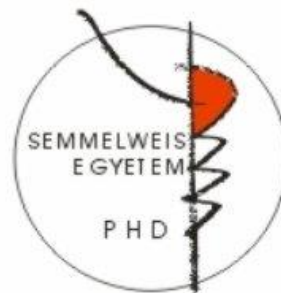


Az Src-típusú tirozin-kinázok nélkülözhetetlenek az autoantitest-függő gyulladásos betegségek kialakulásához

Doktori értekezés

dr. Kovács Miklós

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, az MTA doktora
Programvezető: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Pós Zoltán egyetemi adjunktus, PhD
Dr. Szegedi Andrea egyetemi tanár, az MTA doktora

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Prohászka Zoltán tudományos munkatárs, az MTA doktora

Budapest
2014

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
1.1. Ábrák és táblázatok jegyzéke	5
2. Rövidítések	7
3. Bevezetés	10
3.1. A neutrophilek élettana és patológiája.....	11
3.1.1. Neutrophilek képzése	11
3.1.2. Neutrophilek migrációja	13
3.1.2.1. Transendothelialis migráció	13
3.1.2.2. Transepithelialis migráció	15
3.1.3. A neutrophilek aktivációja, receptoraik jelátvittele.....	16
3.1.3.1. Mintázatfelismerő receptorok.....	17
3.1.3.2. Opszoninek, opszonin receptorok	17
3.1.3.3. Fc γ -receptorok	18
3.1.3.4. Integrinek.....	20
3.1.3.4.1. Outside-in szignalizáció	21
3.1.3.4.2. Inside-out szignalizáció	22
3.1.3.5. Szelektinek jelátvittele.....	23
3.1.3.6. G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR)	24
3.1.3.7. Citokin-receptorok jelátvittele.....	24
3.1.4. Neutrophilek effektor működései, patogének eliminációja.....	25
3.1.4.1. Phagocytosis	25
3.1.4.2. Reaktív oxigén szabadgyökök termelése.....	26
3.1.4.3. Degranuláció.....	27
3.1.4.4. Neutrophil extracellular traps	27
3.1.5. A neutrophilek immunmodulátor működése	29
3.1.5.1. Dendriticus sejtek (DC)	29
3.1.5.2. T- és B-lymphocyták	30
3.1.5.3. Macrophagok	31
3.1.5.4. Természetes ölő (NK) sejtek	32
3.1.5.5. Endo- és epithelsejtek.....	32
3.1.5.6. Neutrophil eredetű mikropartikulumok	33
3.1.6. Neutrophil funkciók zavarai és az azokhoz köthető betegségek	34
3.1.7. Neutrophilek szerepe krónikus gyulladással járó betegségekben.....	36
3.1.7.1. Allergiás kórképek.....	36
3.1.7.2. Gyulladással járó bélbetegségek.....	36
3.1.7.3. Atherosclerosis	37
3.1.7.4. Autoimmun betegségek	37
3.1.7.4.1. Rheumatoid arthritis	38
3.1.7.4.2. Systemás lupus erythematosus (SLE)	39
3.1.7.4.3. Autoimmun bőrgyulladások: bullous pemphigoid, epidermolysis bullosa acquisita	39
3.1.7.4.4. Autoimmun vasculitis.....	40
3.2. Az Src-típusú tirozin-kinázok.....	40
3.2.1. Szerkezet.....	41
3.2.2. Az Src-kinázok funkciói	42

3.2.3. Az Src-kinázok szerepe a központi idegrendszerben és humán megbetegedésekben	42
3.2.4. Az Src-kinázok szerepe myeloid sejtekben	44
3.2.5. Src-kinázok szerepe ITAM- és ITIM-függő jelpályákban: klasszikus immunreceptorok és integrinek jelátvitelére	46
4. Célkitűzések	50
5. Módszerek	51
5.1. Kísérleti állatok.....	51
5.1.1. A felhasznált genetikailag módosított egértörzsek.....	51
5.1.2. Csontvelői kimérák.....	52
5.2. K/B×N szérum transzfer arthritis.....	53
5.3. Autoantitest-indukált hólyagos bőrgyulladás modell	54
5.4. In vivo infiltráció vizsgálata	55
5.4.1. Szöveti elemzés	55
5.4.2. Áramlási citometriás elemzés.....	55
5.5. In vivo migráció.....	56
5.6. Neutrophilek, monocyták és macrophagok in vitro vizsgálata.....	58
5.6.1. A sejtek izolálása.....	58
5.6.2. <i>In vitro</i> sejtválaszok vizsgálata.....	59
5.6.2.1. Immobilizált immunkomplex felszín	59
5.6.2.2. Gyulladásos mediátorok vizsgálata	59
5.6.2.3. Szuperoxid-termelés vizsgálata	59
5.6.2.4. <i>In vitro</i> migrációs tesztek	60
5.6.2.4.1. Savas foszfatáz teszt.....	60
5.6.2.5. Neutrophil-adhézió vizsgálata.....	61
5.7. Gyulladásos mediátorok meghatározása.....	61
5.8. Az adatok ábrázolása, statisztika	61
6. Eredmények	63
6.1. A Hck, az Fgr és/vagy a Lyn szükséges az arthritis létrejöttéhez.....	63
6.1.1. Intakt Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} állatok védettek az arthritiszsel szemben	63
6.1.2. A Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} fenotípusú hematopoietikus sejtek felelősek.....	64
6.2. Az arthritis kialakulása során a Hck, Fgr és Lyn egymást helyettesíthetik	66
6.3. A Hck, Fgr és Lyn kizárólag neutrophileket érintő hiánya elegendő az arthritiszsel szembeni teljes védettséghez	69
6.4. Hck, Fgr és Lyn hiányában a myeloid sejtek gyulladásos infiltrációja elmarad ..	70
6.5. A Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} myeloid sejtek endogén migrációs képessége megtartott ...	74
6.5.1. Neutrophilek és monocyták/macrophagok <i>in vivo</i> képesek a gyulladás helyére vándorolni.....	74
6.5.1.1. A neutrophilek önmagukban képesek bejutni a gyulladás helyére	74
6.5.1.2. A macrophagok gyulladás helyén történő megjelenése nem károsodott	77
6.5.2. Neutrophilek és monocyták <i>in vitro</i> migrációs képessége normális	78
6.5.2.1. Neutrophilek <i>in vitro</i> migrációja	78
6.5.2.2. Monocyták <i>in vitro</i> migrációja	79
6.6. A gyulladásos környezet kialakulása károsodott	79
6.7. A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz szükségesek az Src-kinázok	81
6.7.1. Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} neutrophilek immunkomplexek hatására nem termelnek szuperoxidot	81

6.7.2. Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} neutrophilek immunkomplexek hatására nem termelnek gyulladási mediátorokat	82
6.7.3. Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} neutrophilek nem képesek letapadni immunkomplex- illetve ICAM-1 felszínre.....	83
6.8. Az Fc-receptor- γ -lánc hiánya Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} -hez hasonló fenotípussal jár....	84
6.8.1. Az FcR γ ^{-/-} állatokban nem alakul ki arthritis.....	85
6.8.2. Az FcR γ -hiányában nem jön létre gyulladási sejtinfiltráció	85
6.8.3. Az FcR γ jelenléte nem szükséges a myeloid sejtek endogén migrációs képességéhez	86
6.8.4. A gyulladási környezet kialakulásához szükséges az FcR γ -lánc.....	87
6.8.5. A neutrophilek <i>in vitro</i> immunkomplex-függő jelátviteléhez elengedhetetlen az FcR γ -lánc	87
6.8.6. A Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} és FcR γ ^{-/-} myeloid sejtek nem képesek kompenzálni egymás hatását.....	88
6.9. <i>In vivo</i> folyamatokban az LFA-1, míg <i>in vitro</i> a Mac-1 integrin a fontos	89
6.9.1. Az autoantitest-indukált arthritis LFA-1-függő.....	90
6.9.2. A neutrophilek endogén migrációs képessége LFA-1-függő	90
6.9.3. Az <i>in vitro</i> immunkomplexekre adott válaszok Mac-1-függők.....	91
7. Megbeszélés	93
8. Következtetések	101
9. Összefoglalás	102
10. Summary	103
11. Irodalomjegyzék	104
12. Saját közlemények	141
12.1. A dolgozatban felhasznált saját közlemények	141
12.2. A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó saját közlemények.....	141
13. Köszönetnyilvánítás.....	142
13.1. Munkamegosztás	143

1.1. Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák:

1. ábra: A neutrophilek számának macrophagok általi feedback szabályozása: az IL-23–IL-17–G-CSF tengely.....	12
2. ábra: A neutrophilek transendothelialis migrációjának klasszikus modellje	14
3. ábra: Aktiváló Fc-receptorok proximalis jelátvittele.....	19
4. ábra: Integrinek inside-out és outside-in jelátvittele.....	21
5. ábra: Neutrophilek effektor működései	25
6. ábra: A neutrophilek sorsa: apoptosis vagy NETosis.....	28
7. ábra: Neutrophilek és dendriticus sejtek autoreaktív önerősítő kört hozhatnak létre...	30
8. ábra: Neutrophilek közvetlen és közvetett aktiváló illetve gátló hatása T-sejtekre	30
9. ábra: A neutrophilek képesek aktiválni a marginális zóna B-sejtjeit	31
10. ábra: Neutrophilek, dendriticus sejtek és NK-sejtek együttműködése.....	32
11. ábra: A neutrophilek által kiváltott endothel-kontrakció mechanizmusa.....	33
12. ábra: Az anaphylaxia alternatív, neutrophil-mediált útvonala	36
13. ábra: Neutrophilek, monocyták és thrombocyták atherosclerosisban	37
14. ábra: Neutrophilek részvétele az RA patomechanizmusában	38
15. ábra: Az Src-kináz család tagjainak domainszerkezete.....	41
16. ábra: Src-kinázok aktív-inaktív konformációváltása.....	41
17. ábra: Az Src-típusú tirozin-kinázok funkciói	42
18. ábra: Src-kinázok szerepe a tumor és a gyulladás kapcsolatának szabályozásában...	43
19. ábra: Src-kinázok krónikus légzőszervi betegségek kialakulásában	44
20. ábra: Src-kinázok szerepe myeloid sejtekben.....	45
21. ábra: Klasszikus immunreceptorok jelátvittele.....	47
22. ábra: Integrinek és gátló receptoraik jelátvittele.....	48
23. ábra: Kevert csontvelői kimérák létrehozása <i>in vivo</i> migrációs mérésekhez	56
24. ábra: <i>In vivo</i> kompetitív migráció grafikus ábrázolása és értékelése	57
25. ábra: Transwell migrációs teszt sematikus rajza	60
26. ábra: Autoantitest-indukált arthritis makroszkópos képe vad típusú és Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} intakt egerekben.....	63
27. ábra: Autoantitest-indukált arthritis vad típusú és Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} intakt egerekben	64
28. ábra: Autoantitest-indukált arthritis makroszkópos képe Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} csontvelői kimérákban	65
29. ábra: Autoantitest-indukált arthritis Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} csontvelői kimérákban	66
30. ábra: Hck, Fgr és Lyn egyszeres és többszörös hiányának hatása az autoantitest-indukált arthritis kialakulására 1.	67
31. ábra: Hck, Fgr és Lyn egyszeres és többszörös hiányának hatása az autoantitest-indukált arthritis kialakulására 2.	67
32. ábra: Vad típusú csontvelő megmenti az arthritist Mcl-1 ^{Δmyeloid} neutrophilhiányos egerekben Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} viszont nem	70
33. ábra: Gyulladásos infiltráció szövettani vizsgálata	71
34. ábra: Szöveti neutrophilinfiltráció autoantitest-mediált arthritisben	72
35. ábra: Neutrophil-infiltráció EBA-ban.....	73
36. ábra: Monocyta/macrophag sejtek infiltrációja a gyulladás helyére	73
37. ábra: <i>In vivo</i> migráció CD18 ^{-/-} és Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} kevert kimérákban áramlási citometriával.....	75

38. ábra: Neutrophil <i>in vivo</i> migráció kevert kimérákban	76
39. ábra: Monocyta/macrophag <i>in vivo</i> migráció kevert kimérákban	77
40. ábra: Neutrophil <i>in vitro</i> migráció	78
41. ábra: Monocyta <i>in vitro</i> migráció	79
42. ábra: <i>In vivo</i> gyulladásos mediátor környezet autoantitest-indukált arthritisben	80
43. ábra: <i>In vitro</i> szuperoxid-termelés Hck-, Fgr- és/vagy Lyn-hiányos neutrophilekben	82
44. ábra: Gyulladásos mediátorok termelése <i>in vitro</i> Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} neutrophilekben	82
45. ábra: Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} és CD18 ^{-/-} neutrophilek adhéziója immunkomplex- és ICAM-1 felszínén	83
46. ábra: Autoantitest-indukált arthritis Fc-receptor- γ -lánc hiányában	85
47. ábra: Gyulladásos sejtinfiltráció Fc-receptor- γ -lánc hiányában	85
48. ábra: <i>In vivo</i> myeloid migráció Fc-receptor- γ -lánc hiányában	86
49. ábra <i>In vitro</i> neutrophil migráció Fc-receptor- γ -lánc hiányában	86
50. ábra: Gyulladásos mediátorok termelése Fc-receptor- γ -lánc hiányában <i>in vivo</i>	87
51. ábra: Szuperoxid-termelés <i>in vitro</i> FcR γ ^{-/-} neutrophilekben	87
52. ábra: Gyulladásos mediátorok termelése FcR γ ^{-/-} neutrophilekben <i>in vitro</i>	88
53. ábra: Autoantitest-indukált arthritis vad típusú, Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-} és FcR γ ^{-/-} kevert kimérákban	88
54. ábra: Autoantitest-indukált arthritis LFA-1 ^{-/-} , Mac-1 ^{-/-} és CD18 ^{-/-} állatokban	90
55. ábra: LFA-1 ^{-/-} és Mac-1 ^{-/-} neutrophilek <i>in vivo</i> migrációja arthritisben	91
56. ábra: Immunkomplex-függő szuperoxid-termelés LFA-1 ^{-/-} , Mac-1 ^{-/-} és CD18 ^{-/-} neutrophilekben	92
57. ábra: Gyulladásos mediátorok termelése LFA-1 ^{-/-} , Mac-1 ^{-/-} és CD18 ^{-/-} neutrophilekben <i>in vitro</i> immunkomplexek hatására	92

Táblázatok:

1. táblázat: Egyes neutrophil-funkciók zavarához köthető betegségek ([32] és [247] alapján)	34
2. táblázat: Az Src-család tagjainak expressziója különböző sejtekben	40
3. táblázat: Src-típusú tirozin-kináz család tagjainak expressziója az immunrendszerben	46
4. táblázat: Az egyes genetikailag módosított egértörzsek genotipizálásához használt PCR primerek szekvenciái	52
5. táblázat: Hck, Fgr, Lyn egyszeres és többszörös hiányának hatása autoantitest-indukált arthritis kialakulására	68
6. táblázat: Myeloid sejt számok a perifériás vérben	72

2. Rövidítések

ADAP	adhesion and degranulation promoting adapter protein
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule (=CD166)
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibody
APRIL	a proliferation inducing ligand
BAFF	B cell-activating factor (= B lymphocyte stimulator, BLyS)
BCR	B-cell receptor
Blk	B lymphocyte kinase
BP	bullous pemphigoid
CARD9	caspase recruitment domain 9
CD155	poliovirus receptor
CD99	MIC2; single-chain type-1 glycoprotein
CR3	complement receptor 3
CRP	C-reactive protein
CVII	collagen type VII
Csk	carboxy-terminal Src kinase
DAMP	damage associated molecular patterns
DAP12	DNAX-activating protein of 12 kDa
EBA	epidermolysis bullosa acquisita
ESL-1	E-selectin ligand 1
FcRγ	Fc-receptor γ -chain
FcγR	Fc γ -receptor
FCS	fetal calf serum
Fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
Fyn	oncogene related to SRC, FGR, YES; = Syn
G6PC3	glucose 6-phosphatase 3
GAP	GTPase activating protein
GB	gelatinase B
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GEF	guanine exchange factor
Gfi-1	growth factor independent 1 transcription repressor
GPCR	G protein-coupled receptor
GPI	glucose-6-phosphate isomerase
HAX-1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (HCLS1)-associated protein X-1
HBP	heparin binding protein
HBSS	Hank's balanced salt solution
Hck	hemopoietic cell kinase
IAP	integrin associated protein (=CD47)
ICAM-	intercellular adhesion molecule
IFN-	interferon-
IL-	interleukin-
IRAK-	interleukin-1 receptor-associated kinase

ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JAK	Janus-kinase
JAM-	junctional adhesion molecule
JNK	c-Jun N-terminal kinases
K/BxN	KRN transgene on B6 background crossed with NOD
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1; α_L integrin; $\alpha_L\beta_2$ integrin; CD11b/CD18
LTB₄	leukotriene B ₄
LXR	liver X receptor
Lyn	Lck/Yes novel tyrosine kinase
LYST	lysosomal trafficking regulator
mAbp-1	mammalian actin-binding protein 1
Mac-1	macrophage-1 antigen; α_M integrin; $\alpha_M\beta_2$ integrin; CD11a/CD18
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1; CCL2; JE
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1α	macrophage inflammatory protein 1 α ; CCL3
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2; CXCL2
MPO	myeloperoxidase
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NE	neutrophil elastase
NF-κB	nuclear factor κ B
NK-sejt	természetes ölü (natural killer) sejt
NOD	non-obese diabetes
PAMP	pathogene associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmocytoid dendritic cell
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PMN	polymorphonuclear phagocyte = neutrophil
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRR	pattern recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RA	rheumatoid arthritis
ROS	reactive oxygen species
RSV	Rous sarcoma virus
SAP	serum amyloid P component
SIRP-α	signal regulatory protein α (CD172a)
SLP-76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
Src	sarcoma
STAT	signal transducers and activators of transcription
Syk	spleen tyrosine kinase

TAN	tumor-associated neutrophil
TCR	T-cell receptor
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	tumor necrosis factor α
TREM-1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TRIF	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late antigen-4; $\alpha_4\beta_1$ integrin; CD49d/CD29
Yes	Yamaguchi sarcoma virus oncogene homolog, <i>YES1</i> , c-Yes 1
Yrk	Yes-related kinase
ZAP70	ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa

3. Bevezetés

A különféle autoimmun gyulladásoz megbetegedések a populáció jelentős hányadát érintik, kezelésük azonban nem minden esetben teljesen megoldott, ami új terápiais megközelítések kutatása mellett szól [1].

Az autoimmun betegségek kapcsán kialakuló szövetkárosodások jellemző mechanizmusa az autoantitestek képzése és a szövetekben az immunkomplexek kialakulása, mely beindíthatja a normális esetben a külső patogének eliminálását célzó védekező apparátust, gyulladást hoz létre. Ez a nem megfelelő helyen és időben történő aktiváció vezet aztán a tünetek kialakulásához illetve a szövetkárosodáshoz.

Az autoimmun gyulladásoz betegségek kutatásának régóta alapvető eszköze a különféle *in vivo* állatmodellek alkalmazása. A K/BxN szérum transzfer arthritis [2] vagy az autoantitest-függő hólyagos bőrgyulladás [3, 4] olyan fontos emberi megbetegedéseket modelleznek, mint a rheumatoid arthritis illetve a bullosus pemphigoid és az epidermolysis bullosa acquisita. Patomechanizmusuk közös vonása a myeloid sejtek gyulladás helyén történő aktivációja [4-7], melynek nélkülözhetetlen lépése az immunkomplexek Fc γ -receptorokon keresztül történő felismerése [4, 8], illetve a gyulladás helyére történő β_2 -integrin-függő leukocyta migráció ([II] és [9-12]).

Az Src-típusú tirozin-kinázokat elsőként a sejtek malignus transzformációjáért felelős virális onkogének celluláris megfelelőiként azonosították, lényegében ez vezetett el a protoonkogének felfedezéséhez [13, 14]. Legfontosabb és legismertebb szerepük a sejtek túlélésének és proliferációjának irányítása, de részt vesznek az egyes sejtfelszíni integrinek jelátvitelében, és ezáltal a sejtadhéziós folyamatokban is [15, 16]. Számunkra különösen érdekes, hogy az Src-kinázok nélkülözhetetlenek a fehérvérsejtek β_1 és β_2 integrinjeinek jelátvitelében [17-28]. A daganatos betegségek kialakulásában játszott kiemelkedő szerepük miatt fontos daganatellenes célpontokká váltak [29, 30].

Tekintettel arra, hogy az autoimmun gyulladásoz megbetegedések kialakulásához elengedhetetlenek a β_2 integrinek, azok jelátvitelében pedig nélkülözhetetlenek az Src-kinázok, doktori munkám során az Src-kinázok autoantitest-függő gyulladásoz betegségekben játszott esetleges szerepét vizsgáltam.

3.1. A neutrophilek élettana és patológiája

A többsejtű élőlények és egysejtű patogénjeik között nap mint nap dúló élet-halál harc talán legfontosabb résztvevői a különféle phagocyták, a veleszületett immunrendszer sorkatonái, akik a behatolók felkeresésére és elpusztítására szakosodtak. Már az egészen primitív szervezetekben is jelen vannak, sőt szerepük annyira életbevágó az ízeltlábúakhoz hasonló, adaptív immunrendszerrel még nem rendelkező élőlényekben, hogy ezek a veleszületett phagocytáik nélkül lényegében életképtelenek [31].

Közülük az emberi perifériás vérben a neutrophilek (neutrophil granulocyták, polymorphonuclearis phagocyták = PMN) vannak a legnagyobb mennyiségben, nyugalmi körülmények között az összes fehérvérsejt kb. 50-70 %-át alkotják. Egészséges felnőtt szervezetben naponta kb. 10^{11} neutrophil keletkezik, amely fokozott igénybevétel (pl. gyulladás, bakteriális fertőzés, stb.) esetén akár 10^{12} -ig növekedhet. Nem meglepő tehát, hogy a csontvelő 55-60 %-a a neutrophilek képzésének szolgálatában áll [32, 33].

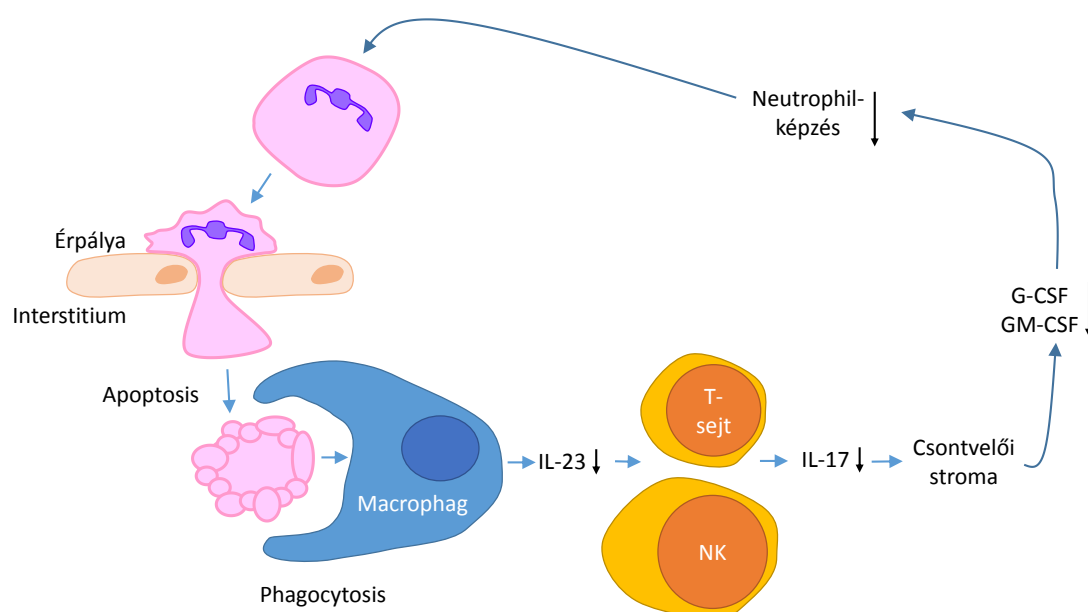
A neutrophilek terminálisan differenciált, relatíve rövid életű sejtek, melyek a veleszületett immunrendszer első védelmi vonalát alkotják a behatoló bakteriális-, gomba- vagy protozoon fertőzésekkel szemben [34]. Életidejüket korábban – főként *in vitro* kultúrákban történt vizsgálatok alapján – a vérben 8-12 órára, a szövetek között legfeljebb 1-2 napra tették [35-37], újabb – bár némiképp vitatott - adatok szerint azonban akár 5 nap is lehet [38, 39].

Korábban a neutrophileket „buta öngyilkos gyilkológépeknek” tekintettük, melyek egyedüli feladata a mások által azonosított behatolók elpusztítása. Azóta azonban rengeteg információ látott napvilágot a neutrophilek sokkal kifinomultabb működéséről, aminek köszönhetően a róluk kialakult képünk jelentősen átalakult. Ma olyan sokrétű, a gyulladás és az immunválasz több elemét szabályozó sejtekként tekintünk rájuk, melyek citokineket és egyéb mediátorokat termelnek, számos (kétirányú) kapcsolatot tartanak fenn a dendriticus sejtekkel, macrophagokkal, az adaptív immunitás egyes elemeivel és az endotheliummal, mindezek révén pedig fontos szereplői a gyulladásos folyamatok komplex szabályozásának [34, 40-45].

3.1.1. Neutrophilek képzése

A neutrophilek képzése a haematopoeticus rendszerben, a csontvelőben történik. A folyamat számos citokin, elsősorban a granulocytá kolónia stimuláló faktor (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) irányítása alatt áll [33].

A szervezet számára rendelkezésre álló neutrophilek számát a képződésük üteme, a csontvelőben történő raktározásuk illetve az onnan való felszabadulásuk, valamint a vérben keringő neutrophilek túlélése és eliminálása, illetve onnan különböző gyulladásos folyamatok kapcsán a szövetek közé történő kilépése határozza meg [32, 33]. Ez idáig nem ismert olyan központi mechanizmus, amely érzékeli a keringő neutrophilek számát, és azt a mindenkori kívánalmaknak megfelelően állítja be [46]. Mégis számos olyan feedback szabályozásról tudunk, amelyek hozzájárulhatnak egy ilyen irányú működéshez.



1. ábra: A neutrophilek számának macrophagok általi feedback szabályozása: az IL-23–IL-17–G-CSF tengely.

Az érpályából a szövetek közé lépő és ott apoptosissal elpusztuló neutrophileket macrophagok kebelezik be, melynek hatására csökken azok interleukin (IL)-23 termelése. Ez következményesen csökkenti a T-sejtek és a natural killer (NK) sejtek IL-17-termelését és a stromán keresztül a G-CSF szintjét is, mely végső soron a neutrophilek képzését szabályozza. IL, interleukin; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-monocyte colony stimulating factor.

Jól példázza egy ilyen feedback kör meglétét egyes sejtadhéziós molekulák, a CD18 integrin β_2 -lánc, a P/E/L szelektinek vagy a CD11a integrin α_L -lánc (LFA-1) hiányában tapasztalható jelentős neutrophilia. Ezekben az állatokban a neutrophilek érpályából való kilépése gátolt. Normális körülmények között a szövetekben (elsősorban a lépben, májban illetve a csontvelőben) a neutrophileket macrophagok kebelezik be [47] (1. ábra). Ennek hatására a macrophagokban csökken az interleukin-23 (IL-23) termelése [48]. Az IL-23 T-sejtekből és természetes ölő (natural killer, NK) sejtekből IL-17-t szabadít fel, az pedig fokozza a stromasejtek G-CSF- és granulocytamonocytakolónia stimuláló faktor

(granulocyte-monocyte colony stimulating factor, GM-CSF)-termelését, mely végül gyulladáshoz és a granulocytaszám emelkedéséhez vezet [49]. A sejtadhéziós molekulák hiányában a neutrophilek ér pályából való kilépése gátolt, amelynek következtében emelkedik a basalis IL-17-, IL-23- és G-CSF-szint [50]. A CD18-deficiens állatokban az IL-23 együttes hiánya visszafordítja ezt a hatást, kivédi a neutrophiliát [51]. Mindez megerősíti, hogy az apoptoticus neutrophilek macrophagok általi bekebelezése feedback mechanizmussal szabályozza a neutrophilek képződését az IL-17–IL-23 tengelyen keresztül (**1. ábra**).

Az IL-17–IL-23 tengely nyilvánvalóan nem az egyedüli mechanizmus, amely a neutrophilek képződését szabályozza. Valószínűleg fontos szerepe van a stromának és a veleszületett immunrendszer egyes mintázatfelismerő receptorainak is, melyek a csontvelői őssejtek proliferációjára is hatással lehetnek [52] [53].

Fontos megemlíteni, hogy nemcsak a csontvelői őssejtek neutrophilirányú differenciációja, hanem a képződött neutrophilek csontvelőből való felszabadulása és a véráramba jutása is szabályozott lépés, melyben fontos szerep jut többek között a CXCR2 fokozza, míg a CXCR4 csökkenti a neutrophilek felszabadulását [54].

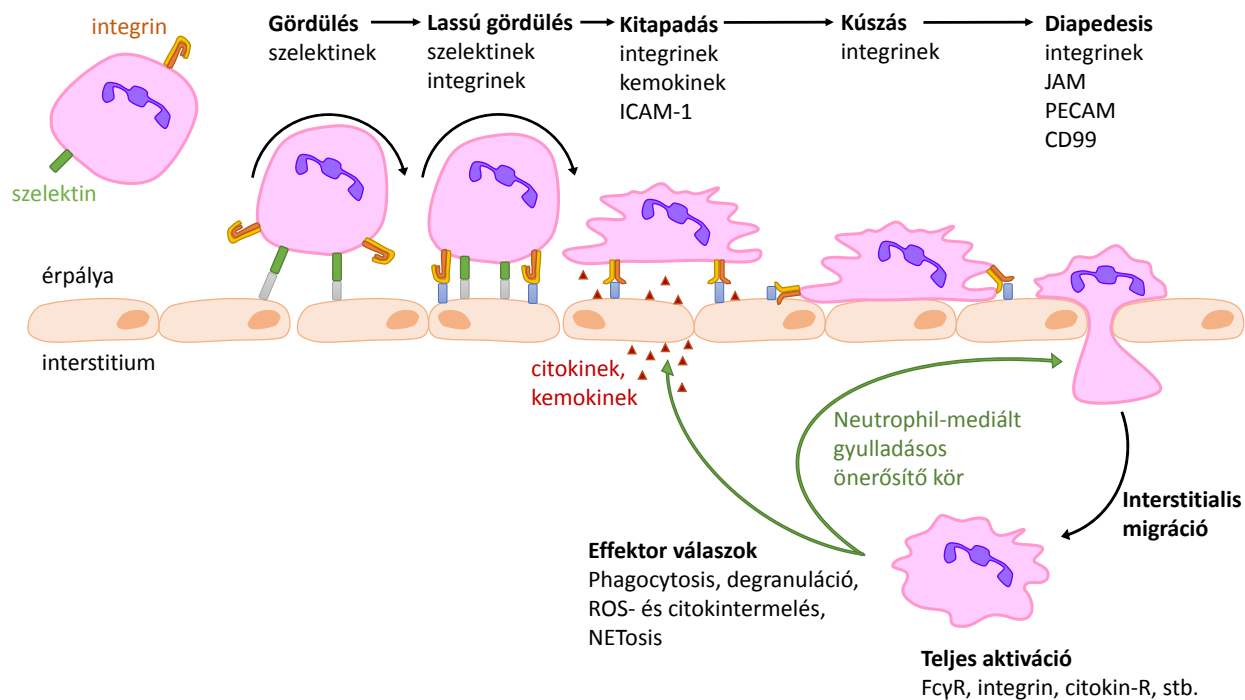
Összességében a neutrophilek számának alakulását mindegyik itt tárgyalt folyamat együttesen szabályozza, egyes állapotokban az egyik vagy a másik elsődlegessé válhat, de még számos megválaszolendő kérdés van a pontos mechanizmussal kapcsolatban [32].

3.1.2. Neutrophilek migrációja

A neutrophilek csontvelőben való keletkezésüket követően a véráramba jutnak, funkciójukat azonban a szövetek között, a gyulladás helyén fejtik ki. Működésük szempontjából alapvető fontosságú tehát az a többlépcsős, igen szorosan szabályozott folyamat, melynek során az ér pályából a szövetek közé (*transendothelialis migráció*) [55-59] illetve a szövetekből az epithelen át a testüregekbe (*transepithelialis migráció*) [32, 60-62] jutnak.

3.1.2.1. Transendothelialis migráció

A transendothelialis migráció során a neutrophilek egyes sejt felszíni molekulái összerendezetten, szigorúan meghatározott sorrendben kapcsolatot létesítenek az aktivált endothelium felszínén található partnereikkel [32, 43, 55, 59] (**2. ábra**).



2. ábra: A neutrophilek transendothelialis migrációjának klasszikus modellje

A neutrophilek az érpálya elhagyása során először szelektin-mediált **gördülést** végeznek, majd az integrinek kötődésével ez lassul, végül citokinek, kemokinek hatására integrineken keresztül **kitapadnak**, az endothel mentén lassú **kúszást** végeznek végül átjutnak az interstitiumba (**diapedesis**). Az interstitiumban a gyulladás helyére migrálnak, ott megtörténik a **teljes aktiváció**, az **effektor válaszok** megjelenése, többek között citokinek, kemokinek termelése, mely további neutrophilek vonzásával egy **pozitív feedback kört** hoz létre. ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; JAM, junctional adhesion molecule; PECAM, platelet/endothelial cell adhesion molecule; CD, cluster of differentiation; CD99, MIC2; single-chain type-1 glycoprotein; ROS, reactive oxygen species; FcγR, Fcγ-receptor.

Első lépésként a neutrophilek és az endothelsejtek felszínén található P-, E- és L-szelektinek fukozilált ligandjaikhoz kötődnek, mely kihorgonyozza a vérben áramló neutrophileket, és lehetővé teszi, hogy az endothel mentén gördülve felmérjék a környezetüket olyan gyulladásos jelek, pl. lokális kemoattraktánsok [63, 64] után kutatva, melyek megállásra és beavatkozásra készítik őket (**2. ábra**). Az elégtelen fukoziláció és szelektinek kapcsolódásának következményes zavara felelős a leukocytá adhéziós deficiencia II (LAD-II) nevezetű, visszatérő fertőzésekkel járó betegséget (**1. táblázat, 34. oldal**).

A gyulladásos jelek nem csak az immunsejtekre, de az endothelre is hatnak, többek között nő a P-szelektin expressziója illetve az endothelsejtek felszínén megjelenik az E-szelektin is. Ezekhez kapcsolódva a neutrophilek gördülésének sebessége jelentősen csökken, ún. *lassú gördülést* (*slow rolling*) végeznek, mely lehetővé teszi a környezet jobb felmérését és a szorosabb kötődés kialakítását [65-67].

Ebben a fázisban ún. másodlagos megerősítő tényezők, pl. az E-szelektin és ligandja, a PSGL-1 kapcsolódása, ún. *inside-out* szignalizáción keresztül aktiválják a neutrophilek β_1 és β_2 integrinjeit, melyek „kinyílnak”, és így képessé válnak arra, hogy kötődjenek a gyulladt endothel felszínén található ligandjaikhoz. Ebben a folyamatban nélkülözhetetlenek egyes kis G-fehérjék guanin-kicserélő faktorai (guanine exchange factor, GEF), a Talin és a Kindlin-3 [68] (l. még: **3.1.3.4.2** és **4. ábra**). Ez utóbbi hiánya illetve hibás működése okozza a LAD-III nevezetű humán betegséget [69], ami nagyon hasonló az integrinek hibájából eredő LAD-I-hez (**1. táblázat, 34. oldal**).

Az integrinek ligandkötése lelassítja a neutrophilek gördülését, és előkészíti a szoros kapcsolat kialakulását. A neutrophilek ebben a stádiumban lassú „kúszó” (*crawling*) mozgást végeznek, melynek célja, hogy megtalálják a legideálisabb helyet az endothelen való átjutáshoz. A transzmigráció elsősorban az endothelsejtek találkozásánál, paracellulárisan történik, de lehetséges a transzcelluláris migráció is [32] [70] [71].

Az interstitialis térben aztán a behatolókat aktív amőbaszerű mozgással közelítik meg. Ezen folyamatokban a korábbi nézetekkel szemben újabban úgy tűnik, hogy nem feltétlenül szükségesek az integrinek. Három dimenziós kollagén mátrixokban ugyanis a neutrophilek integrinek nélkül is képesek vándorolni [72].

A neutrophilek jelölésének és különösen az *in vivo* mikroszkópiának a fejlődése tette lehetővé annak a felismerését, hogy egyes szervezetben a neutrophilek fent leírt klasszikus transendothelialis migrációs folyamattól némileg eltérő módon vándorolnak az érpálya és az intersititium között [73, 74]. Tüdőben a transzmigráció az alveoláris kapillárisokban zajlik [75], és nem szükségesek hozzá β_2 integrinek [32]. A májban a portális és centrális venulákban a többi szervhez hasonlóan működik a folyamat, azonban a sinusoidok falának nagyfokú permeabilitása miatt azok lényegében átjárhatóak a leukocyták számára, vándorlásukat ezért egy teljesen eltérő mechanizmus irányítja [76]. A vese glomerulusokban folyamatos neutrophil- és monocyta-örjárat zajlik [77].

3.1.2.2. Transepithelialis migráció

A transepithelialis migráció részletei sokkal kevésbé ismertek, bár az bizonyos esetekben, pl. gyulladással járó bélbetegségekben vagy akut tüdőkárosodások kialakulása során hasonlóan fontos lehet [32, 60-62]. Mechanizmusát a megfelelő *in vivo* képalkotó eljárások hiánya miatt általában *in vitro* rendszerekben vizsgálják.

Lényeges eltérés a transendothelialis migrációhoz képest, hogy ez fordított sorrendben zajlik, azaz a neutrophilek először a basalis membránnal kerülnek kapcsolatba, majd

„kifelé” a sejtek apicalis vége felé vándorolnak. Az epithelsejtek jellemzően sokkal nagyobbak, mint az endothelsejtek, ezért lényegesen hosszabb utat is kell megtenniük a neutrophileknek, mely jelenlegi ismereteink szerint csak paracelluláris úton lehetséges. Mindezek következtében az áthaladáshoz sokkal nagyobb mértékű változások szükségesek mind a neutrophilekben, mind az epithelben, illetve maga az áthaladás lényegesen nagyobb sérüléssel, az integritás nagyobb fokú megbomlásával jár, mely a permeabilitás jelentős fokozódásához vezethet. Ennek ellensúlyozására az epithelsejtekben speciális javító mechanizmus működik, mely β -katenin közreműködésével a barrier integritásának helyreállítását célozza [78].

A transendothelialis migrációhoz képest a résztvevő felszíni molekulák is eltérőek és szervenként némileg különbözőek lehetnek. A β_2 integrinek valószínűleg fontosak a folyamatban, az ICAM-1 és a VCAM-1 azonban nem, hiszen az epithelsejteken csak apicalisan vannak jelen. Szerepük ezért inkább a transepithelialis migráció végén a neutrophilek rögzítése lehet [32, 79]. Felvetődött továbbá a JAM-C, a CD47, a signal regulatory protein α (SIRP- α) és a triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) szerepe is. Ez utóbbi hiányában a neutrophilek megrekednek az interstitiumban, nem képesek az alveolusok falán áthatolni [80] [79].

3.1.3. A neutrophilek aktivációja, receptoraik jelátvitel

A neutrophilek általában nyugvó állapotban keringenek az érpályában, aktiválódásuk a gyulladás irányába történő elkötelező, meghatározó lépés. A többlépcsős folyamat a transzmigrációval veszi kezdetét, majd általában a szövetek közötti térben, a gyulladás helyén fejeződik be. Ebből is látható, hogy a teljes aktivációhoz általában – fiziológiás körülmények között – egy stimulus nem elegendő. Önmagukban a neutrophilekre ható ingerek csupán potenciózó, ún. *priming* hatással bírnak, a következő stimulusok hatását erősítik [81-85]. Az aktivációs állapot ezért nagyban függ az ingerületbe kerülő receptorok számától és minőségétől.

Az aktiválási kaszkád eredményeként megjelennek a teljesen aktivált neutrophilekre jellemző sejtválaszok (l. **3.1.4**), melyek végeredménye szerencsés esetben a behatolók eliminálása. Rosszabb esetben, amennyiben a teljes aktiváció nem a kellő helyen és időben következik be, – mint pl. steril gyulladások esetén, – a saját szövetek károsodása jöhet létre [32, 43, 86]. Ezért a neutrophilek aktivációjához vezető lépések megértése közelebb vihet a káros gyulladások kontrolljához is.

3.1.3.1. Mintázatfelismerő receptorok

Léteznek olyan általános, számos kórokozóra jellemző molekuláris mintázatok (pathogen associated molecular patterns, PAMP), mint a vírusokra jellemző kettősszálú RNS, bakteriális DNS részletek, lipoteikólsav, peptidoglikán vagy a lipopoliszacharid (LPS, = endotoxin), melyek az emberi szervezetben nincsenek jelen, ezért megjelenésük mindenképpen valamely behatolóra figyelmeztet. Annyira általánosak és specifikusak, hogy már a veleszületett immunrendszer szintjén is érdemes foglalkozni velük. Hasonló szerepük van az olyan saját – necroticus – sejtekből származó molekuláris mintázatoknak is (damage associated molecular patterns, DAMP), melyek normális körülmények között szintén nem fordulnak elő, mint a high-mobility group protein B1, mitokondriális formilált peptidek vagy a mitokondriális DNS.

Ezeket a molekuláris mintázatok a neutrophilek – ismét rációzva a hagyományos „kizárólag buta végrehajtó” szerepükre – ún. mintázatfelismerő receptorokon (pattern recognition receptor, PRR) keresztül érzékelik. A patogénekből származó PAMP-ok és a saját sejtekből származó DAMP-ok valószínűleg igen hasonló hatással vannak a neutrophilekre [42].

A mintázatfelismerő receptorok egy része közvetlenül a phagocytosisban, a kórokozó eliminálásában játszik szerepet. Ilyenek a C-típusú lektinek, mint a gombák sejtfalának β -glukánját felismerő Dectin-1 [87, 88] valamint a TREM-1 [89, 90].

A mintázatfelismerő receptorok egy másik csoportja nem vesz részt közvetlenül a phagocytosis irányításában, sokkal inkább a neutrophil felkészítésében (priming) van szerepük. Az ún. Toll-like receptor (TLR) család tagjai lipid, szénhidrát, DNS illetve egy- és kettős szálú RNS mintázatokat ismernek fel [91]. Neutrophilekben a TLR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, illetve GM-CSF hatására a TLR-9 expresszálódik [92]. Hatásuk elsősorban antiapoptoticus illetve *priming* jellegű, nem közvetlenül aktiválják a neutrophilválaszokat [93]. A citoplazmában található NOD1 a Gram negatív, a NOD2 pedig a Gram pozitív baktériumok peptidoglikánjait ismeri fel [94, 95].

3.1.3.2. Opszoninek, opszonin receptorok

Bármennyire is fontosak a mintázatfelismerő receptorok a neutrophilekben, a patogének megfelelő hatékonyságú eliminációjának elengedhetetlen kellékei a klasszikus opszoninek: az immunglobulinok (főként az IgG) és a komplement-rendszer elemei (első-

sorban a C3b). Steril, autoimmun gyulladások kapcsán gyakran ezek a molekulák szerepelnek a gyulladás és a következményes szövetkárosodás kiváltásában. A neutrophileket mind az IgG, mind a C3b képes aktiválni [32].

Nyugvó állapotban a neutrophilek a 3-as (CR3 = Mac-1), illetve a C3bi-t felismerő 4-es komplement receptort (CR4) fejezik ki [96]. Aktiváció hatására azonban megjelenik a CR1 (CD35) is, mely a C3b és C4b mellett a mannóz kötő lektint is felismeri [97]. Működésüket részletesebben l. **3.1.3.4.**

A neutrophilek az IgG-t nagy és (emberben és egérben különböző) kis affinitású Fc γ -receptorokon keresztül ismerik fel [98]. A részleteket l. **3.1.3.3.**

Az opsoninek harmadik nagy csoportja a szekretált mintázatfelismerő receptorok, a pentraxinok, melyek a neutrophileket mind komplement-, mind Fc γ -receptorokon keresztül ingerelni tudják [99]. Legismertebb képviselőik a C-reaktív protein (CRP) és a szérum amiloid P (SAP) akut fázis fehérjék. Ezek a patogénekhez kötődve egyrészt nagyon hatékonyan aktiválják a komplement-rendszert, másrészt közvetlenül is képesek a neutrophilek Fc γ -receptoraihoz kötődni, és így a patogént megjelölve annak phagocytosisát és eliminációját hatékonyabbá tenni [99].

3.1.3.3. Fc γ -receptorok

A neutrophilek felszínén számos különböző Fc-receptor található, a sejtek működése szempontjából az alacsony affinitású Fc γ -receptorok a legfontosabbak [100]. Emberben ezek közül az ITAM szekvenciát is hordozó Fc γ RIIA és a mindössze extracelluláris láncból álló Fc γ RIIB fejeződik ki, az immunkomplexek hatására bekövetkező teljes aktivációhoz mindkettő együttes ligandkötése szükséges [101]. Ennek során először az Fc γ RIIB kötődik a ligandjához [102] ezzel mintegy rögzítve azt, majd az Fc γ RIIA is kapcsolódik, és az együttes szignalizációjuk vezet a neutrophil teljes aktiválásához [103].

Ezzel szemben egérben az Fc γ RIII és az Fc γ RIV fejeződik ki [100], melyek mindegyike az Fc γ -lánc segédmolekula ITAM szekvenciáján keresztül fejti ki hatását [101]. A neutrophilek aktiválása szempontjából a két receptor hatása egymást átfedi, helyettesítheti [101]. Az Fc γ -lánc nem csupán a jelátvitelükben, hanem a receptor sejt felszínén való stabilizálásban is nélkülözhetetlen, a segédlánc hiányában az egér neutrophileken nem mutatható ki egyik aktiváló Fc γ -receptor sem [98, 104].

Mindkét fajra jellemző a gátló hatású, ITIM szekvenciákon keresztül működő Fc γ RIIB [98], mely az aktiváló receptorok sejten belüli jelátvitelét gátolja [105] (l. még **21. ábrat** az **47.** oldalon). Nemrégiben ismerték fel, hogy bizonyos körülmények között

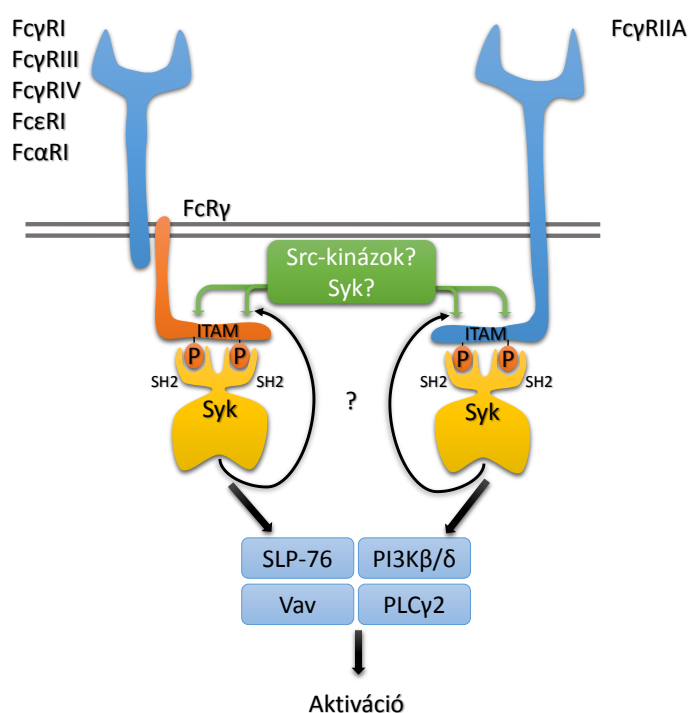
(Dectin-1-gyel együttesen kötődve) az FcγRIIB gátolja a C5a-receptor szignalizációját is [106]. Az egér neutrophilek FcγRIIB-expressziója azonban nem teljesen konzisztens [107, 108], illetve bizonyos emberi haplotípusokban alig kimutatható [109]. Ez arra utal, hogy az aktiváló Fcγ-receptorok jelátvitelének szabályozására létezik másik útvonal is a gátló Fcγ-receptorokon kívül.

A neutrophilek aktivációjának hatására megjelenhet a sejtek felszínén a nagy affinitású FcγRI [110, 111], melynek diagnosztikai jelentősége is van [112], de szerepe az immunválaszban egyelőre nem teljesen tisztázott.

Emberi neutrophileken megtalálható a szolubilis IgA molekulákat felismerő, a kapcsolt FcRγ-lánc ITAM szekvenciáján keresztül szignalizáló FcαRI [113, 114], melynek szerepe lehet egyes gyulladási folyamatok illetve tumorok patomechizmusában [100, 115], de pontos funkciója egyelőre nem ismert. Bizonyos körülmények között kifejeződik az FcεRI is [116, 117], melynek egyes fertőzésekben [118] illetve allergiás folyamatokban [117, 119] tulajdonítanak jelentőséget, bár mások ezt vitatják [120].

Az alacsony affinitású aktiváló Fcγ-receptorok mindkét fajban jellemzően ITAM szekvenciákon keresztül fejtik ki hatásukat: az emberi FcγRIIA esetén ez

magán a receptor molekulán, míg az egér FcγRIII és -IV esetén a kapcsolt FcRγ-láncon található (3. ábra). Ligandkötés hatására az ITAM szekvencia két tirozin aminosava foszforilálódik, az ezért felelős kinázok kiléte azonban nem teljesen egyértelmű, sejttípusonként is eltérő lehet (a részleteket l. 3.2). Jól ismert azonban, hogy a tirozinok foszforilációja a Syk két SH₂ domainjén keresztüli kapcsolódását és következményes aktiválódását eredményezi [121]. A Syk aztán további adapterfehérjéket foszforilál, és így



3. ábra: Aktiváló Fc-receptorok proximalis jelátvitel

Az integrinek alacsony affinitású, „zárt” konformációja Kindlin3 közvetítésével a sejt belsejéből származó (inside-out), egyéb receptoroktól (is) induló (pl. PSGL-1) aktív szignalizációs folyamatok hatására alakul át magas affinitású, „nyitott” konformációvá, mely ligandot kötni képes. A ligandkötés hatására ITAM-függő jelpálya aktiválódik (outside-in), mely a sejtválaszok megjelenéséhez vezet. FcγR, Fc-γ receptor; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; FcRγ, Fc-receptor γ-chain; SLP-76, SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; PLC, phospholipase C; SH2, Src-homology domain 2.

vezet végső soron a neutrophil aktiválódásához és a sejtválaszok megjelenéséhez. A jelátviteli folyamat sémája lényegében megegyezik a T- és B-sejt receptorok működésével, bár az egyes résztvevők eltérnek [121].

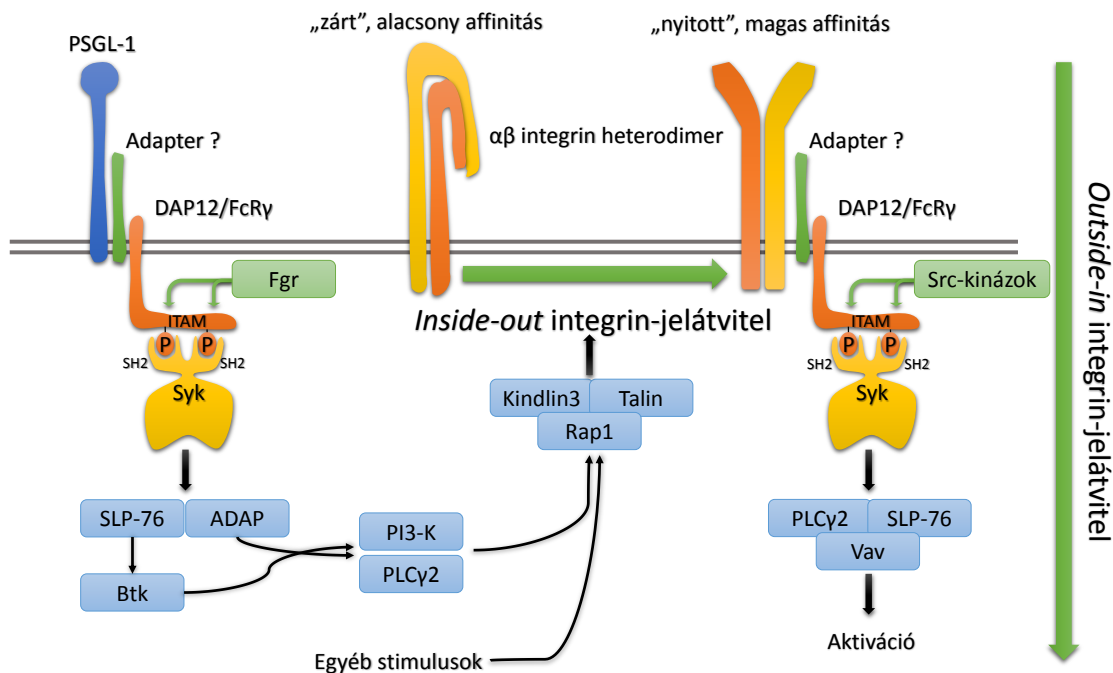
A Syk-tól distlisán a jelpályában részt vesz a végső soron Ca^{2+} -jel kiváltásáért felelős PLC γ 2 [122], az SLP-76 [123], a különböző Vav guanin kicserélő faktorok és Rac kis G-fehérjék (elsősorban a Vav3 és a Rac2) [124, 125], valamint a PI3K β és δ [126].

A p190RhoGAP fehérjének az előzetes feltételezésekkel szemben ebben a jelpályában sincs nélkülözhetetlen szerepe [II]. A PI3-kináz effektor ARAP3 molekula szerepe felmerült, PI3-kináz-függő aktiválódásának hiányában az immunkomplex-függő sejtválaszok fokozódnak, ezt azonban másodlagos hatásnak tartjuk, melynek hátterében a β_2 integrinek *inside-out* szignalizációjában betöltött szerepe állhat [III].

3.1.3.4. Integrinek

A neutrophileken az LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18), a Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11a/CD18, complement receptor 3) és a VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29) integrinek fejeződnek ki, legismertebb ligandjaik az ICAM-1 (LFA-1), a VCAM-1 (VLA-4) és a C3b (Mac-1) [96] [127].

Az integrinek kezdetben egy alacsony affinitású, „zárt” konformációban fejeződnek ki, mely egy aktív szabályozást igénylő folyamat, az ún. „bentről kifelé” ható, *inside-out* szignalizáció hatására alakul közepes, majd nagy affinitású, „nyitott” konformációvá [68]. Ligandokat tartalmazó felszínhez való kötődésük pedig az ún. „kintről befelé” ható, *outside-in* jelátvitelen keresztül aktiválja a neutrophileket, és egyéb gyulladási mediátorok egyidejű hatása esetén [128] hozzájárul az egyes sejtválaszok, a reaktív oxigén szabadgyökök termelése, a szétterülés és a phagocytosis létrejöttéhez [129, 130] (**4. ábra**).



4. ábra: Integrinek inside-out és outside-in jelátvitele

Az integrinek alacsony affinitású, „zárt” konformációja Kindlin3 közvetítésével a sejt belsőjéből származó (inside-out), egyéb receptoroktól (is) induló (pl. PSGL-1) aktív szignalizációs folyamatok hatására alakul át magas affinitású, „nyitott” konformációvá, mely ligandot kötni képes. A ligandkötés hatására ITAM-függő jelpálya aktiválódik (outside-in), mely a sejtválaszok megjelenéséhez vezet. ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1; PI3-K, phosphoinositide 3-kinase; ADAP, adhesion and degranulation promoting adapter protein; DAP12, DNAX-activating protein of 12 kDa; FcR γ , Fc-receptor γ -chain; SLP-76, SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; PLC γ 2, phospholipase C γ 2; SH2, Src-homology domain 2.

3.1.3.4.1. Outside-in szignalizáció

A β_2 integrinek ligandkötésének hatására az Src-típusú tirozin-kinázok [17, 18, 129, 131] foszforilálják a DAP12 és az FcR γ -lánc segédmolekulák immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívumnak (ITAM) nevezett szekvenciáit [131], mely a Syk tirozin-kináz kapcsolódásához és aktiválásához vezet [121, 129]. A Syk pedig a továbbiakban az SLP-76-n [123], a PLC γ 2-n [122, 132] és a Vav guanin kicserélő faktorokon [132, 133] keresztül hozza létre az egyes sejtválaszokat. Valamennyi felsorolt jelátviteli molekula genetikai hiánya a β_2 -függő neutrophilválaszok teljes károsodásához vezet. Látható, hogy a β_2 integrinek proximalis jelátviteli mechanizmusa logikájában, felépítésében és az abban szereplő molekulákat illetően lényegi egyezést mutat az egyes klasszikus immunreceptorok (T- és B-sejt- valamint Fc-receptorok) működésével. Különbséget az Src-kinázok részvétele jelent, mely a β_2 és β_1 [127] integrinek és a T-sejt receptor esetén elengedhetetlen, míg a B-sejt- és az Fc-receptorok esetében a kép nem ennyire egyértelmű (l. 3.2).

A fentiekől distalisán elhelyezkedő jelátviteli elemek ennél lényegesen kevésbé ismertek. Felmerült pl. az Abl kináz [134] és az mAbp-1 szerepe is [135], de ezek egyelőre még nem teljesen tisztázottak.

A neutrophilek működése kapcsán, különösen az aktin citoskeleton átrendeződésével kapcsolatban fontos szerepe van a Rho család kis G-fehérjéinek, a Rho-nak, a Rac-nak és a cdc42-nek. Működésük szabályozása nagymértékben a GTPáz aktiváló fehérjéken, a GAP-okon alapul. Közülük a p190RhoGAP az egyik fő Src-kináz szubsztrát az agyban, az Src-kinázok pedig, ahogy láttuk, szükségesek a neutrophilek integrinfüggő aktivációja során. Ezek alapján felmerült, hogy a p190RhoGAP részt vehet a neutrophilválaszok szabályozásában. Humán neutrophileken végzett mérések ezt megerősítették [136]. Genetikai megközelítéssel azonban úgy találtuk, hogy a p190RhoGAP nem szükséges a neutrophilek adhéziófüggő sejtválaszainak kialakulásához, azok nem károsodtak sem a p190-A [II], sem a p190-B (nem publikált saját megfigyelések) izoforma hiányában.

3.1.3.4.2. *Inside-out* szignalizáció

Az integrinek *inside-out* jelátviteli részleteiben sokkal kevésbé ismert. Ismereteink leginkább a PSGL-1 máshol részletezett (3.1.3.5) jelpályájának felderítéséből származnak (4. ábra). A többi szelektinnel és integrinnel kapcsolatban ismereteink korlátozottak [137], bár több molekula, köztük a Rap1 [138-143] és a foszfoinozid-3-kinázok (PI3K) [III] részvétele is felmerült. Fontos, klinikailag releváns szerepe a Talin, még inkább a Kindlin-3 fehérjének van [32, 69, 137, 144-151], mely nélkülözhetetlen az integrinek megfelelő állapotba kerülésén keresztül a normális migrációhoz.

Az ép *inside-out* szignalizáció tehát szükséges a neutrophilek normális toborzásához, érdekes módon az *outside-in* jelátvitel azonban nem feltétlenül. Annak kulcsmolekulái, a Syk, a Hck, Fgr, Lyn Src-kinázok, a PLC γ 2 vagy a Vav fehérjék hiányában a neutrophilek *in vitro* (és *in vivo*) migrációja nem károsodik [122, 129, 131, 133, 152].

Az ARAP3, a Rho és Arf kis G-fehérje család GTPáz aktiváló proteinje (GAP) egyike a PI3-kinázok számos célpontjának. Az ARAP3 aktivációját a PI3-kinázoktól függetlenítő PH-domain pontmutációk hatására a neutrophilek integrin- és immunkomplexfüggő sejtválaszai is fokozódnak. Ennek hátterében az állhat, hogy az ARAP3 PH domain pontmutáns neutrophilekben nő a β_2 integrinek affinitása és aviditása is, ez pedig nagyobb neutrophilválaszokhoz, és – valószínűleg a felszínhez való erősebb letapadás következtében – a kemotaxis gátlásához vezet. Ezzel összhangban *in vivo* károsodik az autoantitestfüggő arhritis, illetve az annak hátterében álló neutrophilfiltráció is. A PI3-kinázok és

effektor molekulájuk, az ARAP3 tehát *in vitro* és *in vivo* is fontos a β_2 integrinek normális *inside-out* szignalizációján keresztül a sejtek aktivitásának szabályozásához [III].

Lévén, hogy *in vitro* az immobilizált immunkomplex felszínen való stimulációban fontosak lehetnek a β_2 integrinek is (l. **6.9.3**), a fokozott immunkomplex-függő neutrophilválaszokat másodlagos hatásnak véljük [III].

3.1.3.5. Szelektinek jelátvitel

A neutrophilek L- és az endothelsejtek P- és E-szelektinjei a transzmigrációs folyamat első lépéseiben játszanak szerepet: a neutrophilek kihorgonyzásában, illetve a gördülés során [32, 137, 153]. Nyugvó körülmények között az endothelen csak a P-szelektin fejeződik ki, gyulladás hatására azonban az endothel felszíne is megváltozik: a P-szelektin expressziója nő, és megjelenik az E-szelektin is [153].

A szelektinek ligandjai szénhidrátláncokat tartalmazó sejt felszíni glikoproteinek, így az E-szelektinhez kötődő E-szelektin ligand 1 (ESL 1) és a CD44 [154], egyes glikolipidek [155] és a leginkább ismert PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), mely az E- illetve a P-szelektinekhez kapcsolódhat [156].

A szelektinek feladatukat rövid ideig tartó, a molekulák extracelluláris részét érintő gyenge kapcsolatokon keresztül fejtik ki, de bizonyos esetekben aktív jelátvitelük is fontos lehet. Ezek közül részleteiben a legjobban a PSGL-1 jelátvitelét ismerjük [157, 158] (**4. ábra**).

A PSGL-1 E-szelektin kötésének hatására az Fgr Src-típusú tirozin-kináz foszforilálja a PSGL-1-hez kapcsolódó DAP12 és/vagy FcR γ -lánc ITAM szekvenciáját [65, 66], melyhez így kötődik, és ezáltal aktiválódik a Syk tirozin-kináz [159, 160]. A Syk aktiválja az SLP-76 és ADAP [161] fehérjéket, melyek a foszfolipáz C γ 2 [162] illetve a PI3-kináz, majd a Talin és a Kindlin-3 jelpályán keresztül az LFA-1 integrin konformációváltozását okozzák [65, 66]. Az E-szelektin és a PSGL-1 kapcsolódása tehát ezen *inside-out* szignalizációnak nevezett jelátviteli mechanizmussal végeredményben az LFA-1 affinitását növeli, felkészíti a neutrophilt az integrinmediált szoros kapcsolat kialakítására. Tekintettel arra, hogy az E-szelektin csak a gyulladt endothelen fejeződik ki, ez a mechanizmus hozzájárulhat ahhoz, hogy a neutrophilek csak a megfelelő helyen, azaz a gyulladás közelében hagyják el a keringést.

3.1.3.6. G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR)

A neutrophileken számos G-fehérje kapcsolt receptor (G-protein coupled receptor, GPCR) található, melyek egyrészt bakteriális eredetű molekulákat, pl. formilált peptideket, másrészt saját molekulákat, leukotriéneket, kemokineket (pl. IL-8, TNF, adenzin) ismernek fel [163-165]. Elsődleges feladatuk a kemotaxis, a neutrophilek gyulladás helyére történő migrációjának irányítása. A neutrophilek érzékelik a kemokin gradienst, és annak mentén a behatoló patogénhez képesek vándorolni, azt „üldözni” és végül „elkapni” [166, 167]. Részt vesznek azonban a primingban is, sőt igen nagy koncentrációban (elsősorban *in vitro*) akár önmagukban is képesek aktiválni a neutrophileket és kiváltani az effektor válaszokat. Egyes saját halott sejtekből felszabaduló molekulák érzékelése is G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül zajlik [168].

3.1.3.7. Citokin-receptorok jelátvitel

A neutrophilek működése, főként annak az immunválasz egyéb elemeivel való összehangolása jelentős mértékben szolubilis molekulák, citokinek szabályozása alatt áll. Ezen citokinek receptorai lehetnek hagyományos, klasszikus citokin-receptorok, a Toll-like/interleukin-1-receptor család vagy a TNF-receptor család tagjai. Az IL-17 citokinnek jelentős hatása van a neutrophilek működésére, de ezt a hatást nem közvetlenül fejt ki, hanem a G-CSF közvetítésével, ugyanis a neutrophileken nincs IL-17-receptor.

A klasszikus citokin-receptorokban közös, hogy jelátvitelük a JAK-STAT útvonalon keresztül zajlik [169-171]. A jelpályában ezen kívül részt vehetnek az Src-kinázok [172-175], a PI3-K–Akt útvonal [173, 175-177] valamint a MAP-kinázok is [178, 179].

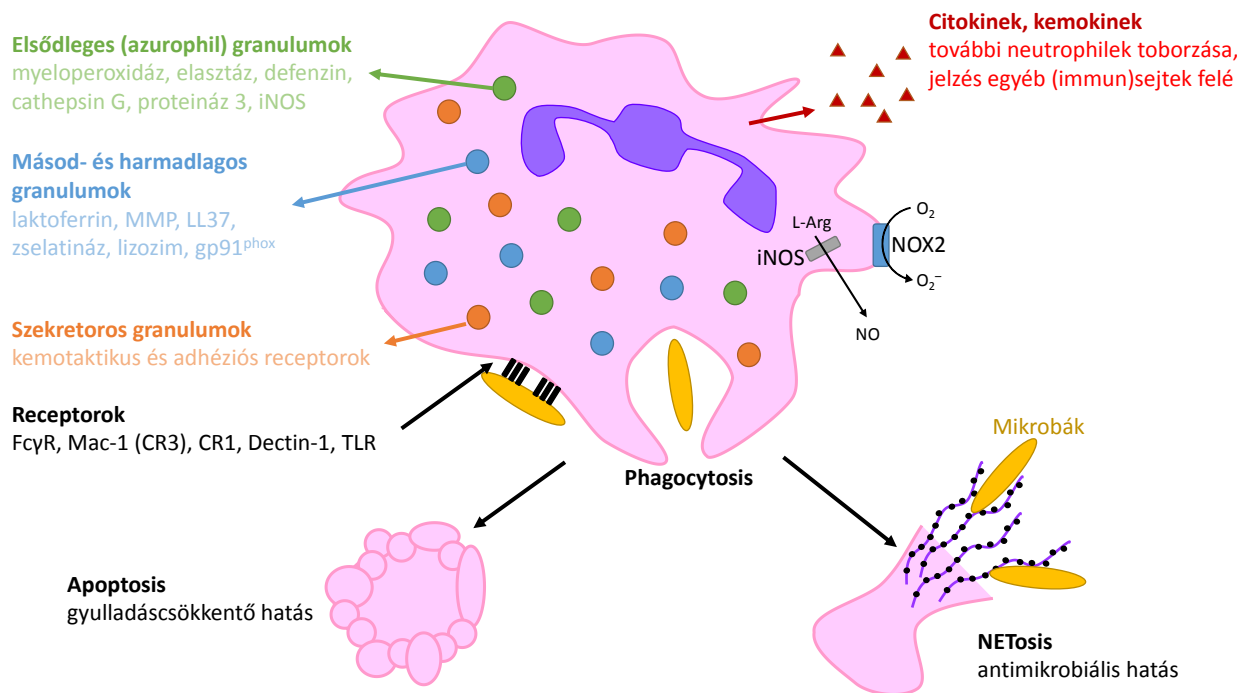
A gyulladás szempontjából kiemelkedő fontosságúak az IL-1 α és - β citokinek [64, 180, 181], melyek hatásukat elsősorban nem közvetlen aktiváción, hanem a neutrophilek túlélésének elősegítésén keresztül fejtik ki [182]. Az IL-1 α végső formájában, míg az IL-1 β pro-IL-1 β -ként szintetizálódik, melyet aztán az ún. *inflammasoma* alakít át aktív citokinné. Receptoraik az immunoglobulin-szerű szupercsaládba taroznak [183].

A TNF-receptor család tagjai különlegesen, hiszen attól függően, hogy milyen sejten belüli jelátviteli mechanizmus kapcsolódik hozzájuk, hatásuk gyökeresen ellentétes lehet. Az ún. 1-es komplexen keresztül az NF κ B és JNK jelpályát aktiválják, gyulladáshoz vezető jeleket közvetítenek, a neutrophileket aktiválják. Ezzel szemben az ún. 2-es komplex apoptotikus hatású [184, 185].

3.1.4. Neutrophilek effektor működései, patogének eliminációja

A neutrophilek a fent tárgyalt mechanizmusokkal történő aktivációjukat követően számos végrehajtott funkciót végeznek, melyek célja a patogének lehetőleg teljes eliminációja egyrészt közvetlenül, másrészt egyéb (immun)sejtek szabályozásán keresztül (5. ábra).

Ha azonban valamely oknál fogva saját sejteken található jeleket ismernek fel célpontként, azok ellen fordulhatnak, mely súlyos szövetkárosodáshoz vezethet.



5. ábra: Neutrophilek effektor működései

A sejtfelszíni receptorokon keresztül bekövetkező aktiváció hatására megjelennek a neutrophilek végrehajtott működései: a célpont (pl. mikrobák) phagocytosisa, citokinek, kemokinek, lipid mediátorok elválasztása, az első-, másod- és harmadlagos illetve a szekretoros granulomok kiürítése, NO és reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) termelése, végül pedig az apoptosis vagy a NETosis. MMP, mátrix metalloproteáz; NO, nitrogén-monoxid; ROS, reactive oxygen species; iNOS, indukálható NO-szintáz; NOX2, NADPH-oxidáz 2; L-Arg, L-arginin; FcγR, Fcγ-receptor; CR, complement receptor; TLR, Toll-like receptor.

3.1.4.1. Phagocytosis

Az FcγR vagy C-típusú lektin opszonin receptorokon keresztül a neutrophil kötődik a patogénekhez, melyet azok speciális vakuolába, a phagosomába történő igen hatékony és gyors bekebelezése követ [186-188]. Eztán a phagosoma intracelluláris preformált granulomok fúziójának hatására egy ún. érési folyamaton megy keresztül. A preformált granulomok többek között hidrolázokat illetve a NADPH-oxidáz elemeit tartalmazzák.

A neutrophilek phagocytosisa sok szempontból hasonló a másik legfontosabb phagocytá, a macrophag hasonló folyamataival, de lényeges eltérések is vannak. A

neutrophilekben a bekebelezés és a phagosoma érése is gyorsabban megy végbe [189]. Az érési folyamat a neutrophilekben Ca^{2+} -függő, míg macrophagokban nem [190, 191]. A teljesen érett phagosoma a neutrophilekben pH semleges, míg a macrophagokban savas [192], a phagosomák érése továbbá.

A neutrophilek phagocytosisának gyorsasága a patogének eliminációja szempontjából általában egyértelműen előnyös, de hátulütői is vannak. A folyamat ugyanis nem teljesen tökéletes, ezért előfordulhat, hogy a preformált granulomok fúziója már azelőtt bekövetkezik, mielőtt a phagosoma teljesen le lenne zárva. Annak tartalma így a környezetbe kerülhet, ahol járulékos szövethárosodást okozhat [193].

A neutrophilek receptoraikkal képesek felismerni a kiterjedt felszínhez – pl. basalis membránhoz – kötődő immobilizált immunkomplexeket illetve komplement elemeket. Bekebelezni azonban ezeket nem tudják, de mégis megpróbálják. Ennek eredménye az ún. *frusztrált phagocytosis*, melynek során a phagosoma érése ugyanúgy megtörténik, azonban mivel a phagocytosist befejezni, a phagosomát lezárni a sejt nem tudja, annak tartalma így az extracelluláris térbe ürül. Ez a mechanizmus állhat számos immunkomplex-függő autoimmun gyulladás kapcsán kialakuló szövethárosodás hátterében.

Thrombohaemorrhagiás vasculitis esetén pl. az endothelen C3 rakódik le, melyet a neutrophil a CR3-n keresztül felismer, aktiválódik és megpróbálja azt phagocytálni. Ez azonban nem sikerülhet, ezért *frusztrált phagocytosis* következik be, amely az érfal sérüléséhez és vérzés kialakulásához vezet [22].

3.1.4.2. Reaktív oxigén szabadgyökök termelése

A phagocytosissal együtt a neutrophil oxigénfogyasztása drámai módon emelkedik. Ezt a folyamatot *oxidatív robbanásnak* nevezzük, végeredménye a NADPH oxidáz (NOX2) működésén keresztül reaktív oxigén intermedierek (ROS) képződése, melyek fontosak a patogének eliminációjában (**5. ábra**), hiányukban krónikus granulomatosis (CGD) alakul ki ([194] és **1. táblázat**).

A reaktív oxigén intermedierek képzésének előfeltétele a számos elemből álló NADPH oxidáz komplex összeépülése. Megfelelő stimulus hatására a citoplazmából a p47^{phox} , p67^{phox} és p40^{phox} molekulák a membránhoz kötődnek, majd ott kapcsolódnak a $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (NOX2), $\text{gp22}^{\text{phox}}$ és rac2 molekulákkal [194].

A NADPH oxidáz által termelt metabolitok önmagukban is hatékonyak lehetnek, de tovább is alakulhatnak. A neutrophilek granulumaiban található myeloperoxidáz (MPO) pl. az így képződött hidrogén-peroxidot alakítja tovább toxicus hipoklórsavvá [195].

A neutrophilek primingja illetve bakteriális fertőzés fokozza a citoplazmában található indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) enzimet. A felszabaduló NO hasonló hatású lehet, mint a reaktív oxigén intermedierek, azok hatását kiegészíti. Amennyiben mindkettő hiányzik *gp91phox^{-/-}Nos2^{-/-}* kettős mutáns állatokban a normál bélflóra is súlyos megbetegedéseket hoz létre, míg bármelyikük egyszeres hiányában ez nem következik be [196].

3.1.4.3. Degranuláció

A neutrophilek citoplazmájában található granulumok fontos antimikrobiális peptideket, proteázokat tartalmaznak [197] (**5. ábra**). Normális esetben a fagosomával fuzionálnak annak érése során, tartalmuk így közvetlenül a bekebelezett mikrobával kerül kapcsolatba. Ritkábban fuzionálhatnak azonban a plazmamembránnal is, tartalmuk így az extracelluláris térbe ürül. Általában neutrophil aktiváció hatására a szekretoros és a harmadlagos granulumok fuzionálnak a plazmamembránnal. A szekretoros vezikulákban található adhéziós és kemotaktikus receptorok kikerülése fontos része lehet a normális migrációs folyamat szabályozásának. Ezzel szemben az elsődleges és másodlagos granulumok tartalmának kikerülése általában káros, és az csak a phagosoma nem megfelelő zárásából fakadóan következhet be, pl. frusztrált phagocytosis során. A másodlagos és harmadlagos granulumok proteázainak kiürítése ugyanakkor a transzmigráció folyamán hozzájárulhat a basalis membrán kollagénjeinek lebontásán keresztül a neutrophilek útjában álló akadályok leküzdéséhez, és segítheti a további extravasatiót.

A granulumokban található antimikrobiális peptidek, α -defensinek és cathelicidinek (legismertebb képviselőjük az LL37) szerepét újabban igen intenzíven kutatják. Ezek a patogének membránjának anionjaihoz kötődve képesek olyan pórusok kialakítására, melyeken keresztül a DNS-t vagy az RNS-t károsító molekulák juthatnak be [198]. Ezen túl az LL37 nem csak közvetlenül az eliminációban, hanem a neutrophilek immunmoduláns működésiben is részt vesz: kemotaktikus és priming hatása is van, a receptora azonban egyelőre még ismeretlen [199].

3.1.4.4. Neutrophil extracellular traps

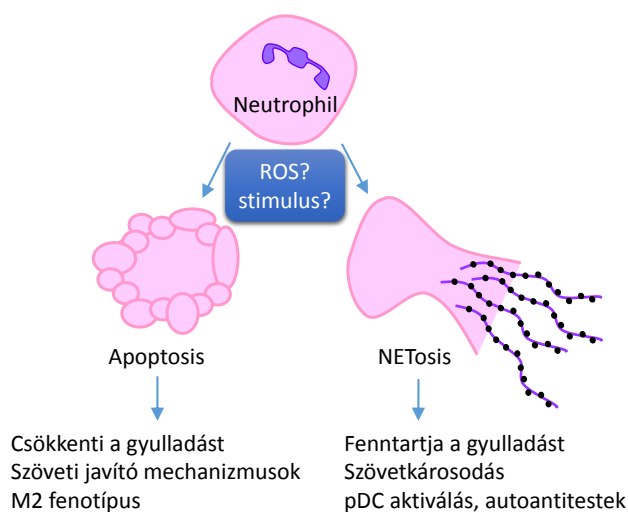
A neutrophilek effektor válaszai közül az utóbbi időkben a legjobban kutatott és leginkább vitatott folyamat a *neutrophil-eredetű extracelluláris csapdák* (neutrophil extracellular traps, NET) képzése [200-203], melynek során a neutrophilből kromatinszálak kerülnek

ki, azokhoz pedig myeloperoxidáz, elasztáz és antimikrobiális peptidek kötődnek. A felfedezésük kapcsán elsőként meglehetősen szkeptizmussal tekintettek rájuk, de egyre inkább igazolást nyer mind a létezésük, mind az aktív szerepük a fertőzésekkel szembeni védekezésben és egyes autoimmun folyamatokban [86].

A NET-ek képződésének folyamata, az ún. *NETosis* a sejthalál egy speciális, ezidáig csak neutrophilekre jellemző formája, mely során a granulum- és magmembránok feloldódnak, majd a dekonzenzált kromatint és az ahhoz kötődő granulumfehérjéket (MPO, elasztáz, LL37), a sejt „kiköpi” magából [204] (**5. ábra**).

A neutrophil extracelluláris csapdák a nevüknek megfelelően hozzátapadnak, „elfogják” a patogéneket, és ezzel egyidejűleg közvetlenül kiteszik őket az antimikrobiális peptidek lokális nagy koncentrációjának (LL37, S100A, laktoferrin-keletor, stb.), illetve térben egy helyre összpontosítva egyszerre számos antimikrobiális peptid hatást egyszerre, azok hatása így megsokszorozódhat [205, 206]. Ezen túl maguknak a hisztonoknak is lehet antimikrobiális hatása [205].

Érdekes a *NETosis* kapcsolatban, hogy az így „elpusztult” neutrophileken



6. ábra: A neutrophilek sorsa: apoptosissal vagy NETosis

A neutrophilek vagy apoptosissal vagy NETosisal pusztulnak el, mely meghatározza a gyulladásos folyamat progresszióját. NET, neutrophil extracellular traps; M2, macrophag 2; pDC plasmocytoid dendritic cell

fenntartásával, míg az utóbbi a neutrophilszám csökkenésével, az *eat-me* szignálokon keresztül azok eltakarításával, összességében inkább a gyulladás csillapodásával jár (**6. ábra**).

nincs ún. *eat-me* szignál, ezért azokat nem macrophagok, hanem különféle nukleázok takarítják el [204]. Ugyanakkor vannak bizonyítékok arra nézve, hogy a *NETosis* nem jelenti a neutrophil végét: a mag nélküli „porhüvely” képes migrálni és hagyományos mechanizmussal ölni [207]. Ha ez igaz, akkor az egész gyulladásos folyamat szempontjából egyáltalán nem mindegy, hogy a neutrophil a *NETosis*t vagy az apoptosist választja: az előbbi az antimikrobiális kapacitás növelésével és a gyulladás

Egyelőre azonban nem ismerjük a döntési mechanizmus részleteit, a reaktív oxigén intermedierek termelése pl. mindkettőben fontos lehet. A NETosis folyamatát különféle gyulladási mediátorok (TNF, immunkomplexek, IL-8), bakteriális, gomba- és protozoon eredetű PAMP-ok is képesek kiváltani [208].

Mint szinte minden hatékony pusztító mechanizmusnak a NETosisnak is vannak árnyoldalai. A sok NET ugyanis kóros tényező lehet vasculitisek [209], sepsis [208] és SLE nephritis esetén [210], sok gyulladási molekulát és autoantigént tartalmaznak [211], aktiválhatják a thrombocyták aggregációját, mely thrombosishoz és érsérüléshez vezethet [212]. A nagyfokú NETosis és az endothel aktivációja összefüggésbe hozható a terhességi preeclampsiaival is [213].

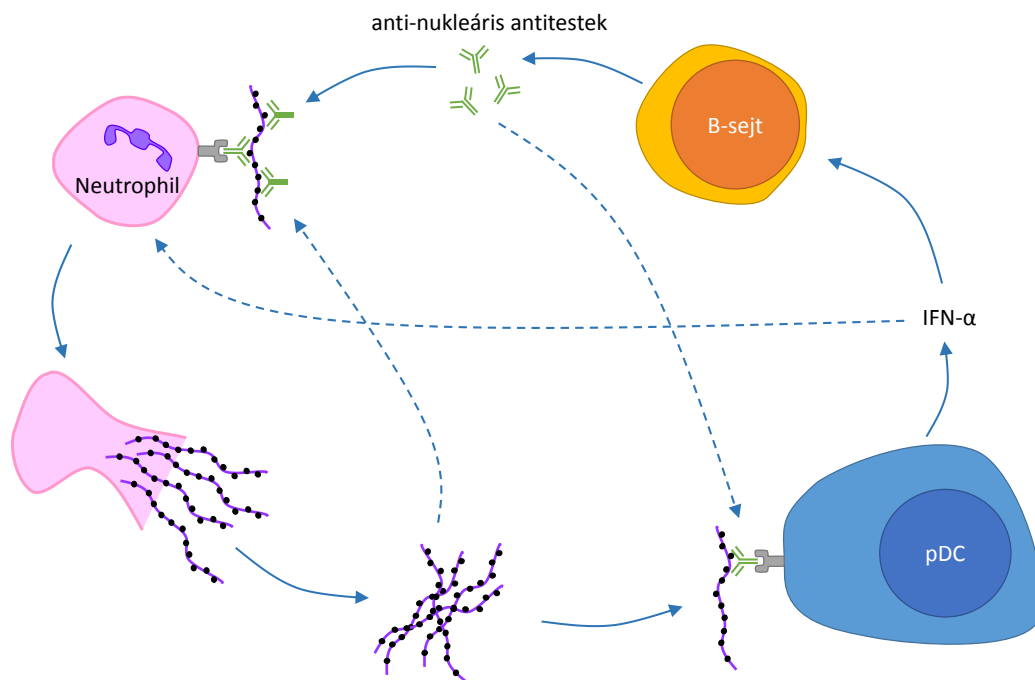
3.1.5. A neutrophilek immunmodulátor működése

A korábbi nézetekkel ellentétben ma már nem úgy tekintünk a neutrophilekre, mint terminálisan differenciált, egy szerepre korlátozott sejtekre, hanem úgy, mint akik transzkripcióban és funkcionálisan aktív szereplői és sejt felszíni molekuláik illetve az általuk termelt citokinek segítségével befolyásolói a teljes immunválasznak [40]. Ezen immunmodulátor működésük során az immunrendszer számos egyéb sejtjével lépnek kölcsönhatásba: dendritikus sejtekkel, lymphocytákkal, természetes ölü (NK) sejtekkel, macrophagokkal, illetve az endothel és az epithel sejtjeivel is.

3.1.5.1. Dendritikus sejtek (DC)

Sok, a neutrophilekből származó molekula, így az α -defensinek, a laktoferrin vagy egyes citokinek (pl. CCL3) szükségesek a dendritikus sejtek gyulladás helyére történő gyors migrációjához [214, 215]. Ott pedig a neutrophilek és a dendritikus sejtek közvetlen kapcsolódása hozzájárul az utóbbiak hatékonyabb antigénprezentációt szolgáló éréséhez, illetve közvetlen hozzáférést biztosít a dendritikus sejteknek a neutrophilek által megkötött patogénekhez [216, 217].

Ezen kapcsolatoknak több autoimmun betegségben is fontos szerepe van, többek között Crohn betegségben [218], SLE-ben és diabetesben [219, 220]. A NET-ek és hozzájuk kapcsolt LL37 peptidek IFN- α -t szabadítanak fel a plasmocitoid dendritikus sejtekből, mely egyrészt hozzájárul a kromatin-LL37 komplexet felismerő autoreaktív lymphocyták és végső soron autoantitestek kialakulásához, másrészt további neutrophileket készítet NETosisra. Ezáltal pedig alapját képezi egy önerősítő, gyulladást fenntartó feedback körnek [32] (**7. ábra**).

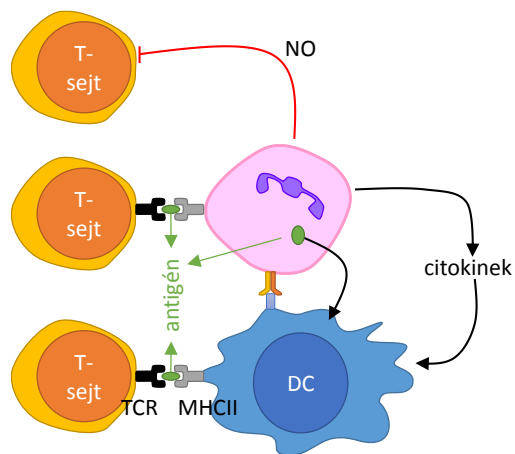


7. ábra: Neutrophilek és dendriticus sejtek autoreaktív önerősítő kört hozhatnak létre
A NETosissal elpusztult neutrophilekből kikerülő DNS és kromatin komplexekekhez autoantitestek kapcsolódnak, melyek így neutrophileket és plasmocytoid dendriticus sejteket (pDC) aktiválnak. Ez pedig interferon α (IFN- α) közvetítésével B-sejteket aktivációjához és további autoantitestek képzéséhez vezet.

3.1.5.2. T- és B-lymphocyták

A neutrophilek bizonyos körülmények között antigén prezentáló sejtekként (APC) is működhetnek. IFN- γ stimulus hatására MHC II-t és a Th1, Th17 irányú T-sejt differenciációra ható koreceptorokat fejeznek ki [221] (**8. ábra**), mely kimutatható Wegener granulomatosisban [222], rheumatoid arthritisben [223] és a colitis egy egérmodelljében is [224].

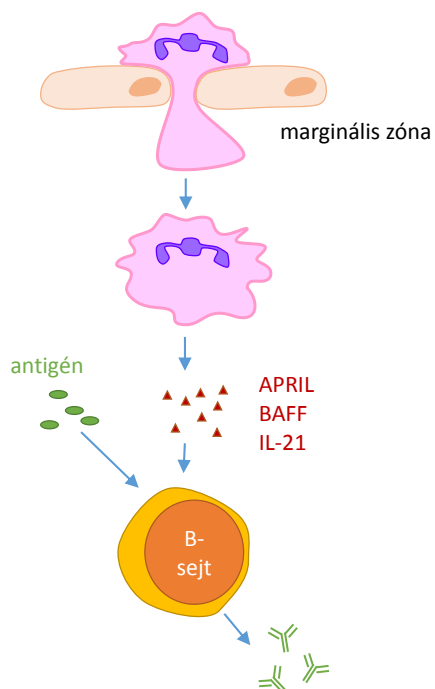
Vannak adatok arra nézve, hogy a neutrophilek nem csak helyben képesek APC-ként működni, de a nyirokereken keresztül a nyirokcsomókba is elvándorolhatnak, ahol vagy közvetlenül T-sejteket vagy dendriticus sejteket aktiválnak [225, 226] (**8. ábra**). A



8. ábra: Neutrophilek közvetlen és közvetett aktiváló illetve gátló hatása T-sejtekre

A neutrophilek gátolhatják a T-sejtek működését, illetve antigéneket prezentálhatnak azoknak közvetlenül, vagy közvetve dendriticus sejteknek átadva, azokat citokinekkal és direkt kapcsolatokon keresztül aktiválva. DC, dendritic cell; TCR, T-cell receptor; MHC, major histocompatibility complex; NO, nitrogén monoxid.

bőrből virális antigéneket szállíthatnak a csontvelőbe, így hozzájárulva CD8⁺ memória T-sejtek kialakulásához [227].



9. ábra: A neutrophilek képesek aktiválni a marginális zóna B-sejtjeit

APRIL, a proliferation inducing ligand; BAFF, B cell-activating factor (= B lymphocyte stimulator, BLyS), IL-21, interleukin 21.

Ezekon túl bizonyos körülmények között akár immunosuppresszív hatásuk is lehet, egy NO-függő mechanizmussal gátolhatják IFN- γ -t termelő T-sejtek kialakulását [228], illetve reaktív oxigén intermedierek segítségével az immunológiai szinten keresztül T-sejt-anergiát válthatnak ki [229].

A neutrophileknek ezen túl fontos szerepe lehet a T-sejtektől független antigének elleni B-sejtválasz kialakításában is [230], nagyrészt a B-sejtek túléléséhez szükséges citokinek, a B-sejt aktiváló faktor (B cell-activating factor, BAFF; más néven B lymphocyte stimulator, BLyS) és az APRIL (a proliferation inducing ligand) elválasztásán keresztül [231]. Lépben a PAMP-ok által aktivált neutrophilek IL-21-t, BAFF-ot és APRIL-t termelnek, amelyek közvetlenül, T-sejtek részvétele nélkül aktiválják és proliferációra készítetik a marginális zóna B-sejtjeit [230] (9. ábra). A keringő

neutrophilek azonban erre nem képesek, ami arra utal, hogy a lépben van valami speciális szabályozó mechanizmus, ami erre képessé teszi őket.

3.1.5.3. Macrophagok

A neutrophilek és a macrophagok számos ponton együttműködnek az immunválasz során. Kölcsönös kapcsolataik mind a gyulladás beindításában és fenntartásában, mind annak leállításban fontosak.

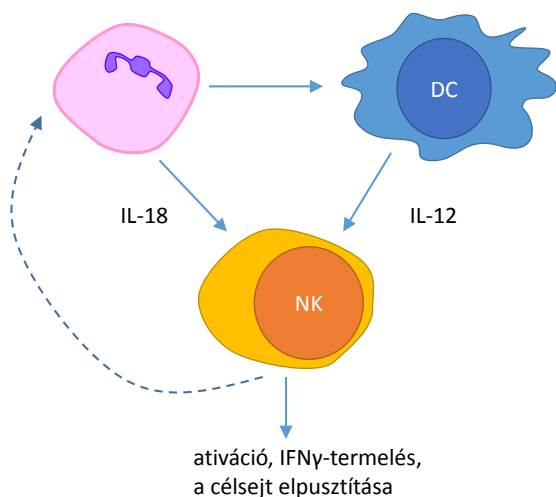
A neutrophilek által elválasztott CCL2, CCL3, CCL19 és CCL20 citokinek illetve granulomfehérjék (pl. a S100A vagy az emberi LL37 homológja, a cathelicidin-related antimicrobial peptide, CRAMP) a gyulladás helyére vonzzák a monocytákat és erősítik a macrophagok effektor működéseit [41, 232, 233].

Amennyiben a neutrophilek apoptosissal pusztulnak el, a felszínükre kikerülő *eat-me* szignálok hatására a macrophagok bekebelezik őket, ami csökkenti a macrophagokban az IL-12 és az IL-23, illetve növeli az IL-10 termelését. Ennek hatására M2-szerű fenotípus

alakul ki, és a szöveti javítófolyamatok kerülnek előtérbe [234]. A csökkenő IL-23 pedig a T-sejtek IL-17-, majd a stroma G-CSF-elválasztásán keresztül végül a neutrophilek számának csökkenéséhez vezet (l. 3.1.1).

3.1.5.4. Természetes öló (NK) sejtek

A neutrophilek szükségesek nyugalmi körülmények között az NK sejtek végső éréséhez,



10. ábra: Neutrophilek, dendriticus sejtek és NK-sejtek együttműködése
IL, interleukin; NK, natural killer; DC, dendritic cell; IFN, interferon.

bár ennek pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert [235]. Fertőzések kapcsán ugyanakkor tudjuk, hogy a neutrophilek citokineket termelnek, melyek közvetlenül aktiválhatják az NK-sejteket: *Legionella* fertőzésben pl. a neutrophilekből származó IL-18 szükséges ahhoz, hogy az NK sejtek IFN- γ -t termeljenek [236]. A teljes aktivációhoz fontos a dendriticus sejtek IL-12-termelése is, ez pedig felveti a lehetőségét egy hármas neutrophil–DC–NK-sejt együttműködésnek (10. ábra), melynek nyomai pl. Crohn betegségben kimutathatók [237].

Az együttműködés részeként az NK sejtekből felszabaduló citokinek a neutrophilek primingjához és túlélésük fokozódásához vezetnek [32].

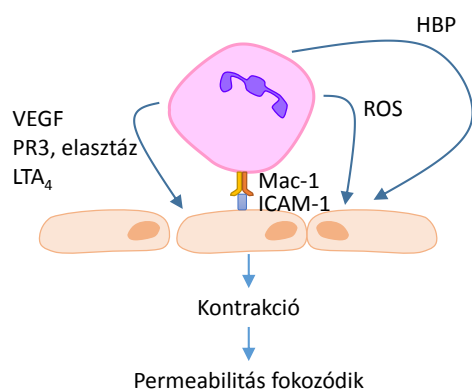
3.1.5.5. Endo- és epithelsejtek

A gyulladás során a neutrophilek és az endo- vagy epithelsejtek közötti kapcsolatok jelentősen befolyásolhatják ez utóbbiak barrier-funkcióját [238]. A transzmigráció következtében aktiválódott jelátviteli utak az endo- vagy epithelsejtek kontrakciójához és ezen keresztül a közöttük lévő rések kialakulásához illetve megnagyobbodásához vezetnek, mely elősegítheti további neutrophilek toborzását is, de a barrier integritásának megszakadása a permeabilitás fokozódásával és folyadék kilépésével jár, amely hozzájárulhat egyes gyulladások esetén pl. a pulmonaris oedema vagy a hasmenés kialakulásához (11. ábra).

Számos neutrophil eredetű faktor, így a VEGF, egyes szerin proteázok (pl. elasztáz vagy PR3) illetve a leukotrién A₄ hat az endo- vagy epithelsejteken található receptoraikra: a VEGF a VEGF-receptorra, a szerin proteázok a különböző proteáz aktivált receptorokra

(PAR), az LTA_4 pedig a COX1-re és COX2-re, melyek tromboxánná alakítják azt. A végeredmény pedig az aktin citoszkeleton átrendeződése és a sejt kontrakciója [239] (**11. ábra**).

Hasonló hatása van az ICAM-1 és a Mac-1 (LFA-1) kapcsolódásának, a reaktív oxigén



11. ábra: A neutrophilek által kiváltott endothel-kontrakció mechanizmusa

VEGF, vascular endothelial growth factor; PR3, proteáz 3; LTA_4 , leukotrién A_4 ; HBP, heparin binding protein; ROS, reactive oxygen species; Mac-1, macrophage-1 antigen; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1.

gén intermedierek termelődésének [240] illetve a neutrophilek szekretoros és azurophil granulumaiból felszabaduló heparin binding proteinnek (HBP) [241] (**11. ábra**). Ez utóbbi inaktiválása kivédi a neutrophilek endothelpermeabilitást fokozó hatását *in vivo* [242]. A HBP a sepsissel vagy shockkal társuló pulmonaris oedema esetén prognosztikai faktorként is használható [243].

A neutrophilek és az endothel kétirányú kapcsolata alapját képezheti egy újabb öngerősítő szabályozó körnek, amennyiben a neutrophilek aktiválják az endothelt, annak megváltozik a felszíne, ez pedig újabb neutrophilek számára jelent transzmigrációs szignált [32, 244].

3.1.5.6. Neutrophil eredetű mikropartikulumok

A mikropartikulumok a sejteknél lényegesen kisebb, az eredeti sejtre jellemző felszíni molekulákat (pl. neutrophilek esetén CD11b-t, CD66-t és CD62L-t) tartalmazó membránnal határolt képletek, melyeket felismerésükkor a sejtek (thrombocyták) szétesésekor keletkező melléktermékeknek vélték. Mára azonban világossá vált, hogy mikropartikulumok számos más sejtípusból is származhatnak, és egyéb – pl. közvetlen antibakteriális [245] – funkcióik mellett a felszínükön található molekulákkal aktívan képesek befolyásolni egyes sejtek működését.

Immunmoduláns hatásukon kívül közvetlenül is hozzájárulhatnak a patogének eliminációjához. Ezen szerepük független a reaktív oxigén intermedierektől és úgy tűnik, hogy a patogének membránjához való kötődésen keresztül azok immobilizálása játszik benne szerepet [245].

3.1.6. Neutrophil funkciók zavarai és az azokhoz köthető betegségek

A különböző neutrophil funkciók működésére vonatkozó ismereteink legfőképpen genetikailag módosított egereken illetve humán neutrophileken *in vitro* végzett kísérletekből származnak. Az immunválasz szerveződése és működése azonban a két faj esetén némileg eltér [246], az esetleges járulékos hatások, kompenzáció miatt pedig a génihiányos állatok vizsgálatának is vannak korlátai, nem beszélve az *in vitro* humán vizsgálatokról, ezért a rendelkezésre álló ismeretek általában nem alkalmazhatók egy az egyben az emberi patológia megértéséhez.

Fordítva viszont az emberi patológia sokszor nagyon sokat segíthet a neutrophilek egyes funkcióinak és azok fontosságának megismerésében. Az egyes öröklődő neutrophil migrációs defektusok vizsgálata vezetett el a migrációban részt vevő molekulák azonosításához (pl. a leukocyta adhézíós defektusok). A NADPH oxidáz hiányában kialakuló krónikus granulomatosis hívta fel a figyelmet az ölü funkciók fontosságára, míg egyes mintázatfelismerő receptorok vagy azok szignalizációs molekuláinak károsodása kapcsán derült fény ezek relatív fontosságára a normális immunműködések szabályozásában.

Egyes neutrophil funkciók károsodásához köthető legjelentősebb betegségeket, az azokhoz vezető molekuláris patomechanizmust, a legjellemzőbb laboratóriumi eltéréseket illetve klinikai tüneteket az **1. táblázat** foglalja össze.

Egereken végzett kísérletekből arra lehetne következtetni, hogy a neutrophilfunkciók egyes zavarai védelemet jelentenének a neutrophilek túlaktiválódásával járó autoimmun kórképekkel szemben. Szerencsére azonban mind az előbbieket (neutrophilfunkció-zavarok), mind az utóbbiak (autoimmun betegségek) meglehetősen ritkák, a kettő együttes előfordulásának esélye pedig ennek megfelelően igen kicsi. Ebből fakadóan a fenti feltételezést mindeztáig egyértelműen sem megerősíteni, sem pedig cáfolni nem sikerült [32].

1. táblázat: Egyes neutrophil-funkciók zavarához köthető betegségek ([32] és [247] alapján)

Betegség	Okok	Laboratóriumi eltérések: neutrophil defektusok	Klinikai tünetek
Neutrophilek képzésének zavarai			
Súlyos kombinált neutropenia (Severe Combined Neutropenia, SCN) [248-252]	neutrophil elasztáz domináns mutációi (60 %) [249] HAX-1 vagy G6PC3 recesszív mutációi [250, 251] szerzett G-CSF receptor mutációk (gyakran fokozott jelátvitel, mely apoptosishoz vezet) [252]	neutropenia (<500 / μ l vér) neutrophil érési zavar, premyelocyták vagy egyéb éretlen előalakok felszaporodása a csontvelőben	visszatérő bakteriális és gombás fertőzések leukemia (kb. 25 % 20 év alatt), főként szerzett G-CSF mutációk esetén [252]
A neutrophilek toborzásának zavarai			
Leukocyta adhézíós deficiencia I (LAD-I) [253]	a β_2 integrinek hiányával vagy hibás működésével járó CD18 (<i>ITGB2</i>) mutációk	kemotaxis, aggregáció, adhézíó,	jelzett leukocytosis és neutrophilia, súlyos visszatérő fertőzések, periodontitis, késői köldökzsinórleválás

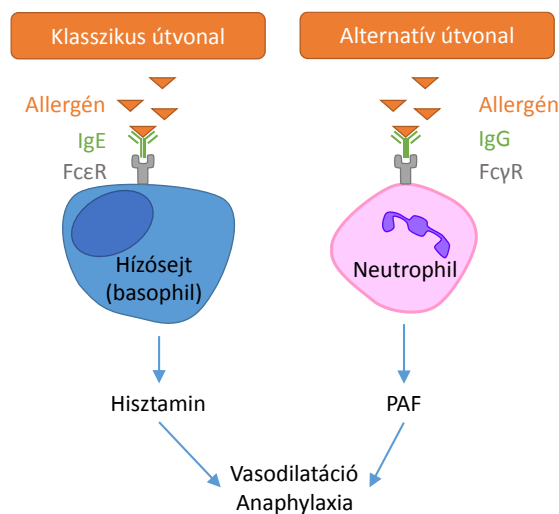
		immunkomplex- és komplement-függő phagocytosis zavara	
Leukocyta adhéziós deficiencia II (LAD-II) [253]	a Golgi GDP-fukóz transzporterének (<i>SLC35C1</i>) a fukóz metabolizmus zavarával járó mutációi: a fukóz szükséges a szelektin-ligandok képzéséhez	szelektin-függő neutrophil gördülés hiánya	jelzett leukocytosis és neutrophilia, súlyos visszatérő fertőzések, periodontitis fukóz-hiányra visszavehető egyéb zavarok: mentális retardáció, Bombay vércsoport, a Lewis vércsoport hiánya
Leukocyta adhéziós deficiencia III (LAD-III) [253]	Kindlin-3 (<i>FERMT3</i>) mutációk következtében a β integrinek inside-out szignalizációja károsodik	a CD18-függő szoros kapcsolat és migráció zavara a szelektin-függő gördülés érintetlen	jelzett leukocytosis és neutrophilia, súlyos visszatérő fertőzések, késői köldökzsínör-leválás, vérzeshajlam (a vérlemezke integrinek zavara miatt)
Neutrophil aktiváció zavarai			
MyD88 és IRAK-4 deficiencia [254]	a TLR-jelátvitelben szereplő MyD88 (<i>MYD88</i>) és IRAK-4 (<i>IRAK-4</i>) funkcióvesztéssel járó recesszív mutációi	súlyosan károsodott TLR1/2, TLR2/6, TLR4 és TLR7/8-n keresztül bekövetkező adhéziós molekula (L-szelektin, CR3)-expresszió, reaktív oxigén szabadgyökök és citokin-termelés illetve túllélés a TLR9 nem érintett [255] a NADPH oxidáz aktiválódása gátolt [256]	visszatérő súlyos gennyes fertőzések
Dectin-1-hiány [254, 257]	funkcióvesztéssel járó recesszív Dectin-1 (<i>CLEC-7A</i>)-mutációk a Dectin-1 felelős a gombák sejtfalában található β -1,3-glukánok illetve a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> egyelőre ismeretlen alkotórészének felismeréséért	a perifériás vér monocytáinak citokin-termelése károsodott (neutrophil funkciókról nincs adat)	a klasszikus krónikus mucocutan candidiasisnál kevésbé súlyos mucocutan gombás fertőzések, onychomycosis
CARD9-hiány [257]	funkcióvesztéssel járó recesszív CARD9 (<i>CARD9</i>)-mutációk a CARD9 intracelluláris adapter fehérje felelős az NF- κ B aktiválásán keresztül Dectin-1-függő kemokin-termelésért	egyelőre nem ismert	főként mucocutan gombás fertőzések, fokozott disszeminált candidiasis-hajlammal (meningitis)
A patogének elpusztításának zavarai			
Krónikus granulomatosis (Chronic Granulomatous Disease, CGD) [32, 194]	a NADPH oxidáz komponenseit érintő mutációk X kromoszómához kötött: gp91 ^{phox} egyéb autoszómális recesszív: p47 ^{phox} , ritkábban: p22 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox}	kiesik a reaktív oxigén szabadgyökök termelése	kataláz-pozitív baktériumok (<i>S. aureus</i>) és gombák (<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i>) okozta súlyos fertőzések állandó, kiterjedt gyulladás, genny, granulomák gyakoran Crohn betegséghez illetve ulceratív colitishoz hasonló krónikus bélgyulladás (bélflóra túlnövése, barrier funkció károsodása miatt) [258]
Chédiak-Higashi szindróma [32, 259]	a lizoszóma-körforgást irányító <i>LYST</i> (<i>LYST</i>) funkcióvesztő recesszív mutációi	hatalmas abnormális granulomok cytotoxicus T-lymphocita zavar	neutropenia, fogékonyság a gennykeltők, különösen a <i>S. aureus</i> okozta fertőzésekkel szemben, periodontitis egyéb tünetek: neurológiai zavarok, vérzések, lymphoproliferatív betegségek
Neutrophil-specifikus granulom hiány (Neutrophil-specific Granule Deficiency, SGD) [32]	funkcióvesztéssel járó C/EBP ϵ (<i>CEBPE</i>) vagy Gfi-1 (<i>GFI1</i>) mutációk, másodlagos és harmadlagos granulomok következményes hiánya [260]	kemotaxis-zavarok, csökkent MPO- és egyéb granulomfehérje-ürítés	visszatérő bőr-, fül- és légzőszervi bakteriális fertőzések, visszatérő bakteriális sinusitis
MPO-hiány [261]	az <i>MPO</i> gén expressziót gátló recesszív mutációi	hiányzik az MPO	önmagában minimális, egyéb zavarokkal kombinálva <i>Candida albicans</i> vagy egyéb gombás fertőzések

3.1.7. Neutrophilek szerepe krónikus gyulladásos betegségekben

Akut gyulladásokban nyilvánvaló a neutrophilek szerepe, de számos adat utal arra, hogy egyes krónikus (gyulladásos) betegségekben is fontosak akár a betegség beindítása, akár fenntartása vagy a tünetek alakulása szempontjából. A neutrophilek tehát jogos célpontok lehetnek ezen krónikus (gyulladásos) betegségek kezelésében is.

3.1.7.1. Allergiás kórképek

Az allergiás folyamatokat és az anaphylaxiát a mai napig szinte kizárólag az IgE-re, az Fcε-receptorokra, a hízósejtekre és a belőlük felszabaduló hisztaminra vezetjük vissza, pedig azokban a neutrophileknek illetve az IgG-nek is fontos szerepe lehet. Egér és humán neutrophilek ugyanis Fcγ-receptor-függő módon képesek IgG hatására *in vivo* anaphylaxiás reakció kiváltására [262], hozzájárulnak a tüdő krónikus mycoplasma-fertőzéshez társuló allergiás gyulladáshoz [263], illetve elengedhetetlenek a kontakt dermatitis szenzitizációs fázisában is (F. Weber, Németh T., Mócsai A. és mts., nem publikált megfigyelések). Ezen felismerések újszerűsége miatt a neutrophilek tényleges emberi allergiás kórképekben való szerepe még alig tisztázott.



12. ábra: Az anaphylaxia alternatív, neutrophil-mediált útvonala
Ig, immunoglobulin; *Fcγ/εR*, *Fcγ/ε-receptor*; *PAF*, platelet activating factor.

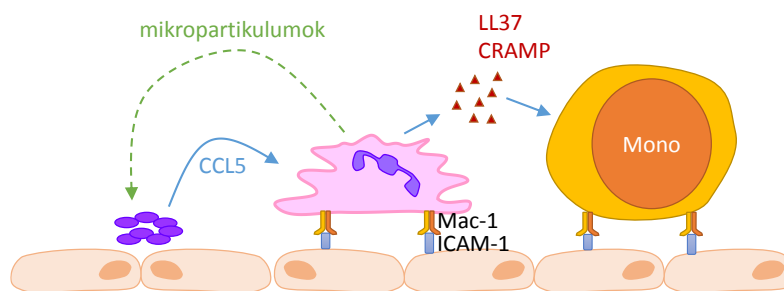
3.1.7.2. Gyulladásos bélbetegségek

A gyulladásos bélbetegségekben (inflammatory bowel disease, IBD), a Crohn betegségben és a colitis ulcerosában a belek falában jelentős gyulladásos sejtinfiltráció figyelhető meg, melynek nagy részét neutrophilek alkotják, sőt a neutrophilinvázió mértéke a betegség súlyosságának prognosztikai faktora is egyben [71]. A patomechanizmusban játszott szerepük legnagyobb részét visszavezethető az epithel barrierfunkciójának károsításához (l. 3.1.5.5).

3.1.7.3. Atherosclerosis

Az atherosclerosis egy krónikus betegség, melynek hátterében az endothel felszínén gyulladáskeltő lipidek lerakódása és a következményes, lényegében kontrollálatlan gyulladás áll [264]. Az atheroscleroticus laesiókban a neutrophilek kimutathatók mind emberben [265], mind pedig egérben [266-268]. A myeloperoxidáz eredetű ROS az endothelsejtek apoptózisának kiváltásán és a lipidperoxidáló hatásukon keresztül hozzájárulhat a betegség kialakulásához [269]. Számos, az aktivált neutrophilek granulumaiból kiszabaduló fehérje, így α -defensinek és az LL37 is kimutatható az emberi atheroscleroticus laesiókból [270, 271], melyek a kromatin-LL37

komplexeiket tartalmazó NET-ekkel együtt monocytákat vonzhatnak, és hozzájárulhatnak azok aktivációjához is [233, 272] (**13. ábra**). Egérben a neutrophilek szerepét támasztja alá, hogy a CXCR2-



13. ábra: Neutrophilek, monocyták és thrombocyták atherosclerosisban

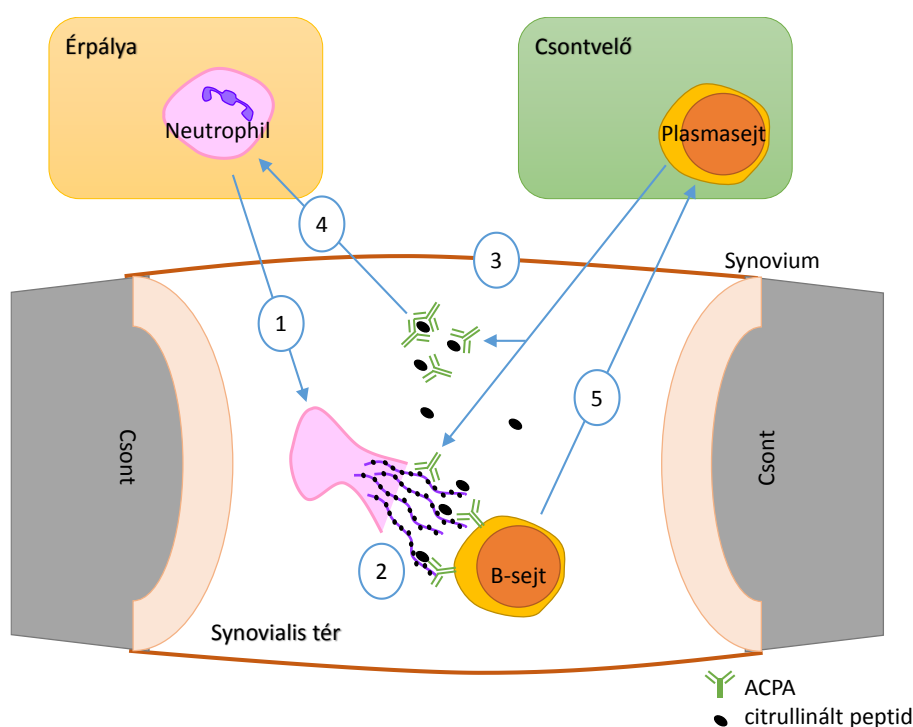
hiányában a következményes neutropenia jelentősen csökkenti az atherosclerosis mértékét [273], ugyanakkor a neutrophilek csontvelőből történő fokozott felszabadulásával járó CXCR4- vagy CCL12-hiányos állatokban az emelkedett perifériás neutrophilszámmal párhuzamosan az atherosclerosis is súlyosabb [274]. Azon kívül, hogy a neutrophilek növelik a laesiók méretét, mikropratikulumaik hatására aktiválják a vérlemezkéket is, amely fokozza a thromboemboliás szövődmények kockázatát ([275] és l. **3.1.5.6**). Az aktivált vérlemezkék ugyanakkor CCL5 elválasztásával további neutrophileket is vonzhatnak [266].

3.1.7.4. Autoimmun betegségek

A neutrophilek szerepe mindközül talán az autoimmun betegségek patomechanizmusában a leginkább ismert és elfogadott. Effektor válaszaik nem megfelelő helyen és időben történő aktiválódása szövetkárosodáshoz vezet, ugyanakkor autoantigének forrásául is szolgálhatnak. Ráadásul immunmoduláns működésük egyre részletesebb megismerése óta a neutrophilek szerepe korábban soha nem látott mértékben hangsúlyossá vált.

3.1.7.4.1. Rheumatoid arthritis

A rheumatoid arthritis (RA) az emberi populáció kb. 1 %-át érintő autoimmun gyulladással járó betegség [276, 277], mely jelentős fájdalommal, synovialis hyperplasiával és az ízületi struktúra normál működését jelentősen korlátozó roncsolódásával jár [86]. A neutrophilek szerepét alátámasztja, hogy a betegek ízületeiben nagyon sok van belőlük, főleg az ízületi károsodások szempontjából döntő helyen, a pannus és a porc határán [278], ahol nem csak passzív nézelődők, hanem bizonyíthatóan aktiválódnak is [279] (**14. ábra**). Ezen túl a neutrophilek számának csökkenése akár neutropenia, akár művi granulocytopheresis következtében a betegség enyhülésével jár [280-282].



14. ábra: Neutrophilek részvétele az RA patomechanizmusában

Az ábrán a folyamatokat számoztam, de a tényleges patomechanizmus pontos sorrendje egyelőre nem teljesen tisztázott. **1.** A neutrophilek az érpályából a synovialis térbe jutnak, ahol **2.** aktiválódnak és **3.** fokozzák a synovialis membrán permeabilitását, ez által további antitestek, pl. anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) léphetnek be. **2.** A neutrophilek NET-eket képezhetnek át, a NET-ek pedig megköthetik a citrullinált fehérjéket fokozva azok hozzáférhetőségét pl. B-sejtek számára. **4.** ACPA-citrullinált fehérjékből álló immunkomplexek hatására további neutrophilek léphetnek be a synovialis térbe. **5.** Naive és/vagy memória B-sejtek felismerik a NET-ekhez kötött citrullinált peptideket, a csontvelőbe vándorolnak és plasmasejteként további ACPA termelésével erősítik a folyamatot.

Az RA patomechanizmusának vizsgálatához régebb óta különféle egérmodelleket alkalmaznak. A kollagén-indukált arthritis modell a betegség teljes spektrumát, azaz az

immunizációs (autoantitestek kialakulása) és az effektor fázist (szöveti károsodások) is modellezi.

A K/BxN szérum transzfer és a humán TNF-transzgén modellek az effektor fázis autoantitest- illetve citokinfüggő mechanizmusainak vizsgálatára alkalmasak ([283-286] ill. [287]). Egyik modellhez sem szükségesek ugyanis T- vagy B-lymphocyták illetve MHC molekulák [2, 288, 289]. Hogy mégis helyük van a rheumatoid arthritis kezelését célzó kutatások eszköztárában azt az igazolja, hogy egyrészt a humán RA-ban is találunk autoantitesteket a betegek synoviumában, sőt azok prediktív faktorként is használhatók [290], másrészt pedig a humán TNF transzgén egereken kifejlesztett anti-TNF terápiák nagyon sikeresek az RA kezelésében [291, 292]. Jelen doktori munkámban bemutatott kísérleteim is az autoantitest-függő K/BxN szérumtranszfer modellen alapultak.

3.1.7.4.2. *Systemás lupus erythematosus (SLE)*

A systemás lupus erythematosus (SLE) bőr, vese és/vagy ízületi érintettséggel járó, a populáció 0,1 %-át érintő (nőkben gyakoribb) autoimmun betegség [293, 294], melyre jellemző a sejtmag antigénjei elleni, különösen az anti-DNS autoantitestek jelenléte. A DNS autoantigének forrásaként felmerül a neutrophilekre jellemző NETosis szerepe is, mely során a sejtmag tartalma és egyes antimikrobiális peptidok, pl. az LL37 az extracelluláris térbe kerülnek, ahol így autoantigénként jelenhetnek meg [203, 219, 295] (**7. ábra**).

3.1.7.4.3. *Autoimmun bőrgyulladások: bullus pemphigoid, epidermolysis bullosa acquisita*

Az autoimmun bőrbetegségek közül a bullosos pemphigoidra (BP) a hemidesmosoma BP180 és BP230 autoantigénjei ellen, míg a meglehetősen ritka epidermolysis bullosa acquisitára (EBA) a 7-es típusú kollagén (collagen type VII, CVII) ellen termelődő autoantitestek jellemzőek [86].

Az EBA-ban szenvedő betegek széruma vonzza a neutrophileket a dermalis-epidermalis határhoz [296]. Egerekben a betegség a CVII-tel történő aktív immunizálással [297], vagy anti-CVII autoantitestekkel is kiváltható [298]. Kísérleteink során mi ez utóbbi megközelítést alkalmaztuk (l. **5.3**). A betegség kialakulása során a neutrophilek migrációja C5a-függő [299], depléciójuk vagy a NADPH-oxidáz hiánya védettséget biztosít [300].

3.1.7.4.4. Autoimmun vasculitis

A kis ereket érintő vasculitisek közül az antineutrophil cytoplasmaticus antitesthez (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) kapcsolt formák minden 50000 emberből egyet érintenek [301]. A betegségben szereplő 2 fő antigén a myeloperoxidáz (MPO), mely ellen az ún. perinuclearis ANCA (p-ANCA), illetve a proteinase 3 (PR3), mely ellen a cytoplasmaticus ANCA (c-ANCA) termelődik. Mindkét molekula a neutrophilek elsődleges granulumaiban található. A p-ANCA kimutatható Churg-Strauss szindrómában, egyes polyangiitisekben és crescendo glomerulonephritisben, míg a Wegener granulomatosisban szenvedő betegek nagy része c-ANCA pozitív. Mind a p-, mind a c-ANCA képes a neutrophilek aktiválására, a reaktív oxigén szabadgyökök és citokinek termelésének kiváltására [302, 303]. Ezen kívül a NETosis is szerepet játszhat, elsősorban a vasculitisszel társuló glomerulonephritis kialakulása során [304]. Az egyes kísérletes állatmodellek mind megerősítették, hogy az autoimmun vasculitis kialakulásában a neutrophileknek fontos szerepük van [305-307].

3.2. Az Src-típusú tirozin-kinázok

Az Src-típusú tirozin-kinázokat elsőként olyan virális onkogének sejtben endogéne megtalálható megfelelőiként azonosították, amelyek felelősek lehetnek a malignus transzformációért és a tumoros megbetegedések kialakulásáért [13, 14].

Valójában a Rous sarcoma víruson (RSV) végzett kutatások során a transzformáló virális *onkogén*, a v-Src eukaryota sejtes eredetének felismerése, majd a sejtben megtalálható eredeti formájának, a c-Src-nek a felfedezése vezetett a *proto-onkogén* elmélet megalkotásához [14]. Ennek eredménye a mutálódott és emiatt abnormálisan aktiválódott kinázokat, pl. a Bcr-Abl-t, a c-Kit-et és az EGF receptort célzó terápiák megjelenése és sikere emberi daganatos megbetegedések gyógyításában [14]. Ennek köszönhetően az Src-kinázok a mai napig a daganatellenes gyógyszerkutatások egyik fő célpontját jelentik [29, 30].

2. táblázat: Az Src-család tagjainak expressziója különböző sejtekben

Src	Ubiquiter; 2 neuron-specifikus izoforma
Fyn	Ubiquiter; T-sejt specifikus izoforma (Fyn T)
Yes	Ubiquiter
Lyn	Agy, B-sejtek, myeloid sejtek (2 alternatív splice variáns)
Hck	Myeloid sejtek (2 különböző transláció-iniciációs hely)
Fgr	Myeloid sejtek, B-sejtek
Blk	B-sejtek
Lck	T-sejtek, NK sejtek, agy
Frk alcsalád	főként epithel
Frk/Rak	
lyk/Bsk	

3.2.1. Szerkezet

Az Src-típusú tirozin-kináz család tagjai az Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Fgr, Lyn, Blk és a Yrk¹. Expressziójuk sejttípusonként változik (**2. táblázat**). Mindegyikük kb. 60 kDa méretű, szerkezetükre jellemző egy egyedi N-terminális-, egy SH3, SH2 és végül egy kináz domain [308] (**15. ábra**).

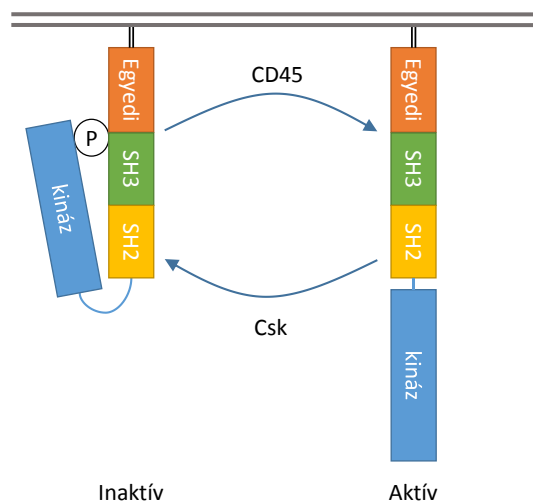


15. ábra: Az Src-kináz család tagjainak domainszerkezete

U, egyedi (unique) domain; SH, Src-homology domain; Y, tirozin.

Az N-terminális egyedi domain szerepe a membránhoz való kihorgonyozódás és ezen keresztül a specificitás biztosítása, az SH3 és SH2 domainek a ligand-specificitásért és a molekulán belüli kölcsönhatások kapcsán annak feltekeredésén keresztül az aktivitás szabályozásáért felelősek. A C-terminálisan található foszforilálható tirozin nagyon fontos szerepet kap a kinázaktivitás szabályozásában (**16. ábra**). Amennyiben ez a tirozin foszforilálódik, a kináz molekula egy feltekeredett, inaktív állapotban stabilizálódik [309].

Ebben a helyzetben az SH3 domain a kináz domainnel és a linker régió egyes részleteivel kapcsolódik. Az SH2 domain inaktív állapotban való rögzítéséhez kulcsfontosságú az 527. pozícióban² lévő tirozin (Y527) foszforilációja, melyért elsősorban a karboxi-terminális Src-kináz, a Csk (carboxy-terminal Src kinase) felelős [309]. Több adat is utal arra, hogy az Y527-foszforiláció hibája az enzimaktivitás növekedésével jár: 1. az Y527 mutációja az enzimaktivitás fokozódásával jár, 2. az Y527 körüli aminosavak hiányoznak a v-Src-ből és törlésük a c-Src konstitutív aktivációját hozza létre, 3. a Csk hiánya az Src-kinázok aktivációjával jár [309]. Az Y527 (illetve annak megfelelő tirozinek) defoszforilációjáért leginkább a CD45 foszfatáz felelős [308, 310].



16. ábra: Src-kinázok aktív-inaktív konformációváltása

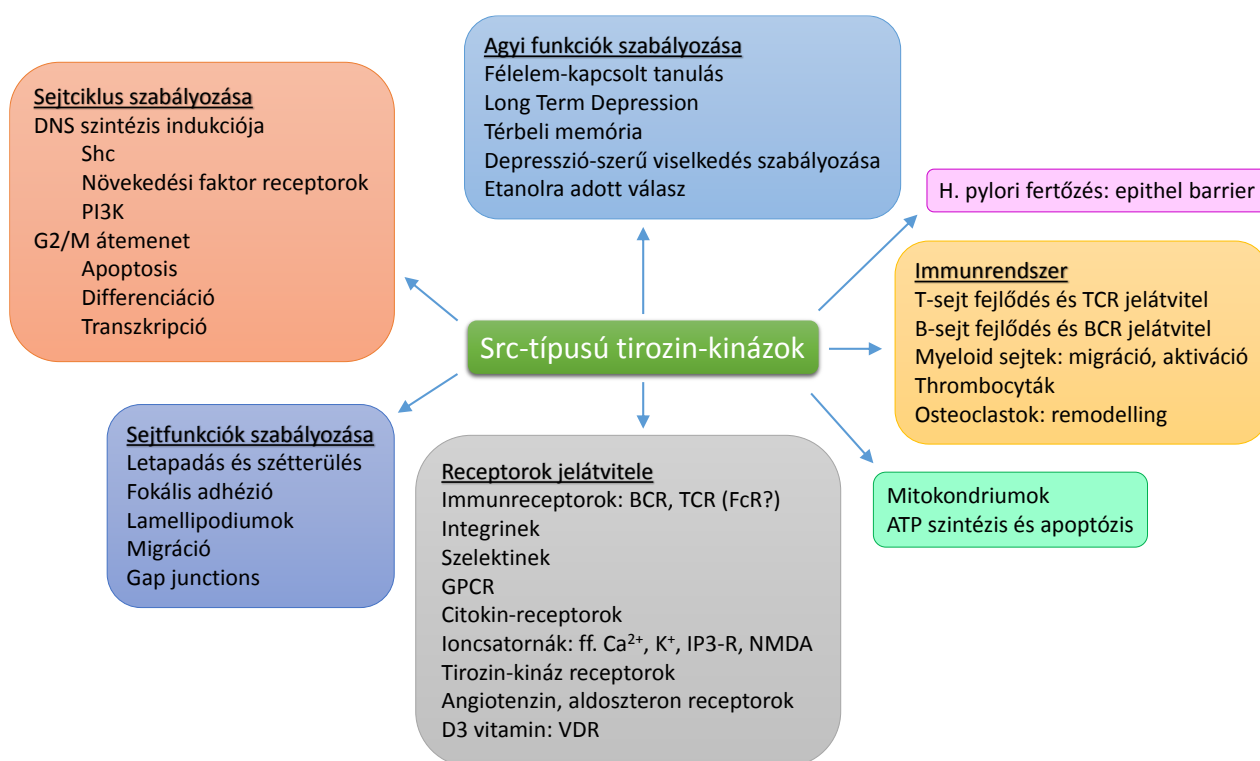
SH, Src-homology domain; Csk, carboxy-terminal Src kinase.

¹ Az Yrk csak csirkében expresszálódik, emlősökben nem.

² Az Src esetén az 527. pozícióban, a család többi tagjánál a pontos pozíció más lehet, de a funkció azonos

3.2.2. Az Src-kinázok funkciói

A sejtekben betöltött legfontosabb szerepük a túlélés és a differenciáció szabályozása [15, 16] (17. ábra). Ezen túlmenően azonban kulcsfontosságú szereplői a fehérvérsejtek és thrombocyták számos különböző működésének, így a veleszületett immunrendszer szignalizációs folyamatainak, a phagocytosisnak, citokinek, növekedési faktorok, apoptózis-regulátorok, integrinek, immunkomplexek, és G-fehérje kapcsolt receptorok jelátvitelének [18, 308, 311-314] [308, 309, 315-319]. Érdekes és figyelemre méltó azonban, hogy mindezek mellett az immunsejtekben jelentős negatív szabályozó szerepük is lehet [320-324].



17. ábra: Az Src-típusú tirozin-kinázok funkciói

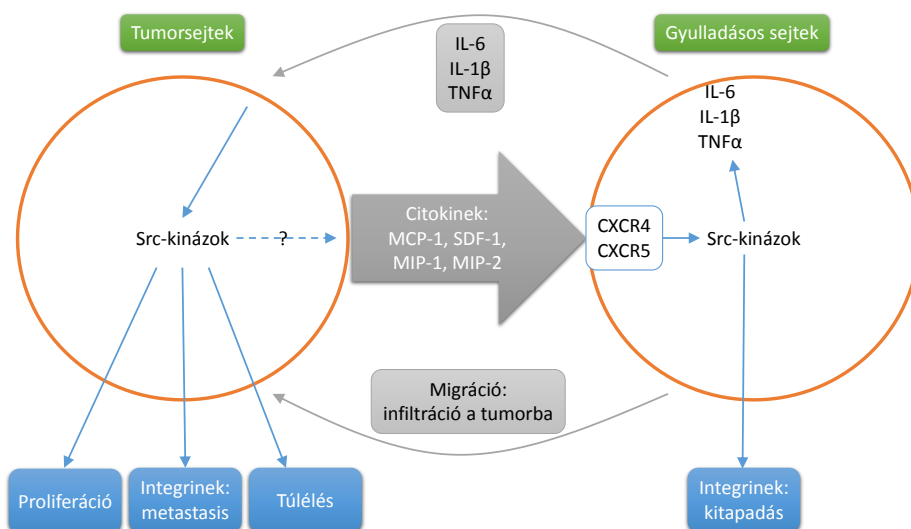
Shc, ; *PI3K*, *phosphoinositide 3 kinase*; *H. pylori*, *Helicobacter pylori*; *TCR*, *T-cell receptor*; *BCR*, *B-cell receptor*; *FcR*, *Fc-receptor*; *GPCR*, *G protein-coupled receptor*; *ff.*, *feszültségfüggő*; *IP3-R*, *inositol-triphosphate-receptor*; *NMDA*, ; *VDR*, .

3.2.3. Az Src-kinázok szerepe a központi idegrendszerben és humán megbetegedésekben

Az Src-kinázok számos központi idegrendszeri folyamatban játszanak kiemelt szerepet. Korábban azt feltételezték, hogy szerepük a neuronok proliferációjával és differenciációjával véget ér, azonban teljesen differenciált, posztmitotikus neuronokban is igen magas az Src-kinázok expressziója, ami egyértelműen arra utal, hogy a fejlődésen túl

részt vesznek a neuronok működésében is [325]. Az NMDA receptorok jelátvitelében illetve a szinaptikus plaszticitás szabályozásában való részvétele miatt a Fyn gátlása ígéretes lehet Alzheimer-kór kezelésében [315].

Az intracranialis vérzések kapcsán szerepük kettős: egyrészt a folyamat kezdeti fázisában a vér-agy gát integritásának megbomlásában, később ugyanakkor a javító mechanizmusok működésében játszanak szerepet [326].



18. ábra: Src-kinázok szerepe a tumor és a gyulladás kapcsolatának szabályozásában

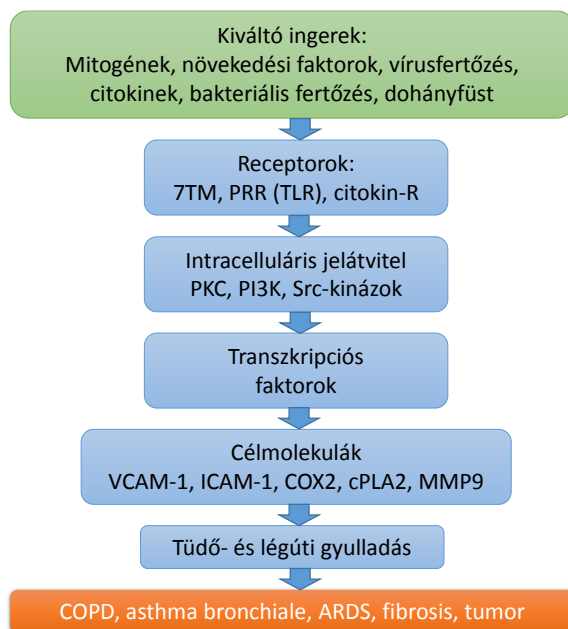
A tumorsejtekben az Src-kinázok fontosak a proliferáció és a túlélés szabályozásában, de az integrin jelátvitelben játszott szerepüknek köszönhetően a metastasis-képzésben is. Valószínűleg részt vesznek egyes citokinek elválasztásában is, melyek gyulladásos sejteket vonzanak, aktiválják őket, és részben Src-kináz-mediált módon serkentik azok integrinfüggő kitapadását, illetve a tumorsejteket serkentő citokinek termelését. IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; CXCR, C-X-C motív chemokine receptor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1 (= CCL2, JE); SDF-1, stromal cell-derived factor 1 (= CCL12); MIP, macrophage inflammatory protein 1/2.

Az Src-kinázoknak mindemellett fontos szerepük lehet daganatos betegségek során a tumor és a gyulladás összekapcsolásában is, mely gyakran tovább rontja a prognózist [327] (18. ábra). Pancreas adenocarcinómában a fokozott Src-kináz aktivitás az E-cadherin-mediált sejtadhézióban játszott szerepén keresztül hozzájárul a betegség progressziójához, a tumor invazív, metastasisokat adó formájának kialakulásához [328].

Helicobac-ter pylori fertőzés kapcsán a baktérium CagA molekulát juttat be az epithelsejtekbe, melyet aztán az Abl és Src-kinázok foszforilálnak. A foszforilált CagA foszforiláció függő és –független módon átveszi az irányítást számos jelátviteli útvonal felett és így az epithelsejtben citoszkeleton-átrendeződést hoz létre, mely végül a sejtek

alakváltozásához, nyúlásához, a köztük lévő rések megnagyobbodásához illetve kialakulásához és végül a barrier funkció károsodásához vezet [318].

Az Src-kinázok szoros térbeli és időbeli szabályozása elengedhetetlen a podosomák és invadosomák megfelelő kialakulásához és működéséhez, melyek fontosak a fejlődés, a fehérvérsejtek vándorlása illetve a sebgyógyulás során. A podosomák kialakulásának hibáit találjuk többek között olyan öröklődő betegségekben, mint a Wiskott Aldrich szindróma, PAPA szindróma vagy akár a Frank-Ter-Haar szindróma. Osteoclastok esetén a hibás podosomaképződés osteopetrosishoz vezethet. A folyamat gátlása ugyanakkor terápiás haszonnal is kecsegtet, hiszen az a metastasisok illetve lokálisan invazív sejtburjánzások kialakulásához is nélkülözhetetlen [329].



19. ábra: Src-kinázok krónikus légzőszervi betegségek kialakulásában

7TM, seven-transmembrane domain receptors; PRR, pattern recognition receptor; TLR, Toll-like receptor; PKC, protein kinase C; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; VCAM/ICAM, vascular/intercellular cell adhesion molecule; COX, cyclooxygenase; cPLA2, cytosolic phospholipase A2; MMP, matrix metalloprotease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ARDS, adult respiratory distress syndrome.

A különféle kiváltó ingerek, bakteriális- és vírusfertőzés, dohányfüst, stb. hatására mintázatfelismerő receptoraikon keresztül Src-kinázok részvételével aktiválódnak a myeloid sejtek, mely aztán alsó- és felső légúti illetve tüdőt érintő gyulladásokhoz és végül akár krónikus légzőszervi megbetegedésekhez, COPD-hez, fibrosishoz vagy akár daganathoz vezethet [330] (19. ábra).

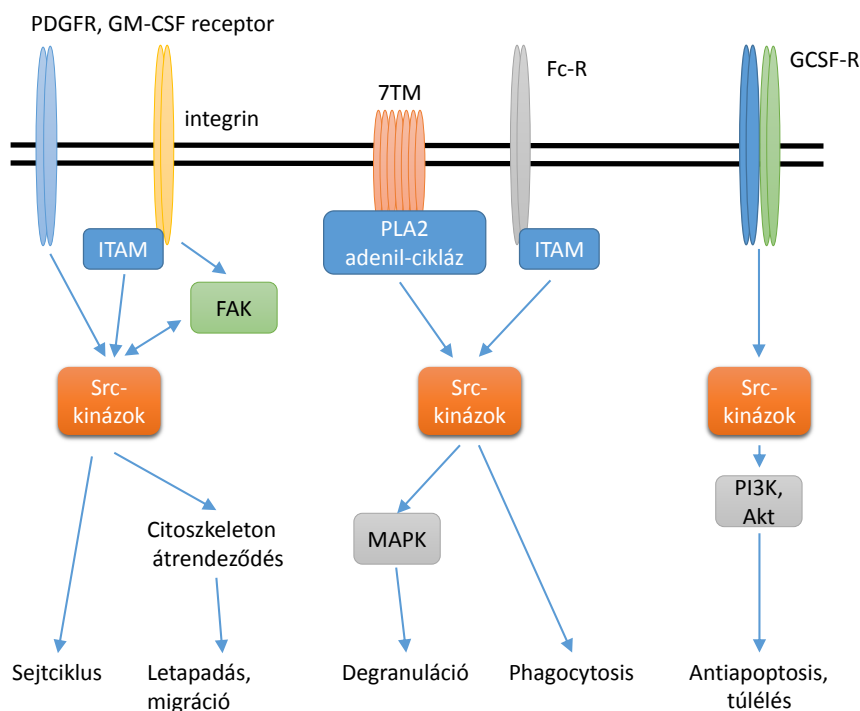
3.2.4. Az Src-kinázok szerepe myeloid sejtekben

Az Src-kinázok számos alapvető myeloid sejtfuncióban játszanak nélkülözhetetlen szerepet, melyet a 20. ábra foglal össze.

A PDGF, GM-CSF receptorok illetve az integrinek aktivációja ITAM-en és fokális adhéziós kinázon (FAK) keresztül Src-kináz-függő módon szabályozza a sejtciklust, a citoszkeleton átrendeződést és így a sejtek letapadását és migrációját [331].

Az Src-kinázok szükségesek a hét transzmembrán régiót tartalmazó (7TM) G-fehérje kapcsolt receptorok és Fc-receptorok hatására bekövetkező degranuláció és phagocytosis létrejöttéhez, mely foszfolipáz A2 és adenil-cikláz, ITAM illetve MAP kinázok közvetítésével jön létre [331].

A G-CSF receptorok stimulációja Src-kinázokon keresztül a PI3-kinázok és az Akt aktivációjához, végül pedig antiapoptoticus szignálként a sejtek túléléséhez vezet [331].



20. ábra: Src-kinázok szerepe myeloid sejtekben

PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; GM-CSF, granulocyte-monocyte colony stimulating factor; FAK, focal adhesion kinase; 7TM, seven-transmembrane domain receptors; PLA2, phospholipase A2;

MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Akt, protein kinase B (PKB).

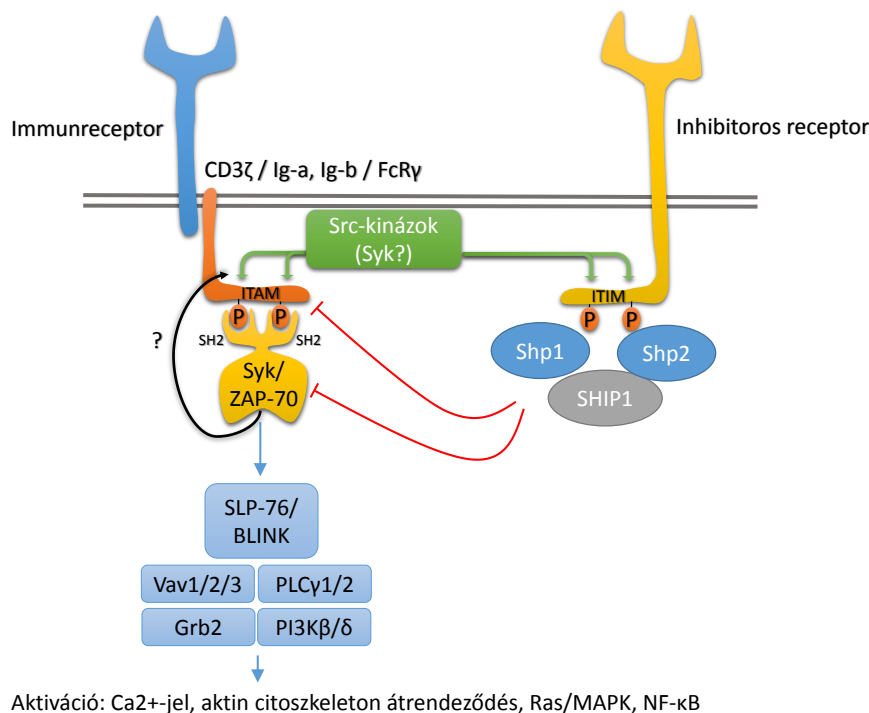
3.2.5. Src-kinázok szerepe ITAM- és ITIM-függő jelpályákban: klasszikus immunreceptorok és integrinek jelátvitelére

A klasszikus immunreceptorok közé a T- és B-sejt (TCR, BCR) illetve Fc-receptorok valamint az NK-sejtek aktiváló receptorai tartoznak, melyek bár eltérő ligandokat ismernek fel, sejten belüli jelátviteli mechanizmusuk igen nagy hasonlóságokat mutat [308, 309, 332] (**21. ábra**). Ehhez szerkezeti felépítésében és a részt vevő molekulákat illetően nagyon hasonló módon zajlik az integrinek jel-

3. táblázat: Src-típusú tirozin-kináz család tagjainak expressziója az immunrendszerben

Sejttípus	Src-kinázok
T-sejtek	Lck, Fyn
B-sejtek	Lyn, Fyn, Blk (Fgr, Yes)
NK-sejtek	Lck, Fyn (Lyn, Yes)
Hízósejtek	Lyn, Fyn (Src)
Neutrophilek, eosinophilek, monocyta/macrophagok	Hck, Fgr, Lyn
Dendriticus sejtek	Hck, Fgr, Lyn, Src
Osteoclastok	Src, Fyn, Hck, Fgr, Lyn
Thrombocyták	Src, Fyn, Lyn, Yes

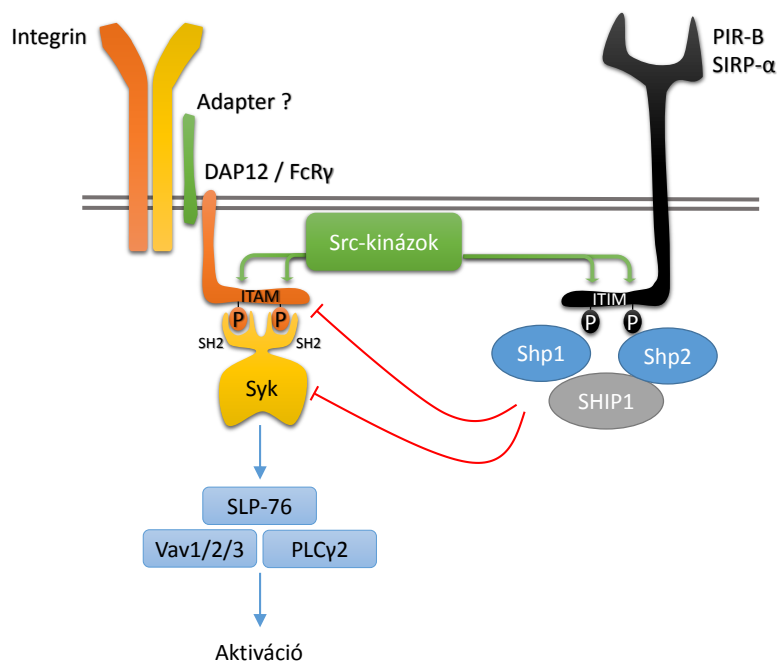
átvitelére is [131] (**22. ábra**). Sejttípustól függően a receptorok ligandkötésének hatására különféle Src-kinázok aktiválódnak (**3. táblázat**) [308], melyek aztán (többek között) magán a receptoron vagy egy ahhoz kapcsolódó adapter molekulán található immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívumokat (ITAM) foszforilálnak. A receptorok többsége specifikus ITAM-tartalmú molekulákon keresztül szignalizál: a BCR az immunglobulin (Ig)-a és Ig-b, a TCR a CD3 ζ , míg az Fc-receptorok az FcR γ -láncon keresztül. A DAP12 illetve az FcR γ -lánc ITAM-tartalmú adapter molekuláknak igen rövid extracelluláris szakasza van, melynek következtében jelenlegi ismereteink szerint közvetlenül nem képesek ligandokat kötni [131, 308, 309, 332]. Az ITAM szekvenciákban található tirozinok illetve azok foszforilációja kulcsfontosságú a további jelátvitel létrejöttében. A kapcsolt receptor ligandkötésének hatására Src-kinázok foszforilálják ezeket a tirozin aminosavakat, melyekhez aztán SH2 domainjein keresztül a Syk kináz kapcsolódik, aktiválódik és beindítja a további jelátviteli folyamatokat, aktiválja az SLP-76, Vav, PI3K, PLC γ molekulákat, a MAP kinázokat illetve az NF- κ B jelpályát [121, 332].



21. ábra: Klasszikus immunreceptorok jelátvittele

Az inhibitoros receptorok aktivitásukat az aktiváló receptorok jelátvitelének gátlásával fejtik ki. ITAM/ITIM, immunoreceptor tyrosine-based activation/inhibitory motif; SH2, Src-homology domain 2; Ig, immunoglobulin; ZAP-70, ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa; SLP-76, SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; BLINK, B-cell linker; Shp, SH2 domain-containing phosphatase; SHIP1, SH2-containing inositol phosphatase-1.

A immunrendszer megfelelő működése szempontjából az aktiváció mellett legalább olyan fontos a válaszok megfelelő időben és helyen történő leállítása is, mely hiányában az immunrendszer túlaktiválásával jellemezhető súlyos zavarok lépnek fel [333]. Az Src-kinázok C-terminális tirozinjának Csk általi foszforilációja gátolja a kinázaktivitást és ezáltal a jelátvitelt [334]. Protein tirozin foszfatázok, mint a PTP1B és a CD45 szintén szerepet játszanak az immunreceptorok jelátvitelének szabályozásában, defoszforilálják az Src-kinázok C-terminális vagy a kináz domainben lévő tirozinjait, ezáltal aktiválják illetve gátolják a kinázaktivitást a stimulustól illetve a sejttípustól függően [335]. Gátló receptorok jelpályáiban az Src-kinázok immunreceptor tirozin-alapú gátló motívumokat (ITIM) is foszforilálhatnak, melyekhez aztán vagy protein tirozin foszfatázok vagy lipid foszfatázok kapcsolódhatnak (21. ábra és 22. ábra). Az SH2-domaint tartalmazó foszfatáz 1 és 2 (Shp1 és Shp2) defoszforilálják egyrészt az ITAM szekvenciákat, másrészt a disztálisabb jelátviteli molekulákat. A lipid foszfatázok pedig, mint az SH2-domaint tartalmazó inositol foszfatáz 1 (SHIP1) a PI3K jelpályát gátolják [336]. Az ITIM taralmú molekulák részvételének pontos szabályozása még nem teljesen tisztázott [335].



22. ábra: Integrinek és gátló receptoraik jelátvitelének

Az inhibitoros receptorok aktivitásukat az aktiváló receptorok jelátvitelének gátlásával fejtik ki. ITAM/ITIM, immunoreceptor tyrosine-based activation/inhibitory motif; SH2, Src-homology domain 2; SLP-76, SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; BLINK, B-cell linker; Shp, SH2 domain-containing phosphatase; SHIP1, SH2-containing inositol phosphatase-1; PLC, phospholipase C; PIR-B, paired immunoglobulin-like receptor B; SIRP- α , signal-regulatory protein- α .

Az Src-kinázoknak egyéb sejttípusokhoz hasonlóan [16] az immunsejtekben is fontos szerepük van a különféle sejtfelszíni integrinek jelátvitelében. Az Lck részt vesz a T-sejtek LFA-1 integrinen keresztüli aktivációjában [23-26]. Az Src-kinázok továbbá szükségesek az NK-sejtek LFA-1-n keresztül bekövetkező aktivációjához és a célsejt következményes elpusztításához [27, 28]. Az Fgr hiánya gátolja a PSGL-1 jelátvitelét [65, 66], a Hck és Fgr illetve a Hck, Fgr és Lyn hiánya pedig a neutrophilek E-szelektinhez való kötődését [337]. Az Src-kinázok fontosnak tűnnek az I-es és II-es típusú citokinreceptorok működésében is [172-175]. Hck és Fgr illetve Hck, Fgr és Lyn együttes hiányában a β_1 és β_2 integrinek *in vitro outside-in* [17-21, 129, 131] jelátvitelének teljes mértékben károsodik, az *inside-out* azonban nem [338]. *In vivo* a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerek védettek a Mac-1-függő thrombohaemorrhagias vasculopathia ellen [22].

Sokkal kevésbé ismert azonban az Src-kinázok részvétele az immunsejtek egyéb sejtfelszíni receptorainak működésében. Úgy tűnik, részvételük fontossága nagyban függ

attól, hogy az egyes jelátviteli folyamatokban mely adapter molekula kapcsolódik az ITAM szekvenciákhoz. A T-sejt receptor esetén ez az adapter molekula a ZAP-70, ami jelentős különbséget jelent a Syk-vel működő B-sejt- és Fc-receptorokhoz képest. A TCR működéséhez ugyanis elengedhetetlen, hogy az Src-típusú tirozin-kinázok (elsősorban az Lck) foszforilálják a CD3 ζ -lánc ITAM szekvenciájának tirozinjait, és így lehetővé tegyék a ZAP-70 kötődését. Hiányuk a T-sejt-receptor-függő válaszok teljes blokkolásával jár [339-342].

A Syk-vel működő receptorok proximalis jelátvitelében azonban az Src-kinázok szerepe koránt sem ennyire egyértelmű és kizárólagos. A B-sejtek legfontosabb Src-kináza, a Lyn hiányában fokozódik a B-sejt receptor jelátvitelének és – feltehetően ennek eredményeként – a B-sejtek túlélése és proliferációja [321, 343, 344]. A Lyn, Fyn és Blk, tehát a B-sejtek valamennyi Src-kinázának hiánya gátolja az NF- κ B B-sejt receptoron keresztül bekövetkező aktivációját, de nem befolyásolja a receptor proximalis jelátvitelét, az Ig α és Ig β láncok ITAM szekvenciáinak foszforilációját [345, 346].

Hasonlóan bizonytalan az Src-kinázok szerepe az Fc-receptorok jelpályáiban, így a hízósejtek Fc γ - és Fc ϵ -receptorainak működésében [321, 347-354], valamint macrophagok és neutrophilek Fc γ -receptor-függő sejtválaszainak kialakulásában [18, 308, 312]. Hck^{-/-} Fgr^{-/-} neutrophilek IgG immunkomplexekre adott válaszai normálisak [18], míg Hck^{-/-} Fgr^{-/-} Lyn^{-/-} macrophagokban késleltetett ugyan, de normális mértékű az IgG-vel opszonizált birka vörösvértestek phagocytosisa [308, 312]. Neutrophilekben mindeztidáig nincs közvetlen adat erre nézve, de érdemes megemlíteni, hogy az Abl-kinázok mellett az Src-kinázokat is gátló dasatinib hatására az Fc γ -receptorok jelátvitelének jelentősen károsodhat [355].

Mindezek mellett fontos kiemelni, hogy a Syk minden ez idáig tesztelt B-sejt-receptor- és Fc γ -receptor funkcióhoz nélkülözhetetlen [308, 356-360].

A fentiek mögött az állhat, hogy a ZAP-70-el ellentétben a Syk önmaga is képes az Src-kinázoktól függetlenül az ITAM szekvenciákat foszforilálni, és ez által saját aktiválódását elősegíteni [361, 362], ezért a Syk-vel működő B-sejt- és Fc γ -receptorok jelátvitelében az Src-kinázok nélkülözhetőek, míg a ZAP-70-függő T-sejt receptor működéséhez nem.

Összességében tehát úgy tűnik, hogy az Src-típusú tirozin-kinázok elengedhetetlenek a myeloid sejtek integrinjeinek jelátvitelében, az Fc γ -receptorokéban azonban nem.

4. Célkitűzések

Az itt bemutatott doktori munkám során az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

1. Van-e valamilyen szerepe a Hck, Fgr, Lyn Src-típusú tirozin-kinázoknak az autoantitest-függő ízületi gyulladás egérmodelljében?
2. A Hck, Fgr és Lyn kinázok közül mely vagy melyek fontosak?
3. Melyik sejttípus tehető felelőssé a megfigyelt hatásokért?
4. Milyen az arthritis patomechanizmusát érintő eltérések állhatnak a háttérben? Szükségesek-e az Src-kinázok
 - a. a gyulladásos sejtinfiltráció kialakulásához?
 - b. a myeloid sejtek endogén migrációs képességéhez?
 - c. a megfelelő gyulladásos környezet kialakulásához?
5. Melyik ismert jelpálya lehet érintett az Src-kinázok hiányában autoantitest-függő arthritisben?

A kérdések vizsgálatához az emberi autoimmun gyulladásos megbetegedések *in vivo* állatmodelljeit és genetikailag módosított egértörzseket használtunk.

5. Módszerek

5.1. Kísérleti állatok

5.1.1. A felhasznált genetikailag módosított egértörzsek

Kísérleteinkhez a már korábban leírt [343, 363] Hck^{tm1Hev} ($Hck^{-/-}$), Fgr^{tm1Hev} ($Fgr^{-/-}$) illetve Lyn^{tm1Sor} ($Lyn^{-/-}$) génhiányos egértörzseket használtuk. Az egyes egyszeres, kétszeres illetve a háromszoros Src-típusú tirozin-kináz-hiányos törzseket homozigóta mutáns formában tartottuk fenn, kivéve a Hck/Lyn kettős génhiányos törzset, mely a korábban leírt myeloproliferatív betegségből fakadó korlátozott életképességének köszönhetően homozigóta formában nem tenyészthető [364], ezért ezt a mutációt $Hck^{-/-}Lyn^{+/-}$ formában tartottuk fenn. Ellentétben a $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ kettős mutáns állatokkal, mely a korábban leírt betegségükből fakadóan 2 hónapos koruk előtt elhullottak, valamennyi egyéb egyszeres, kétszeres és a háromszoros génhiányos törzs alapvetően egészséges, és homozigóta formában jól tenyészthető.

A teljes CD18-hiányos ($Itgb2^{tm2Bay/tm2Bay}$, a továbbiakban $CD18^{-/-}$) egerek [365] Arthur Beaudettől származtak (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA). A CD11a-hiányos ($Itgal^{tm1Hogg/tm1Hogg}$, a továbbiakban $CD11a^{-/-}$) egereket [366] Nancy Hoggtól (Cancer Research UK, London, UK) kaptuk. A CD11b-hiányos ($Itgam^{tm1Myd/tm1Myd}$, a továbbiakban $CD11b^{-/-}$) egereket [367] a Jackson Laboratorytól (Bar Harbor, ME, USA) vásároltuk, az Fc-receptor γ -lánc-hiányos ($Fcer1g^{tm1Rav/tm1Rav}$, a továbbiakban $FcR\gamma^{-/-}$) egereket [104] pedig a Taconic Farmstól (Hudson, NY, USA).

Az ún. KRN T-sejt receptor transzgén hordozó egerek (Tg(TcraR28,TcrbR28)KRNDim; [368]) Diane Mathistól és Christophe Benoist-tól (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) származnak. A mutációt C57BL/6 egerekkel keresztezve, heterozigóta formában tartottuk fenn.

Az $Mcl-1^{flox}LysMCre$ egerek You-Wen He-től származnak (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA).

A genetikai háttér egységességének érdekében valamennyi mutáns egértörzs legalább 6 generáción keresztül C57BL/6 törzsszel lett keresztezve. A mutációk jelenlétét minden esetben allél-specifikus PCR-rel (**4. táblázat**) és néhány esetben ezen felül a jellemző fenotípus megjelenése alapján (pl. arhtritis a KRN transzgén pozitív egyedekben), western blottal a fehérje hiányának kimutatásával (pl. időzített terhességből származó $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ embriók esetén), illetve áramlási citometriával (pl. KRN T-sejt receptor) ellenőriztük.

Kontrollként C57BL/6 vad típusú egereket használtunk, melyeket egyrészt a Charles Rivertől (Sulzfeld, Németország) másrészt az Onkológiai Intézettől (Budapest) vásároltuk, és helyben a saját állatházban SPF körülmények között tenyésztettük. A NOD illetve a CD45.1 allélt C57BL/6 genetikai háttéren hordozó ún. BoyJ (B6.SJL-*Ptprc*^a) törzs a Jackson Laboratorytól származott.

Az egereket egy konvencionális állatházban, egyedileg szellőztetett ketrecekben (Tecniplast, Buguggiate, Italy) tartottuk.

A Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottsága (EÁB) illetve a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága valamennyi állatkísérletünket engedélyezte.

4. táblázat: Az egyes genetikailag módosított egértörzsek genotipizálásához használt PCR primerek szekvenciái

Törzs	Primer	Szekvencia 5' – 3'
Hck KO	Fwd	GCT CCA TAG ATC CGT CGT GCC ATT TCC
	Rev	GTT GTT TGG TCC CAG CTT GCT GGA GG
	neo	GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG
Fgr KO	Fwd	CAA GGC CGG ACT TCG TCC GTC TTT CC
	Rev	GAG AGC CTT ACT GGA ATC CCT CTT TAG C
	neo	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CTC TCC ACC
Lyn KO	BF2	CAT AGC CTG AGT TAG TTC CCT AGC
	BR1	TCA CAT ATG AAC ATG TGT GTA CAT GTC
	Lyn 6.3	GTG CTT AAT GAC ATC ACC ATG CAT TAG G
	neo	GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG
CD18 KO	WT	GCC CAC ACT CAC TGC TGC TTG
	Common	CCC GGC AAC TGC TGA CTT TGT
	KO	AGG ACA GCA AGG GGG AGG ATT
FcR γ KO	WT	GCC CTT CCC TTC CCT CTA CAC
	Common	CTC ACG GCT GGC TAT AGC TGC C
	KO	CTC GTG CTT TAC GGT ATC GCC
Mac-1 KO	WT	CAT ACC TGT GAC CAG AAG AGC
	Common	TAG GCT ATC CAG AGG TAG AC
	Mutant	ATC GCC TTC TTG ACG AGT TC
LFA-1 KO	NEO-F	GCA GGA TCT CCT GTC ATC TCA CC
	LFAB4	CAA TCT GCA AGA CCT GGT ACC
	LFAB5	CAA GGC CTG GAG CTA CAA CCT G
Mcl-1 ^{fllox}	Fwd	GGT TCC CTG TCT CCT TAC TTA CTG TAG
	Rev	CTC CTA ACC ACT GTT CCT GAC ATC C
LysM-Cre	WT	TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC
	Common	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC
	Cre	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG

5.1.2. Csontvelői kimérák

Az *in vivo* kísérletekben az egyes genotípusok összehasonlíthatóságának növeléséhez csontvelői kimérákat használtunk. A donorok tibiáit és femurjait HBSS oldattal átmostuk, majd centrifugálást követően az üledéket α -MEM oldatban vettük fel, és a felhasználásig jégen tartottuk. Az így nyert teljes csontvelő preparátumot előzetesen letális egésztest-be-sugárzáson átesett, CD45.1 allélt hordozó (ún. BoyJ) recipiensekbe jutattuk be intravénás úton. A besugárzáshoz ¹³⁷Cs izotóppal működő Gamma-Service Medical (Lipcse, Németország) D1 irradiátort használtunk, a recipiensek 11,5 Gy ö11sszdózist kaptak. A Hck, Fgr

és Lyn nem-haematopoieticus rendszerben betöltött szerepének tisztázása érdekében háromszoros génihiányos $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerekbe besugárzást követően CD45.1-t hordozó vad típusú csontvelőt transzplantáltunk.

A transzplantáció után 3-6 héttel a kimérákból perifériás vért vettünk, majd Ly6G és CD45.2 festést követően áramlási citometriával meghatároztuk a donor- illetve recipiens eredetű sejtek arányát. A repopuláció mértékét, ezáltal a transzplantáció sikerességét donor eredetű, CD45.2-pozitív sejtek arányával mértük. A kísérletekhez csak olyan kimérákat használtunk fel, amelyekben a donor-eredetű sejtek aránya a perifériás vérben legalább 99% volt. A csontvelői kimérákat általában 4-10 héttel a transzplantáció után használtuk fel, kivéve a $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ kimérákat. A már említett, ismert korai letalitás [364] a csontvelői kimérákat is érinti, ezért ezeket a szokásosnál korábban, már a transzplantáció után 3-5 héttel felhasználtuk.

$Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ és $FcR\gamma^{-/-}$ haematopoieticus sejteket egyaránt kifejező kevert csontvelői kimérák létrehozásához $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ illetve $FcR\gamma^{-/-}$ donorokból származó csontvelő változó arányú (1:3-tól 3:1-ig) keverékét injektáltuk az előzetesen besugárzott recipiensekbe. Az két genotípus elkülönítéséhez áramlási citometriát használtunk. Lévén, hogy mindkét donor CD45.2-t hordoz az elkülönítés alapja az Fc γ -receptor IV eltérő expressziója volt. Fc-receptor- γ -lánc hiányában ugyanis a sejtek nem expresszálják ezt a receptort [369]. Az áramlási citometriához Alexa-647-konjugált Fc γ RIV antitestet használtunk (clone 9E9), melyet Falk Nimmerjahn (Erlangen, Németország) bocsátott a rendelkezésünkre

Az *in vivo* kompetitív migrációs mérésekhez használt kevert kimérák előállítását alább ismertetem.

5.2. K/B \times N szérum transzfer arthritis

Az arthritis vizsgálatához egy autoantitest-mediált ízületi gyulladás modellt használtunk, melyben a KRN T-sejt receptor és autoimmunitásra hajlamosító MHC II (Ag⁷) együttes jelenlétében súlyos spontán szimmetrikus ízületi gyulladás jelenik meg. A patomechanizmus hátterében egy ízületi antigén, a glukóz-6-foszfát-izomeráz (GPI) elleni autoantitest-termelés áll [368]. A beteg egyedekből származó, autoantitesteket tartalmazó szérummal a betegség egészséges egyedekre is átvihető, amelyekben ezáltal az ízületi gyulladás kialakulásának effektor fázisa tisztán, az autoantitestek keletkezésétől elkülönülten vizsgálható.

Ehhez először a KRN T-sejt receptort C57BL/6 genetikai háttéren transzgenként hordozó egereket autoimmunitásra hajlamosító MHC II-t hordozó NOD egerekkel kereszteztük. A keresztezésből származó utódokból retroorbitális véreztetéssel vért vettünk, majd szérumot preparáltunk. A KRN transzgent hordozó utódokból származó (K/B \times N) szérumot használtuk az ízületi gyulladás kiváltásához, a transzgent nem hordozó utódokból származó (B \times N) szérumot pedig kontrollként [368, 370]. A transzgen jelenlétét allél-specifikus PCR-rel, és további megerősítésként az ízületi gyulladással fenotípus megjelenésével ellenőriztük.

Az arthritis vizsgálatához intraperitoneális injekcióval 300 μ l K/B \times N (arthritis) illetve B \times N (kontroll) szérumot adtunk be a 0. napon, majd ezt követően 2 héten keresztül naponta követtük a gyulladás súlyosságának alakulását [370]. A gyulladás klasszikus klinikai tüneteit egy 0-10-ig terjedő skálán pontoztuk, a bokavastagságot pedig egy analóg tapintókaros mérőórával mértük (Kroepelin, Schlüchtern, Németország). A méréseket 2 független vizsgáló végezte, majd azok eredményeit átlagoltuk.

Az ízületi funkció esetleges károsodásának megítéléséhez egy biológiai próbát alkalmaztunk. Az egereket egy a tartásukhoz használt ketrecek rácsához nagyon hasonló külön erre a célra gyártott (Charles River Hungary, Isaszeg) rácsra helyeztük. A rácsot fejjel lefelé fordítva az egészséges egerek képesek azon fejjel lefelé megkapaszkodni és hosszabb-rövidebb ideig függeszkedni. Az ízületi gyulladás és a következményes funkciócsökkenés, fájdalom azonban azzal jár, hogy az egerek erre nem képesek, ezért a rácsról leesnek. A rács megfordítását követően minden egérről feljegyeztük, hogy mennyi ideig volt képes a rácson fejjel lefelé kapaszkodni [370]. A tesztet a 6. és 12. nap között naponta 3-szor ismételtük, majd meghatároztuk, hogy az egyes időpontokban az egyes egerek az esetek hány százalékában voltak képesek a rácson függeszkedni, majd az így kapott görbét genotípusonként illetve csoportonként átlagoltuk. Az adatokat az idő függvényében ábrázoltuk.

5.3. Autoantitest-indukált hólyagos bőrgyulladás modell

Az emberi epidermolysis bullosa acquisita nevű autoantitest-indukált hólyagos bőrgyulladás egérmodelljét kollagén VII-ellenes antitestek beadásával váltottuk ki.

Az mCVIICr fragmentet tartalmazó GST fúziós fehérjét *E. coli*-ban való kifejezését követően GST affinitás oszlopokon tisztították, majd nyulakat immunizáltak vele [371]. A véreztetés után kapott szérumból ezután oszlopkromatográfias módszerrel (Protein G Sepharose Fast Flow affinity column chromatography, GE Healthcare, Little Chalfont,

UK) IgG-frakciót szeparáltak [371]. Az így kapott antitestek reaktivitását ELISA-val és eger bőron végzett indirekt immunfluoreszcenciával vizsgálták (részletesen l. [299] [371]). Kontrollként normál nyúl IgG-t használtunk.

Az egerek isofluran anaesthesia mellett a 0., 2., 4., 6. és 8. napon 12-12 mg (összesen 60 mg egerenként) kontroll vagy kollagén VII-ellenes IgG-t kaptak. A betegség lefolyását fotózással és a klinikum alapján pontozással követtük. A pontozás alapja specifikus bőrelváltozások (pl. erythema, hólyag) megjelenése és az érintett bőrterület kiterjedése volt. Az érintett bőrterület kiterjedését előre definiált arányokkal jellemeztük (pl. egy fül 2,5 %, orr 5 %, stb.). A kollagén-ellenes antitestek szérumszintjét ELISA-val mértük a 6. napon.

5.4. *In vivo* infiltráció vizsgálata

5.4.1. Szöveti elemzés

A szövettani metszetek készítéséhez az egereket a 7. napon leöltük, a bokáikat formalinban fixáltuk, dekalifikáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket hematoxylin-eosinnal festettünk [372]. A metszeteket ezek után egy Leica (Wetzlar, Németország) DMI 6000B inverált fénymikroszkóppal fotóztuk.

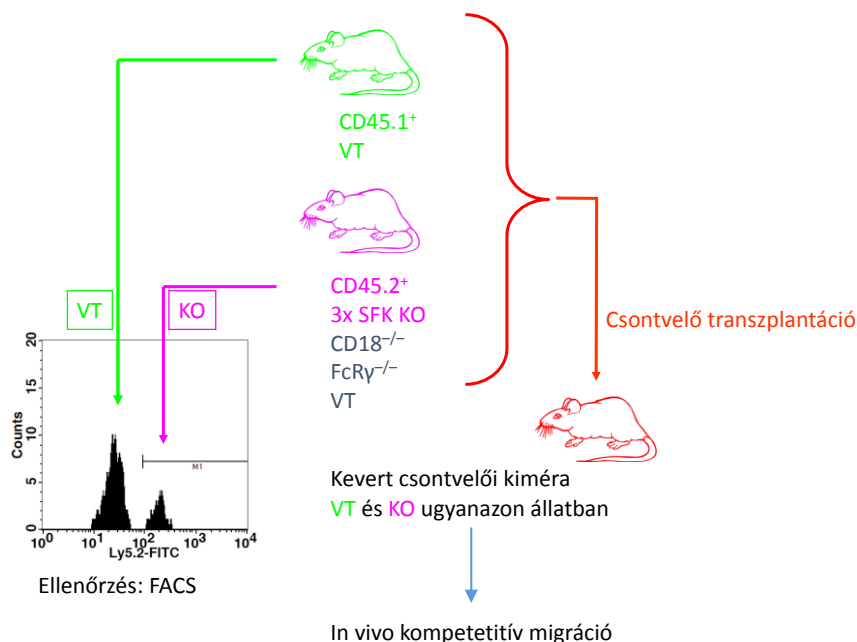
5.4.2. Áramlási citometriás elemzés

A K/BxN szérum transzfer arthritis esetén a synovialis infiltrátum vizsgálatához az arthritis indukcióját követő 4. napon az egerek bokaízületének környékét, illetve a mellső végtag "kézháti" részét összesen 1 ml 10 mM EDTA-t (pH 7,5) és 20 mM HEPES-t (pH 7,4; Sigma) tartalmazó PBS-sel átmostuk. Az autoantitest-indukált hólyagos bőrgyulladás modell esetén az orr környéki bőrterület érintettsége volt a legkövetkezetesebb, ezért azt a 7. napon eltávolítottuk, ollóval feldaraboltuk, majd erőteljes rázatás mellett 37°C-on 1 órán keresztül emésztettük 20mM HEPES-t (pH 7,4), kalciumot, magnéziumot, 28 U/ml Liberase-t (Roche, Basel, Svájc) és 10 mg/ml DNase I-t (Roche) tartalmazó HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) oldatban.

Az így kapott szuszpenzió sejtösszetételét festést követően áramlási citometriával határoztuk meg. Az egyes myeloid sejttípusok elkülönítését egyrészt az azokra jellemző előre- (forward scatter, FSc) és oldalszórás (side scatter, SSc), illetve a jellegzetes sejtfelületi markerek festődése alapján végeztük. Az Ly6G-pozitív (clone 1A8, BD Biosciences) eseményeket tekintettük neutrophileknek, az Ly6G-negatív kapun belül pedig az F4/80- (clone A3-1, AbD Serotec) és/vagy CD11b-pozitív (clone M1/70, BD Biosciences) sejteket monocyta/macrophagoknak.

5.5. *In vivo* migráció

A myeloid sejtek *in vivo* migrációjának kimutatásához kevert csontvelői kimérákon egy kompetitív *in vivo* migrációs tesztet alkalmaztunk [370]. Ehhez első körben CD45.2



allélt hordozó vad típusú (C57BL/6), Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}, CD18^{-/-} illetve FcRγ^{-/-} donorokból származó csontvelőt kevertünk össze változó arányban (1:4-től 4:1-ig) CD45.1 allélt hordozó vad típusú csontvelővel (23. ábra). Ezt a keveréket előzetesen letá-

23. ábra: Kevert csontvelői kimérák létrehozása *in vivo* migrációs mérésekhez

Eltérő CD45 allélt hordozó donorokból származó vad típusú (VT) és génhíányos csontvelő keverékét transzplantáltuk előzetesen besugárzott recipiensekbe. Az eltérő donorból származó sejteket áramlási citometriával (FACS) különítettük el.

recipiensekbe transzplantáltuk. Ezáltal olyan kevert csontvelői kimérákat hoztunk létre, melyek azonos szervezeten belül egyszerre tartalmaztak CD45.2-t expresszáló vad típusú, Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}, CD18^{-/-} vagy FcRγ^{-/-} illetve CD45.1-t expresszáló vad típusú sejteket is.

A transzplantáció után 5-8 héttel ezekben a kimérákban K/BxN szérum transzfer arthritis indukáltunk, majd a szérumtranszfert követő 4. napon perifériás vért vettünk, illetve a fent leírt módon (5.4.2) kimostuk a synoviális sejteket. A 5.4.2 szakaszban ismertetett módon, áramlási citometriával elkülönített myeloid sejttypusokon belül CD45.2 festődés (clone 104, BD Biosciences) alapján meghatároztuk a CD45.2-t és a CD45.1-t expresszáló, azaz a különböző donoroktól származó (különböző genotípusú) sejtek arányát.

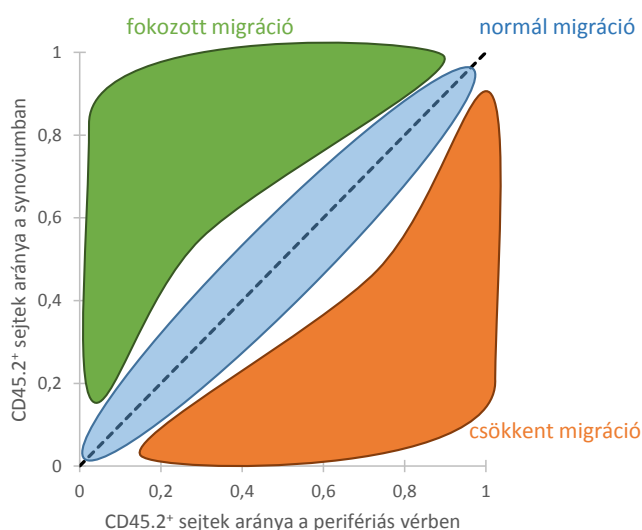
A különböző CD45.2-pozitív (génhiányos) sejtek migrációját a perifériás vérben illetve a synoviális folyadékban megfigyelhető arányukkal jellemeztük (24. ábra). A

synoviális folyadék CD45.2-pozitív myelooid sejtjeinek arányát ábrázoltuk a perifériás vér CD45.2-pozitív sejtjei arányának függvényében. Az így kapott grafikonon az egyes pontok az egyes kevert csontvelői kiméráknak felelnek meg, minden pont egy-egy külön kimérát jelöl.

Amennyiben egy adott sejt típuson belül a CD45.2-t expresszáló sejtek aránya a perifériás vérben illetve a synoviumban megegyezik, az arra utal, hogy a CD45.2-pozitív sejtek migrációs képessége megtartott, a CD45.1-pozitív vad típusú sejtekével azonos. Az ezen egereket jellemző pontok így egy lineáris, 45°-os egyenes mentén szórnak, hiszen a perifériás vér egy adott CD45.2-pozitív arányához azzal lényegében megegyező arány táruul a synoviumban (24. ábra; kék terület).

Amennyiben a CD45.2-pozitív sejtek aránya magasabb a synoviumban, mint a perifériás vérben, akkor arra következtethetünk, hogy a CD45.2-pozitív (génhiányos) sejtek nagyobb mértékben képesek a gyulladás helyére vándorolni, mint a CD45.1-pozitív vad típusú sejtek, endogén migrációs képességük tehát fokozott. Ebben az esetben az egyes kevert kimérákat reprezentáló adatpontok a 45°-os egyenes feletti tartományban szórnak, a vízszintes tengelyen a CD45.2-pozitív (génhiányos) sejtek perifériás vérben mért arányát leíró értékekhez jellemzően azoknál jelentősen nagyobb értékek társulnak a függőleges tengelyen (24. ábra; zöld terület).

Ezzel ellentétben a perifériás vérben mérthez képest csökkent CD45.2-pozitív arány a synoviumban arra utal, hogy ezen sejtek kevésbé képesek bejutni a gyulladás helyére, mint a velük azonos szervezetben lévő CD45.1-pozitív vad típusú társaik, endogén migrációs képességük tehát károsodott (24. ábra; narancs terület). Ebben az esetben a grafikonon az egyes egereknek megfelelő adatpontok a 45°-os egyenes alatti tartományban szórnak, egy adott perifériás vérben mért CD45.2-pozitív arányhoz jellemzően annál kisebb értékek tartoznak a synoviumban, azaz a függőleges tengelyen.



24. ábra: *In vivo* kompetitív migráció grafikus ábrázolása és értékelése

A CD45.2-pozitív sejtek CD45.1-pozitív vad típusú sejtekhez viszonyított relatív endogén migrációs képességét a következő módon számszerűsíthetjük:

$$\text{relatív migráció} = \frac{\left(\frac{\text{CD45.2}^+ \text{ sejtek aránya a synoviumban (\%)}}{\text{CD45.2}^+ \text{ sejtek aránya a vérben (\%)}} \right)}{\left(\frac{\text{CD45.1}^+ \text{ sejtek aránya a synoviumban (\%)}}{\text{CD45.1}^+ \text{ sejtek aránya a vérben (\%)}} \right)}$$

Amennyiben ez az érték 1 körül van, a migrációs képesség megtartott, 1-nél kisebb érték károsodott, 1-nél jelentősen nagyobb érték pedig fokozott endogén migrációs képességre utal.

5.6. Neutrophilek, monocyták és macrophagok *in vitro* vizsgálata

5.6.1. A sejtek izolálása

A neutrophil granulocyták *in vitro* sejtválaszainak vizsgálatához intakt egerek femurjaiból és tibiáiból csontvelőt preparáltunk, melyből hypotoniás lízist³ követően Percoll gradiensen⁴ történő centrifugálással tisztítottuk az érett csontvelői neutrophileket [152]. A tisztításhoz steril, kalcium-, magnézium- és endotoxin-mentes oldatokat használtunk. A gradiens-centrifugálás után a sejteket mosás, számolás, hígítást követően a felhasználásig (általában kevesebb, mint 30 percig) kalcium- és magnéziummentes oldatban tartottuk, majd közvetlenül az aktivációt megelőzően 0,5 µM kálium-klorid jelenlétében 37°C-on előmelegítettük. Az összes *in vitro* neutrophil-mérést 37°C-on, 1 µM magnézium, 0,5 µM kalcium és 20 mM HEPES (pH 7,4) jelenlétében HBSS oldatban végeztük (kivéve az LTB₄-termelést, l. alább).

A monocytákat intakt egerek femurjaiból és tibiáiból nyert csontvelőből tisztítottuk a CD115 (CSF-1R, c-fms) mágneses jelölését követően (CD115 MicroBead kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) pozitív szelekcióval Miltenyi LS oszlopokon a gyártó utasításainak megfelelően. A minták tisztasága >95 %-os volt F4/80 és Ly6G-festéssel áramlási citometriával történt mérés alapján. A sejteket a teljes tisztítási folyamat során 4 °C-on tartottuk, majd közvetlenül a felhasználást megelőzően 37 °C-on 10 percen keresztül előmelegítettük. Valamennyi *in vitro* monocyta-mérés 37°C-on, 1 µM magnézium, 0,5 µM kalcium és 20 mM HEPES (pH 7,4) jelenlétében HBSS oldatban történt.

³ Centrifugálást követően a sejteket felvettük 5 ml 0,2 %-os NaCl-oldatban, 30-40 másodperc lízist követően 5 ml 1,6 %-os NaCl-oldatot adtunk hozzá.

⁴ 62% Percoll gradiens: 24,8 ml Percoll (GE Healthcare), 4 ml 10x HBSS (Gibco), 0,8 ml HEPES, 10,4 ml desztillált víz.

5.6.2. *In vitro* sejtválaszok vizsgálata

5.6.2.1. Immobilizált immunkomplex felszín

Immobilizált immunkomplex felszín létrehozásához humán szérum albumint kötöttünk luminometriás illetve normál ELISA lemezek (Nunc Maxisorp F96, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) felszínéhez közvetlenül vagy poly-L-lizinnel fedett 6 cm-es szövetkultúra edények felszínére kovalensen. Ezt követően a felszínt blokkoltuk 10 %-os FCS (Invitrogen) oldattal, majd anti-HSA IgG-vel (Sigma) kezeltük (részletesen l. [373]).

5.6.2.2. Gyulladásos mediátorok vizsgálata

A gyulladásos mediátorok felszabadulásának vizsgálatához 4×10^6 sejt/ml koncentrációjú neutrophil-szuspenzióból⁵ 100 μ l-t helyeztünk immobilizált immunkomplex felszínre 96-lyukú ELISA lemezeken, majd 6 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a lemezeket. Az inkubációs idő letelte után a lemezekről a sejtszuspenziót leszívtuk, majd centrifugálást követően a sejtmentes felülúszót -20 °C-on tároltuk a mérésig (l. alább). Az LTB₄-termelés méréséhez a neutrophileket tisztítást követően 4×10^6 sejt/ml koncentrációban DMEM-ben (Sigma) vettük fel, majd a fentiekkel egyező módon előkészített immobilizált immunkomplex felszínre helyeztük és 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk, centrifugáltuk, a sejtmentes felülúszóból pedig LTB₄-szintet mértünk.

5.6.2.3. Szuperoxid-termelés vizsgálata

A neutrophilek szuperoxid-termelését fotometriás módszerrel (Labsystems Multiskan Ascent multiplate reader, Thermo Fischer Scientific) citokróm c-redukciós teszttel mértük. A fentiekkel megegyezően 100 μ l 4×10^6 sejt/ml koncentrációjú, HBSS-ben⁶ oldott neutrophil-szuspenziót helyeztünk immobilizált immunkomplex-felszínre 96-lyukú ELISA lemezeken, majd 37 °C-on történő inkubáció közben 2 percnként vizsgáltuk a minták fényelnyelését. A vad típusú neutrophil granulocyták ugyanis stimuláció hatására jelentős mennyiségű szuperoxidot ürítenek az extracelluláris térbe, mely a citokróm c-t redukálni képes. Az oxidált és a redukált citokróm c fényelnyelése 550 nm-en jelentősen különbözik, 540 nm-en viszont azonos, ezért a minták 540 és 550 nm-en mért fényelnyelésének különbségéből a citokróm c redukációjának mértéke, így a felszabadult szuperoxid mennyisége számolható (részletesen l. [II]). A minták szuperoxid termelését nmol / 10^6

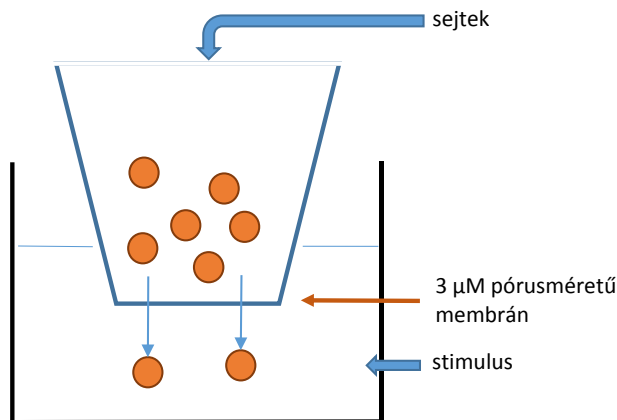
⁵ HBSS + 0,5 μ M Ca²⁺ + 1 μ M Mg²⁺ + 20 mM HEPES

⁶ HBSS + 0,5 μ M Ca²⁺ + 1 μ M Mg²⁺ + 20 mM HEPES

sejtre átszámítva a 0. időpontban mért értékek kivonása után, azaz a tényleges termelést feltüntetve ábrázoltuk az eltelt idő függvényében. A statisztikai számításokhoz az így kapott kinetikai görbékből görbe alatti területet számoltunk.

5.6.2.4. *In vitro* migrációs tesztek

A neutrophilek és monocyták *in vitro* migrációjának vizsgálatához transwell megközelítést



25. ábra: Transwell migrációs teszt sematikus rajza

A sejtek a stimulus hatására a „tölcsérből” a „kádba” vándorolnak.

alkalmaztunk. Ehhez 200 µl 4×10^6 sejt/ml koncentrációjú, HBSS-ben⁷ oldott sejtszuszpenziót helyeztünk előzetesen 150 ng/ml humán fibrinogénnel fedett 3 µm pórusátmé-
rőjű Transwell (Corning, Tewksbury, MA, USA) „tölcsérekbe”, melyeket ezután „üres” (kontroll) vagy a stimulusokat is tartalmazó oldatba merítettünk (25. ábra), majd 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltunk. A sejtek a „tölcsérek” alján lévő mem-

ránokon keresztül a stimulusokat tartalmazó oldatba vándoroltak. Stimulusként 10 µM fMLP-t, 200 ng/ml MIP-2-t, 100 ng/ml MCP-1-t, 100 ng/ml MIP-1 α -t (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) vagy 50 ng/ml LTB₄-t (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) alkalmaztunk.

A „tölcsérek” eltávolítása után az átvándorolt sejtek számát, illetve arányát monocyták esetén Neubauer kamrában történő sejtszámolással, neutrophilek esetén savas foszfatáz teszttel határoztuk meg [370].

5.6.2.4.1. Savas foszfatáz teszt

A savas foszfatáz teszt során a sejteket 10 mM PNPP-t (4-Nitrophenyl phosphate di(tris), Sigma) tartalmazó savas foszfatáz pufferben⁸ vettük fel, majd 90 perc 37 °C-on történő inkubációt követően abszorbanciát mértünk. A teszt a neutrophilekben található savas foszfatáz enzim aktivitását méri fotometriás módszerrel. A sejtek lízisét követően a hozzáadott mesterséges szubsztrátot az enzim defoszforilálja, ezáltal megváltozik annak 450 nm-

⁷ HBSS + 0,5 µM Ca²⁺ + 1 µM Mg²⁺ + 20 mM HEPES

⁸ Savas foszfatáz puffer: 500 ml steril deszillált vízben 4.1 g Na-acetát, 550 µl 96% ecetsav, 2.5 µl 20% Triton X100

en mért fényelnyelése, amely alapján az enzimaktivitásra következtetni lehet. A sejtszám meghatározásához minden kísérletben, minden genotípus esetén külön-külön felező hígítási sort készítettünk a kiindulási sejtszuszpenzióból. Ezek enzimaktivitása alapján kalibrációs görbéket vettünk fel, melyek alapján a transwell tesztben átvándorolt sejtek enzimaktivitásából a sejtszám számolható.

5.6.2.5. Neutrophil-adhézió vizsgálata

A neutrophilek ICAM-1-felszínhez történő adhéziójának vizsgálatához 96-lyukú ELISA lemezekre 10 µg/ml egér rekombináns ICAM-1-t (Fc chimera; R&D Systems) kötöttünk⁹, majd a felszínt 10 % FCS-sel blokkoltuk. Erre 100 µl 4×10^6 sejt/ml koncentrációjú, HBSS-ben¹⁰ oldott neutrophilt helyeztünk, majd ezeket 50 ng/ml TNF- α -val (Peprotech) stimuláltuk és 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a lemezekről a nem letapadt sejteket mosással eltávolítottuk, a felszínen maradók számát pedig savas foszfatáz teszttel határoztuk meg (5.6.2.4.1).

5.7. Gyulladásos mediátorok meghatározása

A korábban leírt módon preparált synoviális folyadék illetve az *in vitro* stimulált neutrophilek sejtmentes felülúszójából meghatároztuk egyes gyulladásos mediátorok koncentrációját. Viszonylag nagy számú gyulladásos mediátor tájékozódó, szemikvantitatív méréséhez egy western-blot alapú citokin array-t használtunk (Panel A from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a gyártó ajánlásának megfelelően, majd a röntgenfilmeket denzitometráltuk. Ezen túl az IL-1 β , KC, MCP-1, MIP-1 α and MIP-2 citokinek/kemokinek illetve az LTB₄ lipid mediátor szintjének pontosabb meghatározásához ELISA (R&D Systems) méréseket végeztünk a gyártó utasításai szerint.

A kapott eredményeket *in vivo* mérések esetén 1 végtagra, *in vitro* mérések esetén pedig 1 millió sejtre számoltuk át.

5.8. Az adatok ábrázolása, statisztika

Az egyes mérések elemszámát, illetve a független kísérletek számát az az egyes kísérletek bemutatásánál közlöm. A kvantitatív ábrákon *in vitro* kísérletek esetén a független kísérletekből származó mérések, *in vivo* kísérletek esetén, az egyes egereken végzett mérések

⁹ 50 mM karbonát pufferben (pH 9,6)

¹⁰ HBSS + 0,5 µM Ca²⁺ + 1 µM Mg²⁺ + 20 mM HEPES

átlagát és az átlag szórását (SEM) tüntettem fel. Az időbeli változásokat ábrázoló függvények esetén a további statisztikai elemzéshez és összehasonlításhoz a görbe alatti területet használtuk, melyből kivontuk a nulla időpontnak megfelelő értékeket.

A statisztikai szignifikancia meghatározásához az egyes genotípusok adott kísérletben adott „válaszát” használtuk. Ehhez minden kísérletben meghatároztuk az egyes genotípusok kontroll és stimulált mintái eredményének (időbeli változások esetén a görbe alatti terület) különbségét. Az így kapott értékeket normalizáltuk az azonos kísérletben mért vad típusú minták „válaszára”. Ezután a normalizált értékeken kétmintás nem-egyenlő varianciájú, heteroscedasztikus t-próbát végeztünk annak meghatározására, hogy az adott genotípus statisztikailag mennyiben tér el a vad típustól az adott mérés esetén. Szignifikanciaszintként 0,05-ös p-értéket használtunk.

6. Eredmények

6.1. A Hck, az Fgr és/vagy a Lyn szükséges az arthritis létrejöttéhez

Első körben tisztázni szeretettük volna, hogy van-e bármilyen szerepe a myeloid sejtek legfontosabb Src-típusú tirozin-kinázainak autoantitest-indukált arthritis létrejöttében. Ehhez olyan háromszorosan génkiütött (knockout, KO) egereket vizsgáltunk, melyekből egyszerre hiányzott mindhárom, a myeloid sejtekben expresszálandó Src-típusú tirozin-kináz, a Hck, az Fgr és a Lyn.

6.1.1. Intakt Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} állatok védettek az arthritisszel szemben

Vad típusú és háromszorosan génhányos, Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} (3× SFK KO) intakt egerekben K/BxN szérumbeladással arthritist indukáltunk.

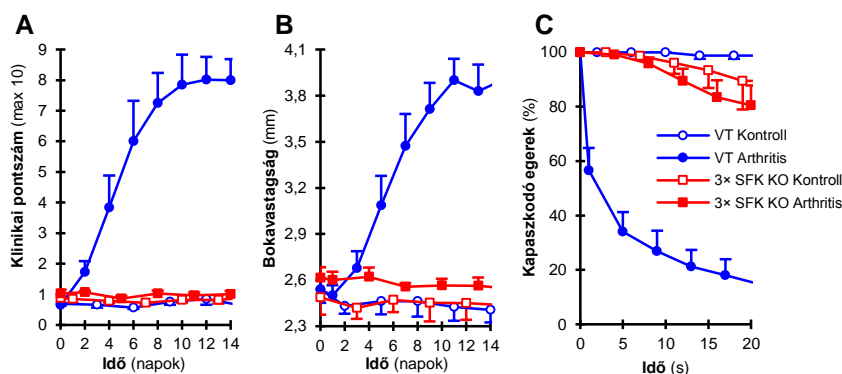


26. ábra: Autoantitest-indukált arthritis makroszkópos képe vad típusú és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} intakt egerekben

Vad típusú (VT) és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} (3× SFK KO) egerekben 300 μl kontroll vagy arthritises szérumbeladással arthritist indukáltunk. Az ábrán a 8. napon készült reprezentatív fotókat mutatunk be.

A vad típusú egerekben a szérumbeladás hatására jelentős mértékű gyulladás alakult ki annak klasszikus klinikai tüneteivel (26. ábra). A Hck, Fgr és Lyn együttes genetikai hiányában azonban a betegség nem jött létre. Hosszabb időn keresztül vizsgálva az egereket nyilvánvalóvá válik, hogy a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} háromszorosan génhányos egerek

teljes mértékben védettek az autoantitestek által kiváltott arthritisszel szemben, mind a betegség klinikai jelei (**27. ábra A**, $p = 4.2 \times 10^{-5}$; $n = 6$), mind pedig a boka megvastagodásával mérhető oedema ellen (**27. ábra B**, $p = 4.5 \times 10^{-4}$; $n = 6$).



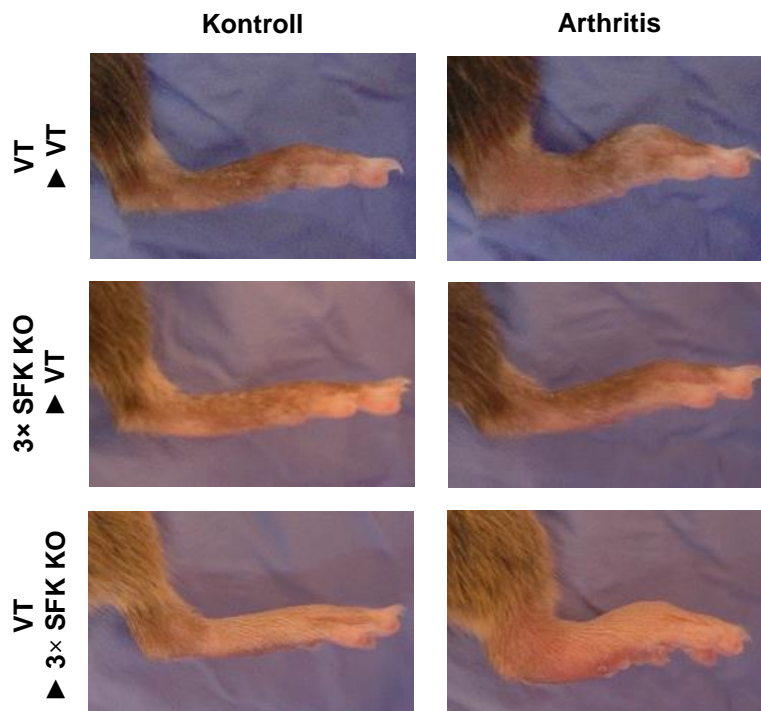
27. ábra: Autoantitest-indukált arthritisz vad típusú és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ intakt egerekben

Vad típusú és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ ($3 \times SFK$ KO) egerekben $300 \mu l$ kontroll vagy arthritisesz szérummal arthritist indukáltunk, majd a betegség lefolyását követtük naponta klinikai pontozással (A), a bokavastagság mérésével (B) illetve a 6-12 nap között végzett ízületi funkcióstesztel (C).

Az arthritisz következtében kialakuló ízületi funkciókárosodás mértékét egy biológiai próbával, a rácson történő fejjel lefelé függeszkedéssel vizsgáltuk (l. 5.2 szakasz) [370]. Az arthritisz következtében a vad típusú egerek ízületi funkciója jelentős mértékben károsodott, nem voltak képesek a rácson megkapaszkodni, többségük a rácsmegfordítását követően néhány másodpercen belül leesett (**27. ábra C**). Ezzel szemben a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ háromszorosán génhányos egerek ízületi funkciója nem károsodott, a legtöbbjük a teljes 20 másodperces vizsgálati idő alatt a rácson maradt ($p = 9.5 \times 10^{-6}$; $n = 6$).

6.1.2. A $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ fenotípusért haematopoietikus sejtek felelősek

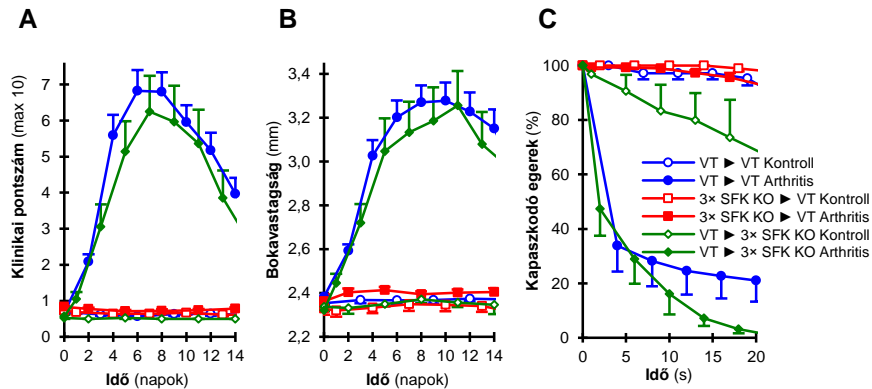
Annak eldöntésére, hogy a Hck, Fgr és Lyn kinázok a haematopoietikus rendszerben vagy azon kívül szükségesek az arthritisz kialakulásához, csontvelői kimérákat alkalmaztunk: $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ csontvelőt transzplantáltunk vad típusú recipiensekbe és fordítva. Kontrollként olyan kimérákat használtunk, melyekben mind a donor, mind a recipiens vad típusú volt. Ezekben a kezelés hatására az intakt vad típusú egerekkel lényegében megegyező mértékű arthritisz jött létre. Amennyiben a Hck, Fgr és Lyn csak a haematopoietikus rendszerből hiányzott ($3 \times SFK$ KO \blacktriangleright VT), az egerekben nem alakult ki gyulladás (**28. ábra**). Ezzel szemben vad típusú csontvelővel transzplantált $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ recipiens egerekben a vad típusúhoz hasonló mértékű gyulladást figyeltünk meg (**28. ábra**).



28. ábra: Autoantitest-indukált arthritis makroszkópos képe $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ csontvelői kimérákban

Vad típusú és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ csontvelőt transzplantáltunk vad típusú (VT ▶ VT illetve $3 \times SFK KO$ ▶ VT) és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ (VT ▶ $3 \times SFK KO$) recipiensekbe, majd arthritist indukáltunk. Az ábrán a 8. napon készült reprezentatív fotókat mutatunk be.

A betegség időbeli lefolyását a **29. ábra** mutatja. A haematopoeticus rendszerükben Hck , Fgr , Lyn háromszoros génhianyos, egyebekben minden más szövetüket tekintve vad típusú csontvelői kimérák teljes mértékben védettek az arthritis kialakulásával szemben (**29. ábra**): mind a klinikai súlyosság ($p = 2.0 \times 10^{-12}$; $n = 14 - 21$), mind a bokavastagodás ($p = 3.5 \times 10^{-11}$; $n = 14 - 21$), mind pedig az ízületi funkció érintettsége ($p = 1.2 \times 10^{-7}$; $n = 14 - 21$) tekintetében. Ezzel szemben a Hck , Fgr és Lyn hiánya a haematopoeticus rendszeren kívül nem befolyásolta az arthritis lefolyását (**29. ábra**) sem a klinikai súlyosság ($p = 0,36$; $n = 7$), sem a bokavastagodás ($p = 0,37$; $n = 7$) mértékét illetően, az ízületi funkció pedig még valamivel jobban is érintett, mint a vad típus esetében ($p = 0,028$; $n = 7$).



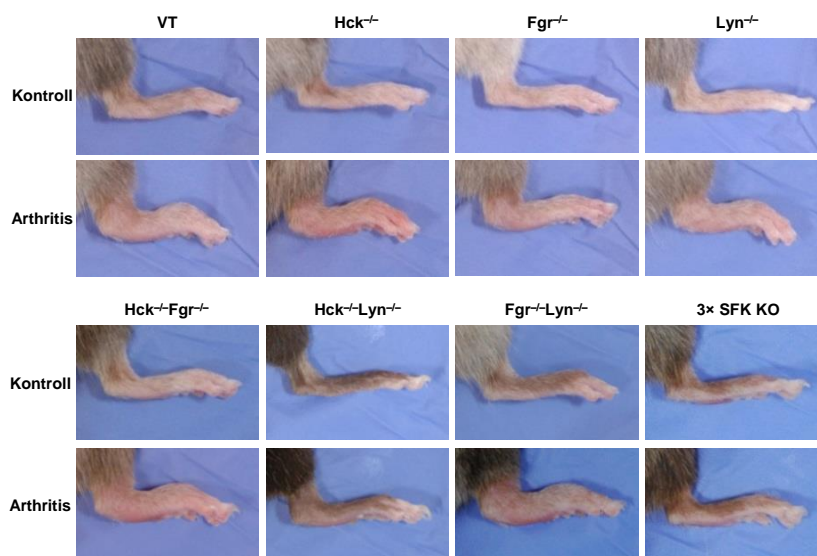
29. ábra: Autoantitest-indukált arthritis $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ csontvelői kimérákban
Vad típusú és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ csontvelőt transzplantáltunk vad típusú (VT \blacktriangleright VT illetve $3 \times$ SFK KO \blacktriangleright VT) és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ (VT \blacktriangleright $3 \times$ SFK KO) recipiensekbe, majd arthritist indukáltunk, és azt klinikai pontozással (A), a bokavastagság mérésével (B) és ízületi funkciós teszttel követtük (C). Az ábrán genotípusonként 4-12 kontroll és 7-26 arthritises székkel kezelt kíméra átlagát és az átlag szórását tüntettük fel 5 független kísérletből.

Ezek az eredmények pedig arra utalnak, hogy a *Hck*, *Fgr* és *Lyn* Src-típusú tirozinkinázok elengedhetetlenül szükségesek a haematopoieticus kompartment valamely elemében az autoantitest-indukált ízületi gyulladás kialakulásához.

6.2. Az arthritis kialakulása során a *Hck*, *Fgr* és *Lyn* egymást helyettesíthetik

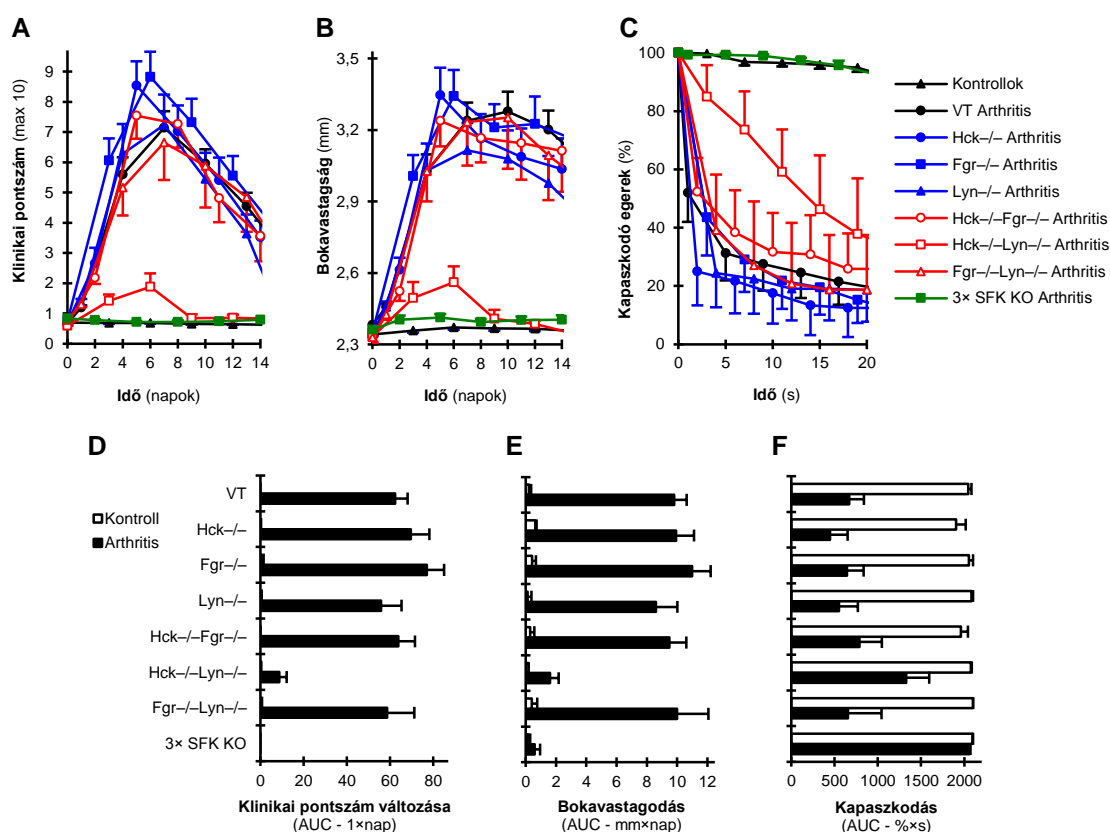
A korábbiakban láttuk, hogy a *Hck*, *Fgr* és *Lyn* együttes hiányában az autoantitest-indukált arthritis nem jön létre, a továbbiakban tisztázni akartuk, hogy melyik kináz felelős mindezzért.

Ennek eldöntésére a *Hck*, *Fgr* és *Lyn* hiányának valamennyi lehetséges kombinációját megvizsgáltuk. Csontvelői kimérákat hoztunk létre, melyekbe *Hck*, *Fgr* illetve *Lyn* egyszeresen, kétszeresen vagy háromszorosan génhányos donor csontvelőt transzplantáltunk. A $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ kettős génhányos egerek ismert, korábban mások által is leírt korai mortalitása [364] miatt intakt egereket ebben az esetben csak viszonylag nagy kompromisszumok árán tudtunk volna alkalmazni: lényegesen alacsonyabb életkor, a súlyos myeloproliferáció miatt jelenősen kisebb testsúly, stb.. Tekintettel arra, hogy a korábbi eredményeink alapján a *Hck*, az *Fgr* és/vagy a *Lyn* a haematopoieticus rendszerben szükségesek az arthritis kialakulásához, a csontvelői kimérák használata mellett döntöttünk.



30. ábra: Hck, Fgr és Lyn egyszeres és többszörös hiányának hatása az autoantitest-indukált arthritis kialakulására 1.

Reprezentatív fotók a 8. napon.



31. ábra: Hck, Fgr és Lyn egyszeres és többszörös hiányának hatása az autoantitest-indukált arthritis kialakulására 2.

Vad típusú (12 kontroll és 26 arthritises), $Hck^{-/-}$ (6, 10), $Fgr^{-/-}$ (7, 11) és $Lyn^{-/-}$ (5, 11) egyszeres, $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ (7, 10), $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ (1, 7) és $Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ (5, 8) kétszeres illetve $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ ($3 \times$ SFK KO; 12, 21) háromszoros génhianyos csontvelői kimérák 10 független

kísérletből. Az (A-C) paneleken valamennyi genotípus kontrolljait összevontuk. A (D-F) értékeit az (A-C)-n bemutatott adatokból számoltuk. A grafikonokon az átlagot és az átlag szórását (SEM) tüntettük fel. A (C) és (E) panel ízületi funkciós méréseit minden egéren 3-20 alkalommal végeztük el. A $Hck^{+/-}Fgr^{+/-}Lyn^{+/-}$ kimérák között a **29. ábra** adatai is szerepelnek.

Sem a Hck, sem az Fgr sem pedig a Lyn egyszeres genetikai hiányának nem volt semmilyen hatása az autoantitest-indukált arthritis kialakulására, a betegség ezekben az állatokban a vad típusal megegyező mértékben zajlott le (**30. ábra** és **31. ábra**, statisztikai adatokat l. az **5. táblázatban**). A $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ és az $Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ kétszeres génhíányos csontvelői kimérákban szintén nem figyeltünk meg szignifikáns károsodást. A $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ kettszörös génhíányos állatok esetében ugyanakkor jelentős, statisztikailag szignifikáns, de közel sem teljes károsodást tapasztaltunk. Valószínűleg ez nagy részben annak is köszönhető, hogy ezek az állatok meglehetősen leromlott általános egészségi állapotban voltak [364].

Fontos kiemelni azonban, hogy teljes károsodást, azaz az ízületi gyulladással szembeni teljes védettséget kizárólag a Hck és Fgr és Lyn együttes hiányában, a háromszoros génhíányos állatokban láttunk. Ez pedig arra utal, hogy az autoantitest-indukált arthritis létrejöttében a három Src-típusú tirozin-kináz egymást szinte teljes mértékben helyettesíteni tudja. A továbbiakban ezért a mechanizmus felderítését a háromszorosan génhíányos állatokon végeztük.

5. táblázat: Hck, Fgr, Lyn egyszeres és többszörös hiányának hatása autoantitest-indukált arthritis kialakulására

A **30. ábra** adataiból számolt statisztikai elemzés. A kinetikai görbékből egerenként görbe alatti területet számoltunk, majd ebből minden kísérletben az arthritises sérummal kezelt egerek esetén levontuk az adott genotípus kontroll egereinek értékeit, végül az adott kísérletben hasonlóan számolt vad típusú arthritises „válaszra” normalizáltunk. A táblázatban valamennyi kísérletből származó adat átlagát, az átlag szórását, a normalizált válasz átlagát, az átlag szórását illetve a vad típusal való összevetés p-értékét tüntettük fel.

Genotípus	Válasz	SEM	n =	Relatív válasz (VT %-ában)	SEM	p=
Integrált klinikai pontszám						
VT	62,37	5,74	26	100,00	7,98	1,000
$Hck^{+/-}$	69,68	8,47	10	104,32	15,63	0,809
$Fgr^{+/-}$	77,04	8,00	11	109,02	13,72	0,577
$Lyn^{+/-}$	55,80	9,47	11	82,43	16,05	0,342
$Hck^{+/-}Fgr^{+/-}$	63,90	7,58	10	87,24	9,00	0,300
$Hck^{+/-}Lyn^{+/-}$	8,77	3,32	7	11,96	4,62	1,18E-10
$Fgr^{+/-}Lyn^{+/-}$	58,61	12,63	8	101,50	23,15	0,952
3× SFK KO	-1,20	0,48	21	-0,41	0,98	1,98E-12
Integrált bokavastagodás						
VT	9,80	0,83	26	100,00	9,06	1,000
$Hck^{+/-}$	9,93	1,19	10	102,83	16,64	0,883
$Fgr^{+/-}$	10,99	1,21	11	114,34	14,98	0,424
$Lyn^{+/-}$	8,59	1,42	11	88,25	16,66	0,544
$Hck^{+/-}Fgr^{+/-}$	9,50	1,11	10	92,97	10,37	0,615
$Hck^{+/-}Lyn^{+/-}$	1,60	0,57	7	12,86	4,80	1,40E-09

Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-}	9,99	2,07	8	120,27	27,38	0,501
3× SFK KO	0,59	0,36	21	5,29	4,19	3,47E-11
Ízületi funkció (kapaszkodás)						
VT	669,56	172,03	16	100,00	10,45	1,000
Hck ^{-/-}	446,50	204,86	10	96,72	14,15	0,854
Fgr ^{-/-}	643,61	193,86	11	99,59	13,19	0,981
Lyn ^{-/-}	550,91	220,08	11	95,03	15,24	0,791
Hck ^{-/-} Fgr ^{-/-}	787,83	258,94	10	70,60	12,49	0,086
Hck ^{-/-} Lyn ^{-/-}	1326,89	269,02	5	46,10	17,35	0,032
Fgr ^{-/-} Lyn ^{-/-}	654,28	390,70	4	99,80	28,39	0,995
3× SFK KO	2056,27	14,85	14	4,12	1,60	1,22E-07

6.3. A Hck, Fgr és Lyn kizárólag neutrophileket érintő hiánya elegendő az arthritisszel szembeni teljes védelemhez

A következőkben azt szeretnénk volna pontosítani, hogy a haematopoeticus rendszer mely eleme lehet felelős a tapasztalt fenotípusért. Tekintettel arra, hogy a neutrophilek nélkülözhetetlen szerepe a modell működésében ismert volt, kíváncsiak voltunk, hogy az Src-kinázok a neutrophilekben játszott szerepe elégséges-e a teljes védelemhez.

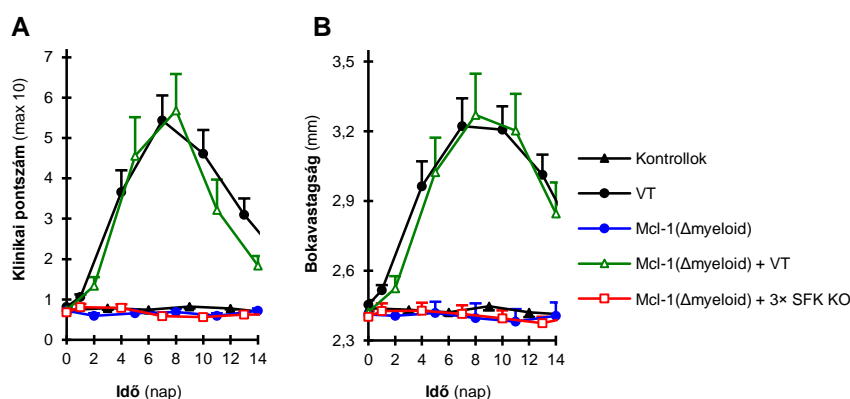
Ennek eldöntésére a legjobb kísérletes megközelítés a sejtvonalspecifikus génhányos állatok használata lenne. Kísérleteink idejében azonban nem állt rendelkezésre a Hck, Fgr vagy Lyn sejtvonalspecifikus törlését lehetővé tevő ún. floxált formája. Még akkor is, ha ez rendelkezésre állt volna, a szükséges keresztezések és ellenőrzések nagyon sok időt, energiát és költséget emésztettek volna fel.

Ezért egy alternatív megközelítést alkalmaztunk. Az elképzelésünk az volt, hogy egy neutrophilhiányos, de minden egyéb haematopoeticus sejtjét illetően lényegében vad típusú egérből származó csontvelőt Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} csontvelővel keverünk össze, és azt vad típusú recipiensekbe transzplantáljuk. Ezzel egy olyan kimérát hozunk létre, amelyben minden haematopoeticus sejttypusból mind vad típusú, mind Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} megtalálható, kivéve a neutrophileket, amelyek – lényegében – mindegyike Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}.

Az Mcl-1 antiapoptoticus fehérje hiánya az adott sejt pusztulásához vezet. Egy adott sejtvonalspecifikus törléséhez tehát elegendő, ha az Mcl-1 fehérjét célzottan kiütjük abból a sejtvonalból. Erre alkalmas módszer az ún. Cre-Lox rendszer. A kiütni (funkcióképtelenné tenni) kívánt gén működése szempontjából kritikus részét loxP szekvenciákkal körbevéve (flanking loxP = flox) az adott szakaszt a bakteriális eredetű Cre rekombinázzal kivághatjuk, ezáltal tönkretéve a gént. A rendszer specificitásáért a Cre-t hajtó promotor felel. Esetünkben ez a LysM, mely kizárólag a myeloid sejtekből törli az Mcl-1-t (viszonylag jó hatásfokkal), ezáltal azok specifikus pusztulását, végső soron hiányát idézi elő. Érdekes módon azonban csak a neutrophilekét, azok száma a saját kezünkben kb. 95%-al

csökken, a monocyták, macrophagok fejlődése, száma és funkciója azonban nem érintett [374].

A várakozásoknak megfelelően ezek a neutrophilhiányos $Mcl-1^{flox/flox}LysM^{cre/cre}$ ($Mcl-1^{\Delta myeloid}$) egerek teljes mértékben védettek az autoantitest-indukált arthritisszel szemben (**32. ábra**; klinikai pontszám: $p = 0,0013$; bokavastagság: $p = 0,0017$; $n = 4$).



32. ábra: Vad típusú csontvelő megmenti az arthritist $Mcl-1^{\Delta myeloid}$ neutrophilhiányos egerekben $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ viszont nem

Összesen 7 kontroll és 10 arthritises szérummal kezelt vad típusú (intakt heterozigóta valamint VT:VT kevert kiméra együtt), 1 illetve 4 $Mcl-1^{flox/flox}LysM^{cre/cre}$ ($Mcl-1^{\Delta myeloid}$) intakt egeret, továbbá 3 illetve 7 $Mcl-1^{\Delta myeloid}$:vad típusú és 3 illetve 6 $Mcl-1^{\Delta myeloid}$: $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ kevert kimérát vizsgáltunk klinikai pontozással (A) és a bokavastagság mérésével (B) 3 független kísérletben. Az ábrán az átlagokat és az átlag szórását tüntettük fel.

Vad típusú csontvelő hozzáadásával (kevert csontvelői kimérákban) a betegség iránti fogékonyság visszaállítható (klinikai pontszám: $p = 0,43$; bokavastagság: $p = 0,29$; $n = 7$), $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ csontvelővel azonban nem (klinikai pontszám: $p = 0,43$; bokavastagság: $p = 0,29$; $n = 7$).

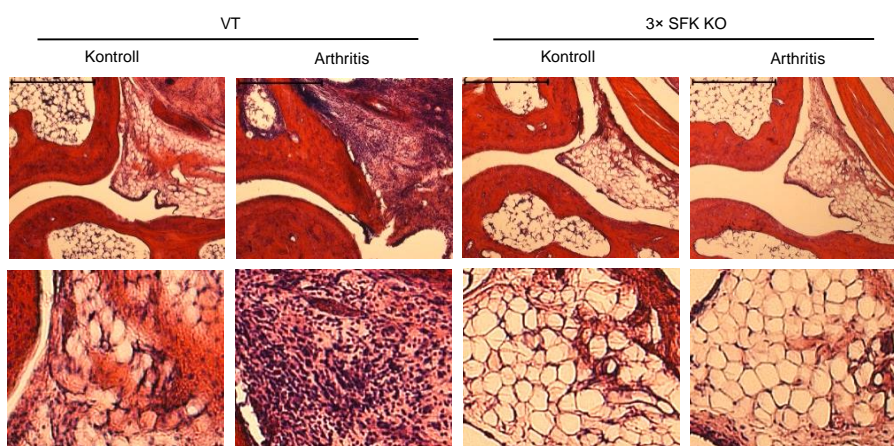
Megfordítva, a Hck , Fgr és Lyn Src-kinázok kizárólag neutrophileket érintő hiánya elegendő az autoantitest-indukált arthritisszel szembeni teljes védettséghez.

6.4. Hck , Fgr és Lyn hiányában a myeloid sejtek gyulladásoos infiltrációja elmarad

Korábban munkacsoportunk és mások is kimutatták, hogy a $CD18$ (β_2) integrin hiányában az egerek lényegében teljesen védettek az autoantitest-indukált K/BxN modellben a betegség kialakulásával szemben ([11], [II] és **53. ábra**). Eddigi ismereteink szerint ez annak köszönhető, hogy a β_2 integrinek (elsősorban az LFA-1) működése elengedhetetlen a sejtek megfelelő endogén migrációs képességéhez [9]. Az Src-kinázok integrin outside-in

szignalizációban és az autoantitest-indukált gyulladásokban betöltött szerepe együttesen azt sugallja, hogy ezen kinázok a vizsgált gyulladásos modellek esetében a β_2 integrinek jelátvitelén keresztül a sejtek endogén migrációs képességében, a gyulladás helyére történő vándorlásukban vesznek részt. Ezért a következőkben megvizsgáltuk a myeloid sejtek gyulladás helyén történő akkumulációját.

Az autoantitestekkel kiváltott gyulladásos folyamat következtében vad típusú egerek esetén szövettani vizsgálattal jelentős myeloid infiltrációt találtunk (**33. ábra**), mely Hck, Fgr és Lyn genetikai hiányában teljes mértékben elmarad.

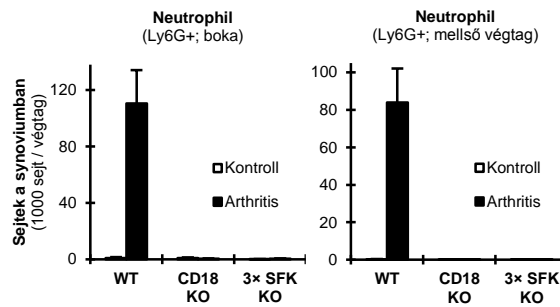


33. ábra: Gyulladásos infiltráció szövettani vizsgálata

Reprezentatív hematoxylin-eosinnal festett szövettani képek 4-4 kontroll és 6-6 arthritises szérummal kezelt vad típusú és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ intakt egérből 2 független kísérletből. Az alsó képek a felsőkből lettek nagyítva. A skála 200 μm -nek felel meg.

A sejtinfiltráció kvantitatív méréséhez áramlási citometriát használtunk. Autoantitesteket tartalmazó szérummal történt kezelést követően a 4. napon kimostuk a (gyulladt) ízületek környékét, majd a specifikus sejtfelszíni markereik alapján megszámláltuk az egyes myeloid sejttypusokat.

A vad típusú egerekben az autoantitestek hatására jelentős mértékű $Ly6G^+$ neutrophilinfiltráció alakult ki, mely teljes mértékben CD18-függőnek bizonyult. A β_2 -integrinek hiányában ugyanis a neutrophilek nem voltak képesek bejutni az ízületekbe (**34. ábra**; $p = 6,8 \times 10^{-5}$ illetve $1,6 \times 10^{-4}$ a boka illetve a mellső végtag esetén; $n = 5$). Hasonlóképpen a neutrophilek infiltrációja teljes mértékben károsodott a Hck, Fgr és Lyn együttes genetikai hiányában ($p = 7,2 \times 10^{-5}$ illetve $1,7 \times 10^{-4}$; $n = 13$).



34. ábra: Szöveti neutrophilinfiltráció autoantitest-mediált arthritiszben

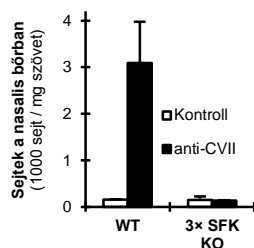
Az egereket 300 μ l kontroll illetve arthritises szérummal kezeltük ip., a 4. napon a jelzett ízület környékét kimostuk, áramlási citométerrel számoltuk. Az ábrán az átlagot és az átlag szórását tüntettük fel 2-6 független kísérletben lemért 3-7 kontroll és 5-13 arthritises szérummal kezelt egérből genotípusonként.

Elméletileg ezzel lényegében megegyező képet kapnánk, amennyiben a mutációk a neutrophilek számának csökkenését, neutropaeniát okoznának, ezért fontos a perifériás vér neutrophilszámának ellenőrzése. A vad típushoz képest azonban mind a CD18^{-/-}, mind a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekben jelentősen nagyobb perifériás neutrophilszámot találtunk mind az arthritis indukcióját megelőzően, mind pedig a neutrophilek ízületi infiltrációja vizsgálatának időpontjában (6. táblázat).

6. táblázat: Myeloid sejtszámok a perifériás vérben

Genotípus	Neutrophil (sejt / μ l vér)		Monocya / Macrophag (sejt / μ l vér)	
	0. nap	4. nap	0. nap	4. nap
WT	0.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	433 \pm 90,	258 \pm 40
CD18 ^{-/-}	10.7 \pm 2.1	16.9 \pm 5.7	710 \pm 144	1591 \pm 351
3x SFK KO	2.5 \pm 0.6	4.6 \pm 1.6	553 \pm 154	244 \pm 59

Az Src-típusú tirozin-kinázok autoantitest-mediált gyulladásokban betöltött szerepének általánosabb megközelítése céljából egyéb betegségmodelleket is alkalmaztunk, jelesül az emberi epidermolysis bullosa acquisita autoantitest-mediált egérmodelljét, mely szintén Src-típusú tirozin-kináz-függőnek bizonyult [I]. Az autoantitest-indukált arthritishoz hasonlóan a kezelés hatására vad típusú egerekben jelentős mértékű neutrophilinfiltráció alakul ki, mely Hck, Fgr és Lyn együttes genetikai hiányában teljes mértékben elmarad (35. ábra).

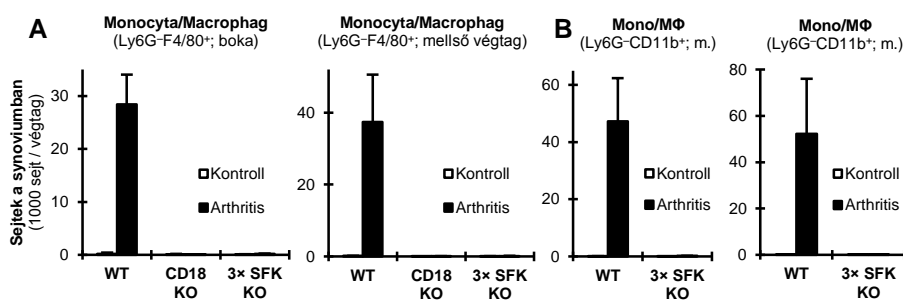


35. ábra: Neutrophil-infiltráció EBA-ban

Kettő független kísérletből genotípusonként összesen 2-2 kontroll és 4-4 anti-CVII-kezelt eger nasalis bőrből emésztést követően meghatározott neutrophilszámok. Az ábrán az átlagot és az átlag szórását tüntettük fel.

A következőkben megvizsgáltuk a másik, kiemelkedően fontosnak tartott myeloid sejttípus, a monocyta/macrophag sejtek infiltrációját. Vad típusú egerekben az autoantitest-kezelés hatására a gyulladás helyére sok Ly6G⁺F4/80⁺ sejt vándorolt, mely ebben az esetben is teljes mértékben CD18-függőnek bizonyult (36. ábra A; $p = 6,8 \times 10^{-5}$ és $1,6 \times 10^{-4}$ a boka illetve a mellső végtag esetén; $n = 5$).

Ehhez hasonlóan a 3 vizsgált Src-kináz együttes hiányában az Ly6G⁺F4/80⁺ sejtek gyulladás helyére történő vándorlása szintén elmarad (36. ábra A; $p = 7,2 \times 10^{-5}$ illetve $1,7 \times 10^{-4}$; $n = 13$). A látottak háttérében a monocyta/macrophag sejtek szervezeti szintű hiánya nem állhat, hiszen ezek száma a perifériás vérben a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekben a vad típussal lényegében megegyezik, a CD18^{-/-} állatok esetén pedig annál lényegesen magasabb (6. táblázat).



36. ábra: Monocyta/macrophag sejtek infiltrációja a gyulladás helyére

Monocyta/macrophag sejtszámok 2-5 független kísérletből a kezelést követő 4. napon 7-7 kontroll és 13-13 arthritises szérummal kezelt intakt vad típusú és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} valamint 3 és 5 CD18^{-/-} eger ízületeiből kimosással nyert mintákban. Az ábrán az összes minta átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

A korábban látottakkal megegyező eredményre jutottunk, amennyiben a monocyta/macrophagokat mint Ly6G⁺CD11b⁺ sejteket definiáltuk: Hck, Fgr és Lyn hiányában az infiltráció elmarad (36. ábra B; $p=0,015$ illetve $0,031$ a boka és a mellső végtag

esetén; n = 6). Ezt a megközelítést CD18^{-/-} egereken nem tudtuk alkalmazni, mert CD18 hiányában a CD11b (és a CD11a) sem expresszálódik a sejtek felszínén.

Mindösszesen tehát mind a β_2 integrinek-, mind az Src-típusú tirozin-kinázok genetikai hiányában az autoantitest-indukált gyulladások során a myeloid sejtek (neutrophilek és monocyták/macrophagok) szövetekbe történő vándorlása teljes mértékben elmarad.

6.5. A *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} myeloid sejtek endogén migrációs képessége megtartott

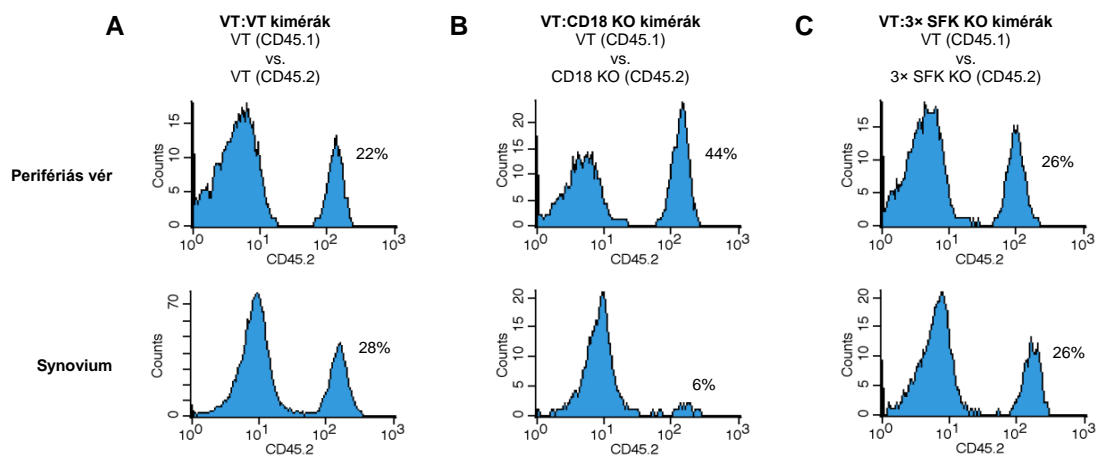
A fenti eredmények arra utalnak, hogy a Hck, Fgr és Lyn Src-kinázok hiánya egy β_2 -integrin-függő migrációs károsodáshoz vezet. A következőkben azt szeretettük volna megvizsgálni, hogy e mögött vajon a myeloid sejtek endogén migrációs képességének károsodása áll-e.

6.5.1. Neutrophilek és monocyták/macrophagok *in vivo* képesek a gyulladás helyére vándorolni

Ennek eldöntésére egy olyan, kevert csontvelői kimérákra alapuló megközelítést alkalmaztunk, melyben az egyes géntípusú és vad típusú sejteket *in vivo* egyazon szervezeten, egyazon gyulladással környezetben belül közvetlenül hasonlíthattuk össze (részletesen 1. 5.5). Az egyes genotípusok elkülönítését az tette lehetővé, hogy donorként a CD45 sejtfelszíni marker eltérő alléljait (CD45.1 illetve CD45.2) hordozó egereket használtunk. Előzetesen besugarazott recipiensekbe ennek megfelelően CD45.1-t hordozó vad típusú és CD45.2-t kifejező vad típusú, CD18^{-/-} illetve *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} géntípusú donorokból származó csontvelői sejtek keverékét transzplantáltuk, olyan kevert csontvelői kimérákat hozva létre, melyekben egyazon szervezeten belül mindkét genotípus myeloid sejtjei jelen vannak. Végül a kimérákban arthritist indukáltunk, és meghatároztuk az ízületekbe vándorolt CD45.2-pozitív (géntípusú) myeloid sejtek arányát (5.5 és 24. ábra).

6.5.1.1. A neutrophilek önmagukban képesek bejutni a gyulladás helyére

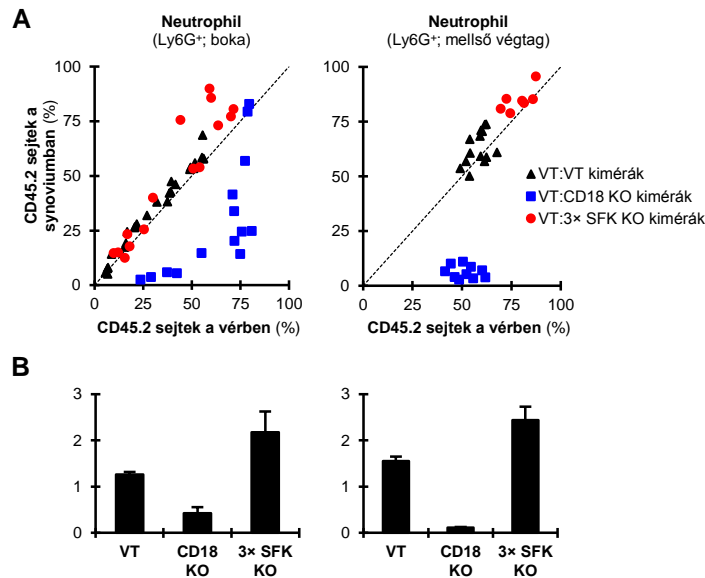
A 37. ábra reprezentatív csontvelői kimérák perifériás véréből és synoviumából származó neutrophilek CD45.2 hisztogramjait mutatja.



37. ábra: *In vivo* migráció $CD18^{-/-}$ és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ kevert kimérákban áramlási citometriával

$CD45.1$ -t expresszáló vad típusú és $CD45.2$ -t expresszáló vad típusú ($VT:VT$), $CD18^{-/-}$ ($VT:CD18 KO$) vagy $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ ($VT:3 \times SFK KO$) donor csontvelő változó arányú keverékének transzplantációjával létrehozott kevert csontvelői kimérákban arthritist indukáltunk, majd a 4. napon elemeztük a perifériás vér és a synovialis folyadék sejtösszetételét (l. 5.4.2 és 5.5). Az ábrán 1-1 reprezentatív kiméra synovialis neutrophiljeinek ($Ly6G^{+}$) $CD45.2$ festődését mutatjuk. A százalékos adatok a $CD45.2^{+}$ sejtek arányát jelzik az $Ly6G^{+}$ kapun belül.

Várákozásunknak megfelelően a kontrollként használt vad típusú:vad típusú kevert kimérákban a $CD45.2$ -pozitív sejtek aránya a perifériás vérben és a synoviumban lényegében megegyezik (**37. ábra**). Ezzel szemben vad típusú: $CD18^{-/-}$ kevert kimérákban a $CD45.2$ -pozitív, azaz $CD18^{-/-}$ sejtek aránya a synoviumban lényegesen alacsonyabb, mint a perifériás vérben, amely arra utal, hogy a neutrophilek $CD18$ hiányában nem képesek bejutni a gyulladás helyére, azaz endogén migrációs képességük erősen $CD18$ -függő. Meglepetésünkre a vad típusú: $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ kevert kimérákban a $CD45.2$ -pozitív, azaz a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ neutrophilek aránya a perifériás vérben és a synoviumban lényegében megegyezik, tehát, amennyiben egyidejűleg vad típusú sejtek is jelen vannak, az Src-típusú tirozin-kinázok nem szükségesek a neutrophilek gyulladás helyére történő vándorlásához (**37. ábra**).



38. ábra: Neutrophil *in vivo* migráció kevert kimérákban

CD45.1-t expresszáló vad típusú és *CD45.2-t* expresszáló vad típusú (VT:VT), *CD18^{-/-}* (VT:CD18 KO) vagy *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* (VT:3× SFK KO) donor csontvelő változó arányú keverékének transzplantációjával létrehozott kevert csontvelői kimérákban arthritist indukáltunk, majd a 4. napon meghatároztuk a perifériás vér és a synovialis folyadék neutrophiljeinek *CD45.1⁺/CD45.2⁺* arányát (A), illetve az abból számolt relatív migráció átlagát és az átlag szórását (B). Az adatok csoportonként 6-26 egérből, 5-11 független kísérletből származnak. (A) Minden pont egy-egy kevert kimérát jelöl.

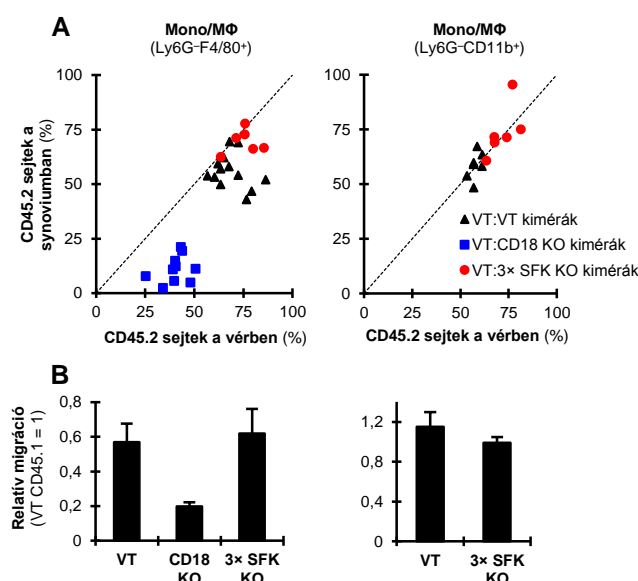
Nagy számú kevert csontvelői kimérán végzett hasonló kísérletek eredményeit a **38. ábra** összegzi, amelyben minden egyes pont egy-egy külön kevert csontvelői kimérát jelöl. A vad típusú:vad típusú és a vad típusú: *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* kevert csontvelői kimérákat jellemző adatpontok a szaggatott vonallal jelzett 45°-os egyenes mentén szórnak, mely azt jelenti, hogy a *CD45.2*-pozitív sejtek aránya a perifériás vérben és a synoviumban megegyezik, a *CD45.2*-pozitív neutrophilek endogén migrációs képessége azonos a *CD45.1*-pozitív vad típusú sejtekével. A vad típusú:*CD18^{-/-}* kevert csontvelői kimérák pontjai ehhez képest jellemzően a jobb alsó sarok irányába tolnak, mely arra utal, hogy a *CD45.2*-pozitív, azaz a *CD18^{-/-}* neutrophilek kevésbé képesek belépni a gyulladás helyére, mint a velük egy szervezetben lévő *CD45.1*-pozitív vad típusú társaik.

A látottak számszerűsítésére ugyanezen adatokból relatív migrációt számoltunk (**38. ábra B**), mely megerősítette azon megfigyelésünket, hogy a neutrophilek gyulladás helyére történő endogén migrációs képessége erősen függ a *CD18* integrinek jelenlététől ($p = 3,6 \times 10^{-10}$ illetve $1,0 \times 10^{-9}$ boka és a mellső végtag estén; $n = 10 - 15$). Nem szükségesek hozzá azonban az Src-típusú tirozin-kinázok, sőt hiányukban a neutrophilek endogén migrációs képessége még némileg fokozódik is ($p = 0,020$ illetve $0,11$; $n = 7 - 15$).

6.5.1.2. A macrophagok gyulladás helyén történő megjelenése nem károsodott

A fentiekhez hasonlóan kevert csontvelői kimérákban meghatároztuk a CD45.2-t hordozó monocyta/macrophag sejtek arányát a synovialis infiltrátumban, és azt összevetettük a perifériás vér CD45.2-pozitív monocytáinak arányával (39. ábra).

A neutrophilekhez hasonló módon a CD18 integrinek hiánya jelentősen csökkentette a synoviumban a CD45.2-t expresszáló Ly6G⁻F4/80⁺ macrophagok arányát a perifériás vér Ly6G⁻F4/80⁺ monocytáihoz képest (39. ábra; $p = 8,0 \times 10^{-6}$; $n = 7$). A Hck, Fgr és Lyn kinázok hiánya azonban nem befolyásolta a Ly6G⁻F4/80⁺ monocyta/macrophag sejtek gyulladás helyén történő megjelenését ($p = 0,83$; $n = 5$). Egy másik megközelítéssel vizsgálva, a monocyta/macrophagokat Ly6G⁻CD11b⁺ sejtekként definiálva, azok endogén migrációs képessége szintén Hck-, Fgr- és Lyn-függetlennek bizonyult (39. ábra; $p = 0,37$; $n = 6$).



39. ábra: Monocyta/macrophag *in vivo* migráció kevert kimérákban

CD45.1-t expresszáló vad típusú és CD45.2-t expresszáló vad típusú (VT:VT), CD18⁻ (VT:CD18 KO) vagy Hck⁻Fgr⁻Lyn⁻ (VT:3× SFK KO) donor csontvelő változó arányú keverékének transzplantációjával létrehozott kevert csontvelői kimérákban arthritist indukáltunk, majd a 4. napon meghatároztuk a perifériás vérből és a synovialis folyadékból a monocyta/macrophagok CD45.1⁺/CD45.2⁺ arányát (A), illetve az abból számolt relatív migráció átlagát és az átlag szórását (B). Az adatok csoportonként 6-26 egérből, 5-11 független kísérletből származnak. (A) Minden pont egy-egy kevert kimérát jelöl.

Összességében tehát, amennyiben a kevert csontvelői kimérákban egyidejűleg vad típusú sejtek is jelen vannak, a Hck⁻Fgr⁻Lyn⁻ neutrophilek és monocyta/macrophagok

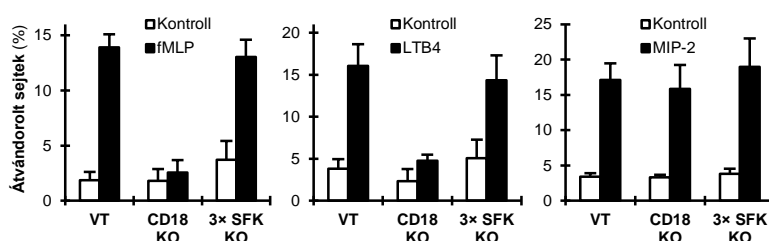
gyulladás helyén történő megjelenése nem károsodott, azaz a CD18^{-/-}-okkal ellentétben a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} myeloid sejtekben nincs endogén migrációs defektus.

6.5.2. Neutrophilek és monocyták *in vitro* migrációs képessége normális

A korábban tapasztaltak, azaz a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} myeloid sejtek normális endogén migrációs képességének további megerősítése érdekében megvizsgáltuk, hogy azok egyes jól meghatározott kemokinek hatására milyen mértékben képesek *in vitro* egy membránon átvándorolni vad típusú és CD18-hiányos sejtekkel összehasonlítva.

6.5.2.1. Neutrophilek *in vitro* migrációja

A bakteriális/mitokondriális jeleket utánzó formilált tripeptid fMLP hatására vad típusú neutrophilek jelentős mértékben képesek átjutni egy fibrinogénnel fedett membránon (40. ábra). A sejtek ezen képessége teljes mértékben CD18-függő ($p = 4,1 \times 10^{-4}$; $n = 4$), azonban Src-típusú tirozin-kinázoktól független ($p = 0,17$; $n = 4$).



40. ábra: Neutrophil *in vitro* migráció

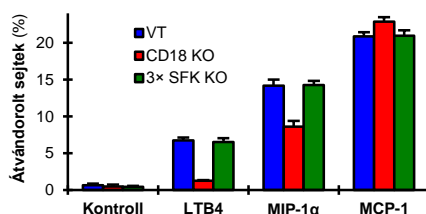
Intakt vad típusú, CD18^{-/-} és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerek csontvelőjéből származó neutrophileket fibrinogénnel fedett Transwell rendszerben stimuláltunk, majd savas foszfatáz teszttel meghatároztuk az átvándorolt neutrophilek arányát. Az ábrán 3-13 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

Ehhez hasonlóan az LTB₄ lipid mediátor irányába történő migráció CD18 integrinek hiányában szintén jelentősen, csaknem teljes mértékben károsodik ($p = 1,7 \times 10^{-6}$; $n = 3$), Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek esetén azonban nem ($p = 0,41$; $n = 4$).

Érdekes módon az emberi IL-8 egy távoli homológja, a MIP-2 (CXCL2) irányába történő *in vitro* neutrophil-vándorlást sem a CD18 integrinek ($p = 0,58$; $n = 9$), sem a Hck, Fgr, Lyn Src-típusú tirozin-kinázok hiánya nem befolyásolta ($p = 0,39$; $n = 7$).

6.5.2.2. Monocyták *in vitro* migrációja

A továbbiakban megvizsgáltuk csontvelőből frissen preparált monocyták *in vitro* migrációs képességét is (41. ábra). CD18 hiányában a monocyták LTB₄ irányába történő vándorlása jelentős mértékben károsodott ($p = 0,0038$; $n = 3$), Hck, Fgr és Lyn hiányában azonban nem ($p = 0,93$; $n = 5$).



41. ábra: Monocyta *in vitro* migráció

Intakt vad típusú, CD18^{-/-} és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerek csontvelőjéből származó monocytákat fibrinogénnel fedett Transwell rendszerben stimuláltunk, majd savas foszfatáz teszttel meghatároztuk az átvándorolt sejtek arányát. Az ábrán 3-5 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

Az egyik fő monocyta kemokin, a MIP-1α (CCL3) hatására a vad típusúakhoz képest a CD18^{-/-} monocyták csak kisebb mértékben voltak képesek a membránon átjutni ($p = 0,057$; $n = 3$), míg a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} sejtek vándorlása ebben az esetben is normális volt ($p = 0,63$; $n = 5$).

Egy másik fontos monocyta kemokin, az MCP-1 (CCL2, JE) irányába történő monocyta-vándorlás a CD18 integrinek hiányában még kis mértékben fokozódik is a vad típusúakhoz képest ($p = 0,0039$; $n = 3$), de a Hck, Fgr és Lyn kinázok hiánya nincs rá semmilyen hatással ($p = 0,74$; $n = 5$).

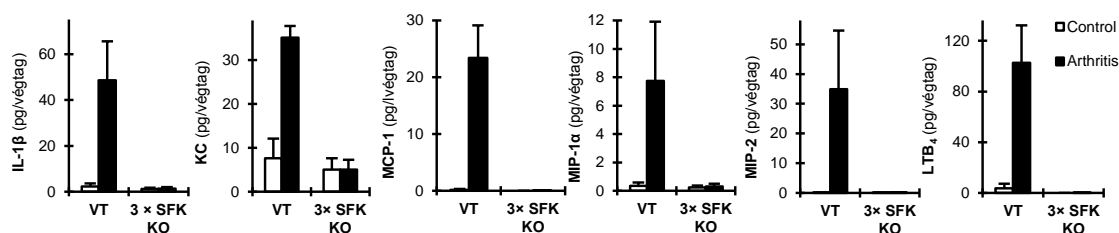
Összességében úgy tűnik, hogy a Hck, Fgr és Lyn Src-típusú tirozin-kinázok jelenléte illetve hiánya nem befolyásolja sem a neutrophilek, sem a monocyták *in vitro* migrációs képességét, függetlenül attól, hogy az adott kemokin irányába történő vándorláshoz szükségesek-e a β₂ integrinek.

6.6. A gyulladáshoz vezető környezet kialakulása károsodott

A Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} intakt egerekben a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} myeloid sejtek toborzása teljes mértékben elmarad, azonban vad típusú sejtek egyidejű jelenlétében ezek a sejtek képesek bejutni a gyulladás helyére. Ennek a nyilvánvaló ellentmondásnak az egyik lehetséges magyarázata az, hogy az Src-típusú tirozin-kinázok a gyulladáshoz vezető környezet kialakításában

lehetnek fontosak, és így többek között a megfelelő kemokinek biztosításában, nem pedig a sejtek endogén migrációs képességében. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk ennek a gyulladáshoz szükséges citokin/kemokin/lipid környezetnek az összetételét.

Egy számos citokint/kemokint tartalmazó Western blot alapú protein array vizsgálattal nyilvánvalóvá vált, hogy az intakt vad típusú és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerekben található gyulladáshoz szükséges környezet jelentősen különbözik [I].



42. ábra: *In vivo* gyulladáshoz szükséges mediátor környezet autoantitest-indukált arthritiszben

Kontroll illetve arthritisz szérummal kezelt intakt vad típusú (VT) és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerek synoviumát a 4. napon a leírt módon (5.7) kimostuk, majd a sejtmentes felülúszóból ELISA-val meghatároztuk a jelzett gyulladáshoz szükséges mediátorok szintjét. Az ábrán csoportonként 4-6 egér értékeinek átlagát és az átlag szórását tüntettük fel 4-5 független kísérletből.

A pontosabb, kvantitatív elemzéshez a vizsgált mediátorok körét szűkítettük. Korábbi irodalmi adatok alapján az IL-1β, a KC (CXCL1), a MIP-1α, és a MIP-2 kiemelt fontosságúak az autoantitest-indukált arthritisz patomechanizmusában [64, 375], az MCP-1 pedig az egyik fő monocyta-kemokinnek számít [376], ezért a továbbiakban ezen mediátorokkal kvantitatív ELISA méréseket végeztünk (42. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy Hck , Fgr és Lyn hiányában elmarad a vad típusban az ízületek környékének gyulladásával összefüggésben tapasztalt IL-1β- ($p = 0,0026$; $n = 5$), KC- ($p = 9,0 \times 10^{-7}$; $n = 5$), MCP-1- ($p = 0,0014$; $n = 5$) és MIP-2-emelkedés ($p = 0,023$; $n = 6$). A MIP-1α-szint növekedése pedig jelentősen, bár nem szignifikánsan károsodik ($p = 0,095$; $n = 5$). Tekintettel az LTB4 autoantitest-indukált arthritiszben betöltött fontos szerepére [64, 377], megvizsgáltuk a synovium LTB4 szintjét is. Arthritisz szérummal kezelt vad típusú egerekben kifejezett LTB4 emelkedést tapasztaltunk, mely $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerekben teljes mértékben elmaradt (42. ábra; $p = 7,4 \times 10^{-15}$; $n = 5$).

A gyulladáshoz szükséges környezet további jellegzetessége a reaktív oxigén-szabadgyökök megjelenése, mely vad típusúval ellentétben Hck , Fgr és Lyn hiánya esetén szintén teljes mértékben elmarad [I].

Összességében tehát az Src-típusú tirozin-kinázok elengedhetetlenül szükségesek ahhoz, hogy autoantitestek hatására kialakuljon a gyulladós környezet, azaz többek között a neutrophileket és monocytákat odavonzó kemokinek és lipid mediátorok, az IL-1 β gyulladós citokin illetve a reaktív oxigén-szabadgyökök felszaporodása.

6.7. A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz szükségesek az Src-kinázok

Eddigi megfigyeléseink szerint a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekben egyrészt nem alakul ki a megfelelő gyulladós környezet (**42. ábra**), másrészt a myeloid sejtek nem jutnak be az ízületkörnyéki szövetekbe, annak ellenére, hogy endogén migrációs képességük megtartott (vö. **6.3** és **6.5**).

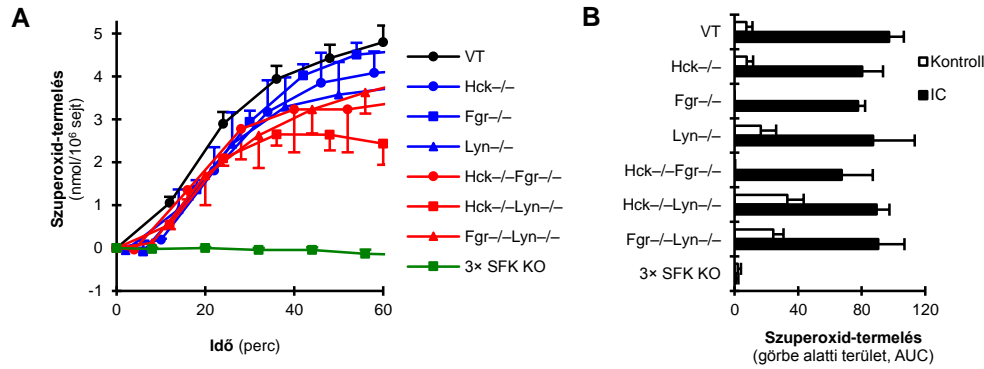
Ennek egy lehetséges magyarázata az lehet, hogy a Hck, Fgr és Lyn Src-típusú tirozin-kinázok szerepe közvetlenül az autoantitestek hatására bekövetkező gyulladás kialakításában, a megfelelő környezet létrehozásában van, és nem a sejtek vándorlásának szabályozásában (ahogy korábbi adatok alapján feltételezni lehetett). Ezen lehetőség további vizsgálata céljából neutrophilek immunkomplex-kiváltotta sejtválaszait vizsgáltuk *in vitro*, különös tekintettel a gyulladós környezet korábban már tárgyalt elemeinek termelésére, felszabadulására.

6.7.1. Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek immunkomplexek hatására nem termelnek szuperoxidot

Vad típusú neutrophilekben immunkomplex stimulációra jelentős mértékben fokozódik az egyik fő oxigén szabadgyök, a szuperoxid termelése (**43. ábra**), mely Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilekben teljes mértékben elmarad ($p = 2,4 \times 10^{-21}$; $n = 15$).

A Hck^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek esetén részleges, de statisztikailag szignifikáns csökkenést láttunk ($p = 5,8 \times 10^{-4}$; $n = 4$). Ezen csökkenés hátterében többek között az is állhat, hogy a Hck^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilekben a kontroll minták értékei, azaz az alapvonal jellemzően magasabban volt, mint a vad típusban, ezért a stimulált és a kontroll minták eredményeinek kivonásából képzett „válasz” érték is elmarad a vad típustól.

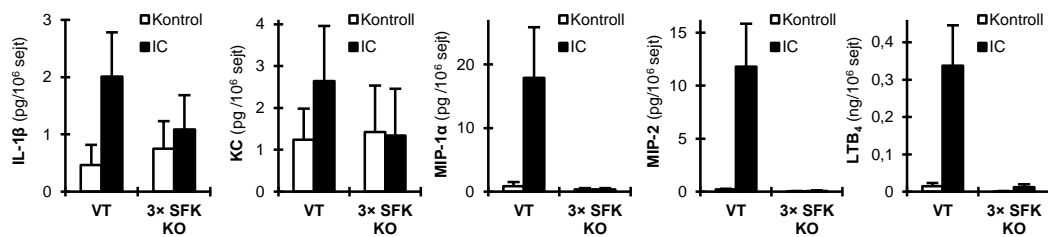
Az összes többi egyszeres és kétszeres Src-típusú tirozin-kináz-hiányos genotípus a vad típussal lényegében megegyező mértékben képes szuperoxidot termelni immunkomplex-stimulus hatására (**43. ábra**; $p = 0,10$ és $0,70$ között; $n = 3$).



43. ábra: *In vitro* szuperoxid-termelés Hck-, Fgr- és/vagy Lyn-hiányos neutrophilekben Vad típusú valamint egyszeresen, kétszeres és háromszorosan Src-kináz hiányos intakt egerek csontvelőiből izolált neutrophileket *in vitro* immobilizált immunkomplex felszínre (IC) helyeztünk, majd időben követtük a szuperoxid-termelést (A). A statisztikai értékeléshez az integrált szuperoxid-termelést használtuk (B). A kezdeti időpontban mért értékeket következetesen levontuk. Az ábrán genotípusonként 3-23 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

6.7.2. Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek immunkomplexek hatására nem termelnek gyulladási mediátorokat

A gyulladási környezet másik jellemző eleme a különféle citokinek, kemokinek és lipid mediátorok felszabadulása. Egy western blot alapú szemi-quantitatív protein array vizsgálattal nyilvánvalóvá vált, hogy vad típusú neutrophilek immunkomplex-stimuláció hatására képesek gyulladási mediátorok termelésére, Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek azonban nem [1].



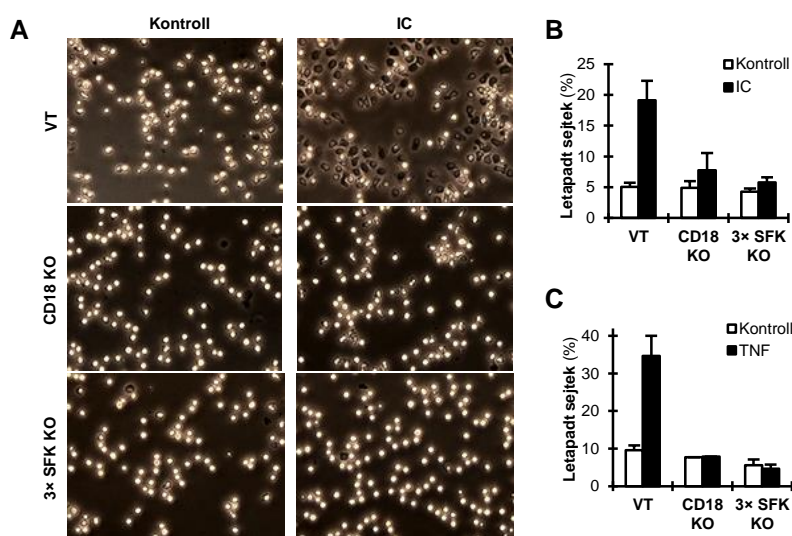
44. ábra: Gyulladási mediátorok termelése *in vitro* Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilekben Vad típusú (VT) és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} (3× SFK KO) intakt egerek csontvelőiből izolált neutrophileket immobilizált immunkomplex felszínre (IC) stimuláltunk, majd a sejtmentes felülízüdből ELISA-val meghatároztuk a jelzett gyulladási mediátorok szintjét. Az ábrán 4-11 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

Kvantitatív ELISA méréseink teljes mértékben megerősítették ezen megfigyelésünket (44. ábra). Hck, Fgr és Lyn hiányában jelentősen csökken, illetve teljesen megszűnik az immunkomplex-kiváltotta IL-1β- ($p = 5,1 \times 10^{-5}$; $n = 6$), KC- ($p = 3,6 \times 10^{-5}$; $n = 6$), MIP-

1 α - (p = 5,0 \times 10⁻⁶; n = 6), MIP-2- (p = 4,8 \times 10⁻¹⁵; n = 11) és LTB₄-termelés (p = 8,8 \times 10⁻⁵; n = 4)¹¹.

6.7.3. Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek nem képesek letapadni immunkomplex- illetve ICAM-1 felszínre

A neutrophilek egyik fontos aktiváció-függő sejtválasza a felszínhez történő letapadás, amely szerepet játszhat akár a szövetek közötti vándorlás során is. Immobilizált immunkomplexekkel fedett felszínhez a vad típusúakkal ellentétben sem a CD18^{-/-}, sem pedig a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek nem képesek tartósan letapadni. Fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva a felszínt az úszó sejtek világos, szabályos és éles szélű körök-ként jelennek meg, míg a felszínhez tartósan letapadt társaik sötétebb (fekete), elmosódottabb szélű, szabálytalan alakú foltokként, ahogy az a **45. ábra**n a vad típus esetén jól megfigyelhető. A CD18 illetve a Hck, Fgr és Lyn hiánya esetén azonban nem találunk letapadt sejteket.



45. ábra: Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} és CD18^{-/-} neutrophilek adhéziója immunkomplex- és ICAM-1 felszínre

Vad típusú (VT), CD18^{-/-} (CD18 KO) és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} (3 \times SFK KO) intakt egerek csontvelőiből izolált neutrophileket immobilizált immunkomplex (IC) (A, B) és ICAM-1-gyel fedett (C) felszínre helyeztünk, majd a felszínt fáziskontraszt mikroszkóppal fényképeztük (A), illetve meghatároztuk az arra kitapadt sejtek arányát (B, C). Az (A) paneleken reprezentatív fotókat, a (B, C) paneleken 3-3 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

A letapadási képesség kvantitatív elemzése céljából a felszínhez erősebben kötődő sejtek arányát vizsgáltuk savas foszfatáz teszt segítségével (l. 5.6.2.4.1). A neutrophileket

¹¹ MCP-1-termelést még a vad típusú neutrophilek esetén sem tapasztaltunk.

megpróbáltuk lemosni a felszínről, majd meghatároztuk, hogy milyen arányban voltak képesek ennek ellenállni, azaz milyen arányban létesítettek szoros kapcsolatot a felszínnel. A vad típusú sejtek esetén tapasztaltakkal szemben sem a CD18^{-/-}, sem pedig a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek nem képesek tartósan letapadni.

Hasonló eredményre vezetett az ICAM-1 felszínhez történő letapadási képesség vizsgálata is. Tekintettel arra, hogy ez a felszín – a fibrinogénhez hasonlóan – önmagában nem elégséges ahhoz, hogy a neutrophilek kitapadjanak (feltehetően az integrinek alacsony affinitású, „zárt” állapota miatt, l. Hiba! A hivatkozási forrás nem található., **3.1.3.4.2** és **2. ábra**), TNF- α stimulust használtunk, mely a neutrophilek primingján és az integrinek *inside-out* szignalizációján keresztül képpé teszi azokat a szorosabb kötődés kialakítására. Mind a CD18^{-/-}, mind pedig a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek esetén a stimulált és a kontroll mintákban a felszínen maradó neutrophilek aránya megegyezett.

Összességében tehát mind a β_2 integrinek, mind pedig az Src-kinázok szükségesek a neutrophilek *in vitro* felszínhez történő letapadásához.

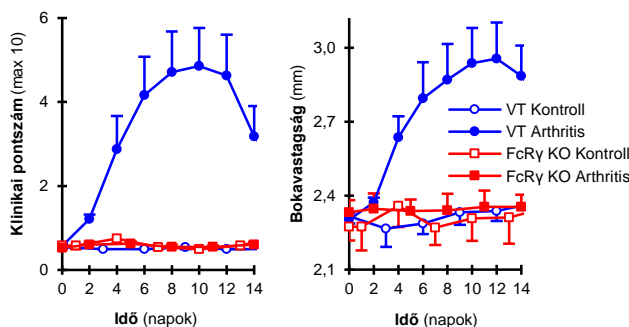
6.8. Az Fc-receptor- γ -lánc hiánya Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}-hez hasonló fenotípussal jár

Hipotézisünk szerint az Src-kinázok szerepe az autoantitest-indukált arthritisben nem a sejtek vándorlásának irányításában, hanem a betegség során az ízületek környékén kialakuló immunkomplexek érzékelésében és ennek hatására a megfelelő gyulladós környezet kialakításában van. Ez az érzékelés feltehetően Fc γ -receptorokon keresztül történik [8, 378], melyek proximalis jelátviteléhez az Src-típusú tirozin-kinázok elengedhetetlenek [I], hiányuk pedig feltehetően ezen jelpálya blokkolásán keresztül vezet a gyulladós környezet elégtelenségéhez és így az arthritisszel szembeni teljes védettséghez. Ha a fenti hipotézisünk igaz, akkor az Fc γ -receptorok illetve az Src-kinázok hiánya hasonló fenotípussal jár, illetve a patomechanizmus azonos pontján hatva nem képesek az egymás által okozott gátat kikerülni, egymás hatását ellensúlyozni.

Ezért a következőkben részletesebben megvizsgáltuk az összes aktiváló Fc- γ -receptor expressziójához és jelátviteléhez nélkülözhetetlen [98, 104] Fc-receptor- γ -lánc hiányának hatását az autoantitest-indukált arthritisre illetve a neutrophilek működésére.

6.8.1. Az FcR γ ^{-/-} állatokban nem alakul ki arthritis

Korábbi irodalmi adatokkal [8, 378] összhangban az FcR γ ^{-/-} egerek teljes mértékben védettek voltak az autoantitest-indukált arthritisszel szemben (**46. ábra**), mind a klinikai pontszám ($p = 0,0033$; $n = 5$), mind pedig a bokavastagság ($p = 0,0039$; $n = 5$) tekintetében.

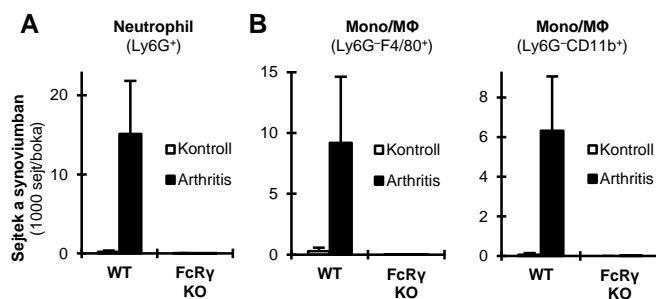


46. ábra: Autoantitest-indukált arthritis Fc-receptor- γ -lánc hiányában

Intakt vad típusú és FcR γ ^{-/-} egerben arthritist indukáltunk, majd naponta klinikai pontozást és bokavastagság-mérést végeztünk. Az ábrán 3 független kísérletből csoportonként 3 kontroll és 5-7 arthritises eger átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

6.8.2. Az FcR γ -hiányában nem jön létre gyulladásos sejtinfiltráció

A Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekhez hasonlóan az FcR- γ -lánc hiányában is teljes mértékben hiányzik a gyulladásos sejtinfiltráció: a synoviumban nincsenek sem neutrophilek ($p = 0,028$; $n = 6$), sem Ly6G⁻F4/80⁺ ($p = 0,040$; $n = 6$) vagy Ly6G⁻CD11b⁺ ($p = 0,042$; $n = 6$) monocyta/macrophag sejtek (**47. ábra**).

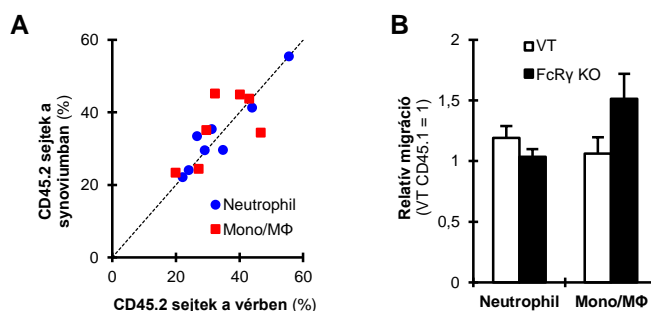


47. ábra: Gyulladásos sejtinfiltráció Fc-receptor- γ -lánc hiányában

Intakt vad típusú és FcR γ ^{-/-} egereket 300 μ l kontroll vagy arthritises szérummal kezeltünk, majd 4 nap múlva meghatároztuk a kimosott synovialis folyadék sejtösszetételét áramlási citometriával (5.4.2). A 3 független kísérletből, csoportonként 2-3 kontroll és 6 arthritises egerből származó adatok átlagát és az átlag szórását ábrázoltuk.

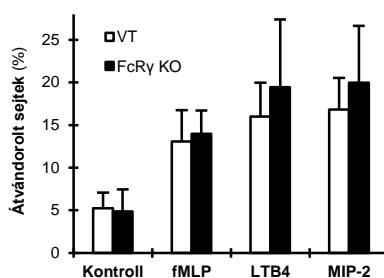
6.8.3. Az FcR γ jelenléte nem szükséges a myeloid sejtek endogén migrációs képességéhez

Amennyiben azonban kevert csontvelői kimérákban (l. 5.5) vad típusú sejtek is jelen vannak, mind az FcR $\gamma^{-/-}$ neutrophilek ($p = 0,27$; $n = 8$), mind pedig a monocyta/macrophagok a vad típusúval lényegében megegyező mértékben képesek bejutni a gyulladás helyére (48. ábra). FcR γ -lánc hiányában tehát – az Src-kinázok hiányával megegyezően – a myeloid sejtek endogén migrációs képessége megtartott.



48. ábra: *In vivo* myeloid migráció Fc-receptor- γ -lánc hiányában

Kevert csontvelői kimérákat hoztunk létre CD45.1-t expresszáló vad típusú és CD45.2-t expresszáló vad típusú vagy FcR $\gamma^{-/-}$ donor csontvelő keverékének transzplantálásával. Az arhtritis indukcióját (300 μ l ip.) követő 4. napon áramlási citometriával vizsgáltuk a synoviumot (5.5). A bal oldali grafikonon minden pont 1-1 egeret jelöl. A perifériás vérben a kísérletet megelőzően és a 4. napon mért CD45.2 arányok átlagát használtuk. Az adatok 3 független kísérletből, csoportonként 3-5 egerből származnak. Az egyes egerek relatív migráció értékeinek átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

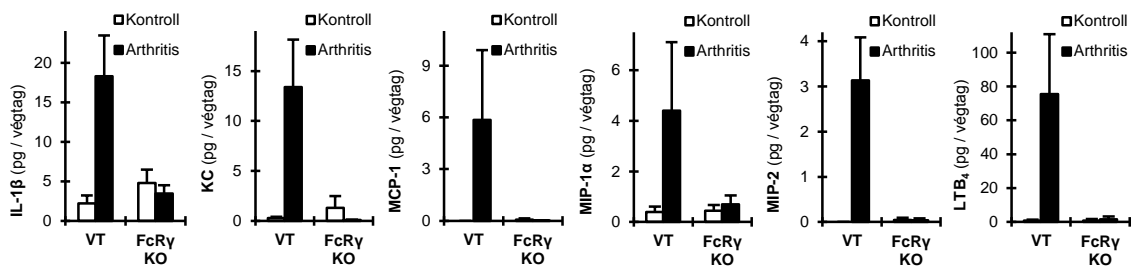


49. ábra *In vitro* neutrophil migráció Fc-receptor- γ -lánc hiányában

A korábban leírt módon (5.6.2.4) mértük vad típusú és FcR $\gamma^{-/-}$ neutrophilek *in vitro* migrációját 10 μ M fMLP, 200 ng/ml MIP-2 vagy 50 ng/ml LTB₄ jelenlétében. Az ábrán 3 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

Az FcR $\gamma^{-/-}$ neutrophilek *in vitro* is a vad típusú neutrophilekkel megegyező mértékben képesek átvándorolni a membránon mind a bakteriális formilált tripeptid fMLP ($p = 0,44$; $n = 3$), a távoli humán IL-8-analóg MIP-2 ($p = 0,42$; $n = 3$), mind pedig a lipid mediátor LTB₄ ($p = 0,46$; $n = 3$) hatására (49. ábra).

6.8.4. A gyulladási környezet kialakulásához szükséges az FcR γ -lánc



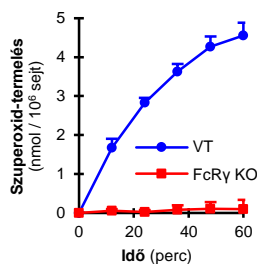
50. ábra: Gyulladásos mediátorok termelése Fc-receptor- γ -lánc hiányában *in vivo*

Vad típusú és FcR γ ^{-/-} egerek ízületkörnyéki szöveteiben a gyulladásos mediátorok koncentrációját mértük a már ismertetett módon (5.7). Az adatok 3 független kísérletből, csoportonként 3-5 egérből származnak. Az ábrán az átlagot és az átlag szórását tüntettük fel.

Előzetes feltételezésünknek megfelelően FcR γ ^{-/-} állatokban, az aktiváló Fc γ -receptorok hiányában az ízületek környékének szöveteiben nem mutatható ki a gyulladásos mediátorok, az IL-1 β ($p = 0,017$; $n = 5$), a KC ($p = 0,026$; $n = 5$), az MCP-1 ($p = 1,5 \times 10^{-5}$; $n = 4$), a MIP-1 α ($p = 0,023$; $n = 3$), a MIP-2 ($p = 0,025$; $n = 4$) és az LTB $_4$ ($p = 0,016$; $n = 5$) szintjének autoantitest-kezelés hatására bekövetkező emelkedése (50. ábra).

6.8.5. A neutrophilek *in vitro* immunkomplex-függő jelátviteléhez elengedhetetlen az FcR γ -lánc

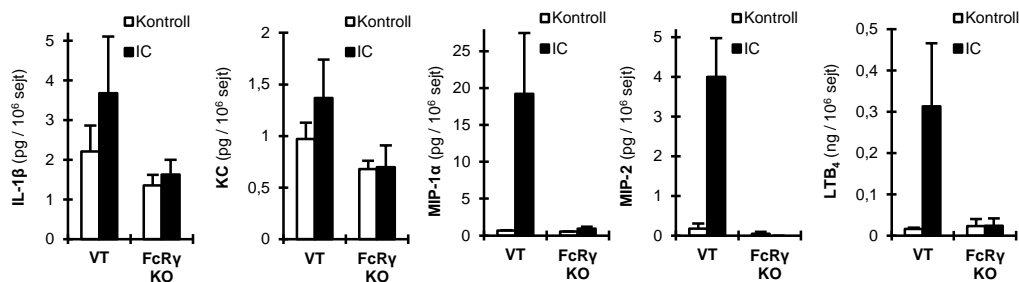
A korábban leírtakkal összhangban [373] az FcR γ -lánc elengedhetetlen neutrophilek immunkomplex-függő szuperoxid-termeléséhez (51. ábra; $p = 7,4 \times 10^{-5}$; $n = 4$).



51. ábra: Szuperoxid-termelés *in vitro* FcR γ ^{-/-} neutrophilekben

Immobilizált HSA– α -HSA immunkomplex felszínre helyezett neutrophilek szuperoxid termelését mértük citokróm *c* redukció alapján (5.6.2.3). Az ábrán 4 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

Az Src-kinázokhoz hasonlóan az FcR γ -lánc hiánya is teljes mértékben megátolta a neutrophilek immobilizált immunkomplex felszín által kiváltott IL-1 β - (52. ábra; $p = 0,0020$; $n = 3$), KC- ($p = 0,038$; $n = 3$), MIP-1 α - ($p = 0,031$; $n = 3$), MIP-2- ($p = 5,2 \times 10^{-4}$; $n = 3$) és LTB $_4$ -termelését ($p = 0,013$; $n = 3$).

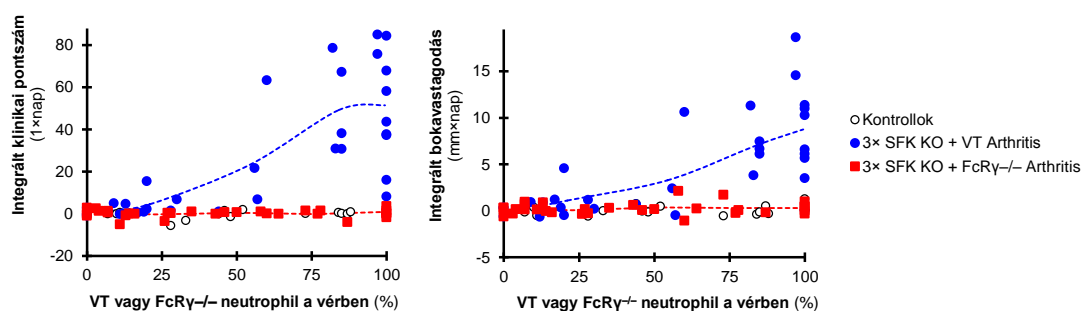


52. ábra: Gyulladásos mediátorok termelése FcR γ ^{-/-} neutrophilekben *in vitro*
Immobilizált HSA- α -HSA immunkomplex felszínre helyezett neutrophilek sejtmentes felületéből ELISA-val citokin/kemokin/lipid mediátor szinteket mértünk a korábban leírtaknak megfelelően (5.6.2.2). Az ábrán 3 független kísérlet átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

6.8.6. A Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} és FcR γ ^{-/-} myeloid sejtek nem képesek kompenzálni egymás hatását

Az eddigi eredményeink alapján tehát az Src-típusú tirozin-kinázok és az FcR γ -lánc – azaz a funkcionális aktiváló Fc γ -receptorok – hiánya lényegében megegyező fenotípussal jár valamennyi vizsgált, és az *in vivo* gyulladások patomechanizmusa szempontjából releváns *in vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerben.

Ez a nagy hasonlóság, illetve az a tény, hogy az Src-kinázok elengedhetetlenek az Fc γ -receptorok proximalis jelátviteléhez [I], arra enged következtetni, hogy az Src-kinázok és az FcR γ -lánc egy közös jelpálya elemei az autoimmun gyulladások kialakulása során, hiányuk ugyanazon jelátvitel blokkolásán keresztül vezet az arthritisszel szembeni védettséghez. Ebben az esetben pedig az egyikre illetve a másikra nézve génhányos sejtek egymás hatását nem tudják áthidalni. Ezért megvizsgáltuk, hogy FcR γ ^{-/-} haematopoietikus sejtek adásával „megmenthető-e” az arthritis Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekben.



53. ábra: Autoantitest-indukált arthritis vad típusú, Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} és FcR γ ^{-/-} kevert kimérákban

Kevert csontvelői kimérákat hoztunk létre FcR γ ^{-/-} vagy CD45.1-t expresszáló vad típusú és Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} (3× SFK KO) donor sejtek változó arányú keverékének transzplantációjával, majd azokban arthritist indukáltunk 300 μ l szérum injektálásával. A naponta történő klinikai pontozásból és bokavastagság-mérésből származó adatok időbeni integráltját ábrázoltuk egerenként a vad típusú illetve

FcR γ ^{-/-} (azaz nem-Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}) perifériás vérben mért arányának függvényében. Az adatok 3 független kísérletből, csoportonként 21-32 egérből származnak.

E célból olyan kevert csontvelői kimérákat hoztunk létre, melyekbe Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} mellett vad típusú vagy FcR γ ^{-/-} csontvelőt transzplantáltunk, majd azokban vizsgáltuk az arthritis kialakulását (**53. ábra**).

A vad típusú haematopoeticus sejtek képesek voltak visszaállítani a betegséget, annál nagyobb mértékben, minél nagyobb arányban voltak jelen (**53. ábra**). Nagyjából a keringő neutrophilek felének kellett vad típusúnak lenni, hogy az egerek konzekvensen megbetegedjenek, e fölött pedig a betegség súlyossága a vad típusú sejtek arányával együtt nőtt.

Ezzel szemben az FcR γ ^{-/-} és a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} haematopoeticus sejteket bármilyen arányban is kevertük egymással, arthritis egyáltalán nem alakult ki (**53. ábra**).

6.9. *In vivo* folyamatokban az LFA-1, míg *in vitro* a Mac-1 integrin a fontos

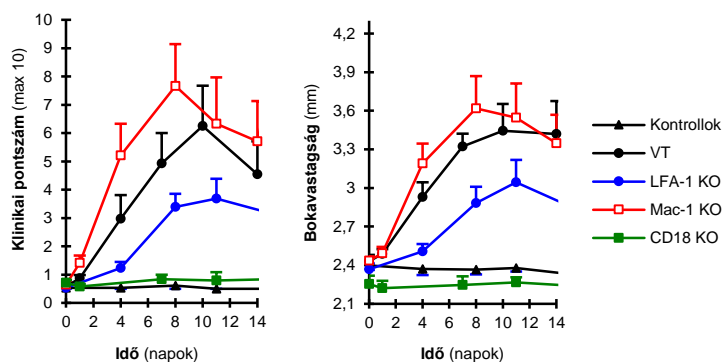
Korábbi irodalmi adatok alapján felmerült, hogy az *in vitro*, immunkomplex-függő sejtválaszok létrehozásában a β_2 integrineknek is fontos szerepe van [379]. Ezzel összhangban CD18^{-/-} neutrophilekben mi is az immunkomplex-függő sejtválaszok valamelyes csökkenését tapasztaltuk (**56. ábra** és **57. ábra**). Ez ugyan messze nem volt olyan jelentős, mint a Hck, Fgr és Lyn illetve az FcR γ -lánc hiányában tapasztalt teljes gátlás, de mindenképpen említésre méltó. Mivel mind az Src-kinázok [17-21, 338], mind az FcR γ -lánc szerepet játszhatnak β_2 integrinek jelátvitelében [131], elméletileg elképzelhető lenne, hogy a Hck, Fgr és Lyn hiányában látott *in vitro*, és ami még fontosabb, az *in vivo* fenotípusért mégis csak az Src-kinázok CD18-jelpályában betöltött szerepe a felelős, ha nem is az endogén migrációs képesség befolyásolásán keresztül. Az *in vitro* adatok alapján nem zárható ki, hogy a β_2 integrineknek fontos szerepe van a gyulladással környezet létrehozásában is, csak éppen nem képesek odajutni, és így ez a hatás nem is tud érvényre jutni.

Voltak azonban olyan irodalmi adatok, amelyek arra utaltak, hogy az *in vivo* CD18 fenotípusért inkább az LFA-1 [9, 11], míg az *in vitro* immunkomplex-függő aktivációban tapasztalt részleges gátlásért a Mac-1 lenne felelős [380].

Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk az LFA-1 és Mac-1 hiányának hatását az *in vivo* arthritisben és az *in vitro* neutrophilválaszokban.

6.9.1. Az autoantitest-indukált arthritis LFA-1-függő

A fentebb említett korábbi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy CD18^{-/-} állatokban nem alakul ki ízületi gyulladás (54. ábra; klinikai pontszám: $p = 3,71 \times 10^{-4}$, $n = 3$; bokavastagság: $p = 4,1 \times 10^{-4}$; $n = 3$). Mac-1 hiányában a betegség a statisztikai szignifikanciát el nem érően ugyan, de súlyosabb, mint vad típusban ($p = 0,32$ illetve $0,42$; $n = 6$).



54. ábra: Autoantitest-indukált arthritis LFA-1^{-/-}, Mac-1^{-/-} és CD18^{-/-} állatokban

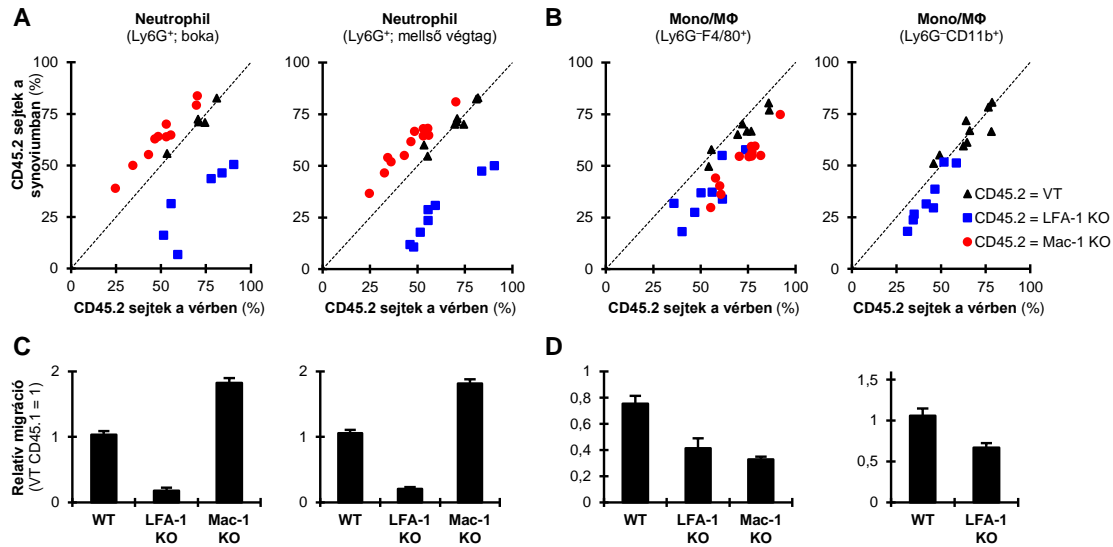
Vad típusú, LFA-1^{-/-}, Mac-1^{-/-} és CD18^{-/-} intakt egerekben és csontvelői kimérákban arthritist indukáltunk, majd követtük a kialakuló betegséget. Az ábrán 2 kísérletben vizsgált csoportonként 1-2 kontroll és 3-8 arthritises állat átlagát és az átlag szórását tüntettük fel. Az intakt egerek és a csontvelői kimérák között nem volt különbség.

A korábbi adatoknak némileg ellentmondanak a mi megfigyeléseink az LFA-1 hiányával kapcsolatban. A mi eredményeink szerint ugyanis LFA-1^{-/-} állatok nem teljes mértékben védettek a betegség kialakulásával szemben, bár annak súlyossága jelentősen elmarad a vad típushoz képest (54. ábra; $p = 0,156$ illetve $0,073$, $n = 8$).

6.9.2. A neutrophilek endogén migrációs képessége LFA-1-függő

Kevert csontvelői kimérákban (l. 5.5) a Mac-1^{-/-} neutrophilek a vad típusúaknál szignifikánsan nagyobb mértékben képesek bejutni a gyulladás helyére (55. ábra; boka: $p = 8,16 \times 10^{-6}$, $n = 10$; mellső végtag: $p = 8,47 \times 10^{-8}$, $n = 12$). Ezzel szemben LFA-1^{-/-} neutrophilek endogén migrációs képessége szignifikánsan gátolt a vad típushoz képest (boka: $p = 5,6 \times 10^{-7}$, $n = 6$; mellső végtag: $p = 6,5 \times 10^{-10}$, $n = 8$).

Ehhez hasonlóan a monocyták *in vivo* endogén migrációs képessége is LFA-1-függő (55. ábra), annak hiányában gátolt a monocyta/macrophagok bejutása a gyulladás helyére mind az F4/80⁺ ($p = 0,017$, $n = 8$), mind a CD11b⁺ megközelítést alkalmazva ($p = 0,0023$, $n = 8$). Érdekes módon a Mac-1^{-/-} monocyta/macrophagok endogén migrációs képessége is csökkent a vad típushoz képest ($p = 6,3 \times 10^{-6}$, $n = 12$).



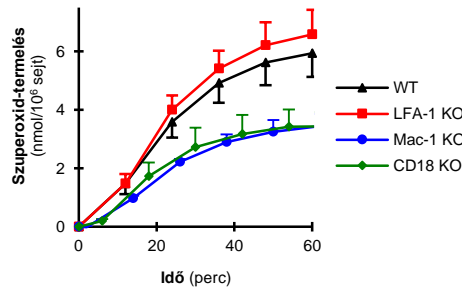
55. ábra: LFA-1^{-/-} és Mac-1^{-/-} neutrophilek *in vivo* migrációja arthritisen

Az állatok 300 μ l arthritises szérumot kaptak ip., a synovialis folyadékából a 4. napon meghatároztuk a CD45.2⁺ neutrophilek (A) és a monocyta/macrophagok (B) arányát. A perifériás vér esetén a kísérletet megelőző és az arthritisz 4. napján mért értékek átlagát használtuk. Az ábrán 4 kísérletből összesen 5 illetve 8 (boka illetve mellső végtag) vad típusú; vad típusú, 6 illetve 8 vad típusú: LFA-1^{-/-} és 10 illetve 12 vad típusú: Mac-1^{-/-} kevert kiméra adatait tüntettük fel. (C) és (D) Az összes egér átlagát és az átlag szórását ábrázoltuk.

6.9.3. Az *in vitro* immunkomplexekre adott válaszok Mac-1-függőek

A korábbi feltételezésekkel összhangban az alkalmazott immobilizált immunkomplex felszínen létrejövő neutrophilválaszok részben β_2 -függőek. CD18^{-/-} neutrophilek szuperoxid- (56. ábra; $p = 0,0054$, $n = 7$), IL-1 β - (57. ábra; $p = 0,014$, $n = 6$), KC- ($p = 0,0074$, $n = 5$), MIP-1 α - ($p = 4,81 \times 10^{-5}$, $n = 5$), MIP-2- ($p = 0,0014$, $n = 7$) és LTB₄-termelése ($p = 0,0047$, $n = 3$) csökkent a vad típushoz képest.

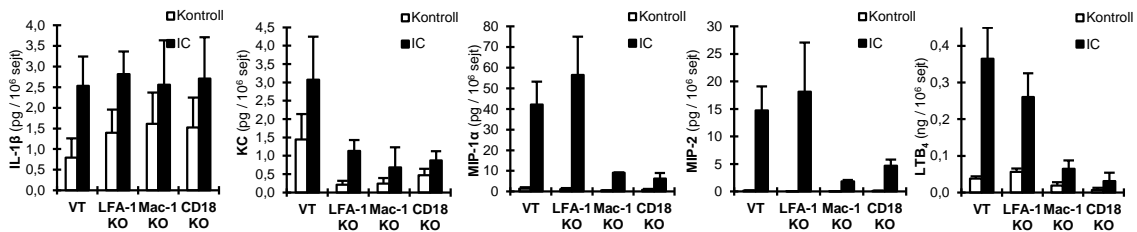
Ennek háttérében a Mac-1 intergrin hiánya áll, hiszen Mac-1^{-/-} neutrophilekben mind a szuperoxid ($p = 0,0016$, $n = 5$), mind pedig a gyulladáshoz vezető mediátorok, az IL-1 β - ($p = 0,065$, $n = 3$), KC- ($p = 0,44$, $n = 3$), MIP-1 α - ($p = 0,0019$, $n = 2$), MIP-2- ($p = 2,05 \times 10^{-4}$, $n = 3$) és LTB₄ ($p = 0,021$, $n = 3$) termelése szintén többé-kevésbé gátolt a vad típushoz képest, a CD18^{-/-} neutrophilekéval pedig lényegében megegyezik (56. ábra és 57. ábra).



56. ábra: Immunkomplex-függő szuperoxid-termelés LFA-1^{-/-}, Mac-1^{-/-} és CD18^{-/-} neutrophilekben

Immobilizált HSA-αHSA immunkomplex felszín. Az ábrán 5-10 független kísérletből származó adatok átlagát és az átlag szórását tüntettük fel, összesen 10 vad típusú, 5 LFA-1^{-/-}, 5 Mac-1^{-/-} és 7 CD18^{-/-} mintából.

Az LFA-1 viszont nem szükséges a neutrophilekben immunkomplex felszínen a szuperoxid (**56. ábra**; $p = 0,99$, $n = 5$) és a gyulladási mediátorok képzéséhez *in vitro* (**57. ábra**, $p =$ rendre $0,16; 0,29; 0,82; 0,40$ és $0,90$; $n = 3$).



57. ábra: Gyulladási mediátorok termelése LFA-1^{-/-}, Mac-1^{-/-} és CD18^{-/-} neutrophilekben *in vitro* immunkomplexek hatására

Immobilizált HSA-αHSA immunkomplex felszín. Az ábrán 4-8 független kísérletből származó vad típusú, 3 LFA-1^{-/-}, 3 Mac-1^{-/-} valamint 3-7 CD18^{-/-} minta átlagát és az átlag szórását tüntettük fel.

Összességében tehát eredményeink arra utalnak, hogy *in vivo* az arthritis létrejöttéhez és a neutrophilek gyulladás helyére történő vándorlásához az LFA-1 integrin részvétele a fontos(abb), míg az *in vitro* immunkomplex felszínen létrejövő maximális neutrophilválaszokhoz a Mac-1. Az Src-kinázok hiányában látott *in vitro* és a még fontosabb *in vivo* fenotípusért tehát nem tehető felelőssé egyik β_2 -jelpálya blokkolása sem. Hiszen a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} és az LFA-1^{-/-} állatok és neutrophilek fenotípusa teljes mértékben eltér egymástól, a Mac-1 hiányában látott *in vitro* neutrophil-fenotípusnak pedig úgy tűnik *in vivo* nincs jelentősége az arthritis kapcsán.

7. Megbeszélés

Jelen doktori munkám során autoimmun gyulladásokban szereplő jelátviteli utak és kulcsmolekulák azonosításával foglalkoztam, melyek később akár potenciális terápiás próbálkozások célpontjai lehetnek.

A középpontban az Src-típusú tirozin-kinázok autoantitest-függő gyulladásokban betöltött lehetséges szerepe állt. Ezen molekulák az utóbbi időkben – főként daganatellenes szerek fejlesztése kapcsán – a gyógyszeripar és az orvostudomány érdeklődésének egyfajta keresztüzében állnak, és így igen nagy tapasztalat, és lehetséges gyógyszer-aspiráns molekulák tömkelege áll rendelkezésre, melyek azonnal bevethetőek lennének egyéb betegségek terápiájához is, amennyiben az Src-kinázok fontos szerepe ezen betegségekben igazolódik.

Vizsgálataink kiindulópontja részben saját munkacsoportunk, részben mások korábbi eredményeinek továbbgondolása volt. Hiszen egyrészt az Src-típusú tirozin-kinázok elengedhetetlen szerepet játszanak a β_2 integrinek ún. „outside-in” szignalizációjában [17-21, 338], másrészt viszont ezen β_2 integrinek szükségesek egyes autoimmun gyulladós betegségek kialakulása során [9-12] és [II]. Ezekből logikusan adódott a feltételezés, hogy az Src-kinázoknak szerepe lehet ezekben az autoimmun gyulladós folyamatokban.

Eredményeink alapján a Hck, Fgr és Lyn Src-típusú tirozin-kinázok jelenléte elengedhetetlen egyes autoimmun gyulladások létrejöttéhez, hiányukban az egerek teljes mértékben védettek az autoantitest-indukált ízületi gyulladással (l. **6.1**), a humán epidermolysis bullosa acquisitához hasonló hólyagos bőrgyulladással [I] illetve a reverz passzív Arthus-reakcióval szemben [I]. Ezen folyamatok során az Src-kinázok hatását a haematopoeticus rendszer sejtjeiben (feltehetően a myeloid sejtjeiben) fejtik ki. Kizárólag a haematopoeticus rendszer sejtjeit érintő hiányuk elégséges a gyulladásokkal szembeni teljes védettséghez ([I] és l. **6.1**), extrahaematopoeticus hiányuknak – vad típusú haematopoeticus rendszer mellett – ugyanakkor nincs hatása az arthritis kialakulására és súlyosságára (l. **6.1.2**).

Eredményeink szerint az autoantitest-indukált arthritis kialakulása során a Hck, Fgr és Lyn kinázok hatása átfedő, bármelyikük képes akár önmagában is a betegség létrehozására (**30. ábra**), bár annak súlyossága eltérő lehet. Hck^{-/-}Lyn^{-/-} állatokban az Fgr önmagában nem képes a többivel összevethető mértékű gyulladás kialakítására, de feltételezésünk szerint ebben igen nagy szerepet játszik a Hck^{-/-}Lyn^{-/-} mutánsok ismert korai letalitása és

súlyos myeloproliferatív betegsége [364], mely valószínűsíthetően önmagában is negatívan befolyásolja az arthritis kialakulását. Mindazonáltal formálisan nem zárhatjuk ki, hogy az autoantitest-indukált gyulladásokban az Fgr a „leggyengébb” szereplő. A teljes védettséghez azonban mindhárom Src-kináz együttes hiánya szükséges.

A munkahipotézisünknek megfelelően, azaz, hogy az Src-kinázok a gyulladás során a β_2 integrinek jelátvitelében fontosak, a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ állatokban látott fenotípus nagymértékben hasonló a CD18 hiányában tapasztaltakkal [9-12] és [II]. A β_2 integrinek szerepe korábbi adatok alapján feltételezhetően a myeloid sejtek gyulladás helyére történő vándorlásában van [9]. Ezt a mi eredményeink is megerősítik, $CD18^{-/-}$ mutánsokban nincs gyulladásos sejt infiltráció (**34. ábra**). Ennek hátterében kevert csontvelői kimérákkal végzett vizsgálatok alapján a myeloid sejtek, neutrophilek és monocyta/macrophagok endogén migrációs defektusa áll (**6.5**).

A gyulladással összefüggő sejtinvázió az Src-kinázok hiányában is elmarad (**6.3**), mely az Src-kinázok β_2 integrinek „outside-in” szignalizációjában betöltött szerepére vonatkozó korábbi adatokkal [17-21, 338] együtt azt sugallta, hogy ebben az esetben is egy sejt autonóm, endogén migrációs károsodás állhat a háttérben. Vad típusú sejtek együttes jelenléte esetén azonban a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ myeloid sejtek probléma nélkül képesek az érpályából a gyulladás helyére jutni (**6.5.1**), úgy tűnik tehát, hogy ebben az esetben endogén migrációs defektusról mégsem beszélhetünk.

A látszólagos ellentmondás feloldásához meg kell vizsgálnunk, hogy milyen tényezők szükségesek ahhoz, hogy a sejtek a gyulladás helyére juthassanak. Egyrésztől szükséges, hogy a sejtek erre önmagukban képesek legyenek, azaz endogén migrációs képesséjükre. Másrészt viszont a „hogyan” mellett ugyanolyan fontos a „miért” is. Szükség van valami olyan irányító, „csábító” tényezőre, mely a sejteket migrációra készíti, és az adott szövetekbe vonzza. Gyulladások kapcsán ez a tényező a gyulladásos környezet a maga citokin-kemokin-lipid mediátor milieu-jével. Ennek hiánya vagy súlyos zavara tehát végső soron ugyanazt, azaz a szövetek közötti sejtinvázió elmaradását okozza.

A Hck, Fgr és Lyn kinázok jelenléte feltétlenül szükséges ahhoz, hogy a megfelelő gyulladásos környezet kialakuljon, hiányukban a szövetekben sem a jellemző citokinek, kemokinek, lipid mediátorok, sem oxigén szabadgyökök nem szaporodnak fel ([I] és **6.6**).

Korábbi irodalmi adatokkal [64, 377, 381] összhangban a mi eredményeink is megerősítik olyan önerősítő pozitív feedback szabályozó körök létezését, melyek a myeloid sejtek toborzását vezérlik. A szövetek közötti aktiváció következményeként ugyanis azokból a sejtekből gyulladásos mediátorok szabadulnak fel, melyek további myeloid sejteket

vonzanak oda a keringésből, amelyek ismét aztán szintúgy aktiválódnak. Ezzel pedig egy önerősítő szabályozó kör alakul ki. Mivel a neutrophilek jellemzően neutrophilekre ható (ref és **6.7.2**), míg a macrophagok a monocytákat vonzó ágenseket választanak el, feltehető, hogy legalább 2 ilyen pozitív feedback kör létezik, melyek között természetesen keresztirányú aktiváció is lehetséges: gondoljunk csak a macrophagok MIP-2-termelésére, mely nagy mértékben neutrophilekre is hat, illetve a neutrophil-eredetű LTB₄ monocytákra kifejtett hatására.

Az a tény, hogy az Src-kinázok teljes mértékben kizárólag neutrophileket érintő hiánya elégséges az arthritisszel szembeni teljes védettséghez (**6.3**) formálisan ugyan nem zárja ki, hogy az Src-kinázok egyéb sejtípusban is nélkülözhetetlenek lennének, de mindenképpen felhívja a figyelmet az említett neutrophil-mediált gyulladáshoz önerősítő körök kulcsfontosságú szerepére az arthritis kialakulása kapcsán.

Fontos megjegyezni, hogy az eddigiekben vizsgált két mutáció az egész fent leírt folyamatot kettő külön helyen blokkolja: β_2 integrinek hiányában a myeloid sejtek nem képesek a gyulladás helyére odajutni, míg a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ sejtek ugyan képesek lennének odamenni, de ott nem képesek a gyulladáshoz mediátorok elválasztására, és további sejtek toborzására, így nincs miért odamenniük. Mindazonáltal az önerősítő pozitív feedback körök jellegéből fakadóan minkét defektus azonos eredménnyel jár: a gyulladáshoz vezető folyamat teljes blokkolásával (**6.4**).

Ez az eredmény felhívja a figyelmet az összetett *in vivo* rendszerek vizsgálata során kapott adatok értelmezésének illetve a következmények levonásának nehézségeire, a körültekintő interpretáció kiemelt fontosságára. Láttuk, hogy az itt leírt folyamatok során 2 mutáció lényegében azonos fenotípussal, sőt első ránézésre megegyező patomechanizmusbeli eltérésekkel jár, ugyanakkor annak oka igen eltérő lehet.

Mindenképpen meg kell említeni, hogy vannak olyan korábbi irodalmi adatok, amelyek arra utalnak, hogy az Src-kinázoknak fontos szerepe van a neutrophilek és macrophagok migrációjában. $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ egerekben az endotoxaemia csökkent mortalitással jár, melynek hátterében a neutrophilek májba történő, integrin-függő migrációjának károsodását vélelmezték [314]. A tioglikolát-indukált steril peritonitis modellben a Hck , Fgr és Lyn hiánya gátolja a macrophagok hasúri toborzását [20]. Allergiás légúti gyulladás során az Fgr szükségesnek bizonyult az eosinophilek légutakba történő vándorlásához [382]. Az Src-típusú tirozin-kinázok emellett fontos szerepet játszanak az LFA-1 integrin kinyújtott, azaz aktív konformációba kerülésében, és ezáltal a gyulladt endothel mentén történő lassú gördülés fázisában, mely a véráramból való kihorgonyzódást és végül a

diapedesist készítheti elő [66, 383]. Az Src-kinázok farmakológiai gátlása vagy genetikai hiánya gátolja a neutrophilek migrációját transwell membrán rendszerben [384], illetve *in vitro* gyulladt endothel-felületen keresztül [385]. A többek között az Src-kinázokat is gátló dasatinib hatására Zigmond kamrában csökken a neutrophilek 2D migrációs képessége [355]. Bár ezen adatok azt sugallják, hogy az Src-típusú tirozin-kinázoknak fontos szerepük lenne a neutrophilek és monocyták/macrophagok migrációjában, több olyan tényező is akad, amely korlátozza az eredmények általánosítását.

Az endotoxaemiával kapcsolatos Hck^{-/-}Fgr^{-/-} migrációs defektust leíró kísérleti adatok meglehetősen korlátozottak. A Hck és az Fgr hiányában a májban szövettani vizsgálattal kevesebb gyulladással járó sejtet, neutrophilt találtak [314], ami utalhat ugyan arra, hogy ezen sejtek migrációs képessége károsodott, de lehet másodlagos hatás is (vö. Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekben migrációs képesség megtartott, de még sincs gyulladással járó infiltráció).

Bár a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} macrophagok peritonealis migrációja egyértelműen károsodott, mások felvetették, hogy a neutrophilekre ez nem igaz [129], sőt Hck^{-/-}Fgr^{-/-} neutrophilek esetén még akár fokozott is lehet [386].

Az Fgr hiánya nem pusztán az eosinophilek légutakba történő vándorlását gátolta, de a megfelelő citokinkörnyezet kialakulását is, ami felveti a lehetőségét annak, hogy a migrációs károsodás csupán másodlagos hatás, az elégtelen gyulladással járó környezet következménye [382].

A Hck hiánya úgy akadályozta meg a thrombohaemorrhagiás vasculopathia kialakulását, hogy közben nem volt hatással a neutrophilek szövetekben való megjelenésére [22].

Végül, de nem utolsósorban, egy zebrahalakon nemrégiben végzett tanulmány fontos szerepet tulajdonít a Lyn kináznak a neutrophilek sérülés helyére történő toborzásában [387]. Fontos kiemelni, hogy a Lyn szükségesnek bizonyult a redox állapot érzékelésén keresztül a neutrophilek mozgásának irányításában, de nem befolyásolta a klasszikus kemoattraktánsok, mint az fMLP vagy LTB₄ irányába történő migrációt. Ez pedig arra utal, hogy még az emlősöknél sokkal ősből származó rendszerekben is az Src-kinázok elsősorban a környezeti jelek feldolgozásában vesznek részt, így ezen keresztül vezénylik a neutrophilek gyulladással járó helyén történő megjelenését, és nem a sejtek endogén migrációs képességéhez szükségesek.

Bár az eredményeink megerősítik, hogy általánosságban az Src-kinázok nélkülözhetetlenek a myeloid sejtek gyulladással járó helyén történő megjelenéséhez (6.3), de ezt nem a sejtek endogén migrációs képességében betöltött szerepüknek (6.5), hanem a hiányukban tapasztalható elégtelen gyulladással járó környezetnek tulajdonítjuk (6.6).

Mindazonáltal egyes speciális *in vitro* körülmények, mint pl. a nagyon szűk pórusméretű membránokon [384] vagy szoros endothel monolayeren [385] át történő migráció, illetve egyes szigorúan 2-dimenziós migrációs tesztek olyan helyzetet eredményezhetnek, amely kedvezhet a sejt vándorlás Src-kinázoktól függő módjának. Ebben szerepe lehet annak a ténynek is, hogy ilyen speciális körülmények között túlságosan nagy hangsúlyt kaphat a sejtek felszínhez történő letapadási és szétterülési képessége. Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek nem képesek a felszínhez letapadni (6.7.3), mely azt eredményezheti, hogy ezekben a kísérletekben csökkent vándorlási képességet, illetve endothelhez történő kapcsolódást találunk. Valószínűleg ennek köszönhető az is, hogy a Hck és Fgr kinázok részvétele a neutrophilek vándorlásában a pórusmérettől függ: 1 µm-es pórusokon át történő migrációhoz szükségesek, 3 µm-es pórusok esetén azonban nem ([384] és 40. ábra). További példa erre az a tény, hogy az Src-kinázokat is gátló dasatinib hatására a 2-dimenziós Zigmund-kamrában csökken (de nem szűnik meg), míg a 3-dimenziós tesztekben normális a neutrophilek migrációs képessége [355].

Mindenképpen szükség van azonban további megfelelően kontrollált *in vivo* vizsgálatokra és képalkotó eljárásokkal végzett mérésekre illetve egyéb pl. bakteriális

Mindenképpen szükség van azonban további *in vivo* kísérletekre, képalkotó, imaging technikákkal végzett mérésekre, illetve egyéb, akár nem steril gyulladásokban szereplő kemotaktikus ágensek vizsgálatára ahhoz, hogy megnyugtatóan tisztázhassuk az Src-kinázok szerepét vagy annak hiányát a fehérvérsejtek *in vitro* és *in vivo* endogén migrációs képességének szabályozásában.

Számos korábbi adat áll rendelkezésre az Src-típusú tirozin kinázok a neutrophilek és a macrophagok β₂ integrineken keresztül történő aktivációjában betöltött fontos szerepéről [17, 18, 21, 338]. Ezekkel teljes összhangban mi is azt találtuk, hogy sem a CD18^{-/-}, sem a Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} neutrophilek nem képesek ICAM-1 felszínre letapadni (45. ábra). Ez ugyanakkor szöges ellentétben áll azzal a megfigyelésünkkel, hogy a HFL neutrophilek és monocyta/macrophagok β₂-integrin-függő endogén migrációs képessége normális (l. 6.5). Ezek az eredmények így együttesen azt sugallják, hogy a β₂ integrinek outside-in jelátvitel és a következményes sejt választások, mint pl. a sejtek letapadása és szétterülése, nem szükségesek a myeloid sejtek β₂-mediált migrációjához. Mindazonáltal további mérésekre lesz szükség, hogy megnyugtatóan rendezni lehessen ezt a kérdést.

Ugyanakkor ezen ellentmondás feloldására egyéb magyarázat is kínálkozik. Három dimenziós körülmények között a fehérvérsejtek ugyanis képesek lehetnek integrinektől

független migrációra is [388]. Adja magát tehát, hogy az arthritis során a HFL sejtek normális endogén migrációs képessége annak lenne betudható, hogy ebben az esetben is egy ilyen integrinektől független sejt-vándorlási folyamatról lenne szó. A sejtek normális endogén migrációs képességéhez azonban nélkülözhetetlen a CD18, amely így lényegében kizárja ezt a lehetőséget.

Felmerül annak a lehetősége is, hogy a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ fenotípusért egyéb sejtek lennének felelősek. Hck , Fgr és Lyn -hiányos csontvelővel transzplantált vad típusú egerek fenotípusa megegyezik a teljes $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ mutánsokéval, míg az Src -kinázok kizárólag extrahaematopoeticus szövetekből való hiánya nem befolyásolja a betegséget (l. **6.1.2**), így tehát csak a haematopoeticus sejtek jöhetnek szóba. Ezek közül az eosinophilek a perifériás vérben a granulocyták 19 ± 4 %-át alkotják, az arthritises ízületben azonban csak mintegy $1,1 \pm 0,7$ %-ban vannak jelen ($n = 5$). Sőt, eosinophilek hiányában nemhogy nem enyhül, hanem még súlyosbodik is az arthritis [389]. A hízósejtek és basophilek arthritisben játszott szerepével kapcsolatban vannak ugyan ellentmondások [390-392], melyek leginkább az egyes hízósejt-hiányos egértörzsek közötti különbségekre vezethetők vissza, jelenleg azonban úgy gondoljuk, hogy ezeknek a sejteknek nincs szerepe az autoantitest-indukált ízületi gyulladásban. Mindezek alapján tehát igen valószínűtlen, hogy akár az eosinophilek, akár a hízósejtek vagy basophilek nagyban hozzájárulnának a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerek fenotípusához.

Az Src -kinázok valószínűleg az aktiváló $Fc\gamma$ -receptorok proximalis jelpályájában betöltött szerepüknek köszönhetően vesznek részt a gyulladós környezet kialakításában [I]. Ezt tovább erősíti az aktiváló $Fc\gamma$ -receptorok hiányával járó $FcR\gamma^{-/-}$ illetve a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ mutánsok *in vivo* és *in vitro* fenotípusának hasonlósága: mindkét esetben arthritiszel szembeni teljes védettséget találunk, melynek hátterében a myeloid sejtek megtartott endogén migrációs képessége mellett a neutrophilek gátolt gyulladós mediátor termelése, és a következményes elégtelen gyulladós környezet miatt károsodott szöveti infiltráció áll (l. **6.8**). Az Src -kinázok és az $FcR\gamma$ -lánc közös jelpályában való részvétele mellett szól, hogy egymás hatását nem képesek kivédeni (l. **6.8.6**).

Mivel a Hck és az Fgr hiánya nem befolyásolta a neutrophilek immunkomplexek hatására bekövetkező aktivációját [18], illetve $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ macrophagokban csak kis mértékben csökkent az IgG-vel opsonizált vörösvértestek fagocitózisa [308, 312], úgy tartották, hogy az Src -típusú tirozin-kinázok nem szükségesek a myeloid sejtek Fc -receptor-függő sejtválaszaihoz. Jelen doktori értekezésemben bemutatott eredményeink ezzel szöges ellentétben állnak. Hck , Fgr és Lyn együttes hiányában a neutrophilek (**6.7**) és

macrophagok [I] immunkomplexekre adott *in vitro* sejtválaszai teljes mértékben károsodnak, illetve az Src-kinázok nélkülözhetelenek az Fc γ -receptorok aktivációjának hatására bekövetkező ITAM-foszforilációhoz [I]. A neutrophilek esetén a Lyn feltehetően kompenzálni képes a Hck és az Fgr hiányát, így teljes károsodás csak mindhárom Src-típusú tirozin-kináz együttes hiányában alakul ki. A macrophagok esetén tapasztalt ellentmondást magyarázhatja, hogy egy másik Src-típusú tirozin-kináz (pl. a c-Src vagy a Yes) a fentihez hasonló kompenzáló szerepet játszhat, illetve nem lehet kizárni annak a lehetőségét sem, hogy az immobilizált immunkomplexekre adott sejtválaszok és az Fc γ -receptorokon keresztül zajló fagocitózis során olyan egyéb jelátviteli utak is szerepet kapnak, melyek a két folyamat során nem teljesen azonosak.

Az eredmények interpretációjának nehézségét tovább fokozza az a tény is, hogy a β_2 integrinek szerepet játszhatnak a myeloid sejtek immunkomplexek által történő aktivációs folyamataiban mind *in vivo*, mind *in vitro*, ahogy erre néhány korábbi irodalmi adat is utal [379]. Kísérleteinkben mi is hasonló eredményre jutottunk, amennyiben CD18^{-/-} neutrophilekben csökkent mind a szuperoxid- mind pedig egyes gyulladáshoz vezető mediátorok termelése (**56. ábra** és **57. ábra**). Ez a károsodás azonban közel sem olyan súlyos, mint a teljes defektus, amit a Hck, Fgr és Lyn illetve az FcR γ -lánc hiányában látunk. Ez pedig arra utal, hogy mindenképpen létezik az immunkomplex-függő aktivációra adott sejtválaszoknak egy olyan része, amely integrinektől független, azonban FcR γ -láncától és Src-kinázoktól függő módon jön létre.

A kérdés további tisztázása érdekében megvizsgáltuk a myeloid sejtek két fő β_2 integrinje hiányának hatásait. A CD11a^{-/-} állatokban az LFA-1 (CD11a/CD18 heterodimer), míg a CD11b^{-/-} állatokban a Mac-1 (CD11b/CD18) sejtfelszíni expressziója hiányzik, így azok *in vitro* és *in vivo* működéseket betöltött szerepét elkülönítve, egymással összevetve tudtuk vizsgálni, valamelyest választ adva arra, hogy melyik integrin mely folyamatokban játszik fontos(abb) szerepet. Eredményeink alapján az immunkomplex-függő neutrophilválaszok CD18 hiányában tapasztalható részleges károsodásáért a Mac-1 felelős (**56. ábra** és **57. ábra**). Korábbi irodalmi adatokkal valamelyest egyetértésben, az *in vivo* arthritis létrejöttéhez ugyanakkor az LFA-1 jelenléte szükséges [9, 11], bár a mi kezünkben a CD11a^{-/-} állatok nem bizonyultak teljesen védettnek az arthritisz szemben, mindképpen jelentősen károsodtak (**54. ábra**). A CD18^{-/-} neutrophilek *in vivo* endogén migrációs defektusáért azonban teljesen egyértelműen az LFA-1 tehető felelőssé (**55. ábra**).

Ezzel szemben a Mac-1-nek egyes neutrophil- illetve autoantitest-függő gyulladási betegségekben inkább negatív szabályozó szerepet tulajdonítanak [11, 393]. Ezzel teljes összhangban mi is azt találtuk, hogy Mac-1 hiányában a fehérvérsejtek endogén migrációs képessége is megtartott, immunkomplexekre adott *in vitro* válaszaik ugyanakkor csökkentek, ennek ellenére mégis az arthritisz még a vad típusnál is lényegesen súlyosabb (**54. ábra**).

Továbbá fontos kiemelni, hogy míg a β_2 -függő sejtválaszokban a Hck és az Fgr vesz részt [17, 18, 21], az autoantitest-indukált ízületi gyulladásban elsősorban a Hck és a Lyn tűnik fontosnak (l. 6.2). Ezek együttesen pedig arra utalnak, hogy az immunkomplex-függő sejtválaszok β_2 integrinektől, főként a Mac-1-től függő komponense nem valószínű, hogy alapvetően felelős lenne a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerek arthritisszel szembeni védettségéért.

Összességében a jelen doktori értekezésben bemutatott eredményeink rávilágítottak az Src-kinázok *in vivo* gyulladási betegségekben betöltött nélkülözhetetlen szerepére, amelynek hátterében a megfelelő gyulladási környezet kialakításában való megkerülhetetlen részvételük áll. Ez pedig felhívja a figyelmet az Src-kinázok gyulladásokban játszott mindezidáig alulbecsült szerepére, mely jó eséllyel a megfelelő humán betegségekre is extrapolálható, és így hozzájárulhat egyes emberi autoimmun betegségek, pl. a rheumatoid arthritis patomechanizmusának mélyebb megértéséhez, és végső soron akár jövőbeni terápiás megközelítések elméleti alapját is képezheti.

8. Következtetések

1. A Hck, az Fgr és/vagy a Lyn Src-típusú tirozin-kinázok heamatopoeticus expressziója nélkülözhetetlen az autoantitest-indukált arthritis kialakulásához.
2. Az arthritis kialakulása során a Hck, Fgr és Lyn egymást helyettesíthetik.
3. A Hck, Fgr és Lyn kinázok kizárólag neutrophileket érintő hiánya elegendő az autoantitest-indukált arthritisszel szembeni teljes védettséghez.
4. Src-kinázok hiányában a myeloid sejtek gyulladással infiltrációja elmarad.
5. A Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} myeloid sejtek *in vivo* és *in vitro* endogén migrációs képessége megtartott.
6. A Hck, Fgr és Lyn hiányában a gyulladással környezet kialakulása károsodott.
7. A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz, a szuperoxid-termeléshez és a gyulladással mediátorok elválasztásához szükségesek az Src-kinázok.
8. Az Fc-receptor- γ -lánc hiánya Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}-hez hasonló fenotípussal jár, az FcR γ ^{-/-} állatokban nem alakul ki arthritis, elmarad a gyulladással sejtinfiltráció annak ellenére, hogy a myeloid sejtek endogén migrációs képessége normális *in vivo* és *in vitro* is. A Src-kinázokhoz hasonlóan a gyulladással környezet kialakulásához valamint a neutrophilek *in vitro* immunkomplex-függő jelátviteléhez elengedhetetlen az FcR γ -lánc.
9. A Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} és FcR γ ^{-/-} myeloid sejtek nem képesek kompenzálni egymás hatását *in vivo* az autoantitest-függő arthritis kialakulása során.
10. Autoantitest-függő gyulladássalokban a β_2 intergrinek hiányában tapasztalható *in vivo* fenotípusért az LFA-1, míg az *in vitro*ért a Mac-1 hiánya a felelős.

9. Összefoglalás

A különféle autoimmun gyulladási megbetegedések a populáció jelentős hányadát érintik, egységes és megnyugtató kezelésük azonban nem teljesen megoldott. A myeloid sejtek jelentős mennyiségben kimutathatók ezekben a betegségekben, jelátvitelüket célzó terápiás próbálkozások ezért komoly reményekkel kecsegtetnek.

Az Src-típusú tirozin-kinázok daganatos megbetegedésekben játszott fontos szerepéből fakadóan az őket célzó terápiás próbálkozások igen intenzív kutatás alatt állnak, mely nagy hasznára lehetne egyéb betegségek gyógyításának is, amennyiben azokban ezen kinázok szerepe igazolódik. Az Src-kinázok nélkülözhetetlen szerepe jól ismert olyan *in vitro* fehérvérsejt funkciókban, mint pl. az integrin jelátvitel, mely kiemelt jelentőséggel bír autoantitest-függő ízületi gyulladásokban is. Ezért doktori munkám célja ezen kinázok autoimmun gyulladásokban betöltött szerepének mélyreható vizsgálata volt.

Első kísérleteimmel kimutattam, hogy a Hck, Fgr és Lyn Src-típusú tirozin-kinázok elengedhetetlenül fontosak a haematopoieticus sejtekben az autoantitest-függő arthritis kialakulásához, melynek során egymást többé kevésbé helyettesíteni tudják.

A továbbiakban igazoltam, hogy a β_2 -integrinekhez hasonlóan az Src-kinázok nélkülözhetetlenek a gyulladási sejtinfiltráció kialakulásához, azonban a β_2 integrinokkal ellentétben nem a sejtek normális endogén migrációs képességéhez, hanem a sejteket odavonzó, kemokin/citokin/lipid mediátorokkal és oxigén szabadgyökökkel jellemezhető megfelelő gyulladási mikrokörnyezet létrejöttéhez fontosak.

A megfigyelt hatások hátterének felderítése kapcsán kimutattam, hogy az Src-kinázok hiányában a neutrophilek nem képesek immunkomplex-függő módon aktiválódni, szuperoxidot illetve gyulladási mediátorokat termelni, melynek hátterében az áll, hogy az Src-kinázok fontosak a neutrophilek Fc γ -receptor jelátvitelében.

A továbbiakban igazoltam, hogy a β_2 integrinek közül a Mac-1 szerepet játszhat a neutrophilek *in vitro* immunkomplex-függő sejtválaszaiban, ugyanakkor *in vivo* nincs szerepe az arthritis kialakulása során. Ebben egy másik β_2 integrin az LFA-1 játszik szerepet a myeloid sejtek endogén migrációs képességének befolyásolásán keresztül.

Összességében a doktori munkám során nyert itt bemutatott eredményeink rávilágítanak az Src-kinázok mindezidáig alulbecsült szerepére az autoimmun gyulladási betegségek kialakulása során, mely a későbbiekben ezen kinázokat célzó új terápiás megközelítések alapja lehet.

10. Summary

The various autoimmune inflammatory diseases are a great burden on the society affecting a great deal of the population, proper treatment, however, is not yet available in all the cases. Myeloid cells are abundant in the lesions of those diseases, therefore targeting them and more specifically their intracellular signal transduction pathways may prove a successful therapeutic approach.

Src-family tyrosine kinases (SFKs) have been identified as crucial players in tumor biology and therefore have been major targets for anti-tumor therapy recently. Those efforts may be immediately applied to researching new therapeutics for inflammatory diseases provided SFKs' role in those diseases is proven.

SFKs are well known to be required for *in vitro* integrin-dependent leukocyte functions which are critical for the development of the autoantibody-induced arthritis and several other inflammatory diseases. My PhD thesis was therefore aimed at clarifying the role SFKs may play in arthritis development.

In the first part of my PhD work, we have shown for the first time that the development of autoantibody-induced arthritis is critically dependent of the haematopoietic expression of the SFKs Hck, Fgr and Lyn which have an overlapping role in the process.

Next, my results suggested that, similarly to β_2 integrins, SFKs are required for the leukocyte infiltrate in the inflamed joints. However, unlike β_2 integrins SFKs are not involved in the intrinsic, endogenous migratory ability of myeloid cells but in creating an inflammatory microenvironment characterized by reactive oxygen species and proinflammatory cytokines, chemokines and lipid mediators.

Trying to identify the underlying cause of these observations we have shown that SFKs are indispensable for immune complex-induced neutrophil activation, which is due to their role in Fc γ -receptor signaling.

In vivo arthritis and leukocyte intrinsic migratory ability proved dependent mainly on LFA-1 whereas *in vitro* immune complex-induced neutrophil responses on Mac-1, further confirming a β_2 -independent role for SFKs in the development of arthritis.

In summary, the results of my PhD thesis shed light on a so far underestimated critical role for Src-family kinases in the development of autoantibody-induced inflammatory diseases, more specifically in the release of inflammatory mediators required for a proper inflammatory environment and also forming the basis of a neutrophil-mediated proinflammatory feedback loop. These observations may also contribute to the better understanding of disease mechanics and hopefully, by providing promising drug targets, also to the therapy of human diseases.

11. Irodalomjegyzék

1. Mócsai A, Kovács L, Gergely P (2014) What is the future of targeted therapy in rheumatology: biologics or small molecules? *BMC Med.* 12: p. 43.
2. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D (1999) From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity.* 10(4): p. 451-61.
3. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ (1993) A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *The Journal of clinical investigation.* 92(5): p. 2480-8.
4. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zillikens D (2002) Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc γ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol.* 161(1): p. 301-11.
5. Wipke BT, Allen PM (2001) Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 167(3): p. 1601-8.
6. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, Fairley JA, Diaz LA (2000) A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *The Journal of clinical investigation.* 105(1): p. 113-23.
7. Solomon S, Rajasekaran N, Jeisy-Walder E, Snapper SB, Illges H (2005) A crucial role for macrophages in the pathology of K/BxN serum-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 35(10): p. 3064-73.
8. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D (2002) Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity.* 16(2): p. 157-68.
9. Monach PA, Nigrovic PA, Chen M, Hock H, Lee DM, Benoist C, Mathis D (2010) Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis: critical producers

- of Fc receptor γ , the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1. *Arthritis Rheum.* 62(3): p. 753-64.
10. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C (2007) NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol.* 212(1): p. 56-65.
 11. Watts GM, Beurskens FJ, Martin-Padura I, Ballantyne CM, Klickstein LB, Brenner MB, Lee DM (2005) Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1. *J Immunol.* 174(6): p. 3668-75.
 12. Liu Z, Zhao M, Li N, Diaz LA, Mayadas TN (2006) Differential roles for β_2 integrins in experimental autoimmune bullous pemphigoid. *Blood.* 107(3): p. 1063-9.
 13. Bishop JM (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Rev Biochem.* 52: p. 301-54.
 14. Martin GS (2004) The road to Src. *Oncogene.* 23(48): p. 7910-7.
 15. Parsons SJ, Parsons JT (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 23(48): p. 7906-9.
 16. Playford MP, Schaller MD (2004) The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene.* 23(48): p. 7928-46.
 17. Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G (1999) Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol.* 162(2): p. 1120-6.
 18. Lowell CA, Fumagalli L, Berton G (1996) Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58^{c-fgr} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol.* 133(4): p. 895-910.
 19. Pereira S, Zhou M, Mócsai A, Lowell C (2001) Resting murine neutrophils express functional α_4 integrins that signal through Src family kinases. *J Immunol.* 166(6): p. 4115-23.
 20. Meng F, Lowell CA (1998) A β_1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J.* 17(15): p. 4391-403.
 21. Suen PW, Ilic D, Cavegion E, Berton G, Damsky CH, Lowell CA (1999) Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck/Fgr deficient macrophages. *J Cell Sci.* 112 (Pt 22): p. 4067-78.

22. Hirahashi J, Mekala D, Van Ziffle J, Xiao L, Saffaripour S, Wagner DD, Shapiro SD, Lowell C, Mayadas TN (2006) Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity*. 25(2): p. 271-83.
23. Morgan MM, Labno CM, Van Seventer GA, Denny MF, Straus DB, Burkhardt JK (2001) Superantigen-induced T cell:B cell conjugation is mediated by LFA-1 and requires signaling through Lck, but not ZAP-70. *J Immunol*. 167(10): p. 5708-18.
24. Fagerholm S, Hilden TJ, Gahmberg CG (2002) Lck tyrosine kinase is important for activation of the CD11a/CD18-integrins in human T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 32(6): p. 1670-8.
25. Feigelson SW, Grabovsky V, Winter E, Chen LL, Pepinsky RB, Yednock T, Yablonski D, Lobb R, Alon R (2001) The Src kinase p56^{lck} up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *J Biol Chem*. 276(17): p. 13891-901.
26. Suzuki J, Yamasaki S, Wu J, Koretzky GA, Saito T (2007) The actin cloud induced by LFA-1-mediated outside-in signals lowers the threshold for T-cell activation. *Blood*. 109(1): p. 168-75.
27. Perez OD, Mitchell D, Jager GC, Nolan GP (2004) LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56⁺CD8⁺ natural killer cells. *Blood*. 104(4): p. 1083-93.
28. Riteau B, Barber DF, Long EO (2003) Vav1 phosphorylation is induced by β_2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med*. 198(3): p. 469-74.
29. Kim LC, Song L, Haura EB (2009) Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 6(10): p. 587-95.
30. Zhang S, Yu D (2012) Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci*. 33(3): p. 122-8.
31. Ribeiro C, Brehelin M (2006) Insect haemocytes: what type of cell is that? *J Insect Physiol*. 52(5): p. 417-29.
32. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 9: p. 181-218.
33. Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 33(5): p. 657-70.

34. Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 6(3): p. 173-82.
35. Mayadas TN, Cullere X (2005) Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* 26(7): p. 388-95.
36. Dancy JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 58(3): p. 705-15.
37. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR (2002) Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood.* 100(3): p. 854-61.
38. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L (2010) In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 116(4): p. 625-7.
39. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM (2011) Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 117(22): p. 6050-2; author reply 6053-4.
40. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 11(8): p. 519-31.
41. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 30: p. 459-89.
42. Kolaczkowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13(3): p. 159-75.
43. Mócsai A (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 210(7): p. 1283-99.
44. Bazzoni F, Cassatella MA, Laudanna C, Rossi F (1991) Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 50(3): p. 223-8.
45. Cassatella MA (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16(1): p. 21-6.
46. Bugl S, Wirths S, Muller MR, Radsak MP, Kopp HG (2012) Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 1266: p. 171-8.
47. Furze RC, Rankin SM (2008) The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J.* 22(9): p. 3111-9.

48. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG, Glass CK (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell*. 122(5): p. 707-21.
49. Croxford AL, Mair F, Becher B (2012) IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur J Immunol*. 42(9): p. 2263-73.
50. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 22(3): p. 285-94.
51. Smith E, Zarbock A, Stark MA, Burcin TL, Bruce AC, Foley P, Ley K (2007) IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice. *J Immunol*. 179(12): p. 8274-9.
52. Bugl S, Wirths S, Radsak MP, Schild H, Stein P, Andre MC, Muller MR, Malenke E, Wiesner T, Marklin M, Frick JS, Handgretinger R, Rammensee HG, Kanz L, Kopp HG (2013) Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. *Blood*. 121(5): p. 723-33.
53. Takizawa H, Boettcher S, Manz MG (2012) Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood*. 119(13): p. 2991-3002.
54. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC (2010) CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 120(7): p. 2423-31.
55. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7(9): p. 678-89.
56. Schmidt S, Moser M, Sperandio M (2013) The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol*. 55(1): p. 49-58.
57. Muller WA (2013) Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*. 50(1): p. 7-22.
58. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K (2013) Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol*. 55(1): p. 59-69.
59. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M (2010) Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(5): p. 366-78.

60. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD (2011) The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Thorax*. 5(4): p. 255-73.
61. Zemans RL, Colgan SP, Downey GP (2009) Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 40(5): p. 519-35.
62. Hofman PM (2010) Pathobiology of the neutrophil-intestinal epithelial cell interaction: role in carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 16(46): p. 5790-800.
63. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 330(6002): p. 362-6.
64. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD (2010) Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity*. 33(2): p. 266-78.
65. Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ, Ley K (2006) Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation*. 13(2): p. 99-109.
66. Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A (2010) Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*. 116(4): p. 617-24.
67. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA (2004) Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity*. 20(4): p. 393-406.
68. Abram CL, Lowell CA (2009) The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol*. 27: p. 339-62.
69. Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, Moser M, Metin A, Fried M, Tomlinson I, Hogg N (2009) Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med*. 15(3): p. 306-12.

70. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 106(2): p. 584-92.
71. Sumagin R, Sarelius IH (2010) Intercellular adhesion molecule-1 enrichment near tricellular endothelial junctions is preferentially associated with leukocyte transmigration and signals for reorganization of these junctions to accommodate leukocyte passage. *J Immunol*. 184(9): p. 5242-52.
72. Lammermann T, Sixt M (2009) Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 21(5): p. 636-44.
73. Megens RT, Kemmerich K, Pyta J, Weber C, Soehnlein O (2011) Intravital imaging of phagocyte recruitment. *Thromb Haemost*. 105(5): p. 802-10.
74. Rossaint J, Zarbock A (2013) Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J Innate Immun*. 5(4): p. 348-57.
75. Doerschuk CM (2000) Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir Res*. 1(3): p. 136-40.
76. McDonald B, Kubes P (2012) Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. *Toxicol Pathol*. 40(2): p. 157-65.
77. Kitching AR, Kuligowski MP, Hickey MJ (2009) In vivo imaging of leukocyte recruitment to glomeruli in mice using intravital microscopy. *Methods Mol Biol*. 466: p. 109-117.
78. Zemans RL, McClendon J, Aschner Y, Briones N, Young SK, Lau LF, Kahn M, Downey GP (2013) Role of beta-catenin-regulated CCN matricellular proteins in epithelial repair after inflammatory lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 304(6): p. L415-27.
79. Zen K, Parkos CA (2003) Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol*. 15(5): p. 557-64.
80. Klesney-Tait J, Keck K, Li X, Gilfillan S, Otero K, Baruah S, Meyerholz DK, Varga SM, Knudson CJ, Moninger TO, Moreland J, Zabner J, Colonna M (2013) Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J Clin Invest*. 123(1): p. 138-49.
81. Doerfler ME, Danner RL, Shelhamer JH, Parrillo JE (1989) Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. *J Clin Invest*. 83(3): p. 970-7.

82. Swain SD, Rohn TT, Quinn MT (2002) Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal.* 4(1): p. 69-83.
83. Nathan CF (1989) Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood.* 73(1): p. 301-6.
84. Fossati G, Mazzucchelli I, Gritti D, Ricevuti G, Edwards SW, Moulding DA, Rossi ML (1998) In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *Int J Mol Med.* 1(6): p. 943-51.
85. Pitrak DL (1997) Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils. *Curr Opin Hematol.* 4(3): p. 183-90.
86. Németh T, Mócsai A (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 143(1): p. 9-19.
87. Li X, Utomo A, Cullere X, Choi MM, Milner DA, Jr., Venkatesh D, Yun SH, Mayadas TN (2011) The beta-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell Host Microbe.* 10(6): p. 603-15.
88. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR (2007) Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol.* 37(2): p. 467-78.
89. Ford JW, McVicar DW (2009) TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol.* 21(1): p. 38-46.
90. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M (2001) TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 410(6832): p. 1103-7.
91. Trinchieri G, Sher A (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 7(3): p. 179-90.
92. Hayashi F, Means TK, Luster AD (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 102(7): p. 2660-9.
93. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I (2005) The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 77(6): p. 886-92.
94. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G (2007) Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* 27(4): p. 549-59.

95. Ekman AK, Cardell LO (2010) The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology*. 130(1): p. 55-63.
96. Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B (2007) Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost.* 98(2): p. 262-73.
97. Changelian PS, Jack RM, Collins LA, Fearon DT (1985) PMA induces the ligand-independent internalization of CR1 on human neutrophils. *J Immunol*. 134(3): p. 1851-8.
98. Bruhns P (2012) Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 119(24): p. 5640-9.
99. Lu J, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD (2012) Pentraxins and Fc receptors. *Immunol Rev*. 250(1): p. 230-8.
100. van der Steen LP, Bakema JE, Sesarman A, Florea F, Tuk CW, Kirtschig G, Hage JJ, Sitaru C, van Egmond M (2012) Blocking Fc α receptor I on granulocytes prevents tissue damage induced by IgA autoantibodies. *J Immunol*. 189(4): p. 1594-601.
101. Jakus Z, Nemeth T, Verbeek JS, Mocsai A (2008) Critical but overlapping role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol*. 180(1): p. 618-29.
102. Coxon A, Cullere X, Knight S, Sethi S, Wakelin MW, Stavrakis G, Luscinskas FW, Mayadas TN (2001) Fc γ RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity*. 14(6): p. 693-704.
103. Zhou MJ, Lublin DM, Link DC, Brown EJ (1995) Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc γ RII or Fc γ RIIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J Biol Chem*. 270(22): p. 13553-60.
104. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV (1994) FcR γ -chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell*. 76(3): p. 519-29.
105. Vivier E, Daron M (1997) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today*. 18(6): p. 286-91.
106. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM,

- Majoul IV, Strait RT, Harris NL, Kohl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Kohl J (2012) Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med.* 18(9): p. 1401-6.
107. Jang JE, Hidalgo A, Frenette PS (2012) Intravenous immunoglobulins modulate neutrophil activation and vascular injury through FcγRIII and SHP-1. *Circ Res.* 110(8): p. 1057-66.
108. Chen K, Nishi H, Travers R, Tsuboi N, Martinod K, Wagner DD, Stan R, Croce K, Mayadas TN (2012) Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood.* 120(22): p. 4421-31.
109. Su K, Yang H, Li X, Li X, Gibson AW, Cafardi JM, Zhou T, Edberg JC, Kimberly RP (2007) Expression profile of FcγRIIb on leukocytes and its dysregulation in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 178(5): p. 3272-80.
110. Guyre PM, Campbell AS, Kniffin WD, Fanger MW (1990) Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. *J Clin Invest.* 86(6): p. 1892-6.
111. Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, Platzer E (1991) Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc γRI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 78(4): p. 885-9.
112. Hoffmann JJ (2009) Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med.* 47(8): p. 903-16.
113. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD (1990) Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc α receptor in humans. *J Exp Med.* 171(3): p. 597-613.
114. Otten MA, van Egmond M (2004) The Fc receptor for IgA (FcaRI, CD89). *Immunol Lett.* 92(1-2): p. 23-31.
115. Otten MA, Rudolph E, Dechant M, Tuk CW, Reijmers RM, Beelen RH, van de Winkel JG, van Egmond M (2005) Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. *J Immunol.* 174(9): p. 5472-80.
116. Vella A, Bellavite P, Adami A, Ortolani R, Benoni G, Carletto A, Biasi D, Caramaschi P, Tridante G (1999) Expression of FCεRII/CD23 on human

- neutrophils isolated from rheumatoid arthritis patients. *Inflammation*. 23(5): p. 471-9.
117. Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q (2001) Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. *Faseb j*. 15(6): p. 940-9.
 118. Porcherie A, Mathieu C, Peronet R, Schneider E, Claver J, Commere PH, Kiefer-Biasizzo H, Karasuyama H, Milon G, Dy M, Kinet JP, Louis J, Blank U, Mecheri S (2011) Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med*. 208(11): p. 2225-36.
 119. Monteseirin J, Bonilla I, Camacho MJ, Conde J, Sobrino F (2001) IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 31(6): p. 889-92.
 120. Mora J, Riggs EK, Fu J, MacGlashan DW, Jr., Fox SA, Yu B, Tobin MC, Thomas LL (2009) Expression of the high affinity IgE receptor by neutrophils of individuals with allergic asthma is both minimal and insensitive to regulation by serum IgE. *Clin Immunol*. 132(1): p. 132-40.
 121. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL (2010) The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 10(6): p. 387-402.
 122. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mocsai A (2009) Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 206(3): p. 577-93.
 123. Newbrough SA, Mocsai A, Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, Lowell CA, Koretzky GA (2003) SLP-76 regulates Fc gamma receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity*. 19(5): p. 761-9.
 124. Kim C, Dinauer MC (2001) Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*. 166(2): p. 1223-32.
 125. Utomo A, Cullere X, Glogauer M, Swat W, Mayadas TN (2006) Vav proteins in neutrophils are required for Fc gamma R-mediated signaling to Rac GTPases and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase component p40(phox). *J Immunol*. 177(9): p. 6388-97.

126. Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mocsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR, Hawkins PT (2011) PI3Kbeta plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal.* 4(168): p. ra23.
127. Pereira S, Zhou M, Mocsai A, Lowell C (2001) Resting murine neutrophils express functional alpha 4 integrins that signal through Src family kinases. *J Immunol.* 166(6): p. 4115-23.
128. Nathan CF (1987) Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest.* 80(6): p. 1550-60.
129. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 16(4): p. 547-58.
130. Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD (1989) Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol.* 109(3): p. 1341-9.
131. Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol.* 7(12): p. 1326-1333.
132. Graham DB, Robertson CM, Bautista J, Mascarenhas F, Diacovo MJ, Montgrain V, Lam SK, Cremasco V, Dunne WM, Faccio R, Coopersmith CM, Swat W (2007) Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLCgamma2 signaling axis in mice. *J Clin Invest.* 117(11): p. 3445-52.
133. Gakidis MA, Cullere X, Olson T, Wilsbacher JL, Zhang B, Moores SL, Ley K, Swat W, Mayadas T, Brugge JS (2004) Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Biol.* 166(2): p. 273-82.
134. Cui L, Chen C, Xu T, Zhang J, Shang X, Luo J, Chen L, Ba X, Zeng X (2009) c-Abl kinase is required for beta 2 integrin-mediated neutrophil adhesion. *J Immunol.* 182(5): p. 3233-42.
135. Schymeinsky J, Gerstl R, Mannigel I, Niedung K, Frommhold D, Panthel K, Heesemann J, Sixt M, Quast T, Kolanus W, Mocsai A, Wienands J, Sperandio M,

- Walzog B (2009) A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood*. 114(19): p. 4209-20.
136. Dib K, Melander F, Andersson T (2001) Role of p190RhoGAP in beta 2 integrin regulation of RhoA in human neutrophils. *J Immunol*. 166(10): p. 6311-22.
137. Futosi K, Fodor S, Mócsai A (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 17(3): p. 638-50.
138. Caron E, Self AJ, Hall A (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol*. 10(16): p. 974-8.
139. Bos JL, de Bruyn K, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de Rooij J, van Mansfeld F, Zwartkruis F (2003) The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans*. 31(Pt 1): p. 83-6.
140. Li Y, Yan J, De P, Chang HC, Yamauchi A, Christopherson KW, 2nd, Parnavitana NC, Peng X, Kim C, Munugalavadla V, Kapur R, Chen H, Shou W, Stone JC, Kaplan MH, Dinauer MC, Durden DL, Quilliam LA (2007) Rap1a null mice have altered myeloid cell functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins. *J Immunol*. 179(12): p. 8322-31.
141. Deevi RK, Koney-Dash M, Kissenpfennig A, Johnston JA, Schuh K, Walter U, Dib K (2010) Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates inside-out signaling of beta2 integrins in neutrophils. *J Immunol*. 184(12): p. 6575-84.
142. Dash-Koney M, Deevi RK, McFarlane C, Dib K (2011) Exchange protein directly activated by cAMP 1 (Epac1) is expressed in human neutrophils and mediates cAMP-dependent activation of the monomeric GTPase Rap1. *J Leukoc Biol*. 90(4): p. 741-9.
143. Bergmeier W, Goerge T, Wang HW, Crittenden JR, Baldwin AC, Cifuni SM, Housman DE, Graybiel AM, Wagner DD (2007) Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J Clin Invest*. 117(6): p. 1699-707.
144. Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fassler R, Ley K (2012) Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood*. 119(18): p. 4275-82.

145. Moser M, Bauer M, Schmid S, Ruppert R, Schmidt S, Sixt M, Wang HV, Sperandio M, Fassler R (2009) Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med.* 15(3): p. 300-5.
146. Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, de Boer M, Thung LY, Weening RS, Verhoeven AJ, Roos D (1997) Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest.* 100(7): p. 1725-33.
147. McDowall A, Inwald D, Leitinger B, Jones A, Liesner R, Klein N, Hogg N (2003) A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. *J Clin Invest.* 111(1): p. 51-60.
148. Alon R, Etzioni A (2003) LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol.* 24(10): p. 561-6.
149. Alon R, Aker M, Feigelson S, Sokolovsky-Eisenberg M, Staunton DE, Cinamon G, Grabovsky V, Shamri R, Etzioni A (2003) A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood.* 101(11): p. 4437-45.
150. Malinin NL, Zhang L, Choi J, Ciocea A, Razorenova O, Ma YQ, Podrez EA, Tosi M, Lennon DP, Caplan AI, Shurin SB, Plow EF, Byzova TV (2009) A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nat Med.* 15(3): p. 313-8.
151. Kuijpers TW, van de Vijver E, Weterman MA, de Boer M, Tool AT, van den Berg TK, Moser M, Jakobs ME, Seeger K, Sanal O, Unal S, Cetin M, Roos D, Verhoeven AJ, Baas F (2009) LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood.* 113(19): p. 4740-6.
152. Mócsai A, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T, Lowell CA (2003) G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood.* 101(10): p. 4155-63.
153. Sperandio M, Gleissner CA, Ley K (2009) Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev.* 230(1): p. 97-113.
154. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS (2007) Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 26(4): p. 477-89.

155. Nimrichter L, Burdick MM, Aoki K, Laroy W, Fierro MA, Hudson SA, Von Seggern CE, Cotter RJ, Bochner BS, Tiemeyer M, Konstantopoulos K, Schnaar RL (2008) E-selectin receptors on human leukocytes. *Blood*. 112(9): p. 3744-52.
156. Carlow DA, Gossens K, Naus S, Veerman KM, Seo W, Ziltener HJ (2009) PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunol Rev*. 230(1): p. 75-96.
157. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 118(26): p. 6743-51.
158. Lefort CT, Ley K (2012) Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*. 3: p. 157.
159. Zarbock A, Lowell CA, Ley K (2007) Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*. 26(6): p. 773-83.
160. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K (2008) PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med*. 205(10): p. 2339-47.
161. Block H, Herter JM, Rossaint J, Stadtmann A, Kliche S, Lowell CA, Zarbock A (2012) Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Exp Med*. 209(2): p. 407-21.
162. Mueller H, Stadtmann A, Van Aken H, Hirsch E, Wang D, Ley K, Zarbock A (2010) Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood*. 115(15): p. 3118-27.
163. Rabiet MJ, Huet E, Boulay F (2007) The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie*. 89(9): p. 1089-106.
164. Back M, Dahlen SE, Drazen JM, Evans JF, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T, Rovati GE (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIV: leukotriene receptor nomenclature, distribution, and pathophysiological functions. *Pharmacol Rev*. 63(3): p. 539-84.
165. Barletta KE, Ley K, Mehrad B (2012) Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32(4): p. 856-64.

166. Kim D, Haynes CL (2012) Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants. *Anal Chem.* 84(14): p. 6070-8.
167. Sadik CD, Kim ND, Luster AD (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32(10): p. 452-60.
168. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 464(7285): p. 104-7.
169. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I (2006) Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.* 72(11): p. 1538-46.
170. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ (2009) Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev.* 228(1): p. 273-87.
171. O'Shea JJ, Plenge R (2012) JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity.* 36(4): p. 542-50.
172. Mermel CH, McLemore ML, Liu F, Pereira S, Woloszynek J, Lowell CA, Link DC (2006) Src family kinases are important negative regulators of G-CSF-dependent granulopoiesis. *Blood.* 108(8): p. 2562-8.
173. Zhu QS, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ (2006) G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood.* 107(5): p. 1847-56.
174. Corey SJ, Burkhardt AL, Bolen JB, Geahlen RL, Tkatch LS, Tweardy DJ (1994) Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(11): p. 4683-7.
175. Zhu QS, Robinson LJ, Roginskaya V, Corey SJ (2004) G-CSF-induced tyrosine phosphorylation of Gab2 is Lyn kinase dependent and associated with enhanced Akt and differentiative, not proliferative, responses. *Blood.* 103(9): p. 3305-12.
176. Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2(9): p. 500-10.
177. Liu R, Itoh T, Arai KI, Watanabe S (1999) Two distinct signaling pathways downstream of Janus kinase 2 play redundant roles for antiapoptotic activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Biol Cell.* 10(11): p. 3959-70.

178. Pelletier M, Ratthe C, Girard D (2002) Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* 532(1-2): p. 164-70.
179. Sato N, Sakamaki K, Terada N, Arai K, Miyajima A (1993) Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *Embo j.* 12(11): p. 4181-9.
180. Dinarello CA (2011) A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 41(5): p. 1203-17.
181. Sadik CD, Luster AD (2012) Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol.* 91(2): p. 207-15.
182. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science.* 261(5120): p. 472-5.
183. O'Neill LA (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 226: p. 10-8.
184. MacEwan DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 14(6): p. 477-92.
185. Cabal-Hierro L, Lazo PS (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.* 24(6): p. 1297-305.
186. Nordenfelt P, Tapper H (2011) Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 90(2): p. 271-84.
187. Allen LA, Aderem A (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med.* 184(2): p. 627-37.
188. Segal AW, Dorling J, Coade S (1980) Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J Cell Biol.* 85(1): p. 42-59.
189. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* 366(Pt 3): p. 689-704.

190. Tapper H, Furuya W, Grinstein S (2002) Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J Immunol.* 168(10): p. 5287-96.
191. Zimmerli S, Majeed M, Gustavsson M, Stendahl O, Sanan DA, Ernst JD (1996) Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. *J Cell Biol.* 132(1-2): p. 49-61.
192. Jankowski A, Scott CC, Grinstein S (2002) Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J Biol Chem.* 277(8): p. 6059-66.
193. 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(5): p. 1025-42.
194. Kuijpers T, Lutter R (2012) Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci.* 69(1): p. 7-15.
195. Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 4(3): p. 181-9.
196. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M, Nathan C (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* 10(1): p. 29-38.
197. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28(8): p. 340-5.
198. Choi KY, Chow LN, Mookherjee N (2012) Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *J Innate Immun.* 4(4): p. 361-70.
199. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schroder JM, Liu YJ, Gilliet M (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 449(7162): p. 564-9.
200. Gardiner EE, Andrews RK (2012) Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev.* 26(6): p. 255-9.
201. Brinkmann V, Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 198(5): p. 773-83.
202. Kaplan MJ, Radic M (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 189(6): p. 2689-95.

203. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303(5663): p. 1532-5.
204. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 176(2): p. 231-41.
205. Papayannopoulos V, Zychlinsky A (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 30(11): p. 513-21.
206. Huang HW (2006) Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta*. 1758(9): p. 1292-302.
207. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisfleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 18(9): p. 1386-93.
208. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 13(4): p. 463-9.
209. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V, Jenne DE (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 15(6): p. 623-5.
210. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A (2010) Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(21): p. 9813-8.
211. Knight JS, Kaplan MJ (2012) Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 24(5): p. 441-50.
212. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(36): p. 15880-5.
213. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, Resink TJ (2010) Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 584(14): p. 3193-7.

214. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ (2009) Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* 30(11): p. 531-7.
215. Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE, Tacchini-Cottier F (2010) Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6(2): p. e1000755.
216. Alfaro C, Suarez N, Onate C, Perez-Gracia JL, Martinez-Forero I, Hervas-Stubbs S, Rodriguez I, Perez G, Bolanos E, Palazon A, Sanmamed MF, Morales-Kastresana A, Gonzalez A, Melero I (2011) Dendritic cells take up and present antigens from viable and apoptotic polymorphonuclear leukocytes. *PLoS One.* 6(12): p. e29300.
217. Boudaly S (2009) Activation of dendritic cells by polymorphonuclear neutrophils. *Front Biosci (Landmark Ed).* 14: p. 1589-95.
218. van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.* 201(8): p. 1281-92.
219. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M (2011) Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 3(73): p. 73ra19.
220. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, Lehuen A (2013) Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med.* 19(1): p. 65-73.
221. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY (2011) Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol.* 23(5): p. 317-26.
222. Iking-Konert C, Vogt S, Radsak M, Wagner C, Hansch GM, Andrassy K (2001) Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int.* 60(6): p. 2247-62.
223. Iking-Konert C, Ostendorf B, Sander O, Jost M, Wagner C, Joosten L, Schneider M, Hansch GM (2005) Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to

- dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis*. 64(10): p. 1436-42.
224. Ostanin DV, Kurmaeva E, Furr K, Bao R, Hoffman J, Berney S, Grisham MB (2012) Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J Immunol*. 188(3): p. 1491-502.
225. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermonprez P, Barnaba V, Jeannin P (2007) Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. 110(8): p. 2965-73.
226. Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML, Magistrelli G, Masternak K, Chevailler A, Delneste Y, Jeannin P (2011) CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*. 117(4): p. 1196-204.
227. Duffy D, Perrin H, Abadie V, Benhabiles N, Boissonnas A, Liard C, Descours B, Reboulleau D, Bonduelle O, Verrier B, Van Rooijen N, Combadiere C, Combadiere B (2012) Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity*. 37(5): p. 917-29.
228. Mayadas TN, Rosetti F, Hernandez T, Sethi S (2010) Neutrophils: game changers in glomerulonephritis? *Trends Mol Med*. 16(8): p. 368-78.
229. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P, Koenderman L (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 122(1): p. 327-36.
230. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, Magri G, Knowles DM, Tam W, Chiu A, Bussel JB, Serrano S, Lorente JA, Bellosillo B, Lloreta J, Juanpere N, Alameda F, Baro T, de Heredia CD, Toran N, Catala A, Torrebadell M, Fortuny C, Cusi V, Carreras C, Diaz GA, Blander JM, Farber CM, Silvestri G, Cunningham-Rundles C, Calvillo M, Dufour C, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A, Casanova JL, Ganal SC, Diefenbach A, Arostegui JI, Juan M, Yague J, Mahlaoui N, Donadieu J, Chen K, Cerutti A (2012) B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 13(2): p. 170-80.

231. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA (2008) Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett.* 116(1): p. 1-6.
232. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L (2009) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30(11): p. 538-46.
233. Doring Y, Drechsler M, Wantha S, Kemmerich K, Lievens D, Vijayan S, Gallo RL, Weber C, Soehnlein O (2012) Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 110(8): p. 1052-6.
234. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA (2010) Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol.* 185(4): p. 2044-50.
235. Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordonez-Rueda D, Barlogis V, Mahlaoui N, Fenis A, Narni-Mancinelli E, Beaupain B, Bellanne-Chantelot C, Bajenoff M, Malissen B, Malissen M, Vivier E, Ugolini S (2012) Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med.* 209(3): p. 565-80.
236. Sporri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A (2008) A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol.* 181(10): p. 7121-30.
237. Costantini C, Calzetti F, Perbellini O, Micheletti A, Scarponi C, Lonardi S, Pelletier M, Schakel K, Pizzolo G, Facchetti F, Vermi W, Albanesi C, Cassatella MA (2011) Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood.* 117(5): p. 1677-86.
238. DiStasi MR, Ley K (2009) Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol.* 30(11): p. 547-56.
239. Chin AC, Lee WY, Nusrat A, Vergnolle N, Parkos CA (2008) Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol.* 181(8): p. 5702-10.
240. Boueiz A, Hassoun PM (2009) Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* 77(1): p. 26-34.
241. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, Arfors KE, Flodgaard H, Lindbom L (2001) Heparin-binding protein

- (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med.* 7(10): p. 1123-7.
242. Di Gennaro A, Kenne E, Wan M, Soehnlein O, Lindbom L, Haeggstrom JZ (2009) Leukotriene B4-induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). *Faseb j.* 23(6): p. 1750-7.
243. Linder A, Akesson P, Inghammar M, Treutiger CJ, Linner A, Sundén-Cullberg J (2012) Elevated plasma levels of heparin-binding protein in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care.* 16(3): p. R90.
244. Sun S, Sursal T, Adibnia Y, Zhao C, Zheng Y, Li H, Otterbein LE, Hauser CJ, Itagaki K (2013) Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. *PLoS One.* 8(3): p. e59989.
245. Tímár CI, Lőrincz ÁM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Iványi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood.* 121(3): p. 510-8.
246. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(9): p. 3507-12.
247. van den Berg JM, Kuijpers TW (2011) Educational paper: Defects in number and function of neutrophilic granulocytes causing primary immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 170(11): p. 1369-76.
248. Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K (2009) Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haematol.* 144(4): p. 459-67.
249. Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, Xia J, Boxer LA, Dale D, Dinauer MC, Link DC (2007) Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital

- neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. *Blood*. 110(13): p. 4179-87.
250. Hayee B, Antonopoulos A, Murphy EJ, Rahman FZ, Sewell G, Smith BN, McCartney S, Furman M, Hall G, Bloom SL, Haslam SM, Morris HR, Boztug K, Klein C, Winchester B, Pick E, Linch DC, Gale RE, Smith AM, Dell A, Segal AW (2011) G6PC3 mutations are associated with a major defect of glycosylation: a novel mechanism for neutrophil dysfunction. *Glycobiology*. 21(7): p. 914-24.
251. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schaffer AA, Rathinam C, Boztug K, Schwitzer B, Rezaei N, Bohn G, Melin M, Carlsson G, Fadeel B, Dahl N, Palmblad J, Henter JI, Zeidler C, Grimbacher B, Welte K (2007) HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet*. 39(1): p. 86-92.
252. Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K (2007) Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: Results of a long-term survey. *Blood*. 109(1): p. 93-9.
253. Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA (2013) Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes. *Curr Opin Hematol*. 20(1): p. 16-25.
254. Netea MG, van de Veerdonk FL, van Deuren M, van der Meer JW (2011) Defects of pattern recognition: primary immunodeficiencies of the innate immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 11(4): p. 412-22.
255. Hoarau C, Gerard B, Lescanne E, Henry D, Francois S, Lacapere JJ, El Benna J, Dang PM, Grandchamp B, Lebranchu Y, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C (2007) TLR9 activation induces normal neutrophil responses in a child with IRAK-4 deficiency: involvement of the direct PI3K pathway. *J Immunol*. 179(7): p. 4754-65.
256. Singh A, Zarembek KA, Kuhns DB, Gallin JI (2009) Impaired priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase in patients with IRAK4 or NEMO deficiency. *J Immunol*. 182(10): p. 6410-7.
257. Filler SG (2012) Insights from human studies into the host defense against candidiasis. *Cytokine*. 58(1): p. 129-32.
258. Casanova JL, Abel L (2009) Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages. *J Exp Med*. 206(9): p. 1839-43.

259. Kaplan J, De Domenico I, Ward DM (2008) Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol.* 15(1): p. 22-9.
260. Khanna-Gupta A, Sun H, Zibello T, Lee HM, Dahl R, Boxer LA, Berliner N (2007) Growth factor independence-1 (Gfi-1) plays a role in mediating specific granule deficiency (SGD) in a patient lacking a gene-inactivating mutation in the C/EBPepsilon gene. *Blood.* 109(10): p. 4181-90.
261. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 445(2): p. 214-24.
262. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, Shimizu T, Dairon M, Bruhns P (2011) Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest.* 121(4): p. 1484-96.
263. Xu X, Zhang D, Zhang H, Wolters PJ, Killeen NP, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA, Caughey GH (2006) Neutrophil histamine contributes to inflammation in mycoplasma pneumonia. *J Exp Med.* 203(13): p. 2907-17.
264. Galkina E, Ley K (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol.* 27: p. 165-97.
265. Ionita MG, van den Borne P, Catanzariti LM, Moll FL, de Vries JP, Pasterkamp G, Vink A, de Kleijn DP (2010) High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(9): p. 1842-8.
266. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O (2010) Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation.* 122(18): p. 1837-45.
267. Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng CN, Bjorkstrom NK, Malmberg KJ, Lindbom L, Eriksson EE (2010) Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice. *Am J Pathol.* 177(1): p. 493-500.
268. van Leeuwen M, Gijbels MJ, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, de Winther MP, Tervaert JW (2008) Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(1): p. 84-9.
269. Packard RR, Lichtman AH, Libby P (2009) Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol.* 31(1): p. 5-22.

270. Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, Gudmundsson GH, Wang XB, Mandal K, Xu Q, Yan ZQ (2006) Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(7): p. 1551-7.
271. Lee TD, Gonzalez ML, Kumar P, Chary-Reddy S, Grammas P, Pereira HA (2002) CAP37, a novel inflammatory mediator: its expression in endothelial cells and localization to atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 160(3): p. 841-8.
272. Soehnlein O (2012) Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 110(6): p. 875-88.
273. Boisvert WA, Rose DM, Johnson KA, Fuentes ME, Lira SA, Curtiss LK, Terkeltaub RA (2006) Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol.* 168(4): p. 1385-95.
274. Zernecke A, Bot I, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Meiler S, Krohn R, Schober A, Sperandio M, Soehnlein O, Bornemann J, Tacke F, Biessen EA, Weber C (2008) Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 102(2): p. 209-17.
275. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 16(8): p. 887-96.
276. Lee DM, Weinblatt ME (2001) Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 358(9285): p. 903-911.
277. Klareskog L, Catrina AI, Paget S (2009) Rheumatoid arthritis. *The Lancet.* 373(9664): p. 659-672.
278. Mohr W, Westerhellweg H, Wessinghage D (1981) Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. An electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 40(4): p. 396-399.
279. Edwards SW, Hallett MB (1997) Seeing the wood for the trees: The forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology Today.* 18(7): p. 320-324.

280. Ohara M, Saniabadi AR, Kokuma S, Hirata I, Adachi M, Agishi T, Kasukawa R (1997) Granulocytapheresis in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Artificial Organs*. 21(9): p. 989-994.
281. Sanmartí R, Marsal S, Valverde J, Casado E, Lafuente R, Kashiwagi N, Rodriguez-Cros JR, Erra A, Reina D, Gratacós J (2005) Adsorptive granulocyte/monocyte apheresis for the treatment of refractory rheumatoid arthritis: An open pilot multicentre trial. *Rheumatology*. 44(9): p. 1140-1144.
282. Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils - Forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2(9): p. 500-510.
283. Korganow AS, Hong J, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D (1999) From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*. 10(4): p. 451-461.
284. Nandakumar KS, Holmdahl R (2007) Collagen antibody induced arthritis. *Methods in molecular medicine*. 136: p. 215-223.
285. Stuart JM, Dixon FJ (1983) Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 158(2): p. 378-392.
286. Holmdahl R, Jansson L, Larsson A, Jonsson R (1990) Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies. *Scandinavian Journal of Immunology*. 31(2): p. 147-157.
287. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *EMBO Journal*. 10(13): p. 4025-4031.
288. Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R (2003) Collagen Type II-Specific Monoclonal Antibody-Induced Arthritis in Mice: Description of the Disease and the Influence of Age, Sex, and Genes. *American Journal of Pathology*. 163(5): p. 1827-1837.
289. Kagari T, Doi H, Shimozato T (2002) The importance of IL-1 β and TNF- α , and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *Journal of Immunology*. 169(3): p. 1459-1466.

290. Mewar D, Wilson AG (2006) Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 60(10): p. 648-655.
291. Taylor PC (2001) Anti-tumor necrosis factor therapies. *Current Opinion in Rheumatology*. 13(3): p. 164-169.
292. McInnes IB, Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*. 7(6): p. 429-442.
293. Rahman A, Isenberg DA (2008) Systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine*. 358(9): p. 929-939.
294. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR (2007) Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 369(9561): p. 587-596.
295. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V (2011) Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 3(73): p. 73ra20.
296. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D (2002) Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc γ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *American Journal of Pathology*. 161(1): p. 301-311.
297. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Büning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D (2006) Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *Journal of Immunology*. 177(5): p. 3461-3468.
298. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D (2005) Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *Journal of Clinical Investigation*. 115(4): p. 870-878.
299. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D (2005) Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest*. 115(4): p. 870-8.
300. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C (2007) NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *Journal of Pathology*. 212(1): p. 56-65.

301. Rarok AA, Limburg PC, Kallenberg CGM (2003) Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *Journal of Leukocyte Biology*. 74(1): p. 3-15.
302. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC (1990) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(11): p. 4115-4119.
303. Brooks CJ, King WJ, Radford DJ, Adu D, McGrath M, Savage COS (1996) IL-1 β production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: Relevance to systemic vasculitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 106(2): p. 273-279.
304. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*. 15(6): p. 623-625.
305. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Charles Jennette J (2002) Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 110(7): p. 955-963.
306. Xiao H, Heeringa P, Liu Z, Huugen D, Hu P, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC (2005) The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *American Journal of Pathology*. 167(1): p. 39-45.
307. Hattar K, Oppermann S, Ankele C, Weissmann N, Schermuly RT, Bohle RM, Moritz R, Krögel B, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U, Grandel U (2010) c-ANCA-induced neutrophil-mediated lung injury: A model of acute Wegener's granulomatosis. *European Respiratory Journal*. 36(1): p. 187-195.
308. Lowell CA (2004) Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol*. 41(6-7): p. 631-43.
309. Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13: p. 513-609.
310. Okada M (2012) Regulation of the SRC family kinases by Csk. *Int J Biol Sci*. 8(10): p. 1385-97.

311. Chan VW, Mecklenbrauker I, Su I, Texido G, Leitges M, Carsetti R, Lowell CA, Rajewsky K, Miyake K, Tarakhovsky A (1998) The molecular mechanism of B cell activation by toll-like receptor protein RP-105. *J Exp Med.* 188(1): p. 93-101.
312. Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL, Lowell CA (2000) Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* 191(4): p. 669-82.
313. Gardai S, Whitlock BB, Helgason C, Ambruso D, Fadok V, Bratton D, Henson PM (2002) Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem.* 277(7): p. 5236-46.
314. Lowell CA, Berton G (1998) Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(13): p. 7580-4.
315. Nygaard HB, van Dyck CH, Strittmatter SM (2014) Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 6(1): p. 8.
316. Geletu M, Trotman-Grant A, Raptis L (2012) Mind the gap; regulation of gap junctional, intercellular communication by the SRC oncogene product and its effectors. *Anticancer Res.* 32(10): p. 4245-50.
317. Buitrago C, Pardo VG, Boland R (2013) Role of VDR in 1α,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 136: p. 125-30.
318. Tegtmeyer N, Backert S (2011) Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the Helicobacter pylori CagA protein. *Eur J Cell Biol.* 90(11): p. 880-90.
319. Hebert-Chatelain E (2013) Src kinases are important regulators of mitochondrial functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(1): p. 90-8.
320. DeFranco AL, Chan VW, Lowell CA (1998) Positive and negative roles of the tyrosine kinase Lyn in B cell function. *Semin Immunol.* 10(4): p. 299-307.
321. Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, Grail D, Hodgson G, Maglitta R, Stacker SA, Dunn AR (1995) Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell.* 83(2): p. 301-11.
322. Vines CM, Potter JW, Xu Y, Geahlen RL, Costello PS, Tybulewicz VL, Lowell CA, Chang PW, Gresham HD, Willman CL (2001) Inhibition of beta 2 integrin

- receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity*. 15(4): p. 507-19.
323. Gresham HD, Dale BM, Potter JW, Chang PW, Vines CM, Lowell CA, Lagenaur CF, Willman CL (2000) Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *J Exp Med*. 191(3): p. 515-28.
324. Harder KW, Parsons LM, Armes J, Evans N, Kountouri N, Clark R, Quilici C, Grail D, Hodgson GS, Dunn AR, Hibbs ML (2001) Gain- and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity*. 15(4): p. 603-15.
325. Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Matozaki T (2011) Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci*. 34(12): p. 629-37.
326. Liu DZ, Sharp FR (2011) The dual role of SRC kinases in intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 111: p. 77-81.
327. Liu ST, Pham H, Pandol SJ, Ptasznik A (2013) Src as the link between inflammation and cancer. *Front Physiol*. 4: p. 416.
328. Nagathihalli NS, Merchant NB (2012) Src-mediated regulation of E-cadherin and EMT in pancreatic cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 17: p. 2059-69.
329. Boateng LR, Huttenlocher A (2012) Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes. *Eur J Cell Biol*. 91(11-12): p. 878-88.
330. Lee IT, Yang CM (2013) Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. *Mediators Inflamm*. 2013: p. 791231.
331. Byeon SE, Yi YS, Oh J, Yoo BC, Hong S, Cho JY (2012) The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm*. 2012: p. 512926.
332. Zarbock A, Ley K (2011) Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch Biochem Biophys*. 510(2): p. 112-9.
333. Ravetch JV, Lanier LL (2000) Immune inhibitory receptors. *Science*. 290(5489): p. 84-9.
334. Cole PA, Shen K, Qiao Y, Wang D (2003) Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tale. *Curr Opin Chem Biol*. 7(5): p. 580-5.
335. Abram CL, Lowell CA (2007) Convergence of immunoreceptor and integrin signaling. *Immunol Rev*. 218: p. 29-44.

336. Barrow AD, Trowsdale J (2006) You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur J Immunol.* 36(7): p. 1646-53.
337. Totani L, Piccoli A, Manarini S, Federico L, Pecce R, Martelli N, Cerletti C, Piccardoni P, Lowell CA, Smyth SS, Berton G, Evangelista V (2006) Src-family kinases mediate an outside-in signal necessary for beta2 integrins to achieve full activation and sustain firm adhesion of polymorphonuclear leucocytes tethered on E-selectin. *Biochem J.* 396(1): p. 89-98.
338. Giagulli C, Ottoboni L, Caveggion E, Rossi B, Lowell C, Constantin G, Laudanna C, Berton G (2006) The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating β_2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for β_2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *J Immunol.* 177(1): p. 604-11.
339. Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A (2009) The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunol Rev.* 228(1): p. 41-57.
340. Palacios EH, Weiss A (2004) Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene.* 23(48): p. 7990-8000.
341. van Oers NS, Lowin-Kropf B, Finlay D, Connolly K, Weiss A (1996) $\alpha\beta$ T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity.* 5(5): p. 429-36.
342. Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M, Seddon B (2003) The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev.* 191: p. 107-18.
343. Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA (1997) Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity.* 7(1): p. 69-81.
344. Nishizumi H, Taniuchi I, Yamanashi Y, Kitamura D, Ilic D, Mori S, Watanabe T, Yamamoto T (1995) Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity.* 3(5): p. 549-60.
345. Saijo K, Schmedt C, Su IH, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, Adachi T, Patke A, Santana A, Tarakhovsky A (2003) Essential role of Src-family protein tyrosine

- kinases in NF- κ B activation during B cell development. *Nat Immunol.* 4(3): p. 274-9.
346. Saijo K, Schmedt C, Su IH, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, Adachi T, Patke A, Santana A, Tarakhovsky A (2003) Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol.* 4(3): p. 274-9.
347. Barbu EA, Zhang J, Siraganian RP (2010) The limited contribution of Fyn and Gab2 to the high affinity IgE receptor signaling in mast cells. *J Biol Chem.* 285(21): p. 15761-8.
348. Falanga YT, Chaimowitz NS, Charles N, Finkelman FD, Pullen NA, Barbour S, Dholaria K, Faber T, Kolawole M, Huang B, Odom S, Rivera J, Carlyon J, Conrad DH, Spiegel S, Oskeritzian CA, Ryan JJ (2012) Lyn but not Fyn kinase controls IgG-mediated systemic anaphylaxis. *J Immunol.* 188(9): p. 4360-8.
349. Gomez G, Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Baez G, Cid ME, Ryan JJ, Rivera J (2005) Impaired FcepsilonRI-dependent gene expression and defective eicosanoid and cytokine production as a consequence of Fyn deficiency in mast cells. *J Immunol.* 175(11): p. 7602-10.
350. Hernandez-Hansen V, Smith AJ, Surviladze Z, Chigaev A, Mazel T, Kalesnikoff J, Lowell CA, Krystal G, Sklar LA, Wilson BS, Oliver JM (2004) Dysregulated FcεRI signaling and altered Fyn and SHIP activities in Lyn-deficient mast cells. *J Immunol.* 173(1): p. 100-12.
351. Kawakami Y, Kitaura J, Satterthwaite AB, Kato RM, Asai K, Hartman SE, Maeda-Yamamoto M, Lowell CA, Rawlings DJ, Witte ON, Kawakami T (2000) Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. *J Immunol.* 165(3): p. 1210-9.
352. Nishizumi H, Yamamoto T (1997) Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells. *J Immunol.* 158(5): p. 2350-5.
353. Odom S, Gomez G, Kovarova M, Furumoto Y, Ryan JJ, Wright HV, Gonzalez-Espinosa C, Hibbs ML, Harder KW, Rivera J (2004) Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med.* 199(11): p. 1491-502.

354. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J (2002) Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol.* 3(8): p. 741-8.
355. Futosi K, Németh T, Pick R, Vántus T, Walzog B, Mócsai A (2012) Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood.* 119(21): p. 4981-91.
356. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J Exp Med.* 186(7): p. 1027-39.
357. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol.* 18(7): p. 4209-20.
358. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T (1995) Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature.* 378(6554): p. 303-6.
359. Costello PS, Turner M, Walters AE, Cunningham CN, Bauer PH, Downward J, Tybulewicz VL (1996) Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene.* 13(12): p. 2595-605.
360. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature.* 378(6554): p. 298-302.
361. Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel WW, Zurn C, Reth M (2002) Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell.* 10(5): p. 1057-69.
362. Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today.* 21(3): p. 148-54.

363. Lowell CA, Soriano P, Varmus HE (1994) Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. *Genes Dev.* 8(4): p. 387-98.
364. Xiao W, Hong H, Kawakami Y, Lowell CA, Kawakami T (2008) Regulation of myeloproliferation and M2 macrophage programming in mice by Lyn/Hck, SHIP, and Stat5. *J Clin Invest.* 118(3): p. 924-34.
365. Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL (1998) Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med.* 188(1): p. 119-31.
366. Berlin-Rufenach C, Otto F, Mathies M, Westermann J, Owen MJ, Hamann A, Hogg N (1999) Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med.* 189(9): p. 1467-78.
367. Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, von Andrian UH, Arnaout MA, Mayadas TN (1996) A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity.* 5(6): p. 653-66.
368. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D (1996) Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell.* 87(5): p. 811-22.
369. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV (2005) Fc γ RIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity.* 23(1): p. 41-51.
370. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A (2009) Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 206(3): p. 577-93.
371. Csorba K, Sesarman A, Oswald E, Feldrihan V, Fritsch A, Hashimoto T, Sitaru C (2010) Cross-reactivity of autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita with murine collagen VII. *Cell Mol Life Sci.* 67(8): p. 1343-51.
372. Helyes Z, Szabo A, Nemeth J, Jakab B, Pinter E, Banvolgyi A, Kereskai L, Keri G, Szolcsanyi J (2004) Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* 50(5): p. 1677-85.

373. Jakus Z, Németh T, Verbeek JS, Mócsai A (2008) Critical but overlapping role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol.* 180(1): p. 618-29.
374. Dzhagalov I, St John A, He YW (2007) The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood.* 109(4): p. 1620-6.
375. Jacobs JP, Ortiz-Lopez A, Campbell JJ, Gerard CJ, Mathis D, Benoist C (2010) Deficiency of CXCR2, but not other chemokine receptors, attenuates autoantibody-mediated arthritis in a murine model. *Arthritis and rheumatism.* 62(7): p. 1921-32.
376. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 29(6): p. 313-26.
377. Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD (2006) A unique requirement for the leukotriene B₄ receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J Exp Med.* 203(4): p. 829-35.
378. Corr M, Crain B (2002) The role of Fc γ R signaling in the K/BxN serum transfer model of arthritis. *J Immunol.* 169(11): p. 6604-9.
379. Chen H, Mócsai A, Zhang H, Ding RX, Morisaki JH, White M, Rothfork JM, Heiser P, Colucci-Guyon E, Lowell CA, Gresham HD, Allen PM, Brown EJ (2003) Role for plasmin in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading. *Immunity.* 19(1): p. 95-104.
380. Zhou MJ, Brown EJ (1994) CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol.* 125(6): p. 1407-16.
381. Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, Lee DM (2006) Neutrophil-derived leukotriene B₄ is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med.* 203(4): p. 837-42.
382. Vicentini L, Mazzi P, Cavegion E, Continolo S, Fumagalli L, Lapinet-Vera JA, Lowell CA, Berton G (2002) Fc γ R deficiency results in defective eosinophil recruitment to the lung during allergic airway inflammation. *J Immunol.* 168(12): p. 6446-54.
383. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K (2008) PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fc γ R and ITAM adapters DAP12 and Fc γ R to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med.* 205(10): p. 2339-47.

384. Fumagalli L, Zhang H, Baruzzi A, Lowell CA, Berton G (2007) The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol.* 178(6): p. 3874-85.
385. Sarantos MR, Zhang H, Schaff UY, Dixit N, Hayenga HN, Lowell CA, Simon SI (2008) Transmigration of neutrophils across inflamed endothelium is signaled through LFA-1 and Src family kinase. *J Immunol.* 181(12): p. 8660-9.
386. Zhang H, Meng F, Chu CL, Takai T, Lowell CA (2005) The Src family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B. *Immunity.* 22(2): p. 235-46.
387. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A (2011) Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature.* 480(7375): p. 109-12.
388. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature.* 453(7191): p. 51-5.
389. Chen Z, Oeser K, Baum W, Voehringer D, Schett G, Bozec A (2014) Induction of TH2 cells and eosinophil by infection with *nippostrongylus brasiliensis* protects against rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis.* 73: p. A72.
390. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB (2002) Mast cells: A cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 297(5587): p. 1689-92.
391. Zhou JS, Xing W, Friend DS, Austen KF, Katz HR (2007) Mast cell deficiency in Kit^{W^{sh}} mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J Exp Med.* 204(12): p. 2797-802.
392. Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, Radermacher P, Moller P, Benoist C, Mathis D, Fehling HJ, Rodewald HR (2011) Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity.* 35(5): p. 832-44.
393. Rosetti F, Tsuboi N, Chen K, Nishi H, Hernandez T, Sethi S, Croce K, Stavrakis G, Alcocer-Varela J, Gomez-Martin D, van Rooijen N, Kyttaris VC, Lichtman AH, Tsokos GC, Mayadas TN (2012) Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J Immunol.* 189(7): p. 3714-23.

12. Saját közlemények

12.1. A dolgozatban felhasznált saját közlemények

- I. **Kovács M**, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Zs, Lowell CA, Mócsai A (2014) The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med.* 211(10): p.1993-2011. **IF: 13,912 (2013)**
- II. Németh T, Futosi K, Hably Cs, Brouns MR, Jakob SM, **Kovács M**, Kertész Zs, Walzog B, Settleman J, Mócsai A (2010) Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: Generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol.* 185(5): p. 3064-75. **IF: 5,745**
- III. Gambardella L, Anderson KE, Jakus Z, **Kovács M**, Voigt S, Hawkins PT, Stephens L, Mócsai A, Vermeren S (2013) Phosphoinositide 3-OH kinase regulates integrin-dependent processes in neutrophils by signaling through its effector ARAP3. *J Immunol.* 190(1): p. 381-91. **IF: 5,362**

12.2. A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó saját közlemények

- IV. Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, **Kovács M**, Németh T, Szigeti K, Horváth I, Máthé D, Kovács N, Hashimoto H, Reglődi D, Szolcsányi J, Pintér E, Mócsai A, Helyes Zs (2014) Differential regulatory role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide in the serum-transfer-induced arthritis model. *Arthritis Rheumatol.* 66(10): p. 2739-2750. **IF: 7,871 (2013)**

13. Köszönetnyilvánítás

Ehelyütt szeretném kifejezni hálámat Dr. Mócsai Attilának, aki élettan gyakorlatvezetőmként, majd TDK- és végül PhD témavezetőmként végigkísérte életem elmúlt 12 évét. Kérlelhetetlen tudományos következetessége alapjaiban határozta meg szakmai fejlődésemet és szemléletemet.

Köszönöm Dr. Hunyady László professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Élettani Intézete igazgatójának és Dr. Ligeti Erzsébet professzor asszonynak a Celluláris és molekuláris élettan doktori program vezetőjének, hogy lehetővé tették, hogy doktori munkámat az intézetben végezzem.

Köszönettel tartozom Dr. Jakus Zoltánnak, akinek a megfigyelései jelentették a kiindulópontot az itt bemutatott doktori munkámhoz, tanácsai pedig nagyban hozzájárultak annak sikerességéhez. Köszönöm Dr. Németh Tamásnak a barátságát, a mindennapi munka során az egymás kiségitésének, az együtt gondolkodásnak az élményét és nem utolsó sorban a munkámhoz való jelentős hozzájárulását. Nélkülözhetetlen volt Simon Edina segítsége is, aki nélkül a mindennapi munka, és különösen az arthritises mérések illetve az egérkolóniák fenntartása elképzelhetetlen lett volna. Köszönöm Futosi Krisztina kolléganőm sok segítségét. Jelenlegi és egykori asszisztenseink, Benyó Fruzsina, Csepregi Janka, Duleba Mónika, Erdélyi András, Kása Orsolya, Koncz Anna és Tóth Anna háttér-munkája tette lehetővé, hogy a kísérletek lényegi részére koncentrálhassak. Köszönöm TDK hallgatóim, dr. Pihokker Norbert, dr. Szabó Lóránt, Székely László, Szikszai Donát és Szöllősi Dávid munkáját és közreműködését. Nem utolsó sorban köszönöm valamennyi társszerzőnknek és különösen Dr. Clifford Lowellnek a munkámhoz nyújtott rengeteg segítséget, értékes kritikát, ötleteket.

Köszönöm továbbá a labor és az intézet valamennyi munkatársának az inspiráló környezetet, melyben nap mint nap dolgozni felejthetetlen élményt jelentett.

Végezetül szavakban ki sem fejezhető hálával tartozom családomnak, feleségemnek, szüleimnek és kislányomnak, akik szerető támogatása és végtelen türelme lehetővé tette mindezt.

13.1. Munkamegosztás

A dolgozathoz felhasznált közlemények – természetesen – számos kutató közös munkájának eredményei, ezért az alábbiakban röviden ismertetem a szerzők közötti munkamegosztást.

Az Src-kinázok szerepe az arthritis kialakulásában (Kovács et al., J Exp Med, 2014)

A Hck, Fgr és Lyn génhiányos állatokat Dr. Clifford Lowellnek köszönhetjük. Az Src-kinázok arthritisben betöltött szerepével kapcsolatban az első kísérletet Dr. Jakus Zoltán kollégám végezte, majd a projekt PhD munkám kezdetekor hozzám került. A további *in vivo* arthritises méréseket Simon Edinával közösen végeztük. A macrophagokkal kapcsolatos *in vitro* kísérleteket Dr. Németh Tamás és Futosi Krisztina, a protein array vizsgálatokat Dr. Németh Tamás végezte. Dr. Jakus Zoltánnak köszönhetőek az immunprecipitációs eredmények. Az epidermolysis bullosa acquisita modellel kapcsolatos első *in vivo* megfigyelést Dr. Cassian Sitaruval közösen végeztem, a továbbiakat az ő útmutatásai alapján Dr. Németh Tamás. A gyulladássos infiltráció mérése ebben a modellben is az én munkám. Az *in vivo* MPO aktiváció kimutatását Dr. Botz Bálint és Dr. Helyes Zsuzsanna végezte, illetve ők voltak segítségünkre a szövettani metszetek elkészítésében is. Valamennyi egyéb kísérletet én végeztem. A dolgozatban csak azokat az eredményeket tüntettem fel, melyek döntő részben (teljesen) a saját kísérleteimből származnak, a többi eredményt illetően, melyek a projekt összessége szempontjából fontosak, hivatkoztam a közleményünkre.

A p190RhoGAP szerepének vizsgálata (Németh et al. J Immunol, 2010)

A p190RhoGAP szerepével TDK hallgatóként én kezdtem el foglalkozni, majd a projekt Dr. Németh Tamás kollégámhoz került, a további megfigyeléseket már ő végezte. A részleteket l. Dr. Németh Tamás Jelátviteli folyamatok vizsgálata neutrofil granulocitákban és az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában c. doktori értekezésében (Budapest, 2012).

Az ARAP3 szerepének vizsgálata (Gambardella et al. J Immunol, 2013)

Ebben a projectben Dr. Jakus Zoltán és Simon Edina kollégáimmal az *in vivo* arthritiszel kapcsolatos kísérleteket végeztük.

Jelen doktori értekezésem Eredmények fejezetében feltüntetett ábrák saját kísérletekből származnak, legjobb tudomásom szerint más doktori értekezésben nem szerepelnek.