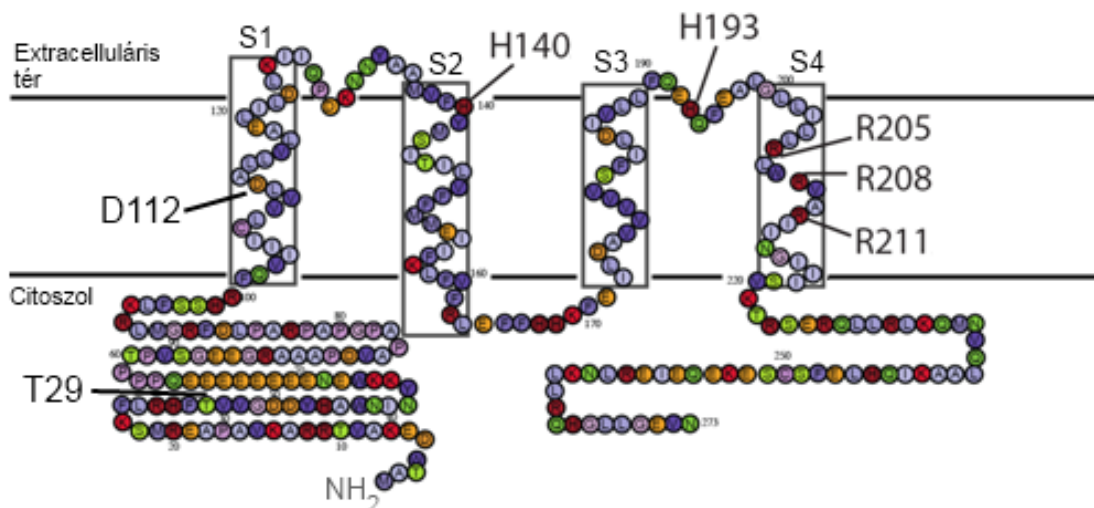
Összességében elmondható, hogy valamennyi érdemi szabadgyök-termelésre képes fehérvérsejtben a Nox2 a domináns NADPH-oxidáz altípus.

### **3.7. A feszültségfüggő protoncsatorna felépítése, működése és szabályozása**

Amint azt már korábban leírtam, a Hv1-mediált feszültségfüggő protonáram hatékonyan képes csökkenteni a phox működése által kiváltott depolarizációt és a citoplazma savanyodását, melyek az oxidáz működését gátolják. Mindezek alapján a Hv1-re ma sokszor mintegy kiegészítő oxidáz alegységre tekintenek olyan sejtekben, ahol intenzív NADPH-oxidáz aktivitás lehet jelen.

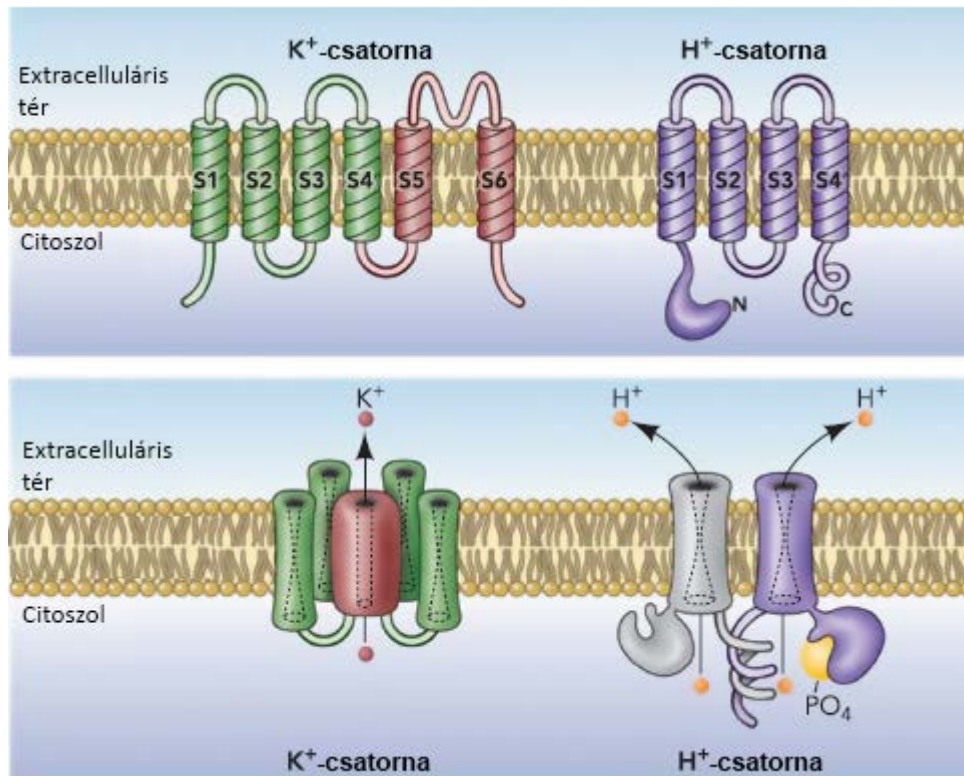
Feszültségfüggő protonáram létezését 1982-ben csiga neuronokon igazolták [149], bár egysejtűekben egy évtizeddel korábban már feltételezték létezését [150]. Humán sejtekben a 1990-es évek első felében mutattak ki protonáramot [101,151], majd fehérvérsejtekben leírták és tanulmányozták a protoncsatorna szabadgyök-termelésre kifejtett szerepét [152,153]. Az áram háttérében álló egyetlen fehérje aminosav szekvenciáját 2006-ban derítették fel [154,155], utat nyitva ezzel az egyes aminosavak, domének szerepének feltárása előtt.

A Hv1 génje emberben a 12. kromoszómán található, elnevezése HVCN1 (az angol hydrogen voltage-gated channel 1 rövidítése után). A Hv1 273 aminosavból felépülő kb. 32 kDa molekulatömegű fehérje (9. ábra) [154]. A fehérje egérben megtalálható homológja (mouse Hv1, mHv1) 269 aminosavból áll [155].



**9. ábra. Az emberi feszültségfüggő protoncsatorna (Hv1) szerkezete.** A csatorna szerkezetét krisztallográfias mérésekkel is megerősítették. A Hv1 négy transzmembrán szegmessel (S1-S4) rendelkezik, C-terminálisan egy coiled-coil domént azonosítottak. A funkcionálisan lényeges aminosavak egybetűs rövidítésük és a fehérjeláncon belüli pozíciójuk megjelölésével külön kiemelésre kerültek. T29: a PKC által foszforilált treonin, mely kulcsfontosságú a csatorna fokozott működésének kiváltásában. D122: mutációja a csatorna protonszelektivitását csökkenti. H140 és H193: a gátlószerként alkalmazott  $Zn^{2+}$  koordinációját végző két hisztidin. Mutációjuk csökkenti a Hv1  $Zn^{2+}$ -érzékenységét. R205, R208, R211: az S4 szegmens feszültségérzékelésért feltehetően felelős argininek. [154,156,157] alapján.

A Hv1 fehérjeláncán belül négy transzmembrán szegmens található, és a molekula N- és C-terminálisa egyaránt a citoszolban foglal helyet [154,155]. A natív fehérje homodimert alkot, melyet a C-terminálisan elhelyezkedő coiled-coil domének közötti kölcsönhatások stabilizálnak [158–162] (10. ábra). A Hv1 szerkezeti homológiát mutat egyéb, ún. klasszikus feszültségfüggő ioncsatornák ( $Na^{+}$ - és  $K^{+}$ -csatornák) feszültségérzékelő doménjével (voltage sensing domain-VSD) [100]. A klasszikus feszültségfüggő csatornák 6TM szerkezetűek, a 4TM-szerkezetű VSD mellett egy 2TM szegmensből álló pórusrégióval is rendelkeznek (10. ábra). A klasszikus csatornák esetében 4 ilyen pórusrégió alkot egy közös pórust [163].

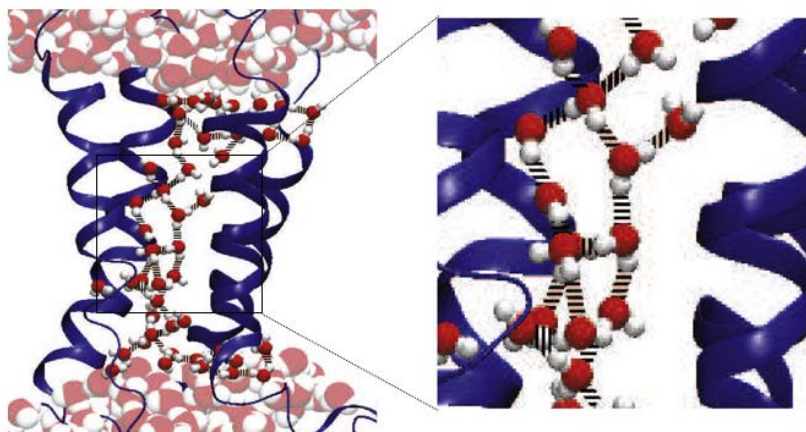


**10. ábra. A feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák és a Hv1 szerkezetének és működésének összehasonlítása.** A felső sorban a csatornaképző monomerek doménszerkezete, az alsóban a funkcionális egység sematikus ábrázolása látható. A feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák 6 transzmembrán szegmessel rendelkező egységekből épülnek fel, melyen belül az első négy a feszültség érzékelését végzi, kettő pedig a pórust alkotja. A működőképes csatorna négy ilyen alegységből épül fel, ahol egy központi pórus körül négy feszültség szenzor helyezkedik el. A protoncsatorna szerkezete a feszültségérzékelő doménhez hasonló, amely itt csatornaként is funkcionál. Noha a protoncsatorna monomerként is funkcióképes, natív állapotban homodimert képez, melyet a C-terminális coiled-coil domének tartanak össze. Az N-terminálisan található foszforilációs hely a fokozott aktivitási állapot létrehozásáért felelős. [157] alapján.

A leírtak alapján felmerül a kérdés, hogy miként képes a Hv1 protonokat vezetni, ha nem rendelkezik az egyéb feszültségfüggő csatornákra jellemző pórus-doménnel? A kérdés megválaszolásához meg kell ismerkednünk a protoncsatorna (és a VSD-k) szerkezetével. A VSD-n belül a negyedik TM szegmens (S4) felelős a membránpotenciál ( $E_m$ ) érzékeléséért, az S4 hélixben periódikusan elhelyezkedő



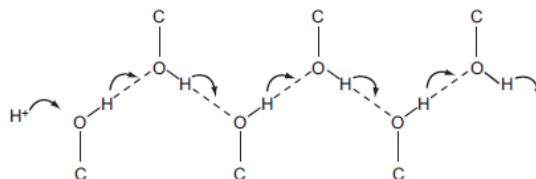
pozitív töltésű arginineknek köszönhetően [154,155]. A pozitív töltésű S4 hélix a membránpotenciál változásának hatására elmozdul, ezáltal klasszikus ioncsatornában elősegíti a nyitott, illetve a zárt konformáció kialakulását a VSD és a hozzá kapcsolódó pórus-domén konformációjának megváltoztatásán keresztül [164–166]. A VSD-fehérjék oly módon épülnek be a membránba, hogy a fehérje extra- és intracelluláris oldalán egyaránt vízmolekulákkal kitöltött „üreg” maradnak, melyeket - legnagyobb valószínűség szerint - az S4 szegmens oldalláncai választanak el egymástól [167,168]. Az S4 szegmens az  $E_m$  változás hatására elmozdul, ekkor a VSD transzmembrán szegmensei szerkezetüktől függően pórust alakíthatnak ki, melyek különböző ionokra permeábilisak lehetnek. A vad típusú  $K^+$ - és  $Na^+$ -csatornákból található VSD-k semmilyen  $E_m$  értéken nem vezetnek ionokat, bizonyos mutációkkal azonban feszültségfüggő csatornákká alakíthatók [168–170]. Jelenlegi elképzelésünk alapján a protonvezető-képesség a Hv1 esetében úgy jön létre, hogy a fehérjén belül depolarizáció hatására létrejön egy „pórus”, melyben aminosav oldallánccok által fixált vízmolekulák találhatóak (ún. „fagyott víz” modell-ld. 11. ábra) [167,171].



**11. ábra. A protonvezetés feltételezett modellje a Hv1-en keresztül.** A bal oldali panelen a feszültségfüggő protoncsatorna valószínűsített szerkezete látható nyitott állapotban. A Hv1 fehérjeláncát kék szín jelöli. A transzmembrán szegmensek helikális struktúráként jelennek meg, az egyéb szerkezeteket kék vonal szimbolizálja. A vízmolekulákat fehér-piros gömbök jelölik. Látható, hogy a fehérje extra- és intracelluláris oldalán egyaránt vízmolekulákkal kitöltött üregek alakulnak ki. A jobb panelen a fehérje központi részének nagyított szerkezete látható. Megfigyelhető, hogy a membrán két oldalán elhelyezkedő vízmolekulák a csatorna nyitott állapotában kapcsolatba kerülnek egymással. A protonok vezetése a sávozott vonalakkal jelölt hidrogén-hidakon keresztül valósul meg (hidrogénhíd-lánc, ld. 12. ábra). [171] alapján.

A vízmolekulák nem képesek elmozdulni a fehérjén belül, protonok azonban a vízmolekulák közötti hidrogénhíd-kötések között átugorva átjuthatnak a membrán egyik oldaláról a másikra (ún. hidrogénhíd-lánc, hydrogen-bonded chain, HBC, 12. ábra) [172]. A fent leírt vezetési mechanizmusból következik, hogy a csatorna szinte kizárólag protonokra permeábilis,  $\text{Na}^+$ -vezetőképessége  $1/10^6$  része a protonokénak [151,173], mely érték egyes szerzők szerint még alacsonyabb [157]. A protonszelektivitásért az S1 szegmensben található 112-es pozíciójú aszparatát (Asp112) a felelős. Az Asp112 mutációja csak akkor eredményez protonszelektív csatornát, ha az aszpartátot a másik savas aminosavra, glutamátra cserélik, minden egyéb esetben nagyban csökken a csatorna proton-szelektivitása, emellett a mutáns fehérjék nagy része protonok helyett anionokat vezet. Kísérletes eredmények alapján az

Asp112 szerepe a pórus leszűkítése, hogy az csak protonok számára legyen átjárható [174].



**12. ábra. A hidrogénhíd-lánc (hydrogen-bonded chain, HBC) mechanizmus.** A folyamat során a protonok nem diffúzióval jutnak egyik pontból a másikba, hanem különböző molekulák hidroxil-csoportjai között helyet cserélve haladnak. Az így létrejövő protonáramlás sebessége meghaladja a vízben mérhető protondiffúzióét. [157].

A Hv1 küszöbpotenciálját az ioncsatornák között egyedülálló módon a vezetett ionok koncentrációja is szabályozza: az IC  $H^+$  koncentráció emelkedése és az EC csökkenése, vagyis az EC tér felé mutató pH gradiens emelkedése serkenti a csatorna aktivációját [175]. A csatorna aktivációjához szükséges ún. küszöbpotenciál a következő (tapasztalati) képlettel határozható meg:

$$(2) V_{akt} = 0,76E_{H^+} + 18mV$$

Ahol:

$V_{akt}$  a küszöbpotenciál

$E_{H^+}$  a proton egyensúlyi potenciálja

A proton egyensúlyi potenciálja 37°C-on:

$$(3) E_{H^+} = 60(pH_{IC} - pH_{EC}) mV$$

A fenti képletekből kiszámolható, hogy a csatorna küszöbpotenciálja széles pH gradiens tartományban pozitívabb a protonok egyensúlyi potenciáljánál, így széles tartományban a csatornán az áram kifelé fog folyni. A fenti ismereteket összegezve tehát a nyitott Hv1 hatékonyan, energia-befektetés nélkül képes fokozni a protonok eltávolítását a sejtől [176].

A Hv1 konduktanciája (g) más ioncsatornákkal összehasonlítva alacsonynak számít, a csatorna protonvezető-képessége ( $g_H$ )  $pH_{IC}$  7,2 mellett kb. 78 fS [177]. Emellett a vezetőképesség és a kapuzási kinetika egyéb feszültségfüggő csatornákhöz képest jobban függ a hőmérséklettől [178].

Amint azt említettem a Hv1 döntően homodimer formában van jelen a sejtmembránban. A diméren belül mindkét alegység szeparált póruval rendelkezik, kapuzásuk azonban ko-operatíván valósul meg, melynek következtében lassul az aktiváció, és meredekebbé válik a  $E_m$ - $g_H$ - összefüggés. A kooperatív kapuzás élettani jelentősége valószínűleg az, hogy a légzési robbanás során megkönnyíti a töltéskompenzációhoz szükséges mennyiségű protoncsatorna aktiválását [153,153].

A feszültségfüggő protoncsatorna rendelkezik egy ún. fokozott aktivitási állapottal (angolul enhanced gating mode), melyet aktivált granulocitákban írtak le, és a következő változások jellemzik [179]:

1. Gyorsabb aktiváció
2. Lassabb inaktiváció
3. Megnövekedett vezetőképesség
4. A csatorna küszöbpotenciálja 40 mV-tal negatívabbá válik

A fokozott aktivitási állapot létrehozásában a PKC-nek döntő szerepe lehet, mivel a PKC inhibitorai gátolják az állapot kialakulását [180]. A kísérletes adatok arra utalnak, hogy a PKC hatását a Thr29 foszforilációja közvetíti, az aminosav alaninra cserélése ugyanis meggátolja a fokozott aktivitási állapot kialakulását [181]. Érdekes módon a fenti változások nem mindegyike figyelhető meg olyan sejtípusokban, melyekben nincs jelen, vagy csekély mennyiségű a phox (pl. bazofil granulociták, CGD-és betegek neutrofilei): az inaktiváció lassulása elmarad, és a küszöbpotenciál is csak 10-20 mV-tal válik negatívabbá (az egyéb változások mértéke nem módosul) [182]. A jelenség magyarázata ismeretlen, mindazonáltal jól rávilágít a Hv1 és a Nox2-komplex között fennálló szoros kapcsolatra [183].

A fokozott aktivitási állapot fiziológias jelentősége a légzési robbanás még hatékonyabb támogatása lehet. Mint azt a korábbi fejezetekben láthattuk, a NADPH-oxidáz aktivitását a membrán depolarizációja gátolja [153]. Fokozott aktivitási állapotban a protoncsatornák alacsonyabb membránpotenciál mellett nyitnak, és időegység alatt nagyobb mennyiségű protont transzportálnak. Emiatt a teljes

töltéskompenzáció a „normál kapuzáshoz” képest kb. 18 mV-tal negatívabb értéken jön létre, a kisebb mértékű depolarizáció következtében pedig a NADPH-oxidáz nagyobb intenzitással képes működni [184].

### **3.7.1. A Hv1-re ható legfontosabb farmakonok**

A Hv1-nek eddig nem ismert specifikus gátlószere. Működése nehézfém ionokkal hatékonyan gátolható, melyek közül a cink divalens formája ( $Zn^{2+}$ ) a leghatásosabb [185]. A rendelkezésre álló adatok alapján a  $Zn^{2+}$  koordinálásában két extracelluláris hisztidin (His140 és His193) játszik szerepet, mivel e két aminosav mutációja érzéketlenné teszi a protoncsatornát a  $Zn^{2+}$  hatásai iránt [154,186]. A  $Zn^{2+}$  nem a Hv1 pórusát tömíti el, hanem a csatorna kapuzását változtatja meg: lassítja az aktivációt és pozitív értékek felé tolja a küszöbpotenciált. A cinkgátlás további fontos tulajdonsága, hogy hatásereősége az EC pH csökkenésével meredeken gyengül. A jelenleg elfogadott magyarázat szerint a jelenségért a már említett két hisztidin oldallánc felelős. A szóban forgó hisztidinek ugyanis azonos funkciós csoporton a  $Zn^{2+}$  mellett protonok kötésére is képesek, így kompetíció jön létre a két ion között [185].

A csatorna gátlószereinek fejlesztésében új távlatokat nyithat a felfedezés, hogy bizonyos fenilamin karboxilát származékok (melyek közé a diklofenak is tartozik) megváltoztatják az mHv1 feszültség-áram görbét, így egyes anyagok a gátlás, mások az aktiváció irányába változtatják meg a csatorna működését [187]. Az újonnan leírt fenilamin karboxilátok a csatornák széles körének működését befolyásolják (mHv1, tranziens receptor potenciál V1 és egyes feszültségfüggő káliumcsatornák), de a későbbiekben Hv1-specifikus hatóanyagok kifejlesztése is elképzelhető.

### **3.8. A feszültségfüggő protoncsatorna kifejeződése fehérvérsejtekben**

Kísérletes munkám kezdetekor nem álltak rendelkezésre olyan közlemények, melyek a Hv1 kifejeződését a különböző emberi fehérvérsejt típusokban megbízható módon demonstrálták volna. A protoncsatorna expressziójára a sejtfelszíni protonáram-denzitás (pA/pF) értékek alapján lehetett következtetni. Ezen megközelítés hátránya,

hogy az intracelluláris membránokban helyet foglaló Hv1 mennyiségéről nem ad felvilágosítást. A protonáram-denzitás mérésével emberi fehérvérsejtekben a következő adatokat rögzítették:

1. eozinofil granulocita ~200 pA/pF
2. neutrofil granulocita 17 pA/pF
3. bazofil granulocita ~100 pA/pF
4. monocita 28 pA/pF
5. B-limfocita 94,7 pA/pF
6. T-limfocita 0,9 pA/pF (az ilyen alacsony áramdenzitás érték valószínűleg aspecifikusnak tartható [188])

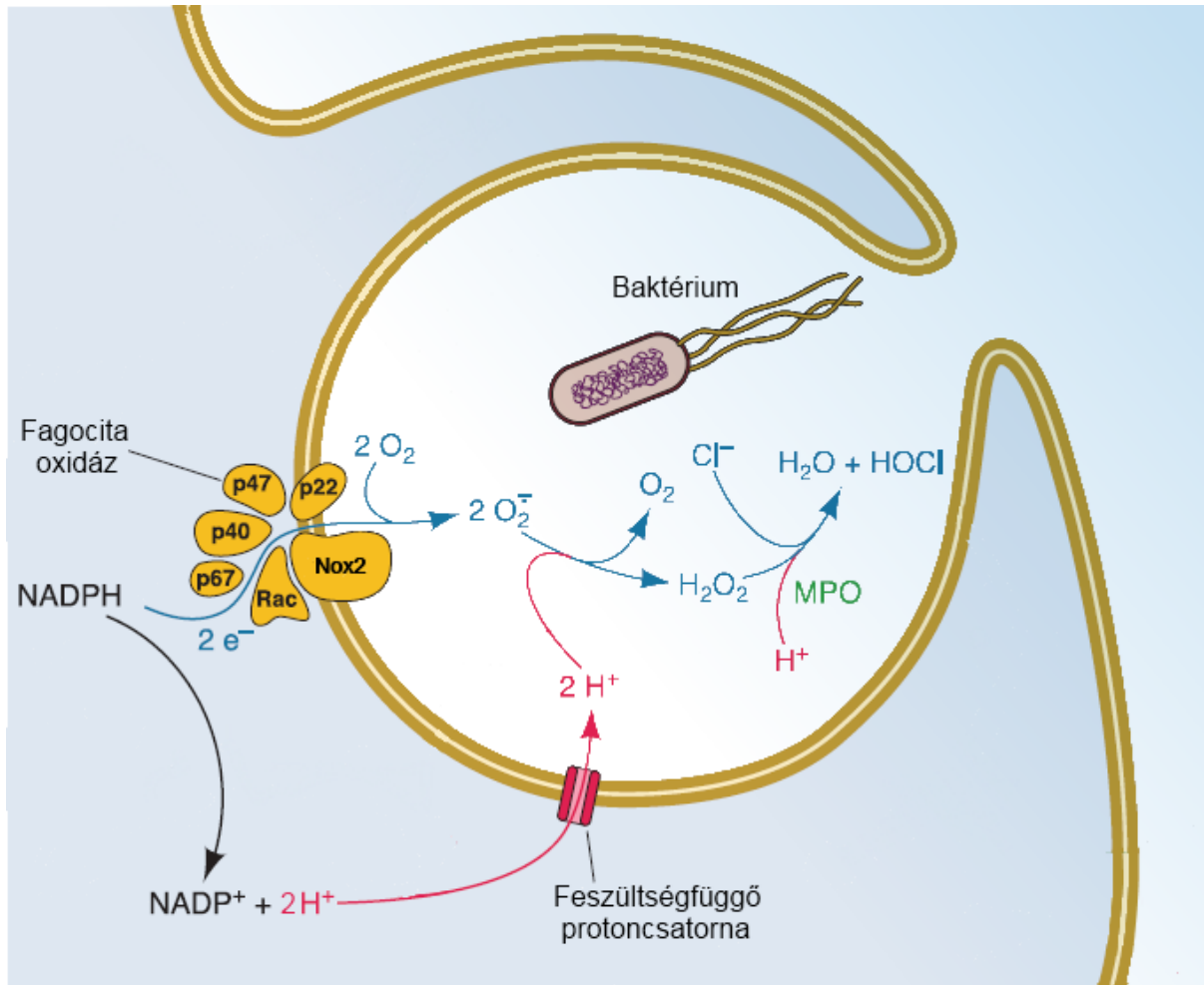
A protonáram-denzitás értékek alapján látható, hogy a Hv1 expressziója a NADPH-oxidázéval többé-kevésbé párhuzamos. A bazofilek és a B-sejtek magas Hv1 expressziója azonban nem korrelál a sejtekben megtalálható phox mennyiségével, mely alapján ezekben a sejtekben a protoncsatorna oxidáztól független szerepe valószínűsíthető (részletesen lásd a következő fejezetben).

A primer emberi fehérvérsejtek fehérjeszintű expressziós adatainak hiányában a humán Hv1 számos jellemzőjére heterológ expressziós rendszerekben, vagy genetikailag módosított állatmodelleken kapott eredmények alapján következtethetünk. Bármennyire is nélkülözhetetlenek az így nyert eredmények, mégsem nyújtanak direkt információt a Hv1 emberi (fehérvér)sejtekben betöltött szerepéről. Hiányzott továbbá a közvetlen bizonyíték, hogy a Hv1 emberi fehérvérsejtekben protoncsatornaként funkcionál. Emellett az sem volt tisztázott, hogy a protoncsatorna a heterológ expressziós rendszerekhez hasonlóan emberi fehérvérsejtekben is dimert alkot-e, vagy esetleg monomerként fordul elő, illetve hogy hogyan változik a monomer és dimer forma aránya aktiváció hatására. Ismeretlen volt továbbá a Hv1 nyugvó és aktivált emberi fehérvérsejteken belüli elhelyezkedése is. A funkcionális kapcsolat miatt valószínűsíthető volt a Hv1 és a Nox2 kapcsolt kifejeződése a sejten belül (melyet a patch-clamp mérések eredményei is alátámasztottak), a kapcsoltság valódi mértéke azonban emberi fehérvérsejtekben nem volt ismert.

### 3.9. A feszültségfüggő protoncsatorna szerepe fehérvérsejtekben

Ma általánosan elfogadott, hogy a protoncsatorna működése hozzájárul a fehérvérsejtek hatékony szabadgyök-termeléséhez (13. ábra). A protonáram gátlása, vagy az mHv1 genetikai defektusa csökkenti a neutrofil és eozinofil granulociták [153–155,189], a makrofágok [188] és egy tanulmány szerint a B-sejtek ROS-termelését [190]. Ezek alapján nem meglepő, hogy - ugyan a Hv1 hiánya miatt kialakult CGD-ről nincs tudomásunk - a feszültségfüggő protoncsatorna élettani és kórélettani funkciói nagy átfedést mutatnak a ROS hatásaival. Hv1-hiányos egerek neutrofilei in vitro csökkent ölési képességgel rendelkeznek, bár ez in vivo nem manifesztálódik [191]. Hv1-hiányos egér neutrofilekben a fokozott depolarizáció következtében kevesebb  $Ca^{2+}$  áramlik be a sejtekbe, ezért migrációjuk is károsodik [189]. Emellett a Hv1 gátlása a citoplazma fokozott savanyodásával jár, melyet az egyéb protoneltávolító mechanizmusok csak részben képesek kompenzálni [192]. A protoncsatorna a fémből készült ortopédiai endoprotézisek fertőzésének létrejöttében is szerepet játszhat. Az ilyen protézisekből ugyanis kobalt ionok oldódnak ki, melyek a  $Zn^{2+}$ -hoz hasonlóan gátolják a Hv1 működését, ezáltal nehezítve a protézisen megtelepedett kórokozók elpusztítását [193].

A CGD-hez hasonlóan Hv1-deficiens egerekben nemcsak (szubklinikus) ölési defektus tapasztalható, hanem autoimmun tünetek (lépmegnagyobbodás, autoantitestek, nephritis) is létrejönnek. A jelenség hátterében T-sejt regulációs zavart feltételeznek, mivel a Hv1 KO egerek vad típusú társaikhoz képest nyugalomban is nagyobb számú aktivált T-limfocitával rendelkeznek [194].



**13. ábra. A protoncsatorna szerepe a légzési robbanás során.** Stimulus (esetünkben egy baktérium) hatására aktiválódik a fagociták membránjában a Nox2-komplex. Az enzimaktivitás következtében az extracelluláris térben szuperoxid ( $O_2^-$ ) keletkezik, ami szubsztrátként szolgál további reaktív oxigénszármazékok ( $H_2O_2$ , HOCl) képezéséhez, melyek elősegítik a kórokozó elpusztítását. A Nox2 által közvetített elektrontranszport azonban a plazmamembrán depolarizációjával jár, a citoplazmában visszamaradó protonok pedig csökkentik az intracelluláris pH-t. Ezen két folyamat korlátozásához járulhatnak hozzá a feszültségfüggő protoncsatornák úgy, hogy a fent említett változások hatására nyitott állapotba kerülnek, és kiürítik a felgyülemlt protonokat. A protoncsatornák funkciójának hiányában csökken a szabadgyök-termelés. MPO: mieloperoxidáz. [157] alapján.



A Hv1 működése káros is lehet, ha a szabadgyök-termelés szövetkárosító hatása kerül előtérbe. Jó példája ennek a központi idegrendszer rezidens makrofágja, a mikroglia, ahol a protoncsatorna szintén a ROS termelést támogatja, és hiányában csökkent phox aktivitás mérhető. A csökkent szabadgyök-termelés jótékony hatását feltételezik azon megfigyelés háttérében, miszerint kísérletesen előidézett ischaemiás stroke esetén a Hv1 KO egerekben kisebb a károsodott agyterület mérete, és a neurológiai deficit is enyhébb VT társaikhoz képest [157].

A B-limfociták igen kifejezett feszültségfüggő protonárammal rendelkeznek [195], mely a ma legelfogadottabb elképzelés szerint e sejtekben is a Nox2-komplex szolgálatában áll. Hv1-hiányos egér B-sejtek a BCR stimulálására csökkent szabadgyök-termeléssel reagálnak, mely a már ismertett mechanizmussal a foszfatazok fokozott aktivitásához vezet. A csökkent foszforiláció következtében lassul a sejtek anyagcseréje és proliferációja, ami in vivo csökkent antitest-válaszhoz vezet [196]. Megjegyzendő, hogy a B-sejtek phox-tartalma és oxidatív robbanásának intenzitása messze elmarad a fagocitákétól [93], továbbá több káliumcsatorna is gondoskodik aktivált B-sejtekben a membránpotenciál negatívan tartásáról [197], mely körülmények a Hv1 megnyílásának nem kedveznek. Nem meglepő tehát, hogy a fenti eredményeknek ellentmondanak egy másik munkacsoport adatai, mely a Hv1-nek autonóm, a phox-tól független funkciót tulajdonít. Éretlen B-sejtvonalakban a Hv1 overexpressziója a sejtciklus gátlásán keresztül csökkent proliferációs képességhez vezetett. A protoncsatornát transzgenikusan is kifejező egerek kisebb számú érett B-sejttel rendelkeznek, megerősítve a Hv1 sejtsztódásban és differenciációban játszott szerepét [198].

Szintén a protoncsatorna NADPH-oxidáztól független működésére világitanak rá a bazofil granulocitákon kapott eredmények. A bazofil granulociták nem tartoznak a falósejtek közé, legfontosabb funkciójuk a leggyakrabban IgE-stimulus hatására bekövetkező hisztamin-szekréció. A bazofilek abban is eltérnek a többi granulocitától, hogy nem mutatnak érdemi NADPH-oxidáz aktivitást, míg a feszültségfüggő protoncsatorna jelentős mennyiségben megtalálható bennük. Aktiváló ingerek hatására (PMA, IgE) a bazofil granulociták granulumaikból hisztamint szabadítanak fel, ami a sejtek pH-jának csökkenésével jár. Amennyiben a protoncsatorna működését  $Zn^{2+}$ -kel gátolják, a savanyodás kifejezettebbé válik, és csökken a hisztamin felszabadulás,

felvetve a Hv1 szerepét a citoszolikus pH aktiváció során végbemenő szabályozásában [199].

## 4. Célkitűzések

1. Tisztázni kívántuk, hogy emberi fehérvérsejtekben is szükséges-e a Hv1 a feszültségfüggő protonáram létrejöttéhez.
2. Tisztázni kívántuk, hogy a Hv1 emberi granulocitákban polimerizál-e in vivo.
3. Vizsgálni kívántuk, hogy emberi granulocitákban a Hv1 és Nox2 kifejeződése függ-e egymástól.
4. Vizsgálni kívántuk, hogy egészséges egyének neutrofil és eozinofil granulocitáinak phox-alegység és Hv1 kifejeződésében és légzési robbanásában milyen mennyiségi, illetve minőség eltérések vannak.
5. Tisztázni kívántuk, hogy a hasúri B-limfociták baktériumölő képességében szerepet játszik-e a fagocita oxidáz.

## 5. Módszerek

### 5.1. Oldatok

A felhasznált reagenseket többségében a Sigma-Aldrich-től szereztük be, és a kísérleteinket döntően szobahőn (21-26°C) végeztük. Azokban az esetekben, amikor a fentiektől eltérően jártunk el, a pontos körülményeket megadom. A transzfekciós, sejtjelölő reagensek, illetve minden egyéb speciális anyag alkalmazása során pontosan követtük a gyártó előírásait.

A patch-clamp mérések során használt fürdő- (extracelluláris) oldat összetétele: 1 mM CsCl, 1 mM tetraetil-ammonium-klorid, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 101 mM N-metil-D-glukamid és 200 mM HEPES (pH 7,55). A pipettaoldat összetétele: 1 mM CsCl, 1 mM tetraetil-ammonium-klorid, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 101 mM N-metil-D-glukamid és 200 mM MES (pH 6,15). A H-médium összetétele: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES és 5 mM glükóz (pH NaCl-dal 7,4-re beállítva). A granulocita izoláló (GI) puffer összetétele: 2 mM EDTA és 2% v/v főtális borjúsérum (FBS, Cat No. DE-14802-F, Lonza, [www.lonza.com](http://www.lonza.com)) RPMI 1640 médiumban. A szérummal opszonizált zimosán (serum treated zymosan-STZ) előállítására céljából natív zimosán szemcséket 30 percig 37°C-on inkubáltunk kevert humán szérummal (melyet legalább 3 egyén szérumából állítottunk elő). A diszucimidil-szuberátot (DSS) 250 mM-os, az N-etilmaleimidet (NEM) 400 mM-os, az N'N'-feniléndimaleimidet (N'N'-phenylendimaleimide, PDM) 10 mM-os koncentrációban DMSO-ban oldottuk. Első lépésben az Amphotericin B-t 80 mg/ml, a forbol-mirisztát-acetátot (PMA) 5 mM-os koncentrációban szintén DMSO-ban oldottuk, majd ezeket H-médiummal hígítva Amphotericin B-ből 1 mg/ml-es, PMA-ból 20 µM-os törzsoldatokat készítettünk. A difenil-jodónium (diphenyl-iodonium, DPI) 10 mM-os törzsoldatát DMSO-val készítettük. A fenilmetánszulfonil-fluoridot (phenylmethanesulfonile-fluoride, PMSF) 100 mM-os koncentrációban, etanolban oldottuk.

## 5.2. Egerek

A p22<sup>phox</sup> génjének mutációját hordozó *nmf333* egértörzs a Jackson Laboratory-ból származott ([www.jax.org](http://www.jax.org)). A Nox2 hiányos állatokat (*Cybb<sup>tm1Din</sup>*) Professor Ralf P. Brandes (Goethe Egyetem, Frankfurt) bocsátotta nagylelkűen a rendelkezésünkre. Kontrollként azonos korú hím C57Bl/6J egereket használtunk. Az egerek a táplálékhoz és a vízhez szabadon hozzáfértek.

## 5.3. Antitestek

Az emberi feszültségfüggő protoncsatorna kimutatására affinitás-tisztított, nyúl poliklonális antitestet alkalmaztunk 2 (Western blot-WB), vagy 4-8 (immunfluoreszcencia-IF) µg/ml-es koncentrációban. A Hv1 ellenes antitest (aHv1-N) előállítására céljából nőstény fehér nyulakat immunizáltunk egy olyan fehérje-konstrukcióval, melyben a Hv1 N-terminális 99 aminosavát kovalensen glutation-S-transzferázhoz kötöttük. Ugyanezen fehérje Affigel 15 gyöngyökre (Bio-Rad Laboratories, [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)) kovalensen kötött formáját alkalmaztuk a glutation-S-transzferáz ellenes antitestekre depletált nyúlserumok affinitás-tisztítására. Az aHv1-N negatív kontrolljaként 8 µg/ml normál nyúl IgG-t használtunk (Santa Cruz Biotechnology, [www.scbt.com](http://www.scbt.com)). Az egér Hv1 ellenes antitestet az emberi aHv1-N-el azonos módon készítettük.

Az IF kísérleteinkben az emberi Nox2 kimutatására a 7D5 jelű egér hibridoma felülúszóját használtuk 1:20 hígításban [200]. Izotípus kontrollként 2,5 µg/ml tisztított egér IgG1-et (BD Biosciences Pharmingen, [www.biosciences.com](http://www.biosciences.com)) alkalmaztunk.

Western blot kísérletek során az egér Nox2-t az NL7 antitesttel mutattuk ki (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Az emberi Nox2-re specifikus m48ab elnevezésű monoklonális antitestet [201] Dr. Dirk Roos bocsátotta nagylelkűen rendelkezésünkre, emellett a humán Nox2 kimutatására az NL7 antitestet is alkalmaztuk. A p67<sup>phox</sup> ellenes antitestet Dr. Német Katalin szívélyességének köszönhetjük. A p47<sup>phox</sup>-ot a Cell Signaling Technology ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)) #4312 számú antitestjével mutattuk ki. Az emberi p22<sup>phox</sup> ellenes antitestet (sc20781) a Santa Cruz Biotechnology Inc-től szereztük

be, az egér p22<sup>phox</sup> ellenes 16G7 monoklonális antitestet Françoise Morel bocsátotta rendelkezésünkre (Grenoble University, Grenoble). A Rac kimutatására a BD Biosciences antitestjét (#610650) használtuk. WB kísérleteinkben a felvitt fehérjék mennyiségét protein-diszulfid-izomeráz- (PDI) ellenes antitesttel (ab2792, Abcam), egér eredetű sejtek esetén monoklonális anti-aktin antitesttel (Sigma, St. Louis, MO, USA) kontrolláltuk. A tormaperoxidázzal jelölt másodlagos antitesteket a GE Healthcare-től vásároltuk. Az Alexa Fluor 488- és az Alexa Fluor 568-jelölt F(ab')<sub>2</sub> antitest-fragmenseket a Molecular Probes-től (probes.invitrogen.com) szereztük be.

#### 5.4. Sejttenyészet és transzfecció

A PLB-985 X CGD sejtek kivételével valamennyi sejtvonalat az ATCC-LGC-től szereztük be (www.lgcstandards-atcc.org), és kisebb módosításoktól eltekintve (részletesen ld. alább) előírásaiknak megfelelően tenyésztettük. A Cos-7 sejteket ún. Dulbecco által módosított Eagle féle médiumban tenyésztettük (GibcoBRL, Csertex kft, Magyarország), mely 10% v/v hőinaktivált FBS-t, 100 NE/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. A PLB-985 sejt kultúrákat RPMI 1640 médiumban inkubáltuk, mely szintén 10% FBS-t, 100 NE/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. Transzfecció során a Cos-7 sejteket 30 mm-es sejt kulturáló lemezekre (Greiner Bio-One, www.greinerbioone.com) helyeztük, majd 1 nappal ezután 1 µg plazmid-DNS-sel transzfeccióztuk. Transzfecció reagensként Lipofectamine 2000-et (Invitrogen) használtunk. A leukémiás PLB-985 sejt vonalat elektroporációval transzfeccióztuk (Amaxa Nucleofector Device, Amaxa Biosystems, www.amaxa.com), melyhez az Amaxa Cell Line Nucleofector kit-et alkalmaztuk (Amaxa Biosystems). Purinomycin-rezisztens PLB-985 klónokat a „kihígításos” módszerrel (limiting dilution) állítottuk elő. A PLB-985 és a PLB-985 X CGD sejtek [202] (melyeket Mary C. Dinauer bocsátott nagylelkűen rendelkezésünkre) neutrofil granulocita irányú differenciációját a kultúr médiumhoz adott 0,5% v/v dimetilformamiddal (DMFA) indukáltuk. A differenciációs nyomás növelésére egyes esetekben a tápoldat FBS koncentrációját 0,5%-ra csökkentettük.

## 5.5. Sejtizolálás

A fehérvérsejteket egészséges egyének vénás véréből izoláltuk, miután részletes felvilágosításukat követően írásos beleegyezésüket adták. A vörösvértesteket és leukocitákat dextrán-szedimentációval választottuk szét egymástól, melyhez vér, fiziológias sóoldatban oldott 4% m/v dextrán (Cat No. 17-0320, GE healthcare, [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)) és 3,13% m/v Na-citrát oldat 5:3:1 arányú elegyét használtuk. A kapott fehérvérsejt-frakciót ezután Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)) fölé rétegeztük, és 20 percig 400 g-vel centrifugáltuk, miáltal elkülönültek a mononukleáris sejtek (MC-k) a granulocitáktól (másnéven polimorfonukleáris sejtektől-PMN). Az ezt követő műveleteket 4°C-on végeztük. A PMN-eket szennyező vörösvértesteket hipozmotikus hemolízissel távolítottuk el (30 másodperc desztillált vízben, majd az ozmolaritás helyreállítása egyenlő mennyiségű 1,8% m/v NaCl oldattal), majd centrifugálás után a sejteket GI pufferben reszuszpendáltuk. A különböző fehérvérsejt-típusokat a kapott MC és PMN frakciókból izoláltuk fluorofórral ellátott antitestek, vagy paramágnesesen jelölt mikrogyöngyök, valamint mágneses szeparátor (VarioMacs, Miltenyi Biotec, [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)) használatával. A PMN frakciót CD16 mikrogyöngyök használatával eozinofil (CD16-) és neutrofil (CD16+) granulocitákra választottuk szét. A monocitákat pozitív szelekcióval a mononukleáris frakcióból nyertük ki CD14 mikrogyöngyök segítségével. A monocita-depletált MC frakcióból munkatársaim T- és B-limfocitákat izoláltak (az eljárást a szerző nem végezte). A T-sejtek anti-CD3-PE (Beckmann Coulter, Fullerton, CA), a B-sejtek anti-CD19-FITC (BD pharmingen, San Diego, CA) antitestekkel lettek jelölve, a szétválasztáshoz FACSvantage Diva Cell Sorter-t alkalmaztunk (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Az egér eredetű sejtek izolálásához az állatokon cervikális diszlokációt hajtottunk végre. A hasüregi (PerC, ti. peritoneal cavity,) sejteket a peritoneális tér öblítésével nyertük (5 ml RPMI + 10% FBS). Lép eredetű B-sejtek izolálásához a lépeltávolítása után 70 µm pórusméretű szűrőn öblítés mellett áttörtük, hogy sejtuszpenziót kapjunk. A kapott szuszpenziókból a B-sejteket a gyártó utasításainak megfelelően, CD19 paramágneses mikrogyöngyök (Miltenyi Biotec) felhasználásával izoláltuk. A B-

limfociták tisztasága valamennyi vizsgált esetben 95% felettinek adódott, a szennyező sejtek PerC B-sejtek esetén döntően makrofágok voltak.

## 5.6. Western-blot kísérletek

A mintapuffer redukáló anyagként 5% v/v  $\beta$ -merkaptoetanolt ( $\beta$ -ME) tartalmazott. A mintákat általában nem hőkezeltük, amennyiben mégis, azt külön jeleztem. A mononukleáris sejteket jégen, 2x-es Laemmli mintapuffetben lizáltuk. A granulociták és PLB-985 sejtek líziséhez 4x-es Laemmli puffert használtunk, melyhez a pufferrel megegyező térfogatú desztillált vizes oldatot adtunk, ami 5 mM EDTA-t (250 mM törzsoldat desztillált vízben, pH NaOH-dal 7,4-re beállítva) és proteáz inhibitor koktélt (1 db Complete Mini tableta 10 ml desztillált vízben) tartalmazott. Az ettől való eltérést közöljük. Ahol kiemeltük, a granulociták és PLB-985 sejteket a lízis előtt 1:5000 diizopropil-fluorofoszfátot (DFP, 1:5000) tartalmazó oldatban (RPMI 1640 + 5 mM EDTA, PBS, H-médium) 30 percig jégen inkubáltuk. A DSS-kezelést 20 percig szobahőn végeztük, a reakciót 20mM TRIS-HCl (pH 8,0) hozzáadásával állítottuk le. A tiol-reaktív reagensekkel (20 mM NEM, 50  $\mu$ M PDM) 40 percig, jégen inkubáltuk a sejteket. A PDM-kereszt kötést 20 mM NEM segítségével állítottuk le. A kereszt kötő anyagokat 1 ml sejtszuszpenzióhoz adtuk (sejtkoncentráció  $10^6$ /ml) DFP jelenlétében. A reakció leállítás után a sejteket centrifugáltuk (200 g, 3 perc), majd 30 $\mu$ l, 2 mM PMSF-et tartalmazó 2x-es Laemmli pufferrel lizáltuk. A mintákat 8, vagy 10%-os poliakrilamid gélen futattuk, és nitrocellulóz membránra blottultuk. A nem-specifikus kötőhelyek blokkolása érdekében a membránokat 1 órán át PBS-ben oldott 5% m/v sovány tejpor oldatban inkubáltuk. Az elsődleges antitesttel (nyúl poliklonális vagy egér monoklonális) történt egyórás inkubációt követően a membránokat 5 alkalommal PBS + 0,1% v/v Tween oldatban mostuk. A tormaperoxidázzal (horseradish peroxidase, HRP) jelölt anti-nyúl, vagy anti-egér másodlagos antitesteket 1:5000 hígításban tartalmazó oldatban (összetétele: PBS + 0,1% v/v Tween 20 + 1% m/v sovány tejpor) 40 percig inkubáltuk a membránokat. Újabb öt mosási lépés után a jelölődést az erősített kemilumineszcencia módszerével (GE Healthcare, ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System), Fuji Super RX filmekken detektáltuk (Fujifilm, www.fujifilm.com). Bizonyos



kísérleteknél a filmeket digitalizáltuk, majd ImageJ segítségével meghatároztuk az egyes fehérjecsíkok integrált denzitását, melyet az adott sejttípushoz tartozó PDI-jelölés intenzitására normalizáltunk. Az így kapott értékeket használtuk fel az eozinofil/neutrofil (Eo/Ne) arány meghatározásához.

## 5.7. Immuncitokémia

Immunfluoreszcens (IF) kísérleteinkben a sejteket kétféleképp fixáltuk: (i) legtöbb alkalommal 20-30 percig hagytuk a sejteket fibronektinnel előkezelt vagy tiszta üveg fedőlemezre kitapadni, esetleg Cytospin centrifugával tapasztottuk tiszta tárgylemezre őket. A kitapadt sejteket azután 4% m/v paraformaldehid oldatban (PBS-ben oldva, pH 7,4) 20 percig fixáltuk. (ii) Más esetekben, - hogy csökkentsük a proteolitikus epítővesztést, illetve a mechanikus sejsérülést - egy előfixálási lépést is beépítettünk a protokollba. A sejteket ilyenkor 30 percig, jégen 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben (pH 7,4) inkubáltuk, majd centrifugálást követően 5 ml FBS-sel mostuk. A sejteket ezután  $30 \times 10^6$ /ml koncentrációban FBS-ben reszuszpendáltuk, majd a szuszpenzióból 5-30 $\mu$ l-t gyorsan fedőlemezre szárítottuk. Ezt követően az (i) pontban ismertetett fixálási lépést végeztük. A sejteket ezután 5 alkalommal PBS-sel mostuk, majd kétszer 10 percig 100 mM glicint tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. A fedőlemezeket 2 alkalommal PBS-ben mostuk, ezt követően a sejteket 20 percig 1% m/v bovin szérum albumint (BSA) és 0,1% v/v Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben permeabilizáltuk. A nem-specifikus kötőhelyek (pl. fehérvérsejtek Fc-receptorai) semlegesítésére több blokkoló oldatot is alkalmaztunk: (i): PBS + 10% v/v kevert humán szérum (mely legalább 3 donor szérumából készült) + 10% v/v normál kecskeszérum (normal goat serum, NGS) + 10% v/v humán Fc-receptor blokkoló reagens (Miltenyi Biotec) + 1 % m/v BSA, illetve (ii) PBS + 5% v/v NGS + 5% v/v humán Fc-receptor blokkoló reagens. Az inkubáció valamennyi blokkoló oldattal 1 órán át tartott. A fedőlemezeket ezután 1 órán át elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd PBS-ben hatszor mostuk, amit 1 óras inkubáció követett a másodlagos antitesttel. Bizonyos kísérleteinkben a sejtmag jelölése a másodlagos antitestek oldatához adott 0,2  $\mu$ M TO-PRO-3 (Life Technologies, www.lifetechnologies.com) segítségével történt. A sejteket ismét hat alkalommal

mostuk, végül Mowiol 4-88 reagensbe (mely polivinil-alkohol 4-88, glicerin, desztillált víz és TRIS pH 8,5 elegye) ágyasztuk, és fedőlemezzel fedtük.

## 5.8. Konfokális mikroszkópia és kolokalizációs analízis

A képek készítéséhez LSM 510, illetve LSM 710 konfokális mikroszkóp rendszert használtunk (Carl Zeiss, [www.zeiss.com](http://www.zeiss.com)) 63X 1,4 numerikus apertúrájú sík Apochromat és 40X 1,3 numerikus apertúrájú sík Neofluar objektívekkel (Carl Zeiss). Az fluorofórok gerjesztése 25 mW-os, 488 nm-es hullámhosszon emittáló argon, és 1,0 mW-os 543 nm-en emittáló hélium/neon lézerrel történt. Az Alexa Fluor 488 emisszióját 500-530 nm között áteresztő szűrővel, az Alexa Fluor 568 nm emisszióját 560 nm-es felül áteresztő szűrővel detektáltuk (LSM 510) vagy az adott fluorofór detektálásához optimális monokromátor beállításokat alkalmaztunk (LSM710). A képek szeletvastagsága 1  $\mu\text{m}$  (LSM510), illetve 0,5  $\mu\text{m}$  (LSM710) volt. A képeket az LSM, illetve ZEN (Carl Zeiss) programmal készítettük, a képek analízisét ImageJ-vel (Rasband, W. S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) végeztük. Az ábrákat ImageJ és Paint.Net 3.5 programmal ([www.paint.net](http://www.paint.net)) szerkesztettük.

A Hv1 és Nox2 kolokalizációjának vizsgálata kizárólag azokban a sejtekben történt meg, melyekben mindkét fehérje jelölődése a háttérfestődés kétszeresénél erősebbnek adódott. A kolokalizáció fokát a Pearson-féle koeficiens segítségével határoztuk meg [204]. A koeficiens értéke ( $r$ ) 1 és  $-1$  között változhat, ahol  $r=1$  teljes pozitív,  $r=-1$  teljes negatív korrelációt jelöl,  $r=0$  esetén nincs összefüggés az egyes csatornák pixeldenzitásai között. Az ábrákon a kolokalizáció szemléltetésére az ImageJ kolokalizáció kiemelő funkcióját alkalmaztuk. A funkció használata előtt az egyes emissziós hullámhosszokhoz tartozó képek átlagos szignál intenzitását korrigáltuk, illetve a küszöbintenzitásnál halványabb pixeleket kizártuk az értékelésből. Küszöbintenzitásnak a maximális intenzitás 20%-át vettük, az ettől való eltérést a megfelelő helyen jeleztem. A 0,6 és  $0,6^{-1}$  közötti intenzitás-aránnyal rendelkező pixel-párokat tüntettük fel kolokalizálóként.

## 5.9. Fagocitózis vizsgálata

Emberi granulocitákkal végzett kísérletekhez PMN, illetve 6 napig differenciáltatott PLB-985 sejteket használtunk  $10^8$ /ml koncentrációban, H-médiumban szuszpendálva. A sejteket 10 percig fibronektinnel bevont üveg fedőlemezekre tapasztottuk, majd a fagocitózis megindítására 300  $\mu$ g/ml végkoncentrációban STZ-t adtunk a mintákhoz. A reakció 37 °C-on zajlott, amit 10 perccel a zimozán hozzáadása után jégre helyezéssel és fixálással (ld. immuncitokémia) leállítottunk.

Egér peritoneális B-sejteket  $10^6$ /ml koncentrációban 10% FBS-t tartalmazó RPMI-ben szuszpendáltuk. Kísérleteink során nyugvó, és fagocitáló sejteket vizsgáltunk. A fagocitózis indukciója céljából a sejteket 1,5-2,5 órán át elölt, Alexa Fluor 594-gyel jelölt *S. aureus*-szal (Molecular Probes) 37 °C-on inkubáltuk. A baktérium:sejt arány 10:1 volt.

## 5.10. A ROS-termelés mérése

A humán sejteket H-médiumban, az egér sejteket HBSS-ben szuszpendáltuk, a granulocitákat  $10^6$ /ml, a 6-7 napig DMFA-val differenciáltatott PLB-985 sejteket és az egér leukocitákat  $2 \times 10^6$ /ml koncentrációban. Az intracelluláris ROS-termelés követésére a szuszpenzióhoz 250  $\mu$ M luminolt és 1 U/ml HRP-t adtunk [183]. A szuszpenzióból 100  $\mu$ l-t töltöttünk 96 lyukú Greiner Lumitrack 200 plate (www.greinerbioone.com) mélyedéseibe. Az extracelluláris szuperoxid-felszabadulás kimutatására a fenti szuszpenziókat egyenlő térfogatú Diogenes szuperoxid detektáló médiummal (National Diagnostics, www.nationaldiagnostics.com) kétszeresére hígítottuk, a kapott mintákból 100  $\mu$ l-t 96 lyukú lemezre vittük fel, majd a lemezt 15 perc alatt 37°C-ra melegítettük. A légzési robbanás megindítására granulocitákban 0,6  $\mu$ M PMA-t, vagy 0,4 mg/ml opszonizált zimozánt alkalmaztunk, a B-sejteket 20 $\mu$ g/ml anti-IgM antitest F(ab')<sub>2</sub> fragmensével (Jackson ImmunoResearch) aktiváltuk. A chemilumineszcenciát 37°C-on, fluori-luminométerben detektáltuk (Ascent Fluorocan FL, Thermo scientific, www.thermo.com, illetve Fluostar Optima lumino-fluorimeter, BMG Labtech.)

### 5.11. Nitroblue-tetrazólium (NBT) teszt

A paramágnesesen izolált PerC B-sejteket  $10^6$ /ml koncentrációban 0,5 mg/ml NBT tartalmú HBSS-ben szuszpendáltuk, majd Alexa Fluor 594-gyel jelölt, elölt *S. aureus*-szal 2 órán át inkubáltuk (Molecular Probes). A bakrérium:sejt arányt 10:1-re állítottuk be. Az inkubációs idő letelte után a sejteket cytospin centrifugával tiszta üveglemezre tapasztottuk, majd, 25 percig 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. A kapott minták mindegyikét Mowiol 4-88 reagensbe ágyztuk. A tárgylemezeket transzmissziós és fluoreszcens mikroszóppal tanulmányoztuk.

### 5.12. Az oxigénfogyasztás és pH-változás meghatározása

Az oxigénfogyasztás és pH-változás követése az XF Analyzer System (Seahorse Bioscience, [www.seahorsebio.com](http://www.seahorsebio.com)) segítségével történt. A granulocitákat  $2-3 \times 10^5$ /ml koncentrációban H-médiumban reszuszpendáltuk, a szuszpenzió 50  $\mu$ l-ét fibronectinnel előkezelt 96 lyukú XF Analyzer Microplate-be töltöttük, majd a sejteket 37°C-on 1 óráig inkubáltuk a kitapadás elősegítésére. Előkezelésként azért fibronectint használtunk, mert ez az egyik legmegfelelőbb anyag az adhézio-indukált aktiváció elkerülésére [86]. Az adhézios idő letelte után 130  $\mu$ l H-médiomot adtunk a mintákhoz. A légzési robbanást a fent leírt módon PMA-val vagy STZ-vel váltottuk ki. A parciális oxigénnyomás, valamint a médium pH-jának változása alapján az analizáló rendszer oxigénfogyasztási rátát (OCR) és extracelluláris savanyodási sebességet (extracellular acidification rate, ECAR) számolt. Valamennyi donor esetén meghatároztuk a legmagasabb OCR értéket ( $OCR_{max}$ ), majd az adott donor egyéb oxigénfogyasztási értékeit ehhez viszonyítottuk. A pH megváltozása befolyásolhatja a NADPH-oxidázok aktivitását, ezt elkerülendő erősen pufferolt oldatokat használtunk (10 mM HEPES, pH 7,4). Következésképpen minimális pH-ingadozást regisztráltunk, ami csökkenti a pH méréseinkből levonható következtetések erejét.

### 5.13. Molekuláris biológia

A molekuláris biológiai munkák zömét Dr. Baráth Mónika, Orient Anna és Dr. Petheő Gábor végezték. A Hv1 klónozásához érett dendritikus sejtekből teljes RNS-t izoláltunk Trizol reagens segítségével (Invitrogen, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). A cDNS szintézisét 20 mikroliter reakciós oldathoz adott 2.5 µg teljes RNS-ből oligo(dt)<sub>18</sub> primerek és RevertAid MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas, [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)) alkalmazásával végeztük. A Hv1-et kodoló szekvenciát (ti. a nyitott leolvasási keretet) A „TA clone kit” (Invitrogen) és nagy pontosságú PCR enzim (Fermentas) segítségével pCDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba (Invitrogen) illesztettük. Templátként a cDNS első szálának 1 µl-ét használtuk. A bázissorrend helyességét szekvenálással igazoltuk (Eurofins MWG Operon, [www.eurofinsdna.com](http://www.eurofinsdna.com)). A Hv1 mRNS (HVCN1, transkripció variáns 1) csendesítésére használt siRNS-eket és azok minimális megváltoztatásával kapott kontroll szekvenciáit siSTRIKE U6 plazmid vektorba (Promega, [www.promega.com](http://www.promega.com)) klónoztuk, mely szelekciós markerként zöld fluoreszcens proteint (GFP-Cat.# C3550), vagy puromicin rezisztencia gént (Cat.# C7900) tartalmazott. Az alábbi target szekvenciákat használtuk: (5’–3’): GAACGGCAACTCTTAAGGT (si-1), GAACCGGAACTCTTAAGGT (si-1c), GGTGGCCCGGATCATCAAT (si-2), GGTGGCGCGCATCATCAAT (si-2c).

### 5.14. Patch-clamp mérések

Patch-clamp méréseinket teljes sejt, feszültségzár felállásban végeztük CV-4-1/100U headstage-el felszerelt Axopatch-1D erősítővel (Axon Instruments, Foster City, CA). A pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból (1B120F-4, World precision Instruments Inc., Sarasota, FL) P-87 pipettahúzóval (Sutter Instrument Co., CA) készítettük. Hővel végzett polírozást követően a pipetták ellenállása pipettaoldattal feltöltött állapotban 7-13 MΩ-nak adódott. A fürdő oldatot Ag/AgCl elektród alkalmazásával földeltük. Az áramintenzitást 100-200 Hz-es aluláteresztő szűrővel (-3 dB, 8 pólusú Bessel filter), 250-500 Hz-es mintavételi frekvenciával detektáltuk. Adatgyűjtésre a pClamp 6, elemzésre a pClamp8 programot (Axon) használtuk. Annak

igazolása céljából, hogy a mért áramot valóban protonok hozták létre az ún. ramp-tail áramok segítségével meghatároztuk a depolarizáció-aktivált áram egyensúlyi potenciálját [205].

### 5.15. Az intracelluláris ölési képesség vizsgálata

Az izolált hasüregi B-sejtek baktériumölő aktivitását gentamycin protekciós esszével határoztuk meg [114]. A vad típusú (VT), p22<sup>phox</sup> vagy Nox2 KO egerek paramágnesesen izolált B-sejtjeit 10<sup>6</sup>/ml koncentrációban 10% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumban reszuszpendáltuk, majd 10:1 baktérium:sejt arányban életképes *S. aureust* (ATCC kód: 29213) adtunk a mintákhoz, amit 1,5 órás inkubáció követett. Az inkubáció végeztével 5 µg/ml végkoncentrációban gentamycint adtunk a szuszpenzióhoz, majd 0, 1,5, 4,5 és 18 órával a gentamycin hozzáadása után 500 µl-es mintákat vettünk. Valamennyi inkubáció 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett történt. A sejteket ezután két alkalommal 500 µl steril PBS-ben mostuk, majd lizáltuk (10 perc 900 µl desztillált vízben, majd az ozmolaritás helyreállítása egyenlő mennyiségű 1,8%-os NaCl oldattal). A kapott lizátumokból hígítási sort készítettünk, melyekből 200 µl-t LB agarlemezre kentünk ki. A keletkezett kolóniákat 12 órás, 37 °C-on végrehajtott inkubációt követően leszámoltuk.

### 5.16. Adatok kiértékelése

Az adatokat átlag ± standard hiba (SEM) formátumban tüntettük fel, az esetleges eltérést ettől a megfelelő helyen jeleztem. A statisztikai analízist a Statistica 8 segítségével végeztük (Statsoft Inc. Tusla, OK, USA). A WB és IF kísérleteket legalább kétszer, egymástól függetlenül hajtottuk végre, az ettől való eltérést feltüntettem.

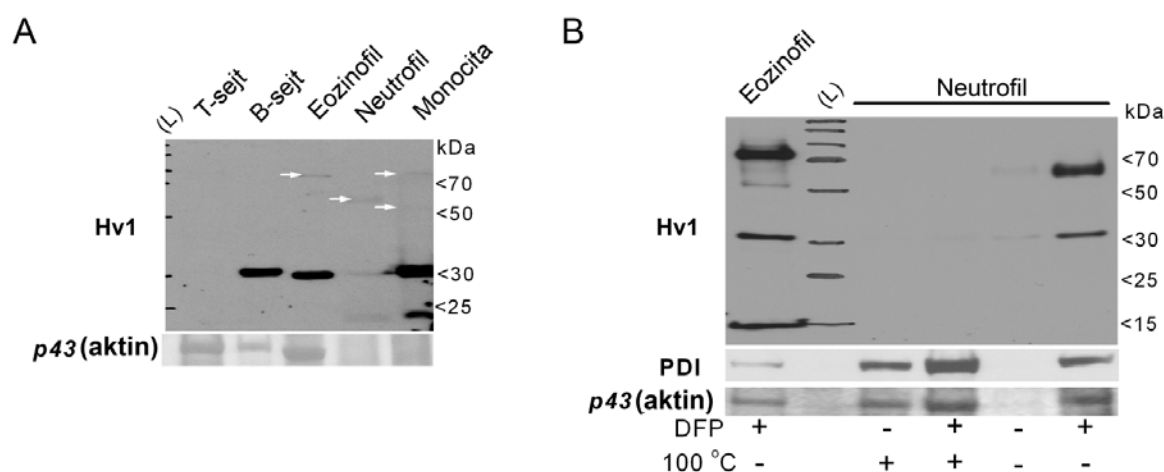
A statisztikai kiértékelést t-teszttel, vagy Mann-Whitney U-teszttel végeztük, a szignifikancia szintjét p<0,05-nél határoztuk meg. Egyéb próba alkalmazásáról, a szignifikanciaszint módosításáról az adott helyen nyilatkozom.

Valamennyi kísérlet megfelelt a Helsinkai deklarációban foglaltaknak, az eljárásokat a Semmelweis Egyetem és a Debreceni Egyetem etikai bizottságai jóváhagyták.

## 6. Eredmények

### 6.1. Emberi fehérvérsejtek Hv1 expressziója

A leukociták Hv1 kifejeződését Western blot segítségével vizsgáltuk. A természetes ölösejtek és a bazofil granulociták perifériás vérből alacsony számuk miatt csak nehezen izolálhatók, ezért ezen sejtekkel nem végeztünk kísérleteket. Az emberi protoncsatorna intracelluláris N-terminális szakasza ellen specifikus, poliklonális antitestet állítottunk elő (aHv1-N), mely Western-blot (WB) és immunfluoreszcens kísérletekben jól alkalmazhatónak bizonyult (lásd módszerek és felhasznált anyagok fejezetet). T-sejtek kivételével valamennyi vizsgált fehérvérsejt-típusban jelentős aHv1-N jelölődést tapasztaltunk 30 kDa molekulatömeg közelében (14.A ábra). A fenti expressziós eredmények egyezést mutatnak a különböző fehérvérsejteken mért protonáram-denzitásokkal [188]. A T-sejtekhez hasonlóan a vörösvérsejtek teljes sejt lizátumából nem sikerült érdemi aHv1-N jelet kimutatni (eredmény nincs bemutatva).



**14. ábra. A Hv1 fehérjeszintű kifejeződése perifériás vérből izolált emberi fehérvérsejtekben.** (A) A Hv1-kifejeződés Western blot analízise. A protoncsatorna kimutatásához aHv1-N-t használtunk. Az egyes oszlopokba  $10^6$  sejt anyagát vittük fel. A molekulásúly jelölésére használt oszlopokat (L) jelzéssel láttuk el. A Ponceau-festéssel készült 43 kDa-os fehérjecsík (feltételezhetően aktin) a felvitt fehérje



mennyiségét és minőségét mutatja. A neutrofil granulociták és monociták esetén az egyértelmű aktincsik hiánya masszív fehérjebomlásra utal. Emiatt megjegyzendő, hogy eltérő motilitású, proteolitikus és metabolikus aktivitású sejtek vizsgálatakor az ún. house-keeping (aktin, PDI) fehérjék jelölése korlátozott értékű a felvitt fehérje mennyiségének megítélésében. Mieloid sejtekben az aHv1-N 60 és 80 kDa között is detektál egy halvány fehérjecsíkot (fehér nyilak). (B) Granulocitákban a hőkezelés és a szerin proteázok csökkentik aHv1-N jelölés hatékonyságát. Az egyes oszlopokba  $5 \times 10^5$  sejt teljes sejt lizátumait töltöttük. A Ponceau-festéssel készült 43 kDa-os fehérjecsík (feltételezhetően aktin) és az anti-PDI jelölés a protein degradáció mértékét mutatják. Figyeljük meg, hogy az anti-PDI jel és az 43 kDa-os fehérjecsík intenzitása egymással párhuzamosan változik, mely alapján az utóbbi is biztonsággal használható a fehérjeminta mennyiségének és minőségének megítéléséhez. A 30 percig, jégen végzett DFP- inkubációt és a hőkezelést (10 perc, 100 °C) a jelölt módon alkalmaztuk. A kísérletet előzetes eredmények alapján terveztük, és kifejezetten demonstrációs céllal készült, ezért ebben a formában nem ismételtük meg. A DFP-kezelt mintákon sejttípustól függetlenül olykor Hv1 jelölődést figyeltünk meg az alacsony molekulatömeg-tartományban, mely valószínűleg a minta maradék proteáz-aktivitásának következménye.

## 6.2. A Hv1 emberi granulocitákban stabil dimert alkot

Western blot kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy valamennyi falósejtnél az aHv1-N 60 és 80 kDa között is gyenge jelölést mutatott. Emellett neutrofil granulociták és monociták mintáiban 30 kDa-nál alacsonyabb molekulatömegnél is látható volt jelölődés. Előbbi esetben a heterológ expressziós rendszerben már leírt dimerek jelenlétét feltételeztük [158–160], míg az utóbbiban proteolitikus bomlást valószínűsítettünk, mivel a granulociták, de legfőképp a neutrofilek igen nagy mennyiségű proteázzal rendelkeznek. A továbbiakban megkíséreltük minimalizálni az esetleges Hv1-degradáció következtében tapasztalható veszteséget. Kísérleteink alapján a diizopropil-fluorofoszfát-(DFP-) érzékeny szerin-proteázok csökkentik a detektálható Hv1 mennyiségét mind a 30, mind a 60-80 kDa-os magasságban (14.B ábra). A szerin-

proteázok hatása a membránpermeábilis proteáz inhibitor DFP alkalmazásával nagymértékben csökkent (részletekért lásd módszerek és felhasznált anyagok fejezet), de kismértékű degradáció továbbra is detektálható maradt (amint az a 14. ábra B részén az eozinofil granulocitáknál megjelenő alacsony molekulatömegű jelölés alapján is látható). A 14. ábra B részén bemutatott kísérletben a 60-80 kDa magasságában megjelenő csík eltérő magasságban mutatkozott eozinofil és neutrofil granulocitákban. A későbbi kísérleteink során azonban nem találtunk összefüggést a magas molekulatömegű csík vándorlási sebessége és a sejttípus között. Olykor 70 kDa közelében kettőzött csík volt látható. E jelenség hátterében a Hv1 egyéb fehérjékkel kialakuló kölcsönhatása valószínűtlen, irodalmi adatok alapján ugyanis a transzfektált Hv1 dimer nem redukáló elektroforézis során szintén kettős jelölődést mutat [158]. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a Hv1-dimer elektroforézis során két stabil konformációt vehet fel.

A Hv1 monomerek közötti interakció természetének pontosabb felderítése érdekében granulocitákból különböző detergens összetételű mintapuffer alkalmazásával sejtlizátumokat készítettünk a redukáló hatású  $\beta$ -merkaptoetanol hozzáadásával, vagy anélkül. A  $\beta$ -ME lebomlása a fehérjék reoxidációjával járhat, ennek elkerülése érdekében a  $\beta$ -ME-t kevéssel (kb. 15 perc) az elektroforézis megkezdése előtt adtuk a mintákhoz. Kísérleteink alapján a  $\beta$ -ME és a magas koncentrációjú ionos detergens (nátrium dodecil-szulfát, SDS) jelenléte elsősorban a Hv1 monomer detektálásának kedvezett (15.A ábra). Nem ionos detergens (Tween-20) alkalmazásával túlnyomórészt dimer mutatható ki, mely nem-redukáló körülmények között kettős csikként észlelhető. A fenti eredmények arra utalnak, hogy natív körülmények között a Hv1 granulocitákban dimereket alkot, melyet ionos kölcsönhatások és diszulfid hidak egyaránt stabilizálhatnak.

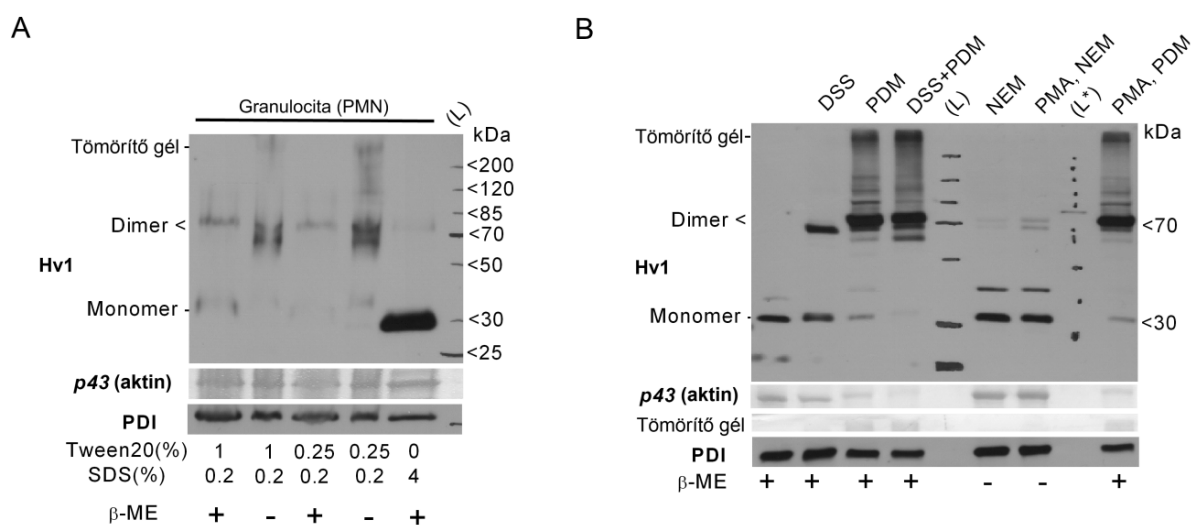
Nem ionos detergens alkalmazásával jobban megőrizhettük a fehérjék között kialakult natív kölcsönhatásokat, ezáltal azok kimutathatóvá válnak, ahogy ezt a Hv1 dimerek példáján is láthattuk. A nem ionos detergens használatának hátránya azonban, hogy alacsony SDS koncentráció mellett bizonyos proteázok aktívak maradhatnak, és a fehérjék fajlagos negatív töltése is csökken. A következményes proteolízis, és megváltozott vándorlási sebesség miatt halványabb és elmosottabb fehérjecsíkok észlelhetők Western-blot kísérletek során. További kísérleteink ezért arra

irányultak, hogy a Hv1 dimerek közötti natív kölcsönhatást keresztköti anyagokkal stabilizáljuk, majd elektroforézis segítségével kimutassuk. A DSS egy aminocsoport-specifikus, homobifunkcionális keresztköti anyag, melyet Hv1-transzfektált sejtekben több munkacsoport is felhasznált a protoncsatorna-dimerek kimutatásának javításához [158,159]. Granulocitákat a sejtek lízise előtt DSS-sel kezelve nagymértékben megnőtt az elektroforézissel észlelhető dimerek mennyisége (15.B ábra). A monomer és dimer protoncsatornán keresztül eltérő karakterisztikájú protonáram folyik [158], ezért egyesek felvetették, hogy a két forma közötti átalakulás hozzájárulhat a protoncsatorna fokozott kapuzási módjában megfigyelt változásokhoz [189]. Granulocitákat és differenciált PLB-985 sejteket szupramaximális PMA-dózissal (200 nM, 15 perc) aktiválva, majd DSS-sel kezelve azonban nem figyeltük meg a monomer-dimer arány megváltozását (eredmény nincs bemutatva).

Noha a Hv1 dimerek felbomlása nem következik be aktiváció hatására, diszulfid kötések kialakulása azonban több ioncsatorna redox-szabályozásában is részt vesz [206]. A PMA-stimuláció során kialakuló redox változások diszulfid-hidakra kifejtett hatásának felderítésére NEM-et és PDM-et alkalmaztunk. Mindkét anyag kovalansen reagál a redukált cisztein oldalláncokkal, de míg a PDM homobifunkcionális keresztköti anyagként összeköttetést hoz létre két SH-csoport között, ezzel utánozva a diszulfid hídképződést, addig a NEM megakadályozza azt. A Hv1 dimerizációjában részt vevő ciszteinek redox állapotának felmérése érdekében a fenti tiolreaktív vegyületeket adtuk a sejtekhez. A PDM-mel végzett 40 perces inkubáció nagyban a stabil dimerek irányába tolta el az egyensúlyt, ezzel szemben NEM alkalmazásával szinte kizárólag a monomert detektáltuk függetlenül a PMA jelenlététől (15.B ábra). Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy bár a dimerképződés során bizonyos ciszteinek egymáshoz közel kerülnek, de nagyrészt redukált állapotban maradnak. E ciszteinek valószínűleg PMA-stimuláció hatására sem oxidálódnak, hiszen a NEM és PDM hatása PMA-tól csaknem teljesen függetlennek bizonyult. A PMA-kezelés emellett szintén nem változtatta meg a granulocitákban megtalálható Hv1 mennyiségét. A WB-denzitometriával a PMA-stimulált sejtek a nyugvó sejtekben jelen lévő Hv1-mennyiség  $96\pm 10\%$ -át tartalmazták.

Elméletileg elképzelhető, hogy a protoncsatorna nem monomer vagy dimer, hanem egy magasabb-rendű multimerként van jelen a granulocitákban. Feltételezésünk

szerint a fenti esetben erőteljes keresztköti protokoll (DSS+PDM, 1 órás inkubáció) illetve nem ionos detergens + DSS alkalmazásával a multimernek jól észlelhető csíkot kell adnia a magasabb molekulatömeg-tartományban. A vizsgált esetek mindegyikében egyértelmű csíkot 70 kDa környékén és a tömörítő gél területén, a töltőzsebek közelében észleltünk, míg a monomer több alkalommal nem volt detektálható (eredmény nincs bemutatva). A töltőzsebek közelében látható aHv1-N jelölődés a protoncsatorna nem specifikus kölcsönhatásaival és/vagy fehérje komplexek hálózatszerű keresztkötésével magyarázhatók. Ezek alapján kimondható, hogy granulocitákban a kettőnél több Hv1-ből álló multimer kialakulásának valószínűsége alatta marad a dimer és az egyéb fehérjékkel létrejövő kölcsönhatások keletkezési valószínűségének.



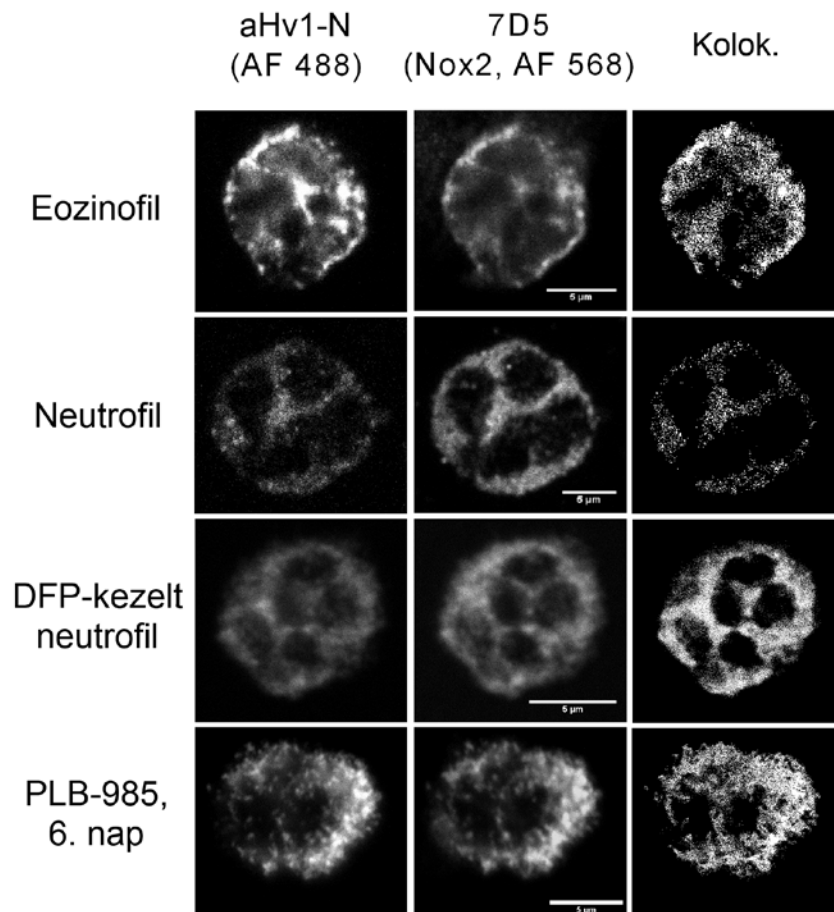
**15. ábra. A granulocitákban a Hv1 dimerként is megtalálható.** (A) Az egyes oszlopokba  $10^6$  PMN teljes sejt lizátumát vittük fel. A DFP-kezelt sejteket 2 mM PMSF-et tartalmazó mintapufferben lizáltuk. A mintapuffer detergens-tartalmát és az 5% v/v β-merkaptóetanol hozzáadását az ábra alsó részén tüntettük fel. (B) A Hv1 dimerek kimutatása Western blotban amino- (DSS) és tiolreaktív (PDM) keresztköti anyagok, és tiolreaktív alkilálószer (NEM) segítségével. A keresztköti mintákban 70 kDa-nál megjelenő anti-Hv1 jel növekmény a 30 kDa-os jelölés kárára következik be. A 75 kDa felett észlelhető fehérjecsíkok valószínűleg a Hv1 egyéb fehérjékkel kialakult keresztkötésének következményei. A PMA kezelés (200 nM, 15 perc) hatására csak kismértékű változás figyelhető meg a Hv1 dimerképzési hajlamában. A 40 kDa-nál látható halvány csík eredete nem tisztázott, és csupán kísérleteink töredékében

detektáltuk. A Ponceau- festéssel 43 kDa magasságában látható fehérjecsík (feltételezhetően aktin) és a tömörítő gél területéről készült felvétel a felvitt fehérje mennyiségét és a keresztkötés fokát mutatja be. Az 5% v/v  $\beta$ -merkaptotanol hozzáadását az ábra alsó sorában tüntettük fel. Az (L\*) jelzéssel ellátott oszlop a festett molekulamarker (L) kalibrálásához használt festetlen markert jelöli.

### **6.3. A Hv1 granulocitákban elsősorban intracelluláris membránokban helyezkedik el.**

Bár a natív Hv1 sejtmembránok közötti megoszlásáról emberi granulocitákban ez idáig nem született adat, heterológ expressziós rendszerekben azt találták, hogy HeLa sejtekben a protoncsatorna leginkább az IC membránokban található [207]. Kimutatták továbbá, hogy a Hv1 egér granulocitákban a fagoszóma falában [208], míg humán B-limfocitákban a késői endoszómákban dúsul [196]. A protoncsatorna sejten belüli megoszlásának pontosabb feltérképezése érdekében adherens granulocitákon, PLB-985 sejteken és perifériás vérből készült kenetek sejtjein vizsgáltuk az immunfluoreszcensen jelölt Hv1 (aHv1-N) és Nox2 (7D5) elhelyezkedését. A két fehérje együttes jelölésével azt kívántuk megvizsgálni, hogy a protoncsatorna és a Nox2 között már említett szoros funkcionális kapcsolat vajon a két fehérje elhelyezkedésében is tetten érhető-e. Továbbá, mivel a Nox2 sejten belüli elhelyezkedése viszonylag alaposan felderített [72,104], a kettős jelölés segítségével a Hv1 megoszlása is jobban megítélhető. A fehérjék eloszlását konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Eozinofil granulocitákban erős aHv1-N jelölést tapasztaltunk, míg a neutrofilekben változó intenzitású, de általánosan gyengébb festődést kaptunk (16. ábra). Differenciált PLB-985 sejtek szintén számottevő Hv1 jelölést mutattak. A Nox2 és a protoncsatorna kolokalizációja valamennyi vizsgált sejttypusban jelentősnek bizonyult. A két fehérje kolokalizációjának fokát leíró Pearson's koefficiens értéke neutrofilekben  $0,68 \pm 0,03$  (n=5), eozinofilekben  $0,84 \pm 0,03$  (n=5), differenciált PLB-985 sejtekben  $0,92 \pm 0,03$  (n=4). A neutrofilek egyéb sejtekhez viszonyított relatíve alacsony kolokalizációs rátája további vizsgálódásra késztetett minket, ezért a kísérletet DFP-kezelt neutrofileken is elvégeztük a proteolízis és apoptózis csökkentése érdekében [209] (16. ábra). Ebben az esetben a Pearson's

koeficiens  $0,78 \pm 0,02$  -nek adódott ( $n=8$ ), mely érték szignifikánsan magasabb a korábbinál ( $p < 0,05$ , Kolmogorov-Smirnov teszt). Ez alapján belátható, hogy a fehérje degradáció immunfluoreszcens kísérletekben is ronthatja a Hv1 detektálhatóságát, csökkentve ezzel a protoncsatorna és a Nox2 kolokalizációjának mértékét. A granulociták közül a PLB-985 sejtek mutatták a legmarkánsabb granuláris festődést, eozinofilekben pedig a Hv1 és a Nox2 egyaránt körülírt területeken, intenzíven dúsult. Érett sejtek magjában gyenge, vagy teljesen hiányzó Hv1-jelölődést észleltünk.

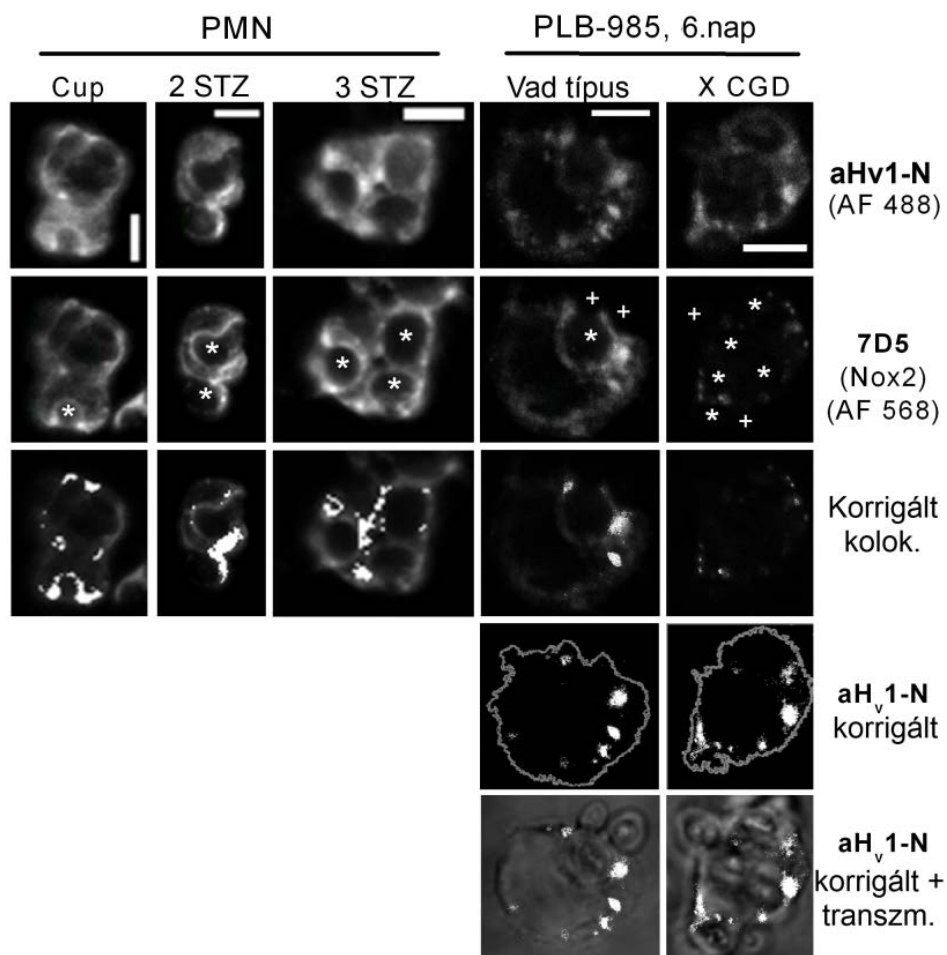


**16. ábra. A Hv1 és a Nox2 részleges kolokalizációja emberi granulocitákban és PLB-985 sejtekben.** (A) A Hv1 (bal oldali oszlop) és a Nox2 (középen) granulocitákon belüli megoszlása. (A méretjelző vonal  $5 \mu\text{m}$ -t jelöl). A neutrofilek DFP-kezelése javította a Hv1 detektálhatóságát. A kolokalizációt csak azokon a sejteken elemeztük, melyekben mindkét fehérje a küszöbérték feletti jelet adott. A kolokalizáló pixeleket a jobb oldali oszlopban fehér pontok jelölik. A kontroll elsődleges antitestekkel

elhanyagolható (háttérrel alig meghaladó) Alexa Fluor jelet tapasztaltunk (adat nincs feltüntetve).

#### **6.4. A fagocitózis során a Hv1 a fagoszómába vándorol**

A jelenleg elfogadott elképzelés szerint falósejtek légzési robbanása folyamán a protoncsatorna legfontosabb szerepe a phox fenntartott működésének támogatása azáltal, hogy kompenzálja az elektronáram depolarizáló hatását [210]. Ezen feladat hatékonyan csak akkor teljesíthető, ha a Hv1 a phox aktivitás helyével megegyező kompartmentbe kerül. A phox aktivitása révén elősegíti a fagoszómába került kórokozó elpusztítását [211], fagocitózis folyamán a komplex a (kialakuló) fagoszóma membránjában is összeállhat [212,213]. A Hv1 fagoszómális áthelyeződésének vizsgálata céljából STZ-t adtunk adherens granulocitákhoz és granulocita irányban differenciált PLB-985 sejtekhez. Tízperces inkubációt követően már megfigyelhetőek kialakulóban lévő fagoszómák (ún. fagoszóma-sapkák vagy kelyhek), illetve lefűződött fagoszómák is. A bekebelezett zimozán körül látható 7D5 jelölődés a Nox2 fagoszómális akkumulációjára utal (17. ábra). A protoncsatorna a Nox2 festődéssel gyakran átfedő mintázatban szintén a zimozán-szemcse körül dúsul. A Hv1 áthelyeződése nem igényli működőképes oxidáz jelenlétét, mivel differenciált PLB-985 X CGD sejtekben is bekövetkezik, melyekből a Nox2 gyakorlatilag hiányzik [202].

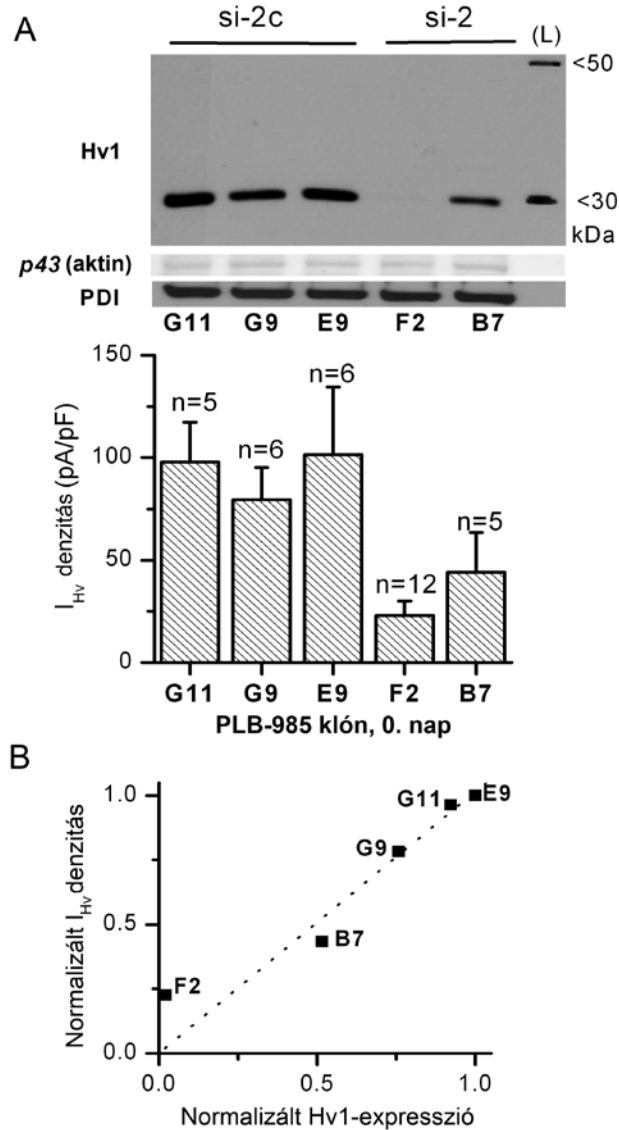


**17. ábra.** A Hv1 és a Nox2 a zimosán fagocitózisa során részleges kolokalizációt mutat. Konfokális lézermikroszkóppal vizsgálva a Hv1- (első sor) és a Nox2- (második sor) jelölés is a fagoszóma közelében dúsul. Az opszonizált zimosánszemcséket (STZ) fehér csillag jelöli. A kialakulóban lévő (ún. fagocitotikus sapka, első oszlop) és a zárt fagoszóma (második és harmadik oszlop) kerek, bennük nélküli struktúrákként jelennek meg. A feldolgozás során a sejtek csak azon pixeleinek adatait használtuk, melyek intenzitása meghaladta a kontroll antitestekkel kapott átlagos jelintenzitás kétszeresét (ún. küszöbintenzitás, a kontroll antitestekkel az aktivált fagociták jelentős intenzitású diffúz jelölődést mutattak, adat nincs bemutatva). A Hv1 és a Nox2 gyakran kolokalizál (harmadik sor). A kolokalizáló pixeleket a halványított 7D5-jelölés fölé vetítettük (a léptékjelzés 5  $\mu\text{m}$ -nek felel meg). PLB-985 sejtekben a Hv1 dúsulása Nox2 jelenlététől függetlenül bekövetkezik (negyedik sor). A sejtek határát – melyet a háttér Hv1-jel alapján állapítottunk meg – szürke vonal jelöli. A fent részletezett küszöbérték feletti Hv1-jel fehér pontok jelölik. Az ötödik sorban az előző sor Hv1-jelölése látható a fagocitáló sejtek transzmissziós módban készült (halványított) felvétele fölé vetítve.



## **6.5. PLB-985 sejtekben a protonáram denzitása egyenesen arányos a Hv1 expressziójával**

Hv1 KO egerek fehérvérsejtjeiben nem detektálható protonáram, alátámasztva azt, hogy egerekben a Hv1 valóban protoncsatornaként funkcionál [189,191,208]. Mivel emberben a protoncsatorna örökletes hiánya nem ismert, ezért az egérhez hasonló genetikai modell nem áll rendelkezésünkre, ennek hiányában pedig az emberi Hv1 protonvezető képességéről csak közvetett bizonyítékokkal rendelkezünk. Az emberi Hv1 protoncsatorna funkciójának közvetlen igazolása érdekében olyan kis interferáló RNS-eket (ún. siRNS) készítettünk, melyek szekvenciája kizárólag az emberi Hv1 mRNS-ben fordul elő. A három siRNS közül kettő (si-1 és si-2) hatékonyan csendesítette a Cos-7 sejtek heterológ Hv1 expresszióját (Hv1 knock-down) a kontroll siRNS-hez viszonyítva (si-1c és si-2c). A két hatékony siRNS közül az si-2 bizonyult fenntartott sejt-kultúrában is alkalmazhatónak. A Hv1 és a protonáram denzitása közötti összefüggést transzfektált PLB-985 sejteken vizsgáltuk, ahol a transzfekcióhoz használt plazmid az si-2/si-2c szekvencia valamelyike mellett egy puromycin-rezisztencia gént is tartalmazott. A puromycin rezisztens PLB-985 klónok Hv1-kifejeződésének vizsgálatát követően három kontroll és két knock-down klón protonáram denzitását vizsgáltuk patch-clamp technika segítségével (18. ábra). Eredményeink alapján a PLB-985 sejtek protonáram denzitása jól korrelál az egyes klónok Hv1-tartalmával (18. ábra). Ezen túlmenően az si-2 Jurkat sejtekben (leukémiás limfocita sejt vonal) szintén hatékonyan csökkentette a protonáram denzitását. Emellett Jurkat sejtekben az si-1 transzfekciója is hatásosnak bizonyult (eredmény nincs bemutatva). A fenti eredmények alapján elmondható, hogy a Hv1 humán fehérvérsejtben nélkülözhetetlen a feszültségfüggő protonáram kialakulásához.

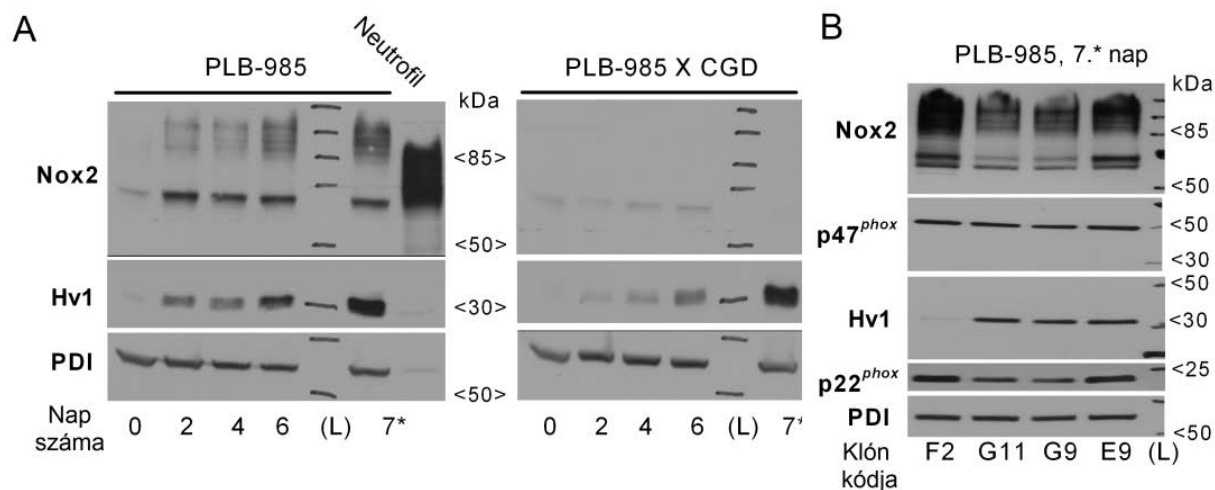


**18. ábra.** A feszültségfüggő protonáram denzitása egyenesen arányos a Hv1-tartalommal. (A) Az egyes PLB-985 klónok Hv1 expressziója (fent), és a hozzá tartozó protonáram denzitása (lent). A klónokat a Hv1 kifejeződés csendesítésére képes plazmiddal (si-2) és annak kontrolljával (si-2c) transzfektáltuk. A Western blot kísérletekhez valamennyi oszlopba  $10^6$  sejt mintáját vittünk fel. Az F2-es klón protonáram denzitása szignifikánsan alacsonyabb, mint az E9-es és G11-es klón protonáram denzitása ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis teszt). (B) Az átlagos protonáram denzitás a p43-jelre normalizált Hv1-expresszió függvényében. Valamennyi klón értékeit az E9-es klón értékeihez viszonyítottuk. A pontozott vonal az origón átvezetett lineáris illesztés eredménye ( $R > 0,97$ ,  $p < 0,005$ ).

## **6.6. A Hv1 és a Nox2 kifejeződése párhuzamosan emelkedik a granulocita fejlődés folyamán.**

Irodalmi adatok alapján a HL-60 leukémás sejtvonal granulocita differenciációja során a protonvezető képesség a phox alegységeinek kifejeződésével párhuzamosan nő [214]. További kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a granulocita fejlődés során a Hv1 és a Nox2 kifejeződése kapcsolt-e egymáshoz valamilyen módon. PLB-985 sejtvonalban (mely a HL-60 sejtvonal egy szubklónja [215]) szintén fokozódik a phox alegységek kifejeződése a granulocita differenciáció folyamán [202]. Mivel a PLB-985 sejtekből Nox2 hiányos klón is hozzáférhető (PLB-985 X CGD), ezért a fenti kérdés tisztázására PLB-985 sejteket választottuk. DMFA-indukált granulocita irányú fejlődés előrehaladtával a Hv1 és Nox2 expressziója egyaránt fokozódott (19.A ábra). Mindkét fehérje kifejeződése a fejlődés első két napján emelkedett a legmeredekebben. A két fehérje paralell megjelenésének háttérben meghúzódó esetleges kapcsolat kimutatása érdekében a kísérletet Nox2 deficiens (X CGD) sejteken is megismételtük. Nox2 hiányában a Hv1 kifejeződése a differenciáció minden napján alacsonyabbnak tűnt (19.A ábra), mely különbség 6 napos differenciációt követően immunfluoreszcens kísérletekben halványabb aHv1-N jelölődésként is megmutatkozott (eredmény nincs bemutatva). Megnövelt differenciációs nyomás (médium szérumkoncentrációjának 10%-ról 0,5%-ra csökkentése [216]) mellett végzett hét napos fejlődés végén nem tapasztaltunk érdemi különbséget a Nox2-hiányos és a vad típusú PLB-985 sejtek protoncsatorna expressziójában (19.A ábra). Ez utóbbi eredmény amellettt szól, hogy a Nox2 hiánya nem befolyásolja érdemben a Hv1 kifejeződését. A hat napos fejlődés során kapott adatok valószínűleg a PLB-985 X CGD klón fejlődési defektusával, vagy Nox2-től függetlenül károsodott Hv1 expressziós képességével magyarázhatók.

Az, hogy a Nox2 hiánya nem változtatja meg jelentősen a Hv1 kifejeződését, nem zárja ki egy fordított irányú összefüggés létezését. Ennek vizsgálatára normál és gátolt Hv1 expresszióval rendelkező PLB-985 sejtek Nox2 kifejeződését vizsgáltuk DMFA és alacsony szérumkoncentráció mellett. Ahogy az 19.B ábrán megfigyelhető, a Hv1 szinte teljes hiánya nem változtatja meg érdemben a Nox2, a p22<sup>phox</sup> és a p47<sup>phox</sup> kifejeződését.

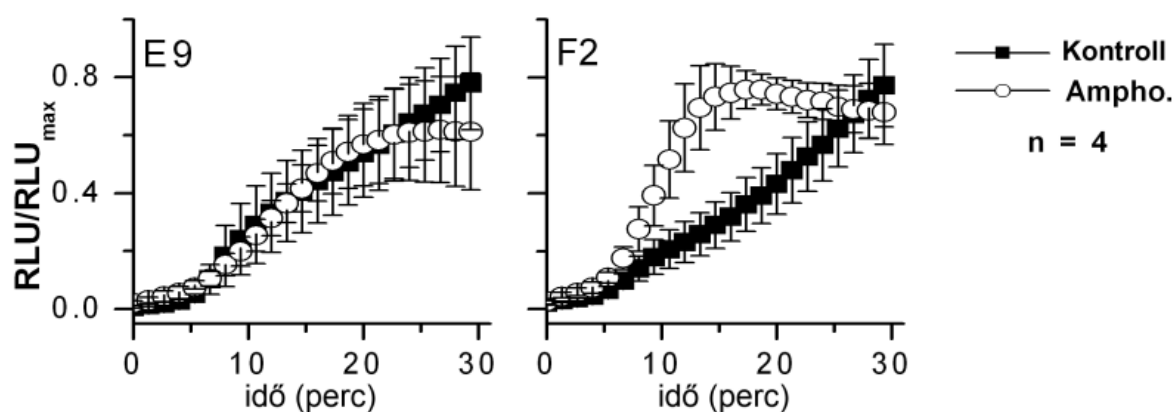


**19. ábra. A Hv1 és Nox2 kifejeződése párhuzamosan, de egymástól függetlenül indukálódik a PLB-985 sejtek granulocita irányú differenciációja során.** (A) A Hv1-kifejeződés indukciója Nox2 hiányában is megmarad. A Western blot kísérletekhez valamennyi oszlopba  $10^6$  sejt teljes lizátumait vittük fel. A PLB-985 sejtek differenciációját 0,5% v/v DMFA-val indítottuk meg, a mintákat a DMFA hozzáadása előtt (0), illetve 2, 4, 6 nappal utána készítettük. A 7\*-gal jelölt minta sejtjei 7 napig differenciálódtak alacsony szérumszintű környezetben (0,5% v/v), mely megnöveli a differenciációs nyomást. A különböző magasságokban észlelhető Nox2-jelölések a glikozilálatlan állapotban 65 kDa-os fehérje különböző glikoziláltsági állapotainak felelnek meg. (B) A Hv1 erősen csökkent termelődése nem zavarja lényegesen a különböző phox alegységek (Nox2, p22<sup>phox</sup> és p47<sup>phox</sup>) kifejeződését differenciált PLB-985 sejtekben.

### 6.7. A Hv1 csökkent kifejeződése gátolja az intenzív szuperoxid-termelést

Hv1 KO egerek fehérvérsejtjeinek ROS-termelő képessége károsodott [189,191,208]. Feltételezve, hogy a Hv1 szerepe emberi és egér leukocitákban azonos, csökkent Hv1 kifejeződés mellett alacsonyabb intenzitású ROS-produkció várható emberi sejtekben is. Ennek ellenére a Hv1 knock-down PLB-985 klónok szuperoxid-termelése meghaladta két kontroll klónét is, azt csupán az E9 klón ROS-termelése

haladta meg (eredmény nincs bemutatva). A jelenség háttérében az egyes klónok eltérő Nox2 expresszióját feltételeztük (lásd 19. ábra). A PMA által kiváltott ROS-termelés Hv1 deficiens egerek granulocitáiban a monovalens kationokra permeábilis gramicidin alkalmazásával a vad típusú sejtekhez hasonlóvá vált [189,217]. A gramicidin vezetőképessége az egyes kationok vizes közegben tapasztalható mobilitásával egyenesen arányos (tehát protonokra nézve a legnagyobb) [217], mégsem valószínű, hogy normál  $K^+$ -koncentráció mellett érdemi protonáram folyna rajta keresztül. Fentiek alapján kitűnik, hogy a töltéskompenzáció, és nem a protoneltávolítás az elsődleges a PMA-aktivált Hv1 hiányos sejtek ROS termelésének támogatásában. Ezek alapján mesterséges konduktancia beépítésével a Hv1 hiányából fakadó csökkent töltéskompenzáció bármely sejtben helyreállítható, ezáltal a ROS-termelés normalizálható. E hipotézis vizsgálatára két kontroll (E9, G9), és két Hv1 knock-down klón (F2, B7) szuperoxid-termelését detektáltuk az ioncsatorna-képző Amphotericin B jelenlétében és hiányában. Amphotericin B hozzáadásával csupán az F2 klón ROS-termelése emelkedett, annak is legfőképp a korai fázisa (20. ábra). Amphotericin B mellett 20 perccel az aktiváció után valamennyi klón szuperoxid-produkciója csökkent. Az F2 klón magas Nox2 és igen alacsony Hv1 expressziója alapján arra következtetünk, hogy a Hv1-en keresztül megvalósuló töltéskompenzáció lényeges lehet emberi granulociták intenzív ROS-termelésének támogatásában.



**20. ábra. Amphotericin B hatása Hv1 knock down és kontroll siRNS-sel transzfektált PLB-985 sejtekben.** Az Amphotericin B csak az erősen csökkent Hv1 expresszióval rendelkező differenciált PLB-985 sejtklónban (F2) növeli meg a szuperoxid-termelést (15 percnél  $2,92 \pm 0,48$ -szoros különbség mérhető,  $p < 0,05$ , Mann-

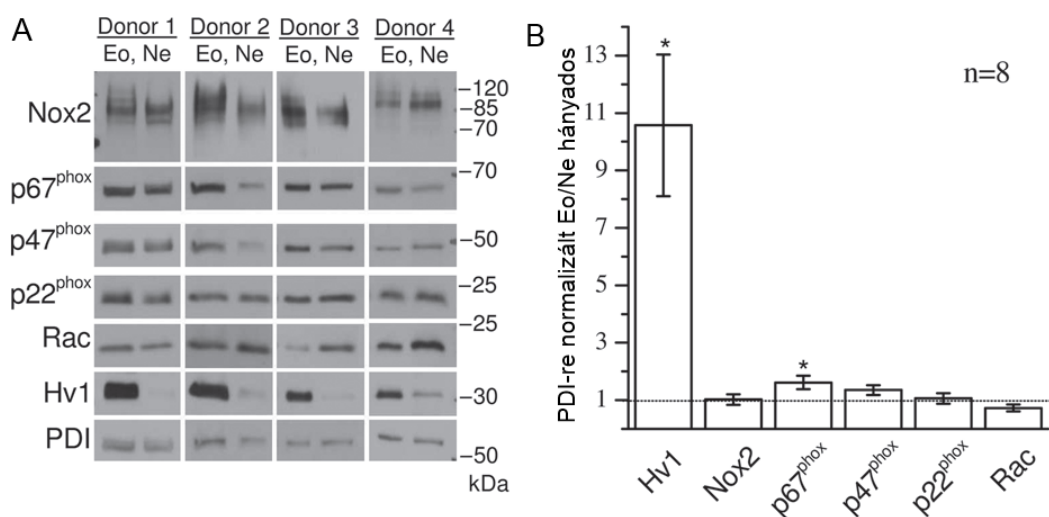
Whitney U teszt). Az E9-es (továbbá a nem mutatott G9-es és a B7-es) klónban nem figyelhető meg szignifikáns változás Amphotericin B jelenlétében. Az extracelluláris szuperoxid-felszabadulást Diogenes reagens segítségével követtük. A sejteket 15 percig inkubáltuk Diogenes és H-médium 1:1 arányú keverékét tartalmazó oldatban 10 mg/ml Amphotericin B jelenlétében, vagy nélküle. A 0 időpontban a sejteket 200 nM PMA hozzáadásával aktiváltuk. Nyugvó sejtek, valamint PMA-stimulált differenciálatlan PLB-985 sejtek elhanyagolható Diogenes jelet adnak (adat nincs feltüntetve).

### **6.8. Eozinofil granulocitákban magasabb a Hv1 kifejeződése, mint neutrofilekben, míg a phox alegységek mennyisége a két sejtípusban nem tér el lényegesen**

A Hv1 és a Nox2 kolokalizációjának vizsgálata során figyeltünk fel arra, hogy eozinofilekben a Hv1-jel mindig intenzívebbnek, a Nox2 jelölés viszont hasonlóan, esetenként valamivel halványabbnak tűnt, mint neutrofil granulocitákban (16. ábra). Ezen utóbbi megfigyeléseink azonban ellentmondtak a legtöbb irodalmi adatnak. A leginkább elfogadott nézet szerint ugyanis az eozinofilek intenzívebb oxidatív robbanásra képesek és ennek hátterében magasabb phox kifejeződést mutatnak, mint a neutrofilek. Mivel ez idáig nem készült részletes összehasonlítás nagyobb számú egészséges egyén bevonásával az eozinofil és neutrofil granulociták phox alegység-, illetve Hv1-kifejeződéséről, következő vizsgálataink céljaul a fenti megfigyelések számszerűsítését tűztük ki.

Első lépésként 8 egészséges önkéntes eozinofil és neutrofil granulocitáiból Western blot kísérletekhez teljes sejt lizátumokat készítettünk. A kapott WB eredményeket denzitometriás analízisnek vetettük alá. Azonos donorok eozinofil és neutrofil mintáit a jobb összehasonlíthatóság érdekében egymás mellé töltöttük a polikrilamid gél zsebeibe. Összesen az 5 esszenciális phox alegység (Nox2, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> és Rac) és a Hv1 kifejeződését vizsgáltuk. A PDI-jelölés segítségével a felvitt fehérjék mennyiségét kontrolláltuk, valamint a denzitometriás adatok normalizálásához is felhasználtuk (21. ábra). Az 21.A ábrán már első meglepetésre is feltűnő, hogy míg a különböző phox alegységek jelölődése a PDI-jellel jó korrelációt

mutat, addig a Hv1 csíkok intenzitása inkább sejttípus-függőnek tűnik, neutrofilekben halvány, eozinofilekben erősebb jelölődést mutat. Ez alapján a phox alegységek expressziójában nem várható érdemi különbség a két sejttípus között, a Hv1 kifejeződése viszont valószínűleg eltérő. A WB eredmények denzitometriás analízise is ezt a megfigyelést támasztja alá (21.B ábra), hiszen a PDI-re normalizált eozinofil/neutrofil (Eo/Ne) arány  $\sim 1$  volt valamennyi vizsgált Nox2-komplex alegységre nézve (Nox2:  $1\pm 0,2$ , p67<sup>phox</sup>:  $1,6\pm 0,2$ , p47<sup>phox</sup>:  $1,4\pm 0,2$ , p22<sup>phox</sup>:  $1\pm 0,2$  és Rac:  $0,7\pm 0,1$ ; n=8, p67<sup>phox</sup> esetében  $p<0,05$ ). Ezzel szemben a Hv1 jel eozinofil granulocitákban jóval erősebbnek bizonyult (Eo/Ne arány  $10,6\pm 2,5$ ; n=8,  $p<0,01$ ). Az átlagos PDI jelölődésben nem tapasztaltunk különbséget a két sejttípus között (Eo/Ne arány  $1\pm 0,2$  – n=8). Emiatt és mivel minden alkalommal megkíséreltünk  $10^6$  sejtől készült mintát felvinni a zsebekbe, a fenti eredmények sejtszámra normalizált összehasonlításaként is értelmezhetőek.



**21. ábra. A légzési robbanás létrehozásában fontos szerepet játszó fehérjék kifejeződésének összehasonlítása eozinofil és neutrofil granulocitákban.** (A) Az esszenciális fagocita oxidáz (phox) alegységek és a Hv1 kifejeződésének Western blot analízise. A zsebekbe  $10^6$  sejt teljes sejt lizátumait töltöttük. A PDI segítségével a felvitt fehérjemennyiséget kontrolláltuk. A jobb összehasonlíthatóság kedvéért az azonos donortól származó mintákat egymás mellett futattuk.

(B) A Western blot eredmények denzitometriás analízise. Valamennyi fehérjecsík intenzitását a hozzá tartozó PDI-csík segítségével normalizáltuk, majd az így kapott értékből minden donor esetén eozinofil/neutrofil hányadost (Eo/Ne) számoltunk. Az 1-

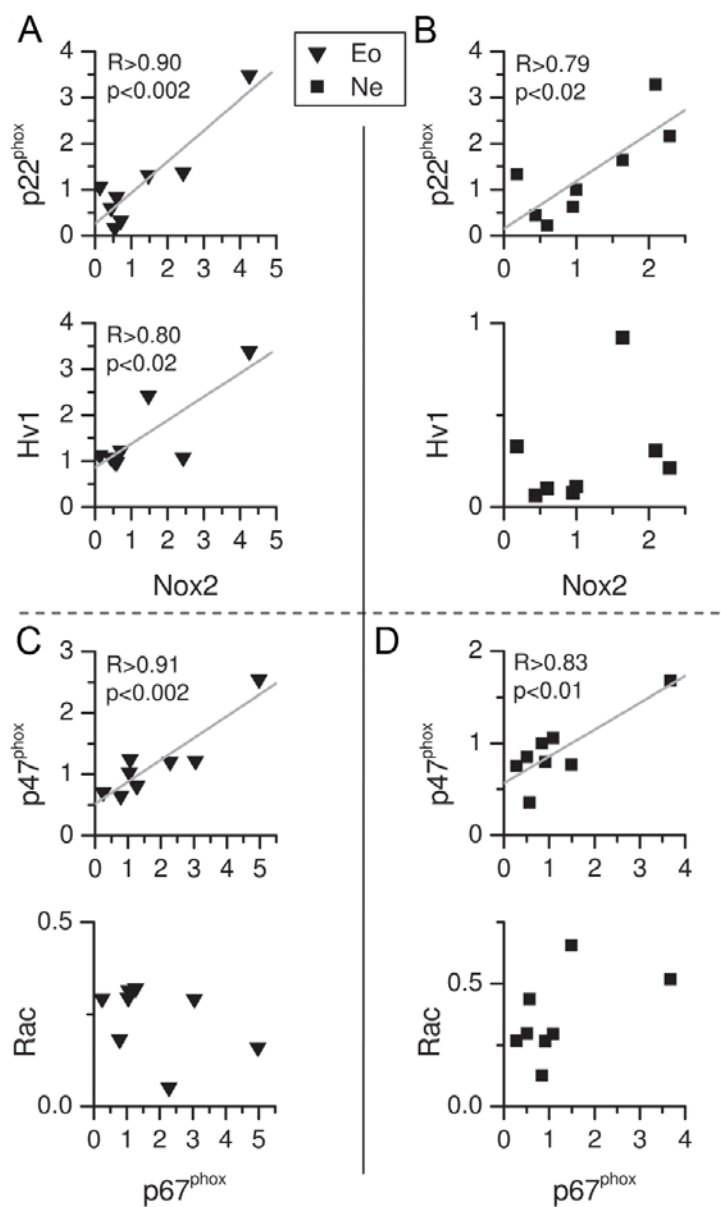
es Eo/Ne hányados (szaggatott vonal) esetén a két sejttípusban az adott fehérje mennyisége azonos (\* $p < 0,05$ ).

## 6.9. Eozinofil granulocitákban a Hv1 kifejeződése korrelál a Nox2-ével

Az eozinofil granulociták magasabb Hv1 tartalma felveti annak lehetőségét, hogy légzési robbanásuk a neutrofilekhez képest nagyobb mértékben függ a Hv1 működésétől. Elektrofiziológiai mérések alapján eozinofilekben a phox-mediált elektronáram erőssége egyenesen arányos a sejtek protonkonduktanciájával [205], míg ugyanez az összefüggés neutrofilek esetén nem áll fenn [179]. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy eozinofil granulocitákban szorosabb a phox és a Hv1 közötti kapcsolat. A fent leírtakból elméletileg következik, hogy a magasabb phox expresszióval rendelkező egyének eozinofiljei nagyobb mennyiségű Hv1-et tartalmaznak. Ezen feltevésünk igazolása érdekében lineáris regresszió módszerével megvizsgáltuk a Hv1 és Nox2 kifejeződése közötti összefüggést eozinofil és neutrofil granulocitákban. Eredményeink ellenőrzése céljából az analízist több phox alegység között is elvégeztük. Az irodalmi adatok alapján a Nox2 és a  $p22^{\text{phox}}$  között erős korreláció várható, hiszen az egyik fehérje stabilitása a másik jelenlététől függ [2]. A  $p47^{\text{phox}}$  és  $p67^{\text{phox}}$  mennyisége közötti összefüggés szintén nem lenne meglepő, e két phox-specifikus fehérje ugyanis egymással mind nyugvó, mind aktivált sejtekben 1:1 sztöchiometriájú komplexet alkot [2]. Ezekkel ellentétben a Rac a phox-aktivitás elősegítése mellett számos egyéb sejtfunkció szabályozásában részt vesz [218], ezért nem várható érdemi korreláció az egyéb phox alegységekkel. A lineáris regresszió valamennyi vizsgált esetben kivitelezhető, mivel az egyes egyének között megfelelően nagy a különböző fehérjék PDI-normalizált expressziójának szórása (3-10-szeres különbség mérhető denzitometriával, 22. ábra). Ahogy az a 22. ábrán látható, a Nox2 szintje korrelál a  $p22^{\text{phox}}$ -ével, és a  $p67^{\text{phox}}$  és  $p47^{\text{phox}}$  között szintén szoros asszociáció figyelhető meg. Az aktív Nox2-komplexben a Rac és a  $p67^{\text{phox}}$  között kialakuló molekuláris és funkcionális kapcsolat [219] ellenére a két fehérje mennyisége egyik vizsgált sejttípusban sem mutatott összefüggést. A fenti korrelációk mindegyike mind



eozinofil, mind neutrofil granulocitákban kimutatható volt, míg a Hv1 és a Nox2 mennyisége között csak eozinofilekben észleltünk összefüggést.

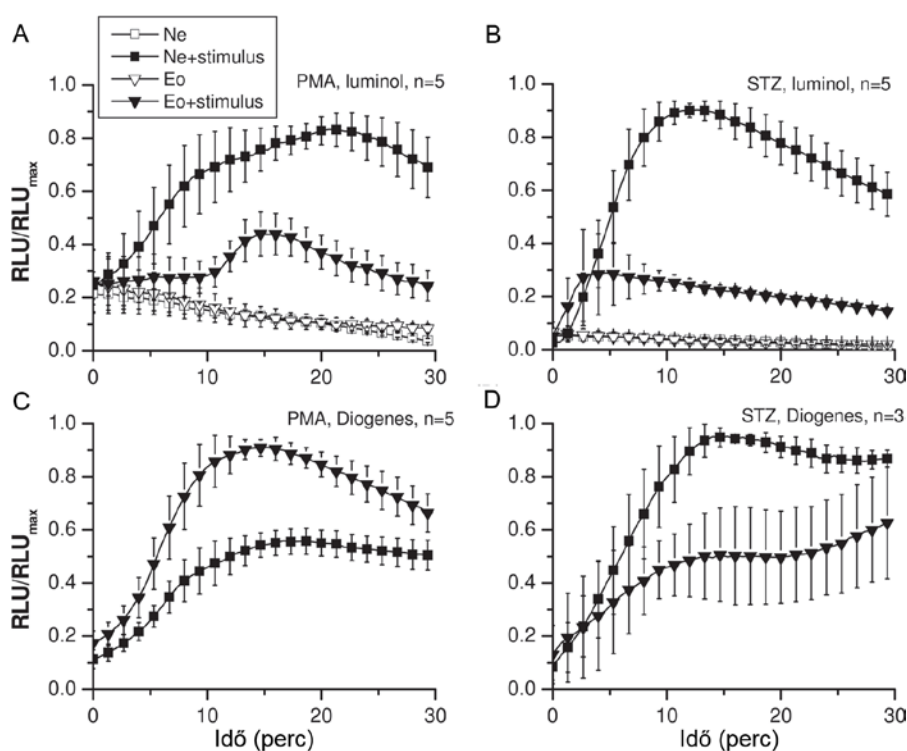


**22. ábra. A légzési robbanást elősegítő fehérjék kifejeződése közötti összefüggés vizsgálata eozinofil és neutrofil granulocitákban.** A nyolc donor granulocitáinak PDI-re normalizált fehérjetartalmát viszonyítottuk egymáshoz. A lineáris regresszióval kapott szignifikáns korrelációt szürke vonalak jelölik. A diagrammok közötti fekete vonalak az egyes csoportok diagramjait (A-D) választják el. Mivel minden csoportban két összehasonlítást végeztünk a szignifikanciaküszöb értékét valamennyi lineáris regresszió esetén 0,0253-ra csökkentettük.

## 6.10. A ROS-termelés legmagasabb mérhető intenzitása az alkalmazott stimulus és mérési módszer függvénye

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy bár a Nox2 kifejeződése hasonló mértékű a két granulocitában, a fehérje sejten belüli elhelyezkedése eltérő mintázatot mutat (16. ábra). Korábbi adatok alapján az eozinofilek a neutrofilekkel ellentétben a termelt ROS nagy részét az EC térbe ürítik [97,103]. Ezzel egybecseng az a megfigyelés, miszerint egészséges donorok paramágnesesen izolált eozinofiljei PMA hatására ~3-szor több szuperoxidot ürítettek (cyt c esszével mérve), és ~3-szor nagyobb plazmalemmális elektronárammal (ti. phox aktivitással) rendelkeztek, mint a neutrofilek [220]. Az eozinofil és neutrofil granulocitákban tapasztalható eltérő ROS-termelési mintázat alapján arra számíthatunk, hogy az eozinofilek PMA által kiváltott légzési robbanásának mért intenzitása mindaddig meghaladja a neutrofilekét, amíg azt az extracelluláris térbe ürített szuperoxid formájában követjük. Fagocitózis során azonban elképzelhető, hogy két sejtípus között nem, vagy esetleg a neutrofilek javára észlelünk különbséget. Shult és munkatársai tanulmányukban hat egészséges donor granulocitáinak ROS-termelését hasonlították össze [221]. Cyt c esszével mérve az STZ-indukálta légzési robbanás azonos intenzitásúnak adódott a két sejtípus között, míg PMA esetén az eozinofilek kétszer több szuperoxidot termeltek. Meglepő módon luminollal mérve azonos eredményekre jutottak annak ellenére, hogy a cyt c-vel szemben a luminol membránpermeábilis. Mivel a luminol kemilumineszcencia kialakulásához peroxidáz-aktivitás szükséges [73], az utóbbi eredmények azzal is magyarázhatók, hogy a sejtek peroxidázai (myeloperoxidáz, illetve eozinofil peroxidáz) eltérő mértékben képesek támogatni az LCL szignál létrejöttét. Megjegyzendő, hogy Shult munkacsoportja hipotóniás gradiens-centrifugálás módszerével izolálta az eozinofileket a neutrofilektől, mely eltérő módon befolyásolhatta a két sejtípus funkciót. További kísérleteink során ezért azt vizsgáltuk, hogy a fentebb leírt megfigyelések paramágneses gyöngyökkel izolált sejtekkel is reprodukálhatók-e. Az extracelluláris ROS-termelést (az elsősorban szuperoxidra érzékeny) Diogenes reagenssel követtük, LCL segítségével pedig elsősorban az intracelluláris szabadgyök-termelést detektáltuk [73]. PMA hatására eozinofil granulocitákban a neutrofilekhez képest mérsékeltebb LCL szignálemelkedést tapasztaltunk (maximális Eo/Ne arány  $0,53 \pm 0,1$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,02$ , 23.A ábra). Ezzel

szemben Diogenes-szel mérve az eozinofilek  $1,7\pm 0,1$ -szer nagyobb jelet generáltak PMA stimuláció hatására ( $n=5$ ,  $p<0,01$ , 23.C ábra). Az STZ-vel aktivált neutrofilekben az eozinofilekhez képest átlagosan háromszor erősebb LCL jelet detektáltunk (maximális Eo/Ne hányados  $0,3\pm 0,2$ ,  $n=5$ ,  $p<0,01$ , 23.B ábra), ami arra utal, hogy a neutrofil granulociták STZ stimulusra intenzív intracelluláris ROS termeléssel válaszolnak. Amennyiben a granulociták STZ által kiváltott ROS-termelését Diogenesszel mértük, nem detektáltunk szignifikáns különbséget a két sejttípus között (Eo/Ne arány  $0,7\pm 0,2$ ,  $n=3$ , 23.D ábra). A fenti eredmények alapján elmondható, hogy az egyes módszerek ellentmondásos eredményre vezetnek, ha azokat különböző sejttípusok összehasonlítására használjuk.

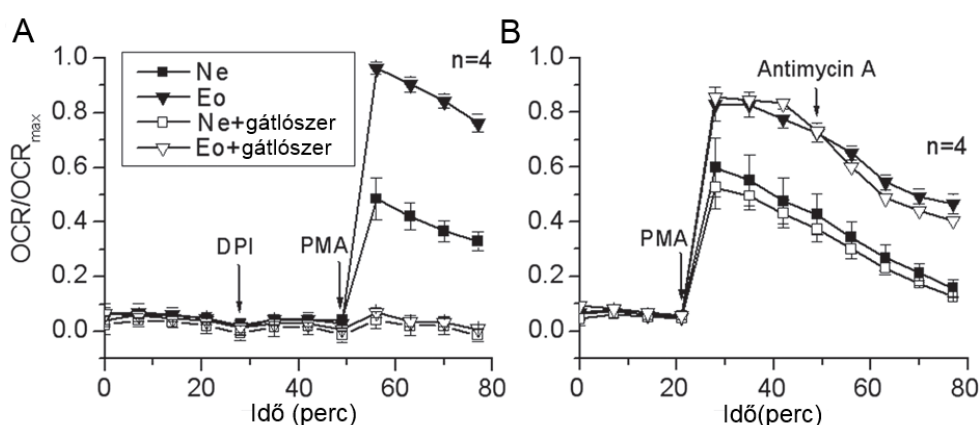


**23. ábra. Az eozinofil és neutrofil granulociták ROS-termelése.** A légzési robbanást a 0 percnél hozzáadott forbol észterrel (PMA,  $0,6 \mu\text{M}$ , A és C), illetve opszonizált zimozánnal (STZ,  $0,4 \text{ mg/ml}$ ) (B és D) indítottuk meg. Az extracelluláris ROS-t Diogenes reagenssel követtük (C és D), míg a luminol kemilumineszcencia (LCL) segítségével elsősorban az intracelluláris ROS-termelést detektáltuk (A és B). Valamennyi donornál meghatároztuk az adott stimulus - mérési módszer kombinációhoz tartozó maximális relatív lumineszcens egységet ( $\text{RLU}_{\text{max}}$ ), a többi mért értéket ehhez viszonyítottuk. LCL módszerrel az STZ-vel stimulált neutrofilek

produkálták a legmagasabb jelet, míg Diogenessel a PMA-val aktivált eozinofileknél mértük a legnagyobb értékeket.

### 6.11. A két granulocita-típus légzési robbanása során mutatott oxigénfogyasztásában nincs érdemi különbség

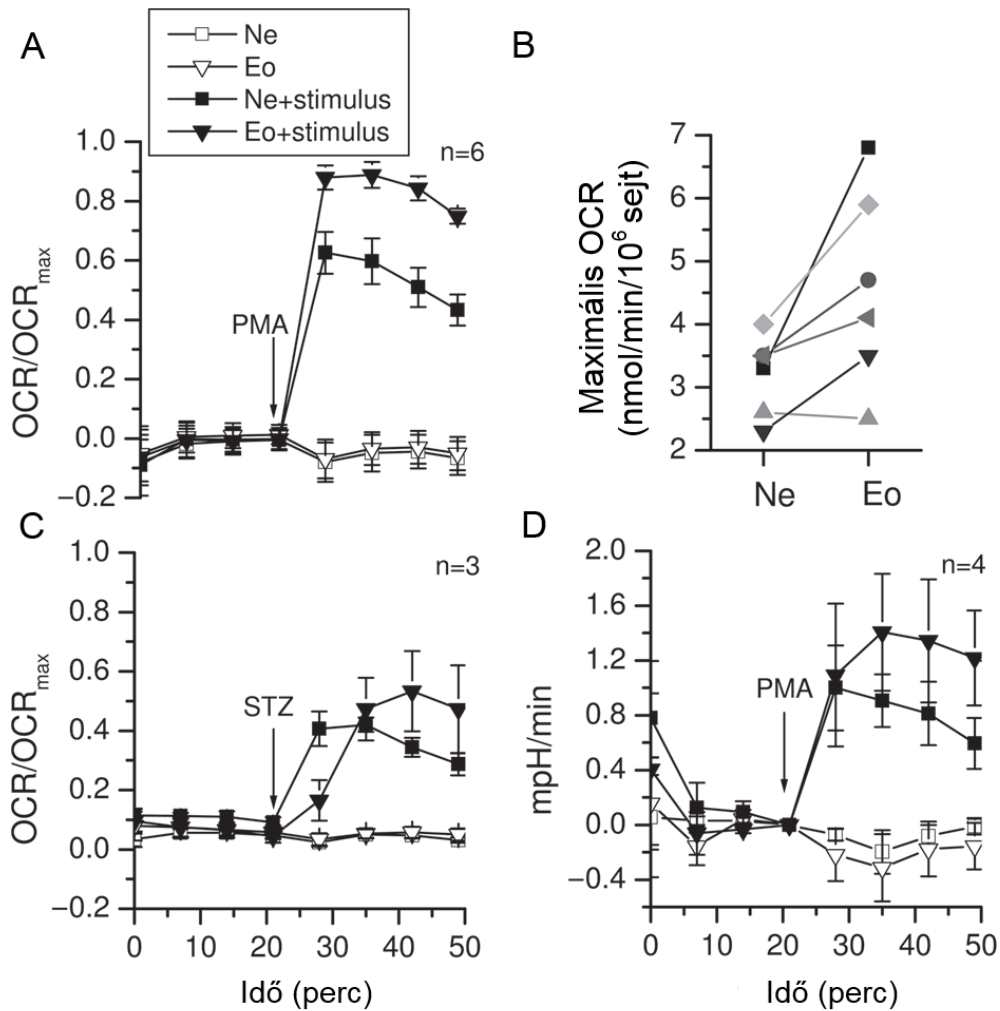
A légzési robbanás során termelt ROS össz-mennyiségének pontosabb meghatározása érdekében oxigénfogyasztás méréseket végeztünk. A légzési robbanás alatt a granulociták oxigén-fogyasztásáért szinte kizárólag a NADPH-oxidáz aktivitása felelős, a mitokondriális légzési lánc ezekben a sejtekben ugyanis gyakorlatilag teljesen inaktív [83–86]. Mivel az egyes donoroktól csak korlátozott számú eozinofil nyerhető, méréseinket az alacsony sejtigényű Seahorse XF rendszerrel végeztük, mely fluorimetriás alapon képes meghatározni az oxigénfogyasztást, valamint az extracelluláris médium pH-jának változását. A mitokondriális és a NADPH-oxidáz függő oxigénfogyasztás izolált meghatározása érdekében méréseinket 1  $\mu$ M antimycin (a légzési lánc gátlószere [222]), illetve 1  $\mu$ M DPI jelenlétében is elvégeztük. A granulocitákat PMA-val vagy STZ-vel aktiváltuk. Amint az a korábbi adatok [86] alapján várható volt, a DPI hatására minimálisra csökkent a sejtek oxigénfogyasztása, míg az antimycin nem gátolta azt (24. ábra).



**24. ábra.** Az aktivált granulociták oxigénfogyasztása erősen függ a NADPH-oxidáz aktivitásától, de független a mitokondriális légzési lánctól. Az oxigénfogyasztást 37°C-on, Seahorse XF analízator rendszer segítségével mértük. A NADPH-oxidáztól

függő és a mitokondriális oxigénfogyasztás meghatározása érdekében (A) 1  $\mu\text{M}$  DPI-t (NADPH-oxidáz gátlószer [223]), illetve (B) 1  $\mu\text{M}$  antimycin A-t (légzési lánc inhibitor [224]) adtunk a sejtekhez. A granulocitákat 0,6  $\mu\text{M}$  PMA hozzáadásával stimuláluk és az oxigénfogyasztási rátát (OCR) mértük. Valamennyi donor esetén meghatároztuk a legmagasabb OCR értéket, melyet  $\text{OCR}_{\text{max}}$ -nak neveztünk, majd az adott donor egyéb oxigénfogyasztás értékeit ehhez viszonyítottuk. Figyeljük meg, hogy az (A) ábrán a PMA hozzáadása előtt eltelt hosszabb idő a (B) ábrához képest megnöveli az eozinofil és neutrofil granulociták között megfigyelhető  $\text{OCR}_{\text{max}}$  különbséget. A jelenség valószínűleg a Seahorse XF készülék mérőfejének mozgása által kiváltott mechanikai hatás művi következménye.

A PMA hatására bekövetkező maximális oxigénfogyasztás eozinofil granulocitákban átlagosan 1,4-szer magasabb volt, mint neutrofilekben (eozinofil granulociták:  $4,5 \pm 0,7$  nmol/perc/ $10^6$  sejt, neutrofil granulociták:  $3,1 \pm 0,3$  nmol/perc/ $10^6$  sejt,  $n=6$ ,  $p<0,02$ , 25.A-B ábra). A fenti adatok alapján valószínűsíthető, hogy az eozinofilek valamivel nagyobb ROS-termelési kapacitással rendelkeznek. A STZ által kiváltott oxigénfogyasztás lassúbb aktivációs kinetikát mutatott eozinofilekben, mint neutrofilekben (25.C ábra), az oxigénfogyasztás csúcserőke azonban nem tért el szignifikánsan a két sejtípus között (eozinofil granulociták:  $1,9 \pm 0,4$  nmol/perc/ $10^6$  sejt, neutrofil granulociták  $2,2 \pm 0,6$  nmol/perc/ $10^6$  sejt,  $n=3$ ). A kísérleti körülmények csupán minimális pH változásokat tettek lehetővé, de a PMA-val aktivált eozinofilek a neutrofileknél így is kb. 1,6-szor magasabb extracelluláris savanyodást váltottak ki, ezen különbség azonban nem volt szignifikáns (25.D ábra).



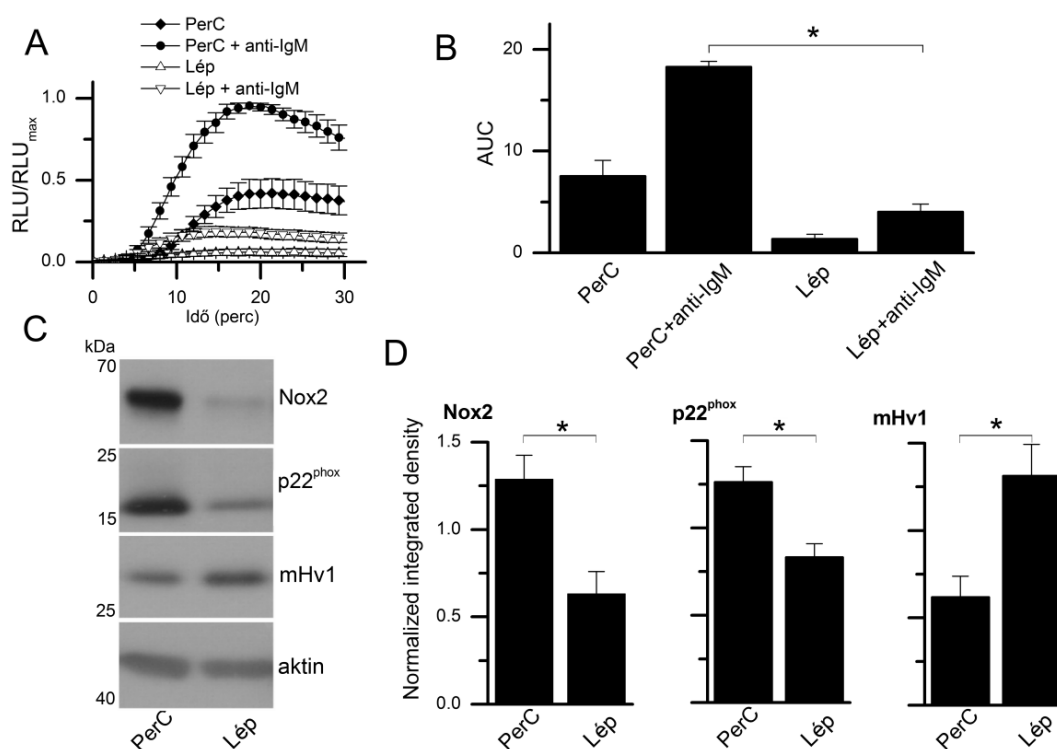
**25. ábra.** Az eozinofil és neutrofil granulociták légzési robbanás alatt mérhető oxigénfogyasztása és az extracelluláris pH változása. A granulocitákat PMA-val (0,6  $\mu$ M) (A) vagy STZ-vel (0,4 mg/ml) (C) aktiváltuk, és az oxigénfogyasztási rátát (OCR) mértük. A legmagasabb oxigénfogyasztási rátát ( $OCR_{max}$ ) PMA-stimulált eozinofilekben detektáltuk (A és C esetén egyaránt). Valamennyi mérési eredményét  $OCR_{max}$ -hoz viszonyítottuk. (B) Az (A) diagrammon szereplő donorok eozinofil és neutrofil granulocitáinak PMA által kiváltott  $OCR_{max}$  értékei párba állítva. (D) PMA-aktivált granulociták extracelluláris médiumában mért pH változások.

## **6.12. Az egér peritoneális B-sejtek relatív intenzív légzési robbanásának háttérében magas cytb<sub>558</sub> expresszió mutatható ki**

Az eddig tárgyalt vizsgálatainkban döntően a granulociták Nox2 és Hv1 kifejeződésével és aktivitásával foglalkoztunk. Fagocitáló granulocitákban, és fagocitákban általában is, meglehetősen világos elképzelésekkel rendelkezünk a két fehérje élettani jelentőségéről. A Hv1 és Nox2 azonban B-limfocitákban is kifejeződik, viszont a B-sejteket klasszikusan nem tekintik fagocitáló sejteknek. A két fehérje szerepéről és esetleges együttműködéséről B-sejtekben csak szórványos és esetenként egymásnak ellentmondó adatok állnak rendelkezésre. 2012-ben három párhuzamos tanulmányban [114–116] azt találták, hogy bizonyos B-limfocita populációk (pl. a peritoneális B-sejtek egy része [114,115]) bekebeleznek és el is pusztítanak baktériumokat. Ezen tanulmányok azonban nem vizsgálták a limfociták baktericid képességének viszonyát a bennük megtalálható Nox2-rendszerhez. További vizsgálatainkban tehát arra kerestük a választ, hogy a phox hozzájárul-e a fagocitáló B-sejtek baktériumöléséhez. Első lépésként összevetettük az egérből izolált peritoneális (PerC) és lép B-sejtek szuperoxid-termelési képességét. A 26. ábrán látható, hogy mindkét sejtpopulációban aktiválódik egy alapszintű (valószínűleg felszín által kiváltott) szuperoxid-termelés, mely PerC B-sejtekben magasabb. A BCR aktivációja (ti. kereszt kötése) mindkét sejt típusban többszörösére növelte a szuperoxid-felszabadulást, ám a peritoneális B-limfociták ebben az esetben is magasabb jelet generáltak, mint a lép B-sejtek. A harmincperces mérési periódus egészére vonatkoztatva a PerC B-sejtek a lép B-sejteknél kb. ötször nagyobb ROS-termelést mutattak (26.B ábra). A tisztított peritoneális B-sejtek kifejezett ROS termelése nem egyéb (ti. nem B-limfocita) sejtpopuláció jelenlétének a következménye, mivel sem a neutrofilek, sem a makrofágok nem mutattak fokozott ROS-termelést anti-IgM jelenlétében (eredmény nincs bemutatva).

Mivel a B-sejtek kifejezik a fagocita oxidáz alegységeit [225], feltételeztük, hogy a PerC B-sejtek magasabb ROS-termelésének háttérében a phox komponensek intenzívebb kifejeződése áll. Western blot segítségével megvizsgáltuk peritoneális és

lép B-sejtek Nox2 és p22<sup>phox</sup> expresszióját. A peritoneális B-sejtek magasabb Nox2- és p22<sup>phox</sup>-jelölést mutatnak (26.C ábra). A Western blot eredmények denzitometriás analízise alapján a peritoneális B-sejtek kétszer magasabb Nox2 és másfélszer nagyobb p22<sup>phox</sup> expresszióval rendelkeznek (26.D ábra). Granulocitákban a Hv1 az intenzív szabadgyök-termelés idején segíti a phox működését, emellett leírták, hogy protoncsatorna-hiányos B-sejtek csökkent BCR-függő szabadgyök-termeléssel rendelkeznek [196]. Meglepő módon azonban a peritoneális B-sejtekben a lép B-sejteknél alacsonyabb mHv1 kifejeződést detektáltunk (26.C-D ábra), ami arra utal, hogy a protoncsatorna mennyisége és a ROS-termelés intenzitása még oxidatív robbanást mutató sejtekben sem feltétlenül áll egyenes arányban egymással.



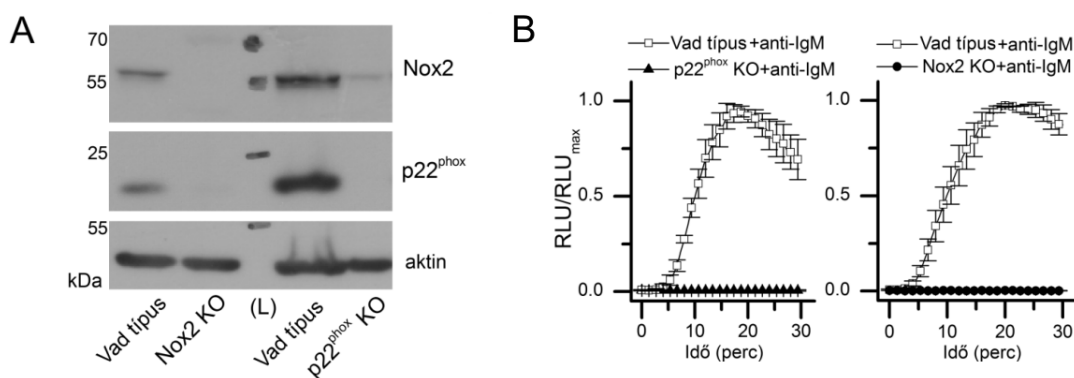
**26. ábra. A B-limfociták szuperoxid-termelése és fagocita oxidáz tartalma.** (A) A peritoneális (PerC) és lépből izolált B-sejtek Diogenes-reagenssel mérhető szuperoxid-termelése. Méréseink során nyugvó és BCR keresztkötéssel aktivált (20 µg/ml anti-IgM F(ab')<sub>2</sub>) sejteken követtük a szuperoxid-felszabadulást (n=5). (B) Az (A) panelen szereplő adatok görbe alatti terület (AUC) analízise (\*p<0.05). (C) A PerC és lép B-sejtek phox alegység expressziójának vizsgálata Western blot segítségével. A komplex membránköötött alegységeinek (Nox2 és p22<sup>phox</sup>) és a feszültségfüggő protoncsatornának



(Hv1) a mennyiségét vizsgáltuk. Az aktin-jelöléssel a felvitt fehérje mennyiségét kontrolláltuk. (D) A Western blot eredmények denzitometriás analízise (n=6, \*p<0.05).

### 6.13. A peritoneális B-sejek ROS-termeléséért a phox felelős

A következő kérdésünk az volt, hogy a phox mekkora arányban felelős a BCR által kiváltott szuperoxid-termelésért. A peritoneális B-sejteket ezért Nox2 knockout, vagy a p22<sup>phox</sup> génjében pontmutációt hordozó *nmf333* egértörzs egyedeiből izoláltuk. Az utóbbi mutációról ismert, hogy homozigóta formában a p22<sup>phox</sup> teljes hiányával jár, így az érintett sejtekben phox-függő szuperoxid-termelés sem mérhető [22]. A Nox2-hiányos állatok peritoneális B-sejtjeiből a *cytb*<sub>558</sub> egyik komponense sem mutatható ki (27.A ábra). Az *nmf333* egerekből izolált peritoneális B-sejtekből nem detektáltunk p22<sup>phox</sup> expressziót, a sejtek Nox2-tartalma pedig jelentősen lecsökkent (27.A ábra). Eredményeink összhangban állnak az irodalmi adatokkal, miszerint a Nox2 és a p22<sup>phox</sup> együttes jelenléte szükséges a stabil citokróm-komplex kialakulásához [27]. Sem a Nox2-, sem a p22<sup>phox</sup>-deficiens peritoneális B-sejtek nem ürítettek mérhető mennyiségű szuperoxidot (27.B ábra), bizonyítva a Nox2-komplex esszenciális szerepét a peritoneális B-sejtek szuperoxid-termelésében.

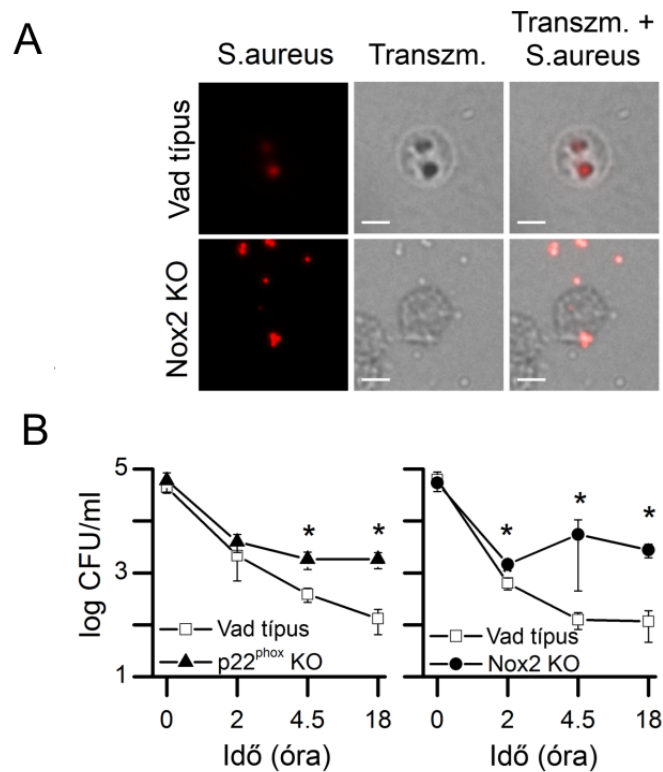


**27. ábra. A PerC B-sejtek szuperoxid-fel szabadulása működőképes Nox2-komplexet igényel.** (A) Vad típusú (VT), Nox2 KO és p22<sup>phox</sup> KO PerC B-sejtek Nox2 és p22<sup>phox</sup> kifejeződésének immunoblot analízise. Az aktin-jelöléssel a felvitt fehérje mennyiségét kontrolláltuk. (B) VT, Nox2 KO és p22<sup>phox</sup> KO PerC B-sejtek anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> stimulus hatására bekövetkező extracelluláris szuperoxid-termelése (n=3)

#### **6.14. A phox a fagocitózis során a fagoszómában aktiválódik, és hozzájárul a B-limfociták antimikrobiális aktivitásához**

A hasüregből és a lépből izolált B-sejtekről kimutatták, hogy képesek baktériumokat fagocitálni, és a bekebelezett kórokozót elpusztítani [114–116]. Megvizsgáltuk tehát, hogy ebben a folyamatban a phox szerepet játszik-e. A peritoneális B-sejteket fluoreszcensen jelölt *S.aureus*-szal inkubáltuk, majd a baktériumok és a phox aktivitás elhelyezkedését fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (28.A ábra). A korábbi eredményeknek megfelelően a B-sejtek kis hányada (kevesebb, mint 10%-a) mutatott fagocita-aktivitást, és ebben a tekintetben nem volt eltérés a VT és a Nox2 hiányos B-sejtek között (eredmény nincs bemutatva). A fagoszómális ROS-termelés kimutatása céljából a B-sejteken nitroblue-tetrazólium (NBT) tesztet végeztünk. A fagocitáló vad típusú sejtekben masszív NBT-formazán lerakódás a bekebelezett baktériumok környezetében alakult ki, míg a Nox2 KO sejtekben nem észleltünk hasonló depozitumokat (28.A ábra).

Mivel fenti kísérleteink a phox fagoszómális akkumulációjára utaltak, megvizsgáltuk, hogy a Nox2 által előállított ROS hozzájárul-e a baktériumok elpusztításához. Gentamycin protekciós módszer segítségével meghatároztuk a peritoneális B-sejtek baktériumölő-képességét, mivel ezen eljárást korábban sikeresen alkalmazták a B-sejtek antimikrobiális aktivitásának meghatározására [114]. Kísérleteinkben Nox2, illetve p22<sup>phox</sup> deficiens peritoneális B-limfociták baktériumölő képességét hasonlítottuk össze vad típusú sejtekével. A Nox2, illetve p22<sup>phox</sup> hiányos sejtekben a baktériumok túlélése a vad típusúakénál szignifikánsan magasabbnak adódott (28.B ábra). E megfigyelésünk alátámasztja, hogy a phox szerepet játszik a B-sejtek antimikrobiális aktivitásában.



**28. ábra. A fagocita oxidáz szerepet játszik a fagoszómális ROS-termelésben és a baktériumok elpusztításában.** (A) A fagoszómális szuperoxid-termelést nitroblue-tetrazólium (NBT)-teszt alkalmazásával vizsgáltuk. Az izolált peritoneális B-sejteket Alexa Fluor 594-jelölt *S. aureus*-szal (vörös) inkubáltuk, Vad típusú sejtekben észlelhetők a sötét színű NBT-formazán precipitátumok, melyek a Nox2-hiányos társaikban nem jelennek meg. A méretjelző vonal 5  $\mu\text{m}$ -t jelöl. (B) VT, Nox2 KO és p22<sup>phox</sup> KO PerC B-sejtek intracelluláris baktériumölési képességének vizsgálata gentamycin protekciós esszével. (n = 3 valamennyi kísérlet esetén, \*p<0.05).

## 7. Megbeszélés

A légzési robbanás 1932-es, első leírása óta [226] a falósejtek kutatásának homlokterében áll. A légzési robbanás vizsgálatához az emberi neutrofil granulociták bizonyultak a legalkalmasabbnak, mivel könnyen és nagy mennyiségben izolálhatóak a donorok perifériás véréből. Neutrofilek segítségével azonosították a fagocita NADPH-oxidáz alegységeit, melyekről kimutatták, hogy hiányukban nem jöhet létre intenzív és szabályozott ROS-termelés a légzési robbanás során [224]. Később kimutatták a feszültségfüggő protonáramot, mely fontos szerepet játszik a légzési robbanás támogatásában. A feszültségfüggő protonáram eredetéről folytatott évtizedes vitának a Hv1 klónozása vetett véget 2006-ban [154,155]. Azóta a Hv1 protoncsatorna expresszióját, szerkezetét, heterológ expressziós rendszerekben és egér fehérvérsejtekben betöltött szerepét több közleményben is vizsgálták. Emberi fehérvérsejtekben azonban kevés és bizonytalan információval rendelkezünk a Hv1 kifejeződéséről és funkciójáról. Vizsgálataim célja egyebek mellett az emberi fehérvérsejtekben kifejeződő Hv1 megbízható kimutatása és legfőbb tulajdonságainak meghatározása volt.

A Nox2-komplex szabályozásánál láthattuk, hogy a különböző stimulusok az egyes sejtfeleségekben eltérő minázatú ROS-termelést indítanak meg, emellett természetesen a különböző sejtípusok között is számottevő mennyiségi és minőségi különbségek figyelhetők meg a szabadgyök-termelés vonatkozásában. Az összes fehérvérsejt-típus közül a neutrofil és az eozinofil granulociták képesek a legnagyobb mennyiségű ROS-t produkálni [91,93], ezért a két sejtípus között fennálló funkcionális különbségek ellenére légzési robbanásuk intenzitásáról és phox-alegységeik expressziójáról több összehasonlítás is született [89,95,97,103,221,227–229]. Az eredmények többsége által sugallt kép azonban a bevezetőben felsorolt aggályok miatt nem feltétlenül fedi a valóságot.

Kísérleteink során összevetettük egészséges egyénekből származó eozinofil és neutrofil granulociták légzési robbanásának létrehozásában kulcsszerepet játszó fehérvérsejt kifejeződését, valamint a granulociták légzési robbanásának intenzitását. A hibás

eredmények elkerülése céljából megkíséreltük minimálisra csökkenteni a sejtek preaktivációját azzal, hogy a granulocitákat közvetlenül az izolálás után felhasználtuk. Továbbá az eozinofileket negatív szelekció segítségével, kíméletesen izoláltuk, úgy hogy a neutrofilek elválasztásához anti-CD16 antitestekkel fedett mikroyöngyöket használtunk, mely módszerrel a neutrofilek is jó állapotban kinyerhetők [230]. Az antitestekkel végzett jelölés neutrofilekre kifejtett esetleges hatásának kizárására előkísérleteinkben megvizsgáltuk jelölt neutrofilek és jelöletlen PMN-ek (>90% neutrofil granulocita) légzési robbanását. A két sejtpopuláció között nem észleltünk különbséget (eredmény nincs bemutatva).

### **7.1. A Hv1 emberi fehérvérsejtekben feszültségfüggő protoncsatoraként működik**

Állatmodellekben és heterológ expressziós rendszerekben kapott eredmények alapján feltételezhető volt, hogy emberi fehérvérsejtekben a protonáramért a Hv1 felel, ám ezt közvetlen módszerekkel előttünk nem vizsgálták. Eredményeink alapján a Hv1 mennyisége (14. ábra) a legtöbb fehérvérsejt-féleségben arányos az egyes sejteken mért protonáram-denzitással. A T-sejtek igen alacsony protonáram-denzitással rendelkeznek (0,9 pA/pF [188]), a Hv1 fehérjeszintű expressziója pedig nem éri el az alkalmazott módszer érzékenységi küszöbét. B-sejtekben és granulocitákban a Hv1 kifejeződés mértéke a protonáram denzitással (~17-200 pA/pF) arányos [188]. Perifériás vérből izolált monociták szintén magas Hv1 expressziót mutatnak, és jól mérhető feszültségfüggő protonárammal rendelkeznek [91]. A primer fehérvérsejteken kapott adatoknak megfelelően PLB-985 sejtekben a Hv1 transzlációjának csendesítése a protonáram denzitásának arányos csökkenését eredményezte (18. ábra). Adatainkat összegezve tehát kijelenthető, hogy a Hv1 jelenléte emberi fehérvérsejtekben elengedhetetlen a feszültségfüggő protonáram létrejöttéhez és nagy valószínűséggel protoncsatornaként funkcionál.

## 7.2. A Hv1 emberi granulocitákban stabil dimereket alkot

A feszültségfüggő protoncsatorna dimerképzését heterológ expressziós rendszerekben már többen tanulmányozták [158–160]. A rendelkezésre álló adatok alapján a dimerizációban a C- [158,159,207] és N-terminális [158,160] intracelluláris domének mellett az S1-S2 szegmentumok közötti extracelluláris összekötő szakaszok [159] is részt vesznek. A Hv1 különböző alakjai eltérő tulajdonságú protonáramot generálnak: a monomerek aktivációja gyorsabb [158], míg a dimerben az alegységek között ko-operativitás figyelhető meg [231]. A fenti eredmények felvetették annak lehetőségét, hogy az egyes sejtfeleségek, illetve a falósejtek nyugalmi és aktivált állapota között megfigyelhető protonáram-kinetikai különbségek az eltérő monomer-dimer arányból fakadnak. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy granulocitákban a Hv1 elsősorban dimerként van jelen (15. ábra). Az egymástól távol elhelyezkedő dimerizációs domének elméletileg lehetőséget adhatnak nagyobb multimerek (trimer, tetramer) kialakulásához is. Kiterjedt próbálkozásaink ellenére emberi granulocitákban ilyen multimerek jelenlétét nem sikerült igazolnunk.

További eredményeink alapján emberi granulocitákban a Hv1 dimerjét -legalábbis részben- erős poláros kölcsönhatások stabilizálják, mivel magas ionos detergens koncentráció mellett a dimerek monomerekre bomlottak (15.A ábra). Ezzel szemben a diszulfid híd kötések alighanem alárendelt szerepet játszanak a dimer kialakításában. Az emberi Hv1 molekula mindösszesen két ciszteint tartalmaz, melyek közül a C-terminális közelében elhelyezkedő Cys249 található olyan pozícióban, mely lehetővé teszi részvételét a dimer kialakításában [159,207]. Megfigyeléseink arra mutatnak, hogy heterológ expressziós rendszerekben tapasztaltakhoz hasonlóan [159,231] a Cys249 nyugvó granulocitákban redukált állapotban található (15. ábra). Redukáló és oxidáló ágensek (pl. NADPH [205], ROS [206]) a Cys249-en keresztül elvileg befolyásolhatják a dimer stabilitását. Tiol-reaktív anyagokkal végzett kísérleteinkben azonban PMA-val kiváltott légzési robbanás folyamán nem észleltünk érdemi változást az említett cisztein redox-állapotában (15.B ábra). Bár eredményeink nem valószínűsítik a diszulfid hidak Hv1-dimer kialakításában játszott szerepét, az esetlegesen kialakuló diszulfid hidak létének és protonáramra kifejtett hatásának kimutatása további vizsgálódást igényel.

A protoncsatorna C-terminális régiójában egy szuperhelikális (ún. coiled-coil) domén található [207], mely más ioncsatornákhöz hasonlóan a Hv1-ben is a protein-protein kölcsönhatások kialakításában vesz részt [158,159,207]. A fehérje N-terminálisának szerkezete kevésbé stabil (ún. random coil) [159], és a dimerizációban játszott szerepe is nagyrészt tisztázatlan. A protoncsatorna C-terminálisának kísérletes eltávolítása a dimer arányának csökkenését eredményezte, a jelenség az N-terminális egyidejű lehasításával nagymértékben fokozódott [158]. Kísérleteink alapján a Hv1 igen proteáz-érzékeny (14. és 16. ábra). Ez felveti annak lehetőségét, hogy a granulociták aktivációja során megélénkülő proteolízis elősegíti a csatorna fokozott kapuzási állapotának kialakulását. Mivel azonban a fokozott kapuzási módban megfigyelhető változások javarészt reverzibilisek [179,205], a proteolízis szabályozó szerepe e folyamatban erősen kétséges. A Hv1 N-terminálisának hasítása és/vagy degradációja mindazonáltal befolyásolhatja a fehérvérsejtek proliferációját, a protoncsatorna overexpressziója ugyanis gátolta éretlen B-sejt limfóma sejtek osztódását [198]. Összegzésként elmondható, hogy a granulocita-aktiváció hatására a Hv1 monomer-dimer arány változatlan marad, hiszen keresztkötő reagensekkel azonos eredmények születtek PMA-val stimulált és nyugvó sejteken (15. ábra). Emellett közvetett bizonyítékok alapján más szerzők is megkérdőjelezték, hogy a fagociták aktivációja bármilyen irányú monomer-dimer átalakulást vonna maga után [186].

### **7.3. Emberi granulocitákban a Hv1 a granulumok membránjában és a sejt felszínen is megtalálható**

A teljes hosszúságú Hv1-gyel transzfektált HeLa sejtekben a protoncsatorna az intracelluláris membránokban foglal helyet. Ezzel ellentétben a natív Hv1 B-limfocitákban elsősorban a sejt felszínen és az endoszómákban található [196]. Konfokális mikroszkópiával nyert eredményeink arra utalnak, hogy nyugvó granulocitákban a protoncsatorna legfőképp különböző intracelluláris granulumokban található, de számottevő mennyiségben megjelenik a plazmamembránban is (16. ábra).

#### 7.4. A Hv1 és Nox2 kifejeződése egymástól független

A feszültségfüggő protoncsatorna a phox által a légzési robbanás kapcsán létrehozott transzmembrán elektrontranszport támogatásának hatékony eszköze [184]. A Nox2 és a Hv1 közötti szoros funkcionális kapcsolatot jól mutatja, hogy az oxidáz aktivációjának hatására a protoncsatorna működése is hatékonyabbá válik [188,232] (ún. fokozott aktivációs állapot – ld. a feszültségfüggő protoncsatorna felépítése, működése és szabályozása fejezetet). Hv1 hiányában több fehérvérsejttípus is csökkent ROS-termelést mutat PMA stimuláció hatására [189,191,196,208]. Az elektron- és protontranszport között tapasztalható szoros funkcionális kapcsolat okán felmerül a kérdés, hogy emberi fehérvérsejtekben a Hv1 és a Nox2 között kimutatható-e hasonló kapcsoltság a kifejeződés és a sejten belüli eloszlás terén. Eredményeink alapján a két fehérje közötti funkcionális kapcsolat a mennyiségük és az elhelyezkedésük tekintetében is tetten érhető:

1. A Nox2 és a Hv1 több falósejttípusban is kolokalizációt mutat (16. ábra)
2. A két fehérje expressziója párhuzamosan növekszik PLB-985 sejtek granulocita irányú fejlődése folyamán (19. ábra)
3. Zimozán fagocitózisa során mindkét fehérje a fagoszóma falában dúsul (17. ábra).

Megjegyzendő azonban, hogy a Hv1 fagoszómalis akkumulációja és expressziójának fejlődő PLB-985 sejtekben tapasztalható korai és masszív emelkedése működőképes Nox2 hiányában is bekövetkezik (17. és 19. ábra). Az utóbbi eredménnyel egybeesik az a megfigyelés, miszerint Nox2 hiányos egyének nyugvó granulocitái normál protonáram denzitással rendelkeznek [233]. A fenti adatok alapján valószínűsíthető, hogy a Nox2 jelenléte nem feltétele a Hv1 kifejeződésének. Az összefüggést a másik irányból vizsgálva azt találtuk, hogy PLB-985 sejtekben a Hv1 expressziójának nagyfokú csendesítése nem vonta maga után a phox alegységek kifejeződésének sérülését (19.B ábra). Irodalmi adatok alapján Hv1 KO egerek fehérvérsejtjeiben gyakorlatilag normális a phox alegységek mennyisége [208], valamint a vad típusú fehérvérsejtekkel egyező Nox2-függő elektronáramot generálnak [192,234]. Annak ellenére, hogy a Hv1 és a Nox2-komplex alegységeinek expressziója egymástól meglehetősen függetlennek tűnik, egér granulocitákban a Hv1 hiánya a phox



működésének csökkenését vonja maga után [191,208,234]. Fontos leszögezni, hogy emberi Hv1 deficienciát ez idáig nem írtak le, és kicsi a valószínűsége, hogy hasonló eset napvilágra kerül. Az egérrel ellentétben ugyanis emberben a Hv1 fontos szerepet játszik a spermiumok termékenyítő képességének kialakításában [235]. Egy súlyos Hv1 mutáció ezért már a megtermékenyülés előtt jó eséllyel kiszelektálódik. Granulocita irányba differenciáltatott PLB-985 sejtekben kapott eredményeink emberi eredetű sejtekben is közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az RNS interferencia segítségével erősen csökkentett Hv1-kifejeződés károsíthatja a sejtek intenzív szuperoxid-termelését (20. ábra).

### **7.5. A Hv1 a neutrofil granulociták egyedüli protoncsatornája?**

Több adat is bizonyítja, hogy a Hv1 emberi és egér fehérvérsejtekben protoncsatornaként funkcionál. Ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a Hv1 mellett egyéb protoncsatornák is segítik a granulociták ROS-termelését. Évekig a Nox2-t tartották a granulociták protoncsatornájának (különösen a szuperoxidot termelő, aktív állapotában) [236,237]. Fontos leszögezni, hogy a Hv1-hiányos egér fehérvérsejtek jelentős ROS-termelést mutatnak [191,208,234], továbbá az általunk használt PLB-985 sejtek a Hv1 mennyiségének nagymértékű csökkentése után is számottevő ROS-termeléssel rendelkeztek. A fenti eredmények tükrében felmerül, hogy nem a Hv1 az egyetlen fehérje, mely a phox által létrehozott depolarizáció kompenzációjáért felelős. A fenti lehetőséget elfogadva a következő kérdések merülnek fel. Neutrofil granulocitákban a Hv1 mellett van-e egyéb protoncsatorna? Ha a Hv1 a neutrofilek egyetlen protoncsatornája, hogyan magyarázható a hiányában észlelhető relatíve magas ROS-termelés? Egy második protoncsatorna létezését cáfolja az a megfigyelés, miszerint a Hv1-hiányos egér eredetű neutrofil granulociták normál elektrontranszport mellett nélkülöznek mindenfajta feszültségfüggő protonáramot mind nyugvó, mind aktivált állapotban [192,234]. Ez alapján tehát ezeken a sejtekben összeszerelődik a működőképes Nox2-komplex, de sem a komplex, sem egyéb csatorna nem hoz létre feszültségfüggő protonáramot. Egyértelmű bizonyítékok hiányában azonban további vizsgáldást igényel annak eldöntése, hogy neutrofil granulocitákban a Hv1 mellett a

Nox2, vagy bármely egyéb molekula képes-e protonokat vezetni. Hogyan magyarázható a Hv1-hiányos fehérvérsejtek számottevő ROS termelése? Egy KO rendszerben egyéb transzportrendszerek (legalábbis részben) kompenzálhatják a feszültségfüggő protoncsatorna hiányát. Feltételezik, hogy  $K^+$ - és  $Cl^-$ -csatornák vad típusú granulocitákban is hozzájárulnak a töltéskompenzációhoz [211]. Arról azonban kevés kísérletes adat áll rendelkezésünkre, hogy Hv1 hiányában megfigyelhető-e a fent említett transzportfolyamatok valamiféle gyorsulása, ezért a kérdés tisztázásához további kísérletek szükségesek. Az ellentmondásos irodalmi adatok [188,236,237] ellenére valószínű, hogy az egér izotípushoz hasonlóan az emberi Nox2 sem hoz létre feszültségfüggő protonáramot. Ezt a feltevést támasztja alá az, hogy különböző fehérvérsejtekben és PLB-985 sejtekben a protonáram-denzitása erősen korrelál a Hv1 kifejeződésével (lásd fent), míg hasonló összefüggés a Nox2 esetén nem észlelhető [188] (18. ábra).

### **7.6. Az eozinofil granulociták a neutrofileknél több Hv1-et tartalmaznak, a phox alegységek mennyisége azonban a két sejtípusban megegyezik**

A működőképes phox minimálisan öt alegységből áll: Nox2,  $p22^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  és Rac [224]. Kísérleteinkben valamennyi előbb felsorolt alegység kifejeződését megvizsgáltuk Western blot és denzitometria segítségével. Eredményeink alapján az öt phox alegység mindegyike közel azonos mennyiségben található meg eozinofil és neutrofil granulocitákban (21. ábra). Ezzel szemben korábbi tanulmányok alapján a phox alegységek expressziója eozinofilekben magasabb. Az ellentmondást feltehetően a már említett sejtizolálási problémák magyarázzák. Az irodalomban először a közelmúltban azonosított [222] feszültségfüggő protoncsatorna expresszióját is összehasonlítottuk a két granulocita típusban. A Hv1-et jelenleg a phox járulékos alegységének tekintik, mivel hiányában 30-75%-os csökkenés figyelhető meg egér granulociták légzési robbanásának intenzitásában [223]. Az egyéb phox alegységekkel éles ellentétben a Hv1 kifejeződése az eozinofilekben 10-szer magasabbnak adódott, mint a neutrofilekben. Az utóbbi érték jól egyezik a patch-clamp mérések

eredményeivel, melyekben az eozinofilek protonáram-denzitását kb. tízszer magasabbnak találták [101,173]. Elméletileg elképzelhető, hogy Western blot kísérleteinkben a proteolízis sejttípus-függő módon megváltoztatta a detektálható Hv1 mennyiségét, mivel a Hv1 igen proteáz érzékeny [154], és granulociták, de különösen neutrofilek vizsgálatánál a proteolízis mindig nehezen kiküszöbölhető problémát jelent [238]. A fehérje-degradáció minimalizálása érdekében a sejtek lízise előtt DFP kezelést alkalmaztunk, mely máskor is hatékonynak bizonyult, amikor a Hv1 proteolízisének gátlása volt a cél.

### **7.7. Az eozinofilekben az extracelluláris ROS-termelés dominál, míg neutrofilekben intracellulárisan keletkeznek nagyobb arányban szabadgyökök**

A különböző phox alegységek expressziójának vizsgálata után arra a kérdésre kerestük a választ, hogy egészséges egyének granulocitáinak légzési robbanásában megfigyelhető-e intenzitásbeli különbség. Különböző kemilumineszcens módszerekkel végzett kísérleteinkkel ellentmondó eredményekre jutottunk. Az extracelluláris szuperoxidra érzékeny Diogenes reagenssel hasonló adatokat kaptunk, mint amit a korábbi közlemények cyt c redukcióval is leírtak (23. ábra). A hasonlóság ellenére a két sejttípus közötti különbség a cyt c esszével kapotthoz képest kisebbnek adódott (Eo/Ne arány 1,7 a korábbi 2-4,7-hez képest). A fenti eltérést két tényező magyarázhatja:

1. A Diogenes ROS-érzékenysége meghaladja a cyt c-jét (ami az irodalmi adatok alapján valószínű).
2. A mi kísérleti körülményeink között a Diogenes nem kizárólag szuperoxidra volt érzékeny.

Az extracelluláris ROS-méréssel ellentétben az elsősorban intracellulárisan detektáló LCL-módszerrel kapott szabadgyök-termelési adatok nem egyeztek a korábban egészséges granulocitákon Schult által leírtakkal [221]. Az ő eredményeikkel szemben a mi kísérletes körülményeink között a neutrofil granulociták az eozinofileknél magasabb LCL-jelet generálnak (23. ábra). Mindent összevetve elmondható, hogy a ROS-termelés mért intenzitása nagyban függ az alkalmazott detektálási módszertől, és

valószínűleg az eozinofilek izolálásának módjától. Adataink mindenesetre megerősítik azt az elképzelést, miszerint az eozinofilek a neutrofilekkel ellentétben a megtermelt ROS nagy részét az extracelluláris térbe ürítik [97,103].

### **7.8. Az eozinofilek légzési robbanásának összingtázása kissé magasabb, mint a neutrofileké**

A légzési robbanás intenzitásának pontosabb meghatározása érdekében oxigénfogyasztás méréseket végeztünk a Seahorse XF technika segítségével. Az oxigénfogyasztás mérésének előnye a ROS-termelés detektálásával szemben, hogy általa a NADPH-oxidáz aktivitása annak helyétől függetlenül mérhető. Ebben a kísérleti felállásban a PMA eozinofilekben valamivel erősebb légzési robbanást váltott ki, mint neutrofilekben (25.A-B ábra), míg STZ hatására hasonló maximális oxigén-fogyasztás értékeket kaptunk (az eozinofilekben lassúbb aktivációs kinetikával, 25.C ábra). A fenti adatok jó egyezést mutatnak a korábbi polarometriásan meghatározott oxigénfogyasztás eredményekkel, noha az általunk kapott különbség kisebb [89].

### **7.9. Emberi fehérvérsejteken nyert adatok összingzése**

Mindent egybevetve elmondható, hogy a Hv1 a monomer forma mellett stabil dimereket alkot nyugvó és aktivált emberi granulocitákban egyaránt. A Hv1 kifejeződési mintázata az intenzív szabadgyök-termelés támogatására optimalizált. Mivel a ROS-termelés célja az egyes fehérvérsejttípusokban eltérő [196,239], a Hv1 és phox alegységek egymástól független kifejeződése lehetővé teszi együttműködésük a sejtfunkciónak legmegfelelőbb finomhangolását. A két fehérje finom összhangját jól szemléltetik az eozinofil és neutrofil granulociták phox alegység- és Hv1-expressziójáról, valamint szabadgyök-termeléséről bemutatott adatok. A két sejtípus ugyanis csaknem azonos mennyiségű phox alegységet fejez ki, és hasonló mennyiségű ROS termelésére képesek, míg a Hv1 eozinofilekben egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben található meg, mint neutrofilekben. Az expressziós mintázat ilyenfajta eltérésének funkcionális

magyarázatához érdemes lenne megvizsgálni humán granulociták viselkedését a feszültségfüggő protonáram hiányában is. Ehhez azonban emberi sejtek esetén specifikus Hv1 gátlószerre lenne szükség, mely jelenleg nem áll rendelkezésre. Arra a kérdésre tehát, hogy miért van szükség eozinofilekben ilyen sok Hv1-re jelenleg csak spekulatív válasz adható. Meglátásunk szerint a megoldáshoz a két sejtípus között megfigyelhető phox-eloszlásbeli különbség adhat támpontot. Korábbi adatok alapján, melyet a mi méréseink is megerősítettek, az eozinofil granulociták az előállított szabadgyököket döntően az extracelluláris térbe ürítik [97,103], míg a neutrofilek jelentős intracelluláris ROS-termeléssel rendelkeznek. A rendelkezésre álló adatok alapján arra következtetünk, hogy a magas Hv1 expresszió az intenzív extracelluláris szabadgyök-termelés fontos feltétele. Feltételezésünket alátámasztja, hogy a közelmúltban egy tanulmányban kimutatták, hogy a plazmalemmális Hv1-aktivitás gátlása neutrofil granulocitákban csökkenti az extracelluláris, ugyanakkor megnöveli az intracelluláris ROS-termelést [240]. Emellett eozinofilekkel ellentétben neutrofilekben a protoncsatorna és a Nox2 kifejeződése nem korrelál egymással (22. ábra). Mindezek alapján valószínű, hogy a töltéskompenzáció a sejt felszíni ROS-termelés legfőbb korlátozója, míg az intracelluláris membránok esetén egyéb tényezők (a transzmembrán pH különbség [99], magas fagoszómális ROS koncentráció) kerülnek előtérbe. A Hv1 depolarizált membránpotenciál mellett a töltéskompenzáció leghatékonyabb és elméletileg kimeríthetetlen eszköze, mely az aktivált granulociták erősen depolarizált felszíni membránpotenciálja mellett [102] kiválóan működik. A fagoszóma membránpotenciáljának fagocitózis során bekövetkező változásairól azonban kevés ismerettel rendelkezünk, de valószínűleg fagoszómákban a magas fokú phox aktivitás fenntartásához kevesebb Hv1 molekula is elegendő, mivel ott más ioncsatornák és protontranszporterek is jelentősebben hozzájárulnak a töltéskompenzációhoz [223]. Ezen túlmenően a túl magas protoncsatorna-denzitás mellett feltehetően nem jöhetnének létre a fagoszóma érése során lejátszódó komplex pH- és ionösszetétel-változások [223].

Végkövetkeztetésként elmondható, hogy a Hv1 specifikus gátlása terápiás haszonnal járhat olyan esetekben, amikor a cél az extracelluláris szuperoxid-felszabadulás gátlása anélkül, hogy a bekebelezett kórozők környezetében lezajló légzési robbanást érdemben károsítanánk.

## 7.10. A phox szükséges a peritoneális B-sejtek hatékony baktériumöléséhez

A halak, kételtűek és hullók B-limfocitáiról ismert, hogy képesek részecskék bekebelezésére [241,242], az emberi B-sejteket azonban eredetileg nem fagocita sejteknek tekintették. A közelmúltban három munkacsoport is beszámolt arról, hogy a hasüregből, illetve májból izolált B-sejtek képesek baktériumokat (*S. aureus* és *E. coli*) fagocitózis útján elpusztítani [114–116]. Kísérleteink során bizonyítékot találtunk arra, hogy a B-sejtek baktériumölési képessége függ a működőképes NADPH-oxidáz jelenlététől. Tudomásunk szerint ez az első eset, hogy B-sejtekben kimutatták a phox által termelt ROS egyértelmű és közvetlen hatását. A hasüregi B-sejtek, szemben a lépéből nyerhető B-sejtekkel, jelentős hányada (~50 %) a B-1 sejtek közé tartozik [112,113]. A B-1 sejtek a veleszületett immunrendszer részei, jellemzően ún. természetes antitesteket termelnek [243]. Ezen B-sejtek több szempontból is hasonlatosak a makrofágokhoz (pl. fagocitálnak, baktériumokhoz kötött antigéneket prezentálnak), sőt megfelelő ingerek hatására a B-1 sejtek makrofágokká alakulhatnak in vitro [244]. PMA-val stimulált PerC B-sejtek mindazonáltal 18-szor kevesebb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést mutatnak, mint a döntően makrofágokból álló peritoneális CD19 negatív sejtpopuláció (a szerzők nem publikált megfigyelése). Ez és a makrofágokhoz képest alacsony fokú fagocitózis alapján nem valószínű, hogy a peritoneális B-sejtek érdemi szereplői lennének a patogének közvetlen eliminációjának.

Eredményeink alapján a peritoneális B-sejtek nagyobb ROS termelő kapacitással rendelkeznek, mint a lépéből izolált B-sejtek, mely minden valószínűség szerint a magasabb Nox2 és p22<sup>phox</sup> kifejeződésükkel magyarázható (26. ábra). A peritoneális B-sejtek baktériumokkal érintkezve Nox2-dependens módon ROS-t termelnek (27. ábra). A keletkezett oxigén-származékok részt vesznek a baktériumok elpusztításában, a phox-hiányos B-sejtek ugyanis csökkent baktériumölő-képességgel rendelkeznek (28. ábra). A hasüregi B-sejtek által termelt oxigényökök legnagyobb valószínűség szerint az antigének hatékony prezentációjához szükségesek, ahogy azt konvencionális B-sejteken korábban már kimutatták [111].

Eredményeink a CGD eddig ismeretlen, esetleg klinikailag is jelenős aspektusát világítják meg. A jövőben azonban további kísérletek szükségesek annak eldöntésére,

hogy a B-1 sejtek csökkent baktériumölő képessége hozzájárul-e a CGD klinikai képiének kialakulásához.

## 8. Következtetések

Kísérletes munkám eredményei alapján az alábbi új megállapításokra jutottunk:

1. Erdményeink alapján kijelenthető, hogy a Hv1 emberi fehérvérsejtekben is nélkülözhetetlen a feszültségfüggő protonáram kialakulásához.
2. A Hv1 az emberi perifériás vér fagocitáiban és B-sejtjeiben jelentős mennyiségben kifejeződik, és granulocitákon kapott eredményeink alapján stabil dimert képez.
3. A Hv1 és a Nox2 kifejeződése mind térben, mind időben számos párhuzamosságot mutat fehérvérsejtekben, különösen eozinofil granulocitákban. Mindazonáltal granulocita irányba differenciáltatott PLB-985 sejtekben nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a két fehérje kifejeződése függene egymástól.
4. Egészséges egyénekből izolált eozinofil és neutrofil granulocitákat összehasonlítva azt találtuk, hogy míg a fagocita oxidáz alegységek lényegében azonos mennyiségben találhatók meg a két sejtípusban, addig a feszültségfüggő protoncsatorna mennyisége eozinofil granulocitákban lényegesen magasabb.
5. Egerek hasüri B-sejtjeit vizsgálva kimutattuk, hogy a bekebelezett *Staphylococcus aureus* körül jelentős fagocita oxidáz aktivitást mutatnak, és hogy ennek hiányában kevésbé képesek elpusztítani ezen baktériumokat.



## 9. Összefoglalás

A fagocita oxidáz (phox) enzimkomplex fehérvérsejtekben a reaktív oxigén származékok (ROS) szabályozott termelését végzi. A ROS fontos szerepet játszanak a kórokozók elpusztításában, emellett az immunrendszer számos egyéb működését is befolyásolják (pl. antigén-prezentáció, immunsejtek jelátvitel). A phox aktivitása membrán-depolarizációval és intracelluláris savanyodással jár, ami intenzív működés esetén kompenzációt igényel. Mai ismereteink alapján ennek leghatékonyabb eszköze a feszültségfüggő protoncsatorna (Hv1), mely mindkét probléma orvosolására képes.

A Hv1 az emberi perifériás vér fagocitáiban és B-sejtjeiben jelentős mennyiségben kifejeződik, és heterológ rendszerekehez hasonlóan emberi granulocitákban az endogén fehérje is dimert alkot. A Hv1 sejten belüli elhelyezkedését tekintve valamennyi fenti sejttypusban a Nox2-vel nagyfokú átfedést mutat. PLB-985 granulocitákban a Hv1 és a Nox2 kifejeződése független egymástól, működésük azonban kapcsolt. A Hv1 kifejeződésének erőteljes gátlása esetén ugyanis a ROS-termelés PLB-985 sejtekben a maximálisan elérhető szint alatt marad normális Nox2 kifejeződés mellett.

Egészséges egyének eozinofil és neutrofil granulocitáinak phox alegység kifejeződésében nem tapasztaltunk érdemi különbséget, míg a Hv1 kifejeződése eozinofilekben egy nagyságrenddel magasabbnak adódott. A különbség lehetséges magyarázata, hogy az intracellulárisan jelentős ROS-termelést mutató neutrofilekkel ellentétben az eozinofilek elsősorban az extracelluláris térbe ürítenek szabadgyököket, ahol a Hv1 által létrehozott töltéskompenzáció feltehetően fontosabb szerephez jut. Az eozinofilek légzési robbanásának maximális intenzitása a neutrofilekéénél csak kevéssel magasabb méréseink alapján.

Egerek hasüregéből nyert B-sejtek a lép B-sejtekénél intenzívebb légzési robbanást produkáltak, melynek hátterében magasabb cytb<sub>558</sub> kifejeződést találtunk. Fagcitózis során a bekebelezett baktérium körül intenzív phox-függő ROS-termelés figyelhető meg, mely kísérleteink alapján hasüregi B-sejtekben is hozzájárul a kórokozók elpusztításához. Phox hiányában ugyanis a B-sejtek csökkent baktériumölést mutattak. Hasüregi B-sejteken kapott eredményeink a krónikus granulomatózisban tapasztalható immunregulációs zavar újabb aspektusára világítanak rá.

## 10. Summary

The phagocyte oxidase (phox) is a multicomponent enzyme, which is responsible for the regulated production of reactive oxygen species (ROS) in leukocytes. ROS contribute to the elimination of invading pathogens, moreover ROS alters many functions of the immune system (e.g., antigen presentation, signal transduction). The intense activity of phox is dependent on the presence of effective compensatory mechanisms, which counteract the depolarisation and intracellular acidification caused by the oxidase. To our current knowledge the voltage-gated proton channel (Hv1) is the most effective tool of compensation, which is able to alleviate both problems jointly.

Hv1 is highly expressed in human peripheral blood phagocytes and B-cells, and similarly to the heterologously expressed Hv1 the endogenous protein forms stable dimers in human granulocytes. The subcellular distribution of Hv1 and Nox2 is highly overlapping in the above leukocytes types. In PLB-985 granulocytes the expression of Hv1 and Nox2 is independent from each other, whereas the two proteins are functionally coupled, since the severe reduction in Hv1 expression results in attenuated ROS production in these cells.

Comparison of eosinophil and neutrophil granulocytes from healthy individuals showed no major difference in the phox subunit expression, whereas the Hv1 content of eosinophils was about ten times higher than in neutrophils. Unlike neutrophils, eosinophils release most of the ROS to the extracellular space, where charge compensation may be a greater issue than in intracellular vesicles. The total intensity of respiratory burst was found to be somewhat fiercer in eosinophils.

Investigation of phox in mouse peritoneal B-cells showed that peritoneal B-cells produce more ROS than their splenic counterparts, which is a consequence of higher *cytb<sub>558</sub>* expression. Upon phagocytosis intense, phox-mediated ROS production was detected around engulfed bacteria, which contributed to the elimination of the pathogens, as phox deficient B-cells killed bacteria less effectively. Our results with peritoneal B-cells highlight a new aspect of the immunoregulatory defect seen in chronic granulomatous disease.

## 11. Irodalomjegyzék

1. Lam GY, Huang J, Brumell JH (2010) The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol* 32: 415-430.
2. Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
3. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 274: 37265-37269.
4. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18: 486-491.
5. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, Cornell JE, Eddy CA, Brzyski RG, El Jamali A (2012) NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J Biol Chem* 287: 9376-9388.
6. Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, Lauer N, Hacker A, Kojda G (2001) Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1130-1135.
7. Rada B, Hably C, Meczner A, Timar C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E (2008) Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol* 30: 237-253.
8. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397: 342-344.
9. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 78: 1025-1042.
10. El Chemaly A, Demarex N (2012) Do Hv1 proton channels regulate the ionic and redox homeostasis of phagosomes? *Mol Cell Endocrinol* 353: 82-87.
11. Nauseef WM (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* 122: 277-291.
12. Babior BM (2002) The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 4: 1023-1024.

13. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322: 32-38.
14. Geiszt M, Kapus A, Ligeti E (2001) Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? *J Leukoc Biol* 69: 191-196.
15. Harper AM, Chaplin MF, Segal AW (1985) Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J* 227: 783-788.
16. Imajoh-Ohmi S, Tokita K, Ochiai H, Nakamura M, Kanegasaki S (1992) Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. *J Biol Chem* 267: 180-184.
17. Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrace G (1992) Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 284 ( Pt 3): 781-788.
18. Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, Dagher MC (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal anti-peptide antibodies. *Biochem J* 382: 981-986.
19. Cross AR, Segal AW (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657: 1-22.
20. Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD (2005) Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem* 280: 31859-31869.
21. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18: 69-82.
22. Nakano Y, Longo-Guess CM, Bergstrom DE, Nauseef WM, Jones SM, Banfi B (2008) Mutation of the Cyba gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. *J Clin Invest* 118: 1176-1185.
23. Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 80: 732-742.
24. Taylor RM, Burritt JB, Baniulis D, Foubert TR, Lord CI, Dinauer MC, Parkos CA, Jesaitis AJ (2004) Site-specific inhibitors of NADPH oxidase activity and structural probes of flavocytochrome b: characterization of six monoclonal antibodies to the p22phox subunit. *J Immunol* 173: 7349-7357.

25. Zhu Y, Marchal CC, Casbon AJ, Stull N, von Lohneysen K, Knaus UG, Jesaitis AJ, McCormick S, Nauseef WM, Dinauer MC (2006) Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* 281: 30336-30346.
26. DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM (2000) Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 275: 13986-13993.
27. Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT (1989) Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 73: 1416-1420.
28. DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT (1995) Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7110-7114.
29. Sumimoto H, Kage Y, Nunoi H, Sasaki H, Nose T, Fukumaki Y, Ohno M, Minakami S, Takeshige K (1994) Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5345-5349.
30. Dahan I, Issaeva I, Gorzalczy Y, Sigal N, Hirshberg M, Pick E (2002) Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem* 277: 8421-8432.
31. Mizrahi A, Berdichevsky Y, Ugolev Y, Molshanski-Mor S, Nakash Y, Dahan I, Alloul N, Gorzalczy Y, Sarfstein R, Hirshberg M, Pick E (2006) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J Leukoc Biol* 79: 881-895.
32. Champion Y, Jesaitis AJ, Nguyen MVC, Grichine A, Herenger Y, Baillet A, Berthier S, Morel F, Paclet MH (2009) New p22-Phox Monoclonal Antibodies: Identification of a Conformational Probe for Cytochrome b558. *J Innate Immun* 1: 556-569.
33. Lomax KJ, Leto TL, Nunoi H, Gallin JI, Malech HL (1989) Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science* 245: 409-412.
34. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA (1989) Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7195-7199.

35. El Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC, Braut-Boucher F (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 41: 217-225.
36. Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F (2004) A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells* 9: 443-456.
37. Yuzawa S, Ogura K, Horiuchi M, Suzuki NN, Fujioka Y, Kataoka M, Sumimoto H, Inagaki F (2004) Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *J Biol Chem* 279: 29752-29760.
38. Francke U, Hsieh CL, Foellmer BE, Lomax KJ, Malech HL, Leto TL (1990) Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1). *Am J Hum Genet* 47: 483-492.
39. Ponting CP (1996) Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* 5: 2353-2357.
40. Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274: 25051-25060.
41. Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273: 16663-16668.
42. Dang PM, Babior BM, Smith RM (1999) NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry* 38: 5746-5753.
43. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: 25234-25246.
44. Dusi S, Donini M, Rossi F (1996) Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem J* 314 ( Pt 2): 409-412.
45. Benna JE, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA (1997) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem* 272: 17204-17208.

46. Zhao X, Xu B, Bhattacharjee A, Oldfield CM, Wientjes FB, Feldman GM, Cathcart MK (2005) Protein kinase Cdelta regulates p67phox phosphorylation in human monocytes. *J Leukoc Biol* 77: 414-420.
47. Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidal MA, El Benna J (2003) Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* 42: 4520-4526.
48. Matute JD, Arias AA, Dinauer MC, Patino PJ (2005) p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol Dis* 35: 291-302.
49. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 ( Pt 3): 557-561.
50. Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, Butler PJ, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT, Stephens L, Williams RL (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol Cell* 8: 829-839.
51. Ito T, Nakamura R, Sumimoto H, Takeshige K, Sakaki Y (1996) An SH3 domain-mediated interaction between the phagocyte NADPH oxidase factors p40phox and p47phox. *FEBS Lett* 385: 229-232.
52. Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277: 10121-10128.
53. Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T (1994) A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1378-1387.
54. Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME (1999) Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: a novel role for Rac in NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 118-122.
55. Sathyamoorthy M, de M, I, Adams AG, Leto TL (1997) p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 272: 9141-9146.
56. Cross AR (2000) p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J* 349: 113-117.
57. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H (2002) The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* 21: 6312-6320.

58. Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H (1996) Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. *J Exp Med* 184: 893-902.
59. Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM, Dinayer MC (2009) A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 114: 3309-3315.
60. Nunes P, Demareux N, Dinayer MC (2013) Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic* 14: 1118-1131.
61. Groemping Y, Rittinger K (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386: 401-416.
62. Sumimoto H (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275: 3249-3277.
63. Diebold BA, Bokoch GM (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* 2: 211-215.
64. Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274: 22999-23005.
65. DeCoursey TE, Ligeti E (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 62: 2173-2193.
66. Baillet A, Xu R, Grichine A, Berthier S, Morel F, Paclet MH (2011) Coupling of 6-phosphogluconate dehydrogenase with NADPH oxidase in neutrophils: Nox2 activity regulation by NADPH availability. *FASEB J* 25: 2333-2343.
67. El Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 30: 279-289.
68. Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E (2001) Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J* 355: 851-858.
69. Csepanyi-Komi R, Sirokmany G, Geiszt M, Ligeti E (2012) ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutrophilic granulocytes. *Blood* 119: 573-582.
70. Lorincz AM, Szarvas G, Smith SM, Ligeti E (2014) Role of Rac GTPase activating proteins in regulation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 68: 65-71.



71. Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, El Benna J (2013) Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol* 85: 92-100.
72. Ginsel LA, Onderwater JJ, Fransen JA, Verhoeven AJ, Roos D (1990) Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* 76: 2105-2116.
73. Dahlgren C, Karlsson A (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232: 3-14.
74. Bylund J, Brown KL, Movitz C, Dahlgren C, Karlsson A (2010) Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic Biol Med* 49: 1834-1845.
75. Li Y, Trush MA (1998) Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 295-299.
76. Doussiere J, Vignais PV (1992) Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. *Eur J Biochem* 208: 61-71.
77. Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP (1990) Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 8: 251-258.
78. Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ (1994) Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 95-102.
79. El Benna J, Dang PM, Perianin A (2012) Towards specific NADPH oxidase inhibition by small synthetic peptides. *Cell Mol Life Sci* 69: 2307-2314.
80. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C (2006) A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem* 27: 31-44.
81. Yamazaki T, Kawai C, Yamauchi A, Kuribayashi F (2011) A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Trop Med Health* 39: 41-45.
82. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods* 202: 133-141.

83. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134: 907-934.
84. Borregaard N, Herlin T (1982) Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest* 70: 550-557.
85. Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MR, Edwards SW (2003) The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol* 170: 1964-1972.
86. Peachman KK, Lyles DS, Bass DA (2001) Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1717-1722.
87. CLARK LC, Jr., WOLF R, GRANGER D, TAYLOR Z (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* 6: 189-193.
88. Ferrick DA, Neilson A, Beeson C (2008) Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today* 13: 268-274.
89. Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, De Boer M, Roos D (1987) Purification of eosinophils from normal human blood, preparation of eosinoplasts and characterization of their functional response to various stimuli. *Immunology* 60: 123-129.
90. Forman HJ, Torres M (2001) Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* 51: 365-371.
91. Musset B, Cherny VV, DeCoursey TE (2012) Strong glucose dependence of electron current in human monocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C286-C295.
92. Condino-Neto A, Newburger PE (1998) NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys* 360: 158-164.
93. Maly FE, Cross AR, Jones OT, Wolf-Vorbeck G, Walker C, Dahinden CA, de Weck AL (1988) The superoxide generating system of B cell lines. Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. *J Immunol* 140: 2334-2339.
94. Elsen S, Doussiere J, Villiers CL, Faure M, Berthier R, Papaioannou A, Grandvaux N, Marche PN, Vignais PV (2004) Cryptic O<sub>2</sub>-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J Cell Sci* 117: 2215-2226.

95. Yagisawa M, Yuo A, Yonemaru M, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yazaki Y, Takaku F (1996) Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: correlation between functional capacity and amount of functional proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 510-516.
96. Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R (1981) The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290: 406-409.
97. Lacy P, Abdel-Latif D, Steward M, Musat-Marcu S, Man SF, Moqbel R (2003) Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol* 170: 2670-2679.
98. Goldmann O, Medina E (2012) The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol* 3: 420.
99. Jankowski A, Grinstein S (2002) Modulation of the cytosolic and phagosomal pH by the NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 4: 61-68.
100. Okamura Y (2007) Biodiversity of voltage sensor domain proteins. *Pflugers Arch* 454: 361-371.
101. DeCoursey TE, Cherny VV (1993) Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils. *Biophys J* 65: 1590-1598.
102. Jankowski A, Grinstein S (1999) A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils. *J Biol Chem* 274: 26098-26104.
103. Bolscher BG, Koenderman L, Tool AT, Stokman PM, Roos D (1990) NADPH:O<sub>2</sub> oxidoreductase of human eosinophils in the cell-free system. *FEBS Lett* 268: 269-273.
104. Borregaard N, Cowland JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503-3521.
105. Lam GY, Huang J, Brumell JH (2010) The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol* 32: 415-430.
106. Timar CI, Lorincz AM, Ligeti E (2013) Changing world of neutrophils. *Pflugers Arch* 465: 1521-1533.
107. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M (2013) Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 114: 532-540.
108. Falus A. Adaptív immunválasz. In: Falus András (szerk.), *Az immunológia alapjai*. Semmelweis kiadó, Budapest, 2007: 89-149.

109. Amigorena S, Savina A (2010) Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22: 109-117.
110. Savina A, Amigorena S (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219: 143-156.
111. Crotzer VL, Matute JD, Arias AA, Zhao H, Quilliam LA, Dinauer MC, Blum JS (2012) Cutting edge: NADPH oxidase modulates MHC class II antigen presentation by B cells. *J Immunol* 189: 3800-3804.
112. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K (2012) B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36: 13-21.
113. Baumgarth N (2011) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11: 34-46.
114. Gao J, Ma X, Gu W, Fu M, An J, Xing Y, Gao T, Li W, Liu Y (2012) Novel functions of murine B1 cells: active phagocytic and microbicidal abilities. *Eur J Immunol* 42: 982-992.
115. Parra D, Rieger AM, Li J, Zhang YA, Randall LM, Hunter CA, Barreda DR, Sunyer JO (2012) Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 91: 525-536.
116. Nakashima M, Kinoshita M, Nakashima H, Habu Y, Miyazaki H, Shono S, Hiroi S, Shinomiya N, Nakanishi K, Seki S (2012) Pivotal advance: characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. *J Leukoc Biol* 91: 537-546.
117. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H (2013) Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* 1285: 97-114.
118. Capasso M, DeCoursey TE, Dyer MJ (2011) pH regulation and beyond: unanticipated functions for the voltage-gated proton channel, HVCN1. *Trends Cell Biol* 21: 20-28.
119. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273: 15366-15372.
120. Kwon J, Qu CK, Maeng JS, Falahati R, Lee C, Williams MS (2005) Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *EMBO J* 24: 2331-2341.
121. Lee RL, Westendorf J, Gold MR (2007) Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4. *J Cell Commun Signal* 1: 33-43.

122. Singh DK, Kumar D, Siddiqui Z, Basu SK, Kumar V, Rao KV (2005) The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca<sup>2+</sup> and an oxidant signal. *Cell* 121: 281-293.
123. Wheeler ML, Defranco AL (2012) Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation. *J Immunol* 189: 4405-4416.
124. Richards SM, Clark EA (2009) BCR-induced superoxide negatively regulates B-cell proliferation and T-cell-independent type 2 Ab responses. *Eur J Immunol* 39: 3395-3403.
125. Torres M, Forman HJ (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17: 287-296.
126. Hogan PG, Lewis RS, Rao A (2010) Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28: 491-533.
127. Geiszt M, Kapus A, Nemet K, Farkas L, Ligeti E (1997) Regulation of capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 272: 26471-26478.
128. Rada BK, Geiszt M, van Bruggen R, Nemet K, Roos D, Ligeti E (2003) Calcium signalling is altered in myeloid cells with a deficiency in NADPH oxidase activity. *Clin Exp Immunol* 132: 53-60.
129. Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J (2006) Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem* 281: 19179-19187.
130. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, Whitney AR, Nauseef WM, Malech HL, DeLeo FR (2004) Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J Immunol* 172: 636-643.
131. Bergamo P, Luongo D, Rossi M (2004) Conjugated linoleic acid--mediated apoptosis in Jurkat T cells involves the production of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem* 14: 57-64.
132. Cale CM, Jones AM, Goldblatt D (2000) Follow up of patients with chronic granulomatous disease diagnosed since 1990. *Clin Exp Immunol* 120: 351-355.
133. Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, Steinberg SM, Venzon DJ, Walsh TJ, Noack D, Rae J, Winkelstein JA, Curnutte JT, Chanock SJ (1998) Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 102: 2146-2155.
134. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Jr., Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H (2000) Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79: 155-169.

135. Metcalfe DD, Thompson HL, Klebanoff SJ, Henderson WR, Jr. (1990) Oxidative degradation of rat mast-cell heparin proteoglycan. *Biochem J* 272: 51-57.
136. Kaldi K, Szaszi K, Koncz G, Susztak K, Ligeti E (1996) Arachidonic acid activatable electrogenic H<sup>+</sup> transport in the absence of cytochrome b558 in human T lymphocytes. *FEBS Lett* 381: 156-160.
137. Holmdahl R, Sareila O, Pizzolla A, Winter S, Hagert C, Jaakkola N, Kelkka T, Olsson LM, Wing K, Backdahl L (2013) Hydrogen peroxide as an immunological transmitter regulating autoreactive T cells. *Antioxid Redox Signal* 18: 1463-1474.
138. Lee K, Won HY, Bae MA, Hong JH, Hwang ES (2011) Spontaneous and aging-dependent development of arthritis in NADPH oxidase 2 deficiency through altered differentiation of CD11b<sup>+</sup> and Th/Treg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9548-9553.
139. Gonzalez A, Hung CY, Cole GT (2011) Absence of phagocyte NADPH oxidase 2 leads to severe inflammatory response in lungs of mice infected with *Coccidioides*. *Microb Pathog* 51: 432-441.
140. Olsson LM, Nerstedt A, Lindqvist AK, Johansson SC, Medstrand P, Olofsson P, Holmdahl R (2012) Copy number variation of the gene *NCF1* is associated with rheumatoid arthritis. *Antioxid Redox Signal* 16: 71-78.
141. Bleesing JJ, Souto-Carneiro MM, Savage WJ, Brown MR, Martinez C, Yavuz S, Brenner S, Siegel RM, Horwitz ME, Lipsky PE, Malech HL, Fleisher TA (2006) Patients with chronic granulomatous disease have a reduced peripheral blood memory B cell compartment. *J Immunol* 176: 7096-7103.
142. Cotugno N, Finocchi A, Cagigi A, Di Matteo G, Chiriacco M, Di Cesare S, Rossi P, Aiuti A, Palma P, Douagi I (2014) Defective B-cell proliferation and maintenance of long-term memory in patients with chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol* .
143. Moir S, De Ravin SS, Santich BH, Kim JY, Posada JG, Ho J, Buckner CM, Wang W, Kardava L, Garofalo M, Marciano BE, Manischewitz J, King LR, Khurana S, Chun TW, Golding H, Fauci AS, Malech HL (2012) Humans with chronic granulomatous disease maintain humoral immunologic memory despite low frequencies of circulating memory B cells. *Blood* 120: 4850-4858.
144. Deffert C, Carnesecchi S, Yuan H, Rougemont AL, Kelkka T, Holmdahl R, Krause KH, Schappi MG (2012) Hyperinflammation of chronic granulomatous disease is abolished by NOX2 reconstitution in macrophages and dendritic cells. *J Pathol* 228: 341-350.
145. Pizzolla A, Hultqvist M, Nilson B, Grimm MJ, Eneljung T, Jonsson IM, Verdrengh M, Kelkka T, Gjertsson I, Segal BH, Holmdahl R (2012) Reactive

- oxygen species produced by the NADPH oxidase 2 complex in monocytes protect mice from bacterial infections. *J Immunol* 188: 5003-5011.
146. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276: 37594-37601.
  147. Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS (2004) T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* 5: 818-827.
  148. Kwon J, Shatynski KE, Chen H, Morand S, De D, X, Miot F, Leto TL, Williams MS (2010) The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. *Sci Signal* 3: ra59.
  149. Thomas RC, Meech RW (1982) Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature* 299: 826-828.
  150. Fogel M, Hastings JW (1972) Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 690-693.
  151. Demaurex N, Grinstein S, Jaconi M, Schlegel W, Lew DP, Krause KH (1993) Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH. *J Physiol* 466: 329-344.
  152. DeCoursey TE, Morgan D, Cherny VV (2002) The gp91(phox) Component of NADPH Oxidase Is Not a Voltage-gated Proton Channel. *J Gen Physiol* 120: 773-779.
  153. DeCoursey TE, Morgan D, Cherny VV (2003) The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature* 422: 531-534.
  154. Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE (2006) A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature* 440: 1213-1216.
  155. Sasaki M, Takagi M, Okamura Y (2006) A Voltage Sensor-Domain Protein is a Voltage-Gated Proton Channel. *Science* 312: 589-592.
  156. Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, Nakagawa A (2014) X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol* 21: 352-357.
  157. DeCoursey TE (2013) Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. *Physiol Rev* 93: 599-652.
  158. Koch HP, Kurokawa T, Okochi Y, Sasaki M, Okamura Y, Larsson HP (2008) Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9111-9116.

159. Lee SY, Letts JA, Mackinnon R (2008) Dimeric subunit stoichiometry of the human voltage-dependent proton channel Hv1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7692-7695.
160. Tombola F, Ulbrich MH, Isacoff EY (2008) The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor. *Neuron* 58: 546-556.
161. Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A, Okamura Y (2012) The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H(+) channel Hv1. *Nat Commun* 3: 816.
162. Li SJ, Zhao Q, Zhou Q, Unno H, Zhai Y, Sun F (2010) The role and structure of the carboxyl-terminal domain of the human voltage-gated proton channel Hv1. *J Biol Chem* .
163. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309: 897-903.
164. Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G (1991) Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 353: 752-756.
165. Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310.
166. Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339: 597-603.
167. Ramsey IS, Mokrab Y, Carvacho I, Sands ZA, Sansom MS, Clapham DE (2010) An aqueous H<sup>+</sup> permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1. *Nat Struct Mol Biol* 17: 869-875.
168. Struyk AF, Cannon SC (2007) A Na<sup>+</sup> channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore. *J Gen Physiol* 130: 11-20.
169. Starace DM, Stefani E, Bezanilla F (1997) Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 19: 1319-1327.
170. Starace DM, Bezanilla F (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427: 548-553.
171. Wood ML, Schow EV, Freitas JA, White SH, Tombola F, Tobias DJ (2012) Water wires in atomistic models of the Hv1 proton channel. *Biochim Biophys Acta* 1818: 286-293.
172. Nagle JF, Morowitz HJ (1978) Molecular mechanisms for proton transport in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 298-302.



173. Gordienko DV, Tare M, Parveen S, Fenech CJ, Robinson C, Bolton TB (1996) Voltage-activated proton current in eosinophils from human blood. *J Physiol* 496 ( Pt 2): 299-316.
174. Musset B, Smith SM, Rajan S, Morgan D, Cherny VV, DeCoursey TE (2011) Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel. *Nature* 480: 273-277.
175. Cherny VV, Markin VS, DeCoursey TE (1995) The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. *J Gen Physiol* 105: 861-896.
176. DeCoursey TE (2008) Voltage-gated proton channels: what's next? *J Physiol* 586: 5305-5324.
177. Cherny VV, Murphy R, Sokolov V, Levis RA, DeCoursey TE (2003) Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and by direct measurement. *J Gen Physiol* 121: 615-628.
178. DeCoursey TE, Cherny VV (1998) Temperature dependence of voltage-gated H<sup>+</sup> currents in human neutrophils, rat alveolar epithelial cells, and mammalian phagocytes. *J Gen Physiol* 112: 503-522.
179. DeCoursey TE, Cherny VV, Zhou W, Thomas LL (2000) Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6885-6889.
180. Morgan D, Cherny VV, Finnegan A, Bollinger J, Gelb MH, DeCoursey TE (2007) Sustained activation of proton channels and NADPH oxidase in human eosinophils and murine granulocytes requires PKC but not cPLA2 alpha activity. *J Physiol* 579: 327-344.
181. Musset B, Capasso M, Cherny VV, Morgan D, Bhamrah M, Dyer MJ, DeCoursey TE (2010) Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes. *J Biol Chem* 285: 5117-5121.
182. Musset B, Cherny VV, Morgan D, DeCoursey TE (2009) The intimate and mysterious relationship between proton channels and NADPH oxidase. *FEBS Lett* 583: 7-12.
183. DeCoursey TE (2008) Voltage-gated proton channels: what's next? *J Physiol* 586: 5305-5324.
184. Murphy R, DeCoursey TE (2006) Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. *Biochim Biophys Acta* 1757: 996-1011.
185. Cherny VV, DeCoursey TE (1999) pH-dependent inhibition of voltage-gated H<sup>(+)</sup> currents in rat alveolar epithelial cells by Zn<sup>(2+)</sup> and other divalent cations. *J Gen Physiol* 114: 819-838.

186. Musset B, Smith SM, Rajan S, Cherny VV, Sujai S, Morgan D, DeCoursey TE (2010) Zinc Inhibition of Monomeric and Dimeric Proton Channels Suggests Cooperative Gating. *J Physiol* .
187. Kornilov P, Peretz A, Lee Y, Son K, Lee JH, Refaeli B, Roz N, Rehavi M, Choi S, Attali B (2014) Promiscuous gating modifiers target the voltage sensor of K(v)7.2, TRPV1, and H(v)1 cation channels. *FASEB J* 28: 2591-2602.
188. DeCoursey TE (2008) Voltage-gated proton channels. *Cell Mol Life Sci* 65: 2554-2573.
189. El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y, Demaurex N (2010) VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. *J Exp Med* 207: 129-2.
190. Capasso M, Bhamrah MK, Henley T, Boyd RS, Langlais C, Cain K, Dinsdale D, Pulford K, Khan M, Musset B, Cherny VV, Morgan D, Gascoyne RD, Vigorito E, DeCoursey TE, MacLennan IC, Dyer MJ (2010) HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol* 11: 265-272.
191. Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, Clapham DE (2009) Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7642-7647.
192. Morgan D, Capasso M, Musset B, Cherny VV, Rios E, Dyer MJ, DeCoursey TE (2009) Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18022-18027.
193. Daou S, El Chemaly A, Christofilopoulos P, Bernard L, Hoffmeyer P, Demaurex N (2011) The potential role of cobalt ions released from metal prosthesis on the inhibition of Hv1 proton channels and the decrease in *Staphylococcus epidermidis* killing by human neutrophils. *Biomaterials* 32: 1769-1777.
194. Sasaki M, Tojo A, Okochi Y, Miyawaki N, Kamimura D, Yamaguchi A, Murakami M, Okamura Y (2013) Autoimmune disorder phenotypes in Hvcn1-deficient mice. *Biochem J* 450: 295-301.
195. Schilling T, Gratopp A, DeCoursey TE, Eder C (2002) Voltage-activated proton currents in human lymphocytes. *J Physiol* 545: 93-105.
196. Capasso M, Bhamrah MK, Henley T, Boyd RS, Langlais C, Cain K, Dinsdale D, Pulford K, Khan M, Musset B, Cherny VV, Morgan D, Gascoyne RD, Vigorito E, DeCoursey TE, MacLennan IC, Dyer MJ (2010) HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol* 11: 265-272.

197. Wulff H, Knaus HG, Pennington M, Chandy KG (2004) K<sup>+</sup> channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol* 173: 776-786.
198. Suenaga T, Arase H, Yamasaki S, Kohno M, Yokosuka T, Takeuchi A, Hattori T, Saito T (2007) Cloning of B cell-specific membrane tetraspanning molecule BTS possessing B cell proliferation-inhibitory function. *Eur J Immunol* 37: 3197-3207.
199. Musset B, Morgan D, Cherny VV, MacGlashan DW, Jr., Thomas LL, Rios E, DeCoursey TE (2008) A pH-stabilizing role of voltage-gated proton channels in IgE-mediated activation of human basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11020-11025.
200. Nakamura M, Murakami M, Koga T, Tanaka Y, Minakami S (1987) Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b558 of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. *Blood* 69: 1404-1408.
201. Burritt JB, Fritel GN, Dahan I, Pick E, Roos D, Jesaitis AJ (2000) Epitope identification for human neutrophil flavocytochrome b monoclonals 48 and 449. *Eur J Haematol* 65: 407-413.
202. Zhen L, King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH, Dinuer MC (1993) Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9832-9836.
203. Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J, Borregaard N (1992) Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem J* 287: 603-610.
204. Bolte S, Cordelieres FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-232.
205. Petheo GL, Maturana A, Spat A, Demaurex N (2003) Interactions between electron and proton currents in excised patches from human eosinophils. *J Gen Physiol* 122: 713-726.
206. Annunziato L, Pannaccione A, Cataldi M, Secondo A, Castaldo P, Di Renzo G, Taglialatela M (2002) Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? *Neurobiol Aging* 23: 819-834.
207. Li SJ, Zhao Q, Zhou Q, Unno H, Zhai Y, Sun F (2010) The role and structure of the carboxyl-terminal domain of the human voltage-gated proton channel Hv1. *J Biol Chem* 285: 12047-12054.

208. Okochi Y, Sasaki M, Iwasaki H, Okamura Y (2009) Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 274-279.
209. Tsang JL, Parodo JC, Marshall JC (2010) Regulation of apoptosis and priming of neutrophil oxidative burst by diisopropyl fluorophosphate. *J Inflamm (Lond)* 7: 32.
210. DeCoursey TE (2008) Voltage-gated proton channels: what's next? *J Physiol* 586: 5305-5324.
211. Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23: 197-223.
212. van Manen HJ, Uzunbajakava N, van Bruggen R, Roos D, Otto C (2003) Resonance Raman imaging of the NADPH oxidase subunit cytochrome b558 in single neutrophilic granulocytes. *J Am Chem Soc* 125: 12112-12113.
213. van Bruggen R, Anthony E, Fernandez-Borja M, Roos D (2004) Continuous translocation of Rac2 and the NADPH oxidase component p67(phox) during phagocytosis. *J Biol Chem* 279: 9097-9102.
214. Qu AY, Nanda A, Curnutte JT, Grinstein S (1994) Development of a H(+)-selective conductance during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Am J Physiol* 266: C1263-C1270.
215. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLeod RA (2003) False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 17: 416-426.
216. Pedruzzi E, Fay M, Elbim C, Gaudry M, Gougerot-Pocidalo MA (2002) Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 117: 719-726.
217. Hladky SB, Haydon DA (1972) Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel. *Biochim Biophys Acta* 274: 294-312.
218. Dinauer MC (2003) Regulation of neutrophil function by Rac GTPases. *Curr Opin Hematol* 10: 8-15.
219. Bokoch GM, Diebold BA (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 100: 2692-2696.
220. DeCoursey TE, Cherny VV, DeCoursey AG, Xu W, Thomas LL (2001) Interactions between NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils. *J Physiol* 535: 767-781.

221. Shult PA, Graziano FM, Wallow IH, Busse WW (1985) Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J Lab Clin Med* 106: 638-645.
222. Slater EC (1973) The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin. *Biochim Biophys Acta* 301: 129-154.
223. El Chemaly A, Demaurex N (2012) Do Hv1 proton channels regulate the ionic and redox homeostasis of phagosomes? *Mol Cell Endocrinol* 353: 82-87.
224. Malech HL, Hickstein DD (2007) Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr Opin Hematol* 14: 29-36.
225. Volkman DJ, Buescher ES, Gallin JI, Fauci AS (1984) B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol* 133: 3006-3009.
226. Baldrige CW, Gerard RW (1932) THE EXTRA RESPIRATION OF PHAGOCYTOSIS. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 103: 235-236.
227. DeChatelet LR, Shirley PS, McPhail LC, Huntley CC, Muss HB, Bass DA (1977) Oxidative metabolism of the human eosinophil. *Blood* 50: 525-535.
228. Segal AW, Garcia R, Goldstone H, Cross AR, Jones OT (1981) Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J* 196: 363-367.
229. Petreccia DC, Nauseef WM, Clark RA (1987) Respiratory burst of normal human eosinophils. *J Leukoc Biol* 41: 283-288.
230. Sedgwick JB, Shikama Y, Nagata M, Brener K, Busse WW (1996) Effect of isolation protocol on eosinophil function: Percoll gradients versus immunomagnetic beads. *J Immunol Methods* 198: 15-24.
231. Tombola F, Ulbrich MH, Kohout SC, Isacoff EY (2010) The opening of the two pores of the Hv1 voltage-gated proton channel is tuned by cooperativity. *Nat Struct Mol Biol* 17: 44-50.
232. Banfi B, Schrenzel J, Nusse O, Lew DP, Ligeti E, Krause KH, Demaurex N (1999) A novel H(+) conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 190: 183-194.
233. DeCoursey TE (2008) Voltage-gated proton channels. *Cell Mol Life Sci* 65: 2554-2573.

234. El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y, Demaurex N (2010) VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. *J Exp Med* 207: 129-139.
235. Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y (2010) Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* 140: 327-337.
236. Henderson LM, Meech RW (2002) Proton Conduction through gp91(phox). *J Gen Physiol* 120: 759-765.
237. Maturana A, Krause KH, Demaurex N (2002) NOX Family NADPH Oxidases: Do They Have Built-in Proton Channels? *J Gen Physiol* 120: 781-786.
238. Amrein PC, Stossel TP (1980) Prevention of degradation of human polymorphonuclear leukocyte proteins by diisopropylfluorophosphate. *Blood* 56: 442-447.
239. Fisher AB (2009) Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal* 11: 1349-1356.
240. Decleva E, Menegazzi R, Fasolo A, Defendi F, Sebastianutto M, Dri P (2013) Intracellular shunting of O<sub>2</sub>(-) contributes to charge compensation and preservation of neutrophil respiratory burst in the absence of voltage-gated proton channel activity. *Exp Cell Res* 319: 1875-1888.
241. Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 7: 1116-1124.
242. Zimmerman LM, Vogel LA, Edwards KA, Bowden RM (2010) Phagocytic B cells in a reptile. *Biol Lett* 6: 270-273.
243. Choi YS, Baumgarth N (2008) Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med* 205: 3053-3064.
244. Popi AF, Osugui L, Perez KR, Longo-Maugeri IM, Mariano M (2012) Could a B-1 cell derived phagocyte "be one" of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLoS One* 7: e34570.

## 12. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Petheő GL, Orient A, Baráth M, **Kovács I**, Réthi B, Lányi Á, Rajki A, Rajnavölgyi É, Geiszt M. (2010) Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes. PLoS One 5: e14081.

IF: 4,411

**Kovács I**, Horváth M, Kovács T, Somogyi K, Tretter L, Geiszt M, Petheő GL (2014) Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. Free Radical Res. 48: 1190-9.

IF (2013): 2,989

**Kovács I**, Petheő GL, Horváth M, Lányi Á, Geiszt M. (2015) Reactive oxygen species mediated bacterial killing by B-lymphocytes. J Leukocyte Biol. 97: 1133-7.

IF (2013): 4,304.

### **13. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Hunyady Lászlónak, aki medikusként meghívott a tudományos diákkörbe lehetővé téve, hogy egy színvonalas tudományos műhelyben tevékenykedjek.

Köszönettel tartozom Dr. Geiszt Miklósnak és Dr. Petheő Gábornak, akik témavezetőként mindig készek voltak tanácsaikkal segíteni a munkámat.

Köszönet illeti emellett a Geiszt és Spät labor valamennyi munkatársát, akik segítőkészségükkel nagyban hozzájárultak e munka megszületéséhez.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Ligeti Erzsébetnek, aki a Doktori Iskola Programvezetőjeként kísérte figyelemmel munkámat.

Hálával tartozom továbbá az Élettani Intézet valamennyi dolgozójának, akik a kutatási tevékenységemhez baráti légkört teremtettek.

Szeretném emellett megköszönni családom valamennyi tagjának megértését, türelmét és áldozatát, amelyeket ezen munka megszületése folyamán meghoztak.