Tirozin-kináz jelpályák szerepének vizsgálata neutrofil granulocitákban és autoimmun betegségmodellekben

Doktori értekezés

Futosi Krisztina

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, az MTA doktora
Dr. Vántus Tibor, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Bácsi Attila egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Tóthfalusi László egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Klebovich Imre egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Kacskovics Imre egyetemi docens, az MTA doktora

Budapest
2014

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK 2

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

3. BEVEZETÉS 11

3.1 A tirozin-kinázok 12
3.1.1 Tirozin-kináz gátlók 15

3.2 A neutrofil granulociták jellemzése 21
3.2.1 A neutrofil granulociták homeosztázisa 21
3.2.2 A neutrofil granulociták működése 22

3.3 A neutrofil granulociták jelátviteli mechanizmusai 28
3.3.1 Fc-receptorok jelátvitele neutrofilekben 28
3.3.2 β_2-integrinek és szelektinek jelátvitele neutrofilekben 30
3.3.3 G-fehérjéhez kapcsolt jelátvitel neutrofil granulocitákban 34
3.3.4 Citokin-receptorok jelátvitele neutrofil granulocitákban 36
3.3.5 Mintázatfelismerő receptorok jelátvitele neutrofil granulocitákban 38

3.4 A reumatoid artritisz 41

3.5 Tirozin-kinázok és neutrofilek szerepe a reumatoid artritisz patomechanizmusában 42
3.5.1 A tirozin-kinázok és a reumatoid artritisz 42
3.5.2 A neutrofilek és a reumatoid artritisz 43

4. CÉLKITŰZÉSEK 45

5. MÓDSZEREK 46

5.1 A neutrofil granulociták izolálása 46
5.1.1 Humán neutrofil granulociták preparálása 46
5.1.2 Egér neutrofil granulociták preparálása 46

5.2 A kináz-gátló vegyülettár felépítése 48

5.3 A neutrofil granulociták gátlószerrel történő előkezelése 49

5.4 A viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatok kivitelezésénél használt Z-faktor analízis 50

5.5 Neutrofil granulociták aktivációja *50*

5.6 A neutrofil granulociták sejtválaszainak mérése és biokémiai vizsgálatai *52*

5.6.1 A neutrofilek szuperoxid-termelésének mérése 52

5.6.2 A neutrofilek szétterülésének és letapadásának vizsgálati módszerei 53

5.6.3 A neutrofilek degranulációs folyamatainak vizsgálatai 53

5.6.4 Az intracelluláris jelátviteli folyamatok vizsgálatai 54

5.6.5 A neutrofilek migrációjának vizsgálata 55

5.6.6 A baktériumölési-teszt 55

5.7 Adhéziós vizsgálatok humán és egér neutrofil granulocitákon teljes szérum jelenlétében *56*

5.8 A kísérleteim során alkalmazott in vivo gyulladásos állatmodellek *57*

5.8.1 A KBxN szérum transzfer artritisz 57

5.8.2 Reverz passzív Arthus-reakció 58

5.9 A bemutatott eredmények prezentációja, statisztikai analízis *58*

6. EREDMÉNYEK 60

6.1 Egy kináz-gátló vegyülettár viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálata humán neutrofil granulocitákon *60*

6.2 A dasatinib hatásának részletes vizsgálata érett humán neutrofil granulocitákon in vitro *67*

6.2.1 A dasatinib hatása a humán neutrofil granulociták szuperoxid-termelésére adhézió-függő aktiváció során 67

6.2.2 A dasatinib hatása a neutrofil granulociták további adhézió-függő sejtválaszaira 70

6.2.3 A dasatinib hatásának vizsgálata a neutrofil granulociták immunkomplex által kiváltott sejtválaszaira 74

6.2.4 A dasatinib hatásának vizsgálata a neutrofil granulociták G-fehérje kapcsolt jelátviteli folyamataira 77

6.2.5 A dasatinib hatása a neutrofil granulociták migrációjára 80

6.2.6 A dasatinib hatása a mintázatfelismerő receptorokon keresztül létrejövő sejtválaszokra 82

6.2.7 A dasatinib hatása a neutrofil granulociták baktériumölési képességére . 85

6.2.8 A dasatinib hatása a fehérvérsejtek letapadására humán szérum jelenlétében 86

6.2.9 Az orálisan adott dasatinib hatása az egér fehérvérsejtek *ex vivo* adhéziójára 87

6.3 A dasatinib hatásának vizsgálata in vivo gyulladásos állatmodellekben *89*

6.3.1 A dasatinib hatásának vizsgálata autoimmun ízületi gyulladásmodellben89

6.3.2 A dasatinib hatásának vizsgálata reverz passzív Arthus-reakcióban..... 93

6.4 Az Src-típusú tirozin kinázok szerepének vizsgálata reverz passzív Arthus-reakcióban 96

6.5 A p190RhoGAP szerepe a neutrofil granulociták β_2-integrin-független zselatináz degranulációjában 98

7. MEGBESZÉLÉS 101

8. KÖVETKEZTETÉSEK 110

9. ÖSSZEFOGLALÁS 111

10. SUMMARY 112

11. IRODALOMJEGYZÉK 113

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 139

13. A TÁRSSZERZŐK KÖZÖTTI MUNKAMEGOSZTÁS 141

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 142

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Abl	Abelson tirozin-kináz
ADAP	Adhesion and degranulation-promoting adapter protein (Adhézió és degranuláció-kiváltó adapter fehérje)
ALL	Acute lymphoid leukemia (Akut limfoid leukémia)
APRIL	A proliferation-inducing ligand
ATP	Adenozin trifoszfát
BAFF	B cell activating factor (B-sejt aktiváló faktor)
Bcl10	B lymphoma/leukemia 10 protein (B limfóma/leukémia 10 fehérje)
BCR	B cell receptor (B-sejt receptor)
Bcr	Breakpoint cluster region protein
BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein
BSA	Bovine serum albumin (Marha szérum albumin)
Btk	Bruton's tyrosine kinase (Bruton-féle tirozin-kináz)
C5a	Complement component 5a (Komplement komponens 5a)
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CARD9	Caspase activation and recruitment domain containing protein 9 (Kaszpáz-aktiváló és –toborzó domén fehérje 9)
CB	Citokalazin B
CD	Cluster of differentation (Differenciációs marker)
CGD	Chronic granulomatous disease (Krónikus granulomatózis)
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
CLEC2	C-típusú lektin receptor 2
CML	Chronic myelogenous leukemia (Krónikus mieloid leukémia)
DAG	Diacil-glicerin
DAMP	Damage-associated molecular pattern (Veszélyhez társult molekuláris mintázat)
DAP-12	DNAX-activating protein of 12 kDa
DFP	Diizopropil-fluorofoszfát
DISC	Death inducing signaling complex

DMARD	Disease-modifying antirheumatic drugs (Betegségmódosító antireumatikus kezelés)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Deoxi-ribonukleinsav
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermális növekedési faktor receptor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim-kötött immunszorbens vizsgálat)
EMA	European Medicines Agency (Európai Gyógyszerügynökség)
Eph-receptor	Ephrin-receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (Extracelluláris szignál által szabályozott kináz)
FADD	Fas-associated death domain protein
Fas	TNF receptor superfamily member 6
Fbg	Fibrinogén
FCS	Fetal calf serum (Magzati borjú szérum)
FcR	Fc-receptor
FDA	Food and Drug Administration (Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Hatósága)
Fgr	Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene homolog
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanin
Foxo3	Forkhead boksz O3
GAP	GTP-ase activating protein (GTP-áz aktiváló fehérje)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (Granulocita kolónia-stimuláló faktor)
Gfi1	Growth factor independent 1 transcription repressor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulocita-monocita kolónia-stimuláló faktor)
GPCR	G protein-coupled receptor (G-fehérje-kapcsolt receptor)
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase (Glükóz-6-foszfát izomeráz)
Grlf1	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 (p190RhoGAP)
GTP	Guanozin-trifoszfát

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Hank-féle normalizált sóoldat)
Hck	Hemopoietic cellular kinase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (4-(2-hidroxiletil)-piperazin-1-etánszulfonsav)
HIV1	Human immundeficiency virus 1 (Humán immundeficiencia vírus 1)
HSA	Humán szérum albumin
IC	Immune complex (Immunkomplex)
IC_{50}	Inhibitory concentration 50 (Félgátló-koncentráció)
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule 1 (Intercelluláris sejtadhéziós molekula 1)
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IκBα	NF-κB inhibitor α
IKK	IκB kináz
IL	Interleukin
IP3	Inozitol-1,4,5-triszfoszfát
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase (Interleukin-1 receptor-asszociált kináz)
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (Immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum)
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (Immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum)
JAK	Janus-kináz
JNK	c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminális kináz)
kDa	kilodalton
LAD	Leukocyte adhesion deficiency (Leukocita adhéziós deficiencia)
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Limfocita-specifikus tirozin-kináz)
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 (Limfocita funkcióhoz asszociált antigén 1)
LFR	Laktoferrin

LPS	Lipopoliszacharid
LTB_4	Leukotrién B4
LTβR	Limfotoxin-β-receptor
Lyn	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
mAbp1	Mammalian actin-binding protein 1 (Emlős aktin-kötő fehérje 1)
Mac-1	Macrophage-1 antigen (Makrofág-1 antigén, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$)
Malt1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (Nyálkahártya-asszociált nyirokszöveti limfóma transzlokációs fehérje 1)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogén-aktivált protein-kináz)
Mcl	Macrophage C-type lectin (Makrofág C-típusú lektin)
MDL-1	Myeloid DAP12-associated lectin-1 (Mieloid DAP12-kapcsolt lektin-1)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)
NET	Neutrophil extracellular traps (Neutrofilből származó extracelluláris csapda)
NFAT	Nuclear factor of activated T cells protein
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enchancer of activated B cell
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Neutrofil zselatináz-kapcsolt lipokalin)
NK-sejt	Natural killer cell (Természetes ölősejt)
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing 3
NOD-like	Nucleotide-binding oligomerization domain containing-like
NOD egér	Non-obese diabetic mouse (I. típusú cukorbeteg egér)
NOD fehérje	Nucleotide-binding oligomerization domain protein (Nukleáris oligomerizációs doménnal rendelkező fehérje)
Pam_3CSK_4	Szintetikus triacilált lipoprotein (TLR2 agonista)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Kórokozó-asszociált molekuláris mintázat)

PBS	Phosphate buffered saline (Foszfáttal pufferelt sóoldat)
PDGF	Platelet-derived growth factor (Vérlemezke-eredetű növekedési faktor)
PH-domén	Plekstrin-homológia domén
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase (Foszfatidil-inozitol 3 kináz)
PKC	Protein-kináz C
PLCγ2	Phospholipase C γ2 (Foszfolipáz C γ2)
PMA	Phorbol 12-miristate 13-acetate (Forbol-mirisztil-acetát)
PMN	Polymorphonuclear leukocyte (Polimorfonukleáris sejt, neutrofil granulocita)
PMSF	Phenyl-methane-sulfonyl fluoride (Fenil-metil-szulfonilfluorid)
PNPP	Para-nitrophenyl-phosphate (p-nitrofenil-foszfát)
PRR	Pattern-recognition receptor (Mintázatfelismerő receptor)
PSGL-1	P-szelektin glikoprotein ligand 1
PY	Phosphotyrosine (Foszfotirozin)
RA	Reumatoid artritisz
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B
RIG	Retinoic acid-inducible gene (Retinsav által indukálható gén)
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNS	Ribonukleinsav
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Nátrium-dodecil-szulfát)
SEM	Standard error of the mean
SH	Src homology domain (Src-homológia domén)
SLP-76	SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa (SH2-domént tartalmazó, 76 kilodalton méretű leukocita adapter fehérje)
Src	Eukaryotic Sarcoma tyrosine kinase (Eukarióta Szarkóma tirozin-kináz)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Syk	Spleen tyrosine kinase (Lép tirozin kináz)

TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TGFβ által aktivált kináz 1)
TCR	T cell receptor (T-sejt receptor)
TIR	Toll-IL-1 domén
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor (Tumor nekrózis faktor)
TNFR	Tumor necrosis factor receptor (Tumor nekrózis faktor receptor)
TRADD	TNF receptor 1-associated death domain protein (TNF receptor 1-es típusához asszociált haláldomén fehérje)
TRAF	TNF receptor-associated faktor (TNF receptorhoz asszociált faktor)
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TNF-hez kapcsolt apoptózist indukáló ligand)
upLPS	ultrapurified lipopolysaccharide (Tisztított lipopoliszacharid)
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (Vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1)
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor (Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor)
VLA-4	Very late antigen-4 (Késői antigén 4)
VT	Vad típus
c-Yes	Cellular homolog of the Yamaguchi sarcoma viral oncogene
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase of 70 kilodalton (Zéta-lánc asszociált 70 kilodalton méretű protein-kináz)

3. BEVEZETÉS

A szubsztrátjukat tirozin aminosavon foszforilálni képes tirozin-kinázok számos sejtműködést szabályoznak a sejtek proliferációjától az aktivációig. Ezen kinázok működése szigorúan szabályozott folyamat, melynek zavara betegségek kialakulását eredményezheti. Ezen kórképek kontrolljában a különböző tirozin-kináz gátló molekulák alkalmazása egyre komolyabb teret hódít.

A különböző gyulladásos folyamatok kialakulásában és a következményes szövetkárosodás létrejöttében számottevő szerepet játszanak a vizsgálataink fókuszában álló mieloid eredetű fagocitasejtek, a neutrofil granulociták. A neutrofilek effektor funkcióinak megjelenéséhez vezető jelátviteli utak lebonyolításában, számos farmakológiai és genetikai megközelítéssel nyert irodalmi adat alapján központi szerepet játszó fehérjék a tirozin-kinázok.

A veleszületett és adaptív immunrendszer szoros kapcsoltságban, egymásra épülten, kétélű kardként egyrészt biztosítja a szervezetet károsító hatások kivédését a gyulladásos folyamatok során, másrészt azonban a finoman hangolt működések szigorú szabályozottság alóli kóros kisiklásával a szervezet saját szöveteit pusztítva, azok jelentős funkcióvesztését eredményezhetik az autoimmun gyulladások során. Az idült gyulladásos betegségek a krónikus betegségek egyik legnagyobb családját képviselve széles társadalmi rétegeket érintenek, ezáltal hatalmas terhet rónak a társadalom és az egészségügyi ellátó rendszerek egészére világszerte. Ezen megbetegedések terápiájának megoldatlansága hatalmas igényt támaszt új támadáspontú és hatásmechanizmusú gyógyszerek fejlesztésére. A betegségek kialakulásában és pathomechanizmusában jelentős szerepet játszó sejtek jelátviteli folyamatainak jobb megismerése, a folyamatban kulcsfontosságú szereppel bíró célmolekulák azonosítása elengedhetetlen a gyógyszerfejlesztés alapját szolgáló, célmolekulákra specifikus gátlószerek kifejlesztéséhez.

Doktori ösztöndíjasként a gyulladásos folyamatok effektor sejtjeiben, a neutrofil granulocitákban zajló jelátviteli utak vizsgálatával foglalkoztam, különös tekintettel a szignalizációban elengedhetetlen tirozin-kinázokra. Munkám fontos részét képezték a kismolekulás tirozin-kináz gátló dasatinib neutrofilekre és autoimmun gyulladásos folyamatokra gyakorolt hatásainak vizsgálata, ezért a tirozin-kinázok,

valamint a neutrofil granulociták bemutatásán túl röviden összefoglalom az autoimmun gyulladásos megbetegedések és azok terápiás lehetőségeinek irodalmi hátterét is.

3.1 A tirozin-kinázok

A protein-kinázok olyan enzimek, melyek nagy energiájú molekulákról (így például az ATP-ről) foszfátcsoportot képesek egyes célmolekulákra helyezni, ezáltal jelentősen befolyásolva a target lokalizációját és/vagy működését, ez utóbbi révén aktivitásfokozódást vagy éppen gátlást okozva. A jelenség eukarióta sejtekben való elterjedtségére jellemző, hogy a humán genom kódoló szakaszának közel 2%-a valamilyen protein-kinázt kódol, számos sejt többféle kinázt is expresszál, valamint az intracelluláris fehérjék harmada képes foszforilálódni [2,3].

Attól függően, hogy a szubsztrát fehérje szerin/treonin vagy tirozin aminosavjain történik a foszforiláció, megkülönböztetünk szerin/treonin-kinázokat és tirozin-kinázokat. A tirozin-kinázok számos sejtműködésben vesznek részt, a sejtek proliferációján, differenciációján, valamint migrációján át egészen a metabolikus változásokig [4]. A lokalizáció alapján a tirozin-kinázokat receptor kináz és nemreceptor kináz csoportokra oszthatjuk. Az előbbire jó példa az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR), az érendotél növekedési faktor receptor (VEGFR) vagy az inzulin receptor, míg a nemreceptor tirozin-kináz családba sorolhatók az Src-típusú kinázok, a Syk tirozin-kináz, továbbá az Abl-kináz, a FAK (fokális adhézió kináz) és a Janus-kinázok (JAK) [5]. A tirozin-kinázok katalitikus alegységének működése szigorú szabályozás alatt áll, melynek fontosságát jól mutatja a konstitutívan aktív tirozin-kinázok daganatok kialakulásában betöltött szerepe [6]. A kinázaktivitás szabályozottságáért felelősek a különböző protein-tirozin foszfatázok, más szerin/treonin-kinázok, és jelentős szereppel bírnak a folyamatban az autoregulációs mechanizmusok [5]. Dolgozatom további részében elsősorban a nemreceptor tirozin-kinázokra fókuszálok.

A sejtek citoplazmájában elhelyezkedő nemreceptor tirozin-kinázok a jelátviteli folyamatok közbenső hírvivő molekulái. Membránreceptor-társaikkal ellentétben természetesen nem rendelkeznek extracelluláris ligandkötő, sem plazmamembrán doménnel, a legtöbb esetben a citoplazmában helyezkednek el,

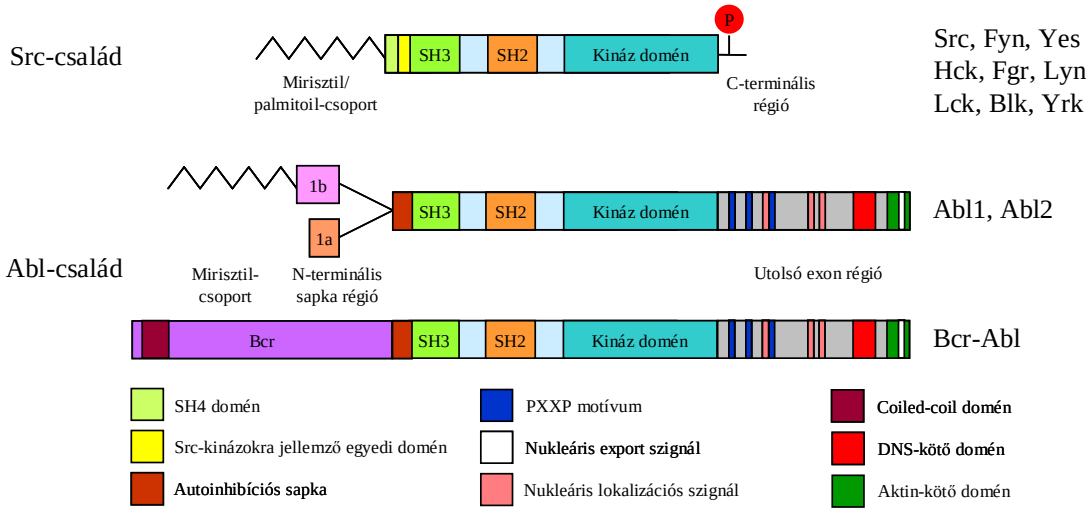
ugyanakkor bizonyos esetekben a plazmamembránhoz rögzülnek aminoterminális mirisztil- vagy palmitoil-csoport révén [7]. A kinázok szerkezetének közös eleme a konzervált felépítésű katalitikus domén, mely egy elsősorban β-redők által alkotott N- és egy dominánsan α-helikális szerkezetű C-terminális aldoménből épül fel. Ezek együttesen felelősek a foszfát-csoport donor molekula (például az ATP) rögzítéséért divalens kationok révén, valamint a foszforilálandó fehérje megkötésért [8]. A foszforilációt mediáló katalitikus doménen kívül a nemreceptor tirozin-kinázok számos esetben rendelkeznek protein-protein, protein-lipid vagy fehérje-DNS kapcsolódást lehetővé tevő doménekkel. Az elsőre jó példa a körülbelül 100 aminosavból felépülő, foszfotirozinokat felismerni képes Src-homológia 2 domén (SH2) vagy a kisebb méretű, prolingazdag régiókra specifikus SH3-domén [7]. A Btk/Tec-családba tartozó fehérjék jellegzetes alkotóeleme a Pleckstrin-homológia (PH-) domén, mely többek között a foszfatidil-inozitol-3-kináz működése révén létrejövő foszfatidil-inizitol-3,4,5-triszfoszfátot képes felismerni [9].

Az extracelluláris aktiváció hatására a tirozin-kinázok intramolekuláris és intermolekuláris mechanizmusok révén konformációváltozáson mennek keresztül. Ez, a főként más fehérjék által történő foszforiláció, illetve az azonos enzim mediálta transz-autofoszforiláció által előidézett konformációváltozás alapvető jelentőségű a tirozin-kinázok működése szempontjából [8].

A nemreceptor tirozin-kinázok jellegzetes képviselői a proto-onkogén Src-kinázok. Az Src-kinázok számos sejten belüli jelátviteli folyamatban részt vesznek, többek között a sejtnövekedésben, differenciációban, migrációban és sejttúlélésben. Az Src családba tartoznak a széleskörű expressziót mutató Src, Fyn és Yes kinázok, ugyanakkor több Src családba tartozó kináz kifejeződése a hemopoetikus sejtekre korlátozódik, idetartozik a Hck, Fgr, Lyn, Lck és Blk. Az Src családba tartozó tirozin-kinázok szerkezetére 6 funkcionális régió jellemző [10] (1. ábra).

N-terminálison található a mirisztilációs helyet magában foglaló és ezáltal a membrán-lokalizációért felelős SH4-domén, ezt követi egy Src-kinázokra jellemző egyedi domén, melynek funkciójáról viszonylag keveset ismerünk, feltehetően specifikus kapcsolódási helyet biztosít egyes receptorok és célfehérjék számára [10]. Az SH3- és SH2-doménnek jelentős szerepe van a kinázaktivitás intramolekuláris szabályozásában. Az SH1 a tirozin-kináz katalitikus vagy kináz doménje, mely a

kinázaktivitásért és a szubsztrát specificitásért felel [10]. A C-terminális régió az SH2 és SH3 doménekkel együtt vesz részt az Src-kinázok aktivitásának szabályozásában [10,11]. A C-terminálison lévő Tyr530 foszforilált formában képes kötődni az SH2 régióhoz, ez, valamint az ezzel egyidőben kapcsolódó SH3 és SH1 domén biztosítja a molekula zárt, inaktív konformációját [10]. Amennyiben a C-terminális Tyr530 defoszforilálódik, a gátló intramolekuláris kapcsolat a C-terminális régió, és az SH2 domén között felbomlik, a molekula felnyílik. A teljes aktivációhoz azonban szükséges a kináz domén aktivációs hurkában lévő Tyr419 foszforilációja is [10].



1. ábra: Az Src- és Abl-kináz családok doménszerkezetének vázlata. A foszforilációs helyeket nem tüntettem fel az ábrán, kivéve az Src családba tartozó fehérjék C-terminális régiójában elhelyezkedő foszfotirozint. Az ábrát a [1] referencia közleményben megtalálható ábra alapján rajzoltam.

A nemreceptor tirozin-kinázok további részletesen vizsgált képviselője az Abl-kináz, melynek egy kromoszóma-aberráció révén kialakuló konstitutív kináz-aktivitása áll egyes, Philadelphia-kromoszóma pozitív leukémiák létrejöttének hátterében. Az Abl-kinázoknak két humán izoformája ismert: az Abl1 és az Abl2, melyek általános expressziót mutatnak [12]. Fontos szerepük van a sejtnövekedésben, sejttúlélésben, sejtmigrációban és morfogenezisben, valamint a sejten belüli DNS károsodásra, oxidatív stresszre adott sejtválaszokban [12]. Az Abl-kinázok esetén is, – az Src-kinázokhoz hasonlóan – egy SH3-SH2-kináz domén egység biztosítja a molekula zárt konformációját (1. ábra). Az Abl-kinázok esetén hiányzik az Src-kinázoknál említett C-terminális régió kulcspozícióban lévő tirozin-foszforilációs helye. Azonban az Abl-kinázok az N-terminális végen egy – az 1b splice variáns esetén mirisztoilált – sapka

régióval rendelkeznek, mely sapka régió esszenciális a kinázaktivitás negatív szabályozásában a zárt konformáció rögzítése révén [13]. A C-terminálison egy kiterjedt „utolsó exon régió” található, mely a kináz sejten belüli lokalizációjáért, illetve a DNS-hez és a citoszkeleton egyes elemeihez történő kötődésért felelős [1]. A 9-es és 22-es kromoszóma reciprok transzlokációja következtében expresszálódó, konstitutívan aktív Bcr-Abl fúziós onkoprotein esetén az Abl-kináz autoinhibíciós N-terminális sapka régió nagyrésze elveszik, illetve a kapcsolódó Bcr domén révén egy coiled-coil szakasz kerül a kináz N-terminális régiójára, mely a Bcr-Abl fúziós fehérjék oligomerizációjához és a kináz domén aktivációs hurkának fokozott transzfoszforilációjához vezet (1. ábra). Mindezek együtt felelősek a Bcr-Abl fúziós fehérje konstitutív kináz aktivitásáért [13].

A tirozin-kinázok sejten belüli jelátviteli utakban betöltött kiemelkedő szerepük, valamint rendellenes katalitikus működésük, vagy a túlzott sejten belüli expressziójuk során kialakuló (gyakran daganatos megbetegedésekhez vezető) patológiás elváltozások okán a gyógyszerkutatások kiemelt célpontjaivá váltak [14].

3.1.1 Tirozin-kináz gátlók

A tirozin-kinázok különböző sejtfunkciókban és betegségekben betöltött kiemelkedő szerepe felvetette az igényét a tirozin-kinázokat specifikusan gátolni képes molekulák kifejlesztésének, így jelentek meg kezdetben a kutatásban, majd a klinikai gyakorlatban a különböző tirozin-kináz gátlók. A tirozin-kináz inhibitorok nagy előnye, hogy előállításuk relatíve olcsó (mely természetesen egy gyógyszercég gazdasági megfontolásai miatt korántsem jelenti a törzskönyvezett gyógyszer alacsony árát), technikailag könnyen kivitelezhető, valamint további előnyük, hogy ezek a kismolekulás gátlószerek orálisan adagolhatók. A protein-kinázokat gátló inhibitorok többféle módon fejthetik ki hatásukat, így kapcsolódhatnak a ligandkötő helyhez (ortosztérikus gátlás), illetve befolyásolhatják a liganddal történő interakciót a ligandkötő helytől eltérő pozícióban is (allosztérikus gátlás) [15]. Ez utóbbi esetben hathatnak az ATP-kötésre kompetitív antagonizmus formájában, illetve befolyásolhatják a fehérje konformációját az ATP-kötő képesség befolyásolása nélkül is [15]. A legtöbb ma a terápiában használatos kináz-gátló ATP-antagonistaként fejti ki a hatását [16]. A krónikus mieloid leukémia (angol nyelvű rövidítéssel CML)

konstitutívan aktív Bcr-Abl fúziós fehérje működése következtében kialakuló tirozin-kináz-mediált mieloproliferatív megbetegedés, melynek kezelésében elsőként juthattak szerephez a tirozin-kináz gátlók a klinikai gyakorlatban. A CML terápiáját ugyanis forradalmasította a kis molekulasúlyú tirozin-kináz gátló imatinib, mely a hagyományos interferon/citozin-arabinozid kezeléssel szemben kimagaslóan jól teljesített és hosszútávon is hatékonynak bizonyult [17,18]. A kismolekulás tirozin-kináz gátló imatinib a kináz domén ATP-kötő helyéhez kötődik a kináz inaktív, zárt állapotában [19], mely nagyban különbözik a többi tirozin-kináz – mint például a szerkezetileg nagyon hasonló Src-családba tartozó kinázok – inaktív konformációjától, és ez biztosítja többek között az imatinib specificitását is az Abl-kináz gátlásban [20]. Az orális imatinib kezelés a betegek nagy részében komplett citogenetikai remissziót eredményez, emellett biztonságos és általában jól tolerálható; nemkívánatos tény ugyanakkor, hogy a CML-ben szenvedő betegek egy részében mutáció révén a terápia során imatinib-rezisztencia alakul ki, kis hányadukban pedig intolerancia eredményez sikertelenséget [21]. Emiatt szükség volt másodvonalbeli szerek kifejlesztésére, így jelent meg a terápiában a dasatinib, illetve a nilotinib [22]. A legtöbb kismolekulás tirozin-kináz gátló több kináz egyidejű gátlását is eredményezi, hiszen a legtöbb inhibitor a tirozin-kinázok rendkívül konzervált ATP-kötő zsebét célozza meg [23]. A tirozin-kináz gátlók off-target hatásai azonban erősíthetik a célmolekulán kifejtett hatást, vagy azon túl újabb előnyös biológiai hatással gazdagíthatják a gátlószer alkalmazhatósági palettáját [23]. Mindezt jól példázza a c-Kit-re és a PDGFR-re is ható imatinib, mely Abl-független gátló hatásai révén nyerhetett alkalmazást a szolid daganatok közé tartozó gasztrointesztinális sztrómális tumorok, valamint a hipereozinofília szindróma terápiájában [24].

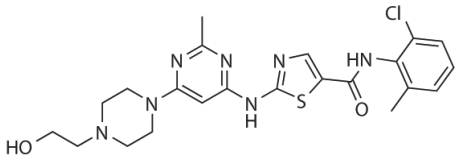
Egyes daganatok kialakulásában fontos szerep jut a receptor tirozin-kinázoknak, így az epidermális növekedési faktor receptornak (angol rövidítéssel EGFR-nek) bizonyos tüdőrákokban, valamint a humán epidermális növekedési faktor receptor 2-nek (angol rövidítéssel HER-2-nek) egyes emlőtumorokban. Ezek fényében nem meglepő, hogy az EGFR-gátló gefitinib és erlotinib hatékonynak bizonyult nem-kissejtes tüdőrákban, illetve, hogy a EGFR és HER-2 kettős gátló lapatinibet törzskönyvezték előrehaladott emlőtumorok esetében [25].

Az immunsejtek normál működéséhez is elengedhetetlenek a különféle tirozin-kinázok, így például a Syk tirozin-kináz vagy a Btk a B-sejt receptor jelátvitelhez, valamint a Janus-kinázok az I-es és II-es típusú citokin-receptorok szignalizációjához [26,27]. Egyes citokinek autoimmun gyulladásokban betöltött szerepe felvetette, hogy a citokin-receptorok szignáltranszdukciójában résztvevő Janus-kinázok gátlása hatékony lehet a kórképek kontrolljában. Ezzel összhangban a JAK1- és JAK3-specifikus tofacitinib eredményesnek bizonyult reumatoid artritiszben szenvedő betegek tüneteinek mérséklésében, szépen demonstrálva azt, hogy az onkológiai alkalmazáson kívül a reumatológia/klinikai immunológia területén is fontos lehet a tirozin-kináz gátlás, mint terápiás megközelítés, ezzel is kiszélesítve a tirozin-kinázok gyógyításban betöltött szerepét [28].

A tirozin-kináz gátlók alkalmasak lehetnek (specificitásuknak megfelelően) a jövő gyógyászatának tartott személyre szabott terápiák kialakítására is egyes betegségekben. A személyre szabott terápiák a molekuláris biológia fejlődésének köszönhetően a különböző betegségek molekuláris hátterének megismerésével, a beteg, illetve a betegség egyéni jellegzetességeit szem előtt tartva olyan célzott terápiák (lehetnek), melyek a gyógyszeres kezelési stratégiákat biztonságosabbá és hatékonyabbá tehetik. Ez mind a betegre, mind a társadalmi ellátó rendszerekre nézve számos előnyt rejt magában.

3.1.1.1 Dasatinib (BMS-354825; Sprycel®)

A Bristol-Myers Squibb gyógyszergyártó cég fejlesztésében létrehozott második generációs, orálisan adagolható, kismolekulás tirozin-kináz gátló dasatinib a nevét alkotójáról, Jagabandhu Dasról kapta [29]. Das egy rendkívül hatékony Src családba tartozó kinázokat gátló vegyületet hozott létre (2. ábra). Korai *in vivo* vizsgálataikban orálisan aktív vegyületnek bizonyult, és képes volt jelentős mértékben gátolni a kísérletes adjuváns artritisz kialakulását patkányokban [29]. E nagy hatékonyságú



2. ábra: A dasatinib szerkezete
N-(2-kloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)]-2-metil-4-pirimidinil]-amino)]-1,3-thiazol-5-karboxamid

kináz-gátló szelektivitási vizsgálatai során fény derült arra, hogy az Src-kinázok családjába tartozó Lck, Src, Yes, Fyn, Hck, Fgr, Lyn molekulák mellett szintén szubnanomólos IC_{50} koncentrációban gátolja az Abl-kinázt, a Bcr-Abl konstitutív Abl-kináz aktivitással rendelkező fúziós fehérjét, a c-Kit molekulát, a PDGF-receptor α/β-t, az Ephrin-receptor tirozin-kinázokat, valamint a Tec-családba tartozó Btk tirozin-kinázt [29-32]. A dasatinib az Src-kinázok gátlásán túl a Bcr-Abl gátlása révén került a további vizsgálatok középpontjába. Már 2004-ben leírták drámai antitumorális hatását K562 (humán blast-fázisos CML sejtvonal) xenograft állatmodellben [32]. A dasatinib jóval (~325-ször) hatékonyabbnak bizonyult a krónikus mieloid leukémiában szenvedő betegek elsővonalbeli terápiáját jelentő imatinibnél a mutációval nem rendelkező Bcr-Abl gátlásban [33]. Mindemellett az imatinib-rezisztenciáért sok esetben a Bcr-Abl fúziós fehérje kináz-doménjét érintő mutációk felelősek, melyek néhány kivételtől eltekintve nem befolyásolják a dasatinib hatékonyságát [33]. A dasatinib, az imatinib-hez hasonlóan a kináz-domén ATP-kötő zsebéhez kapcsolódik, azonban szemben az imatinibbel, a dasatinib nem csupán a kináz inaktív formájához képes kötődni, stabilizálva az inaktív konformációt, hanem függetlenül a kináz aktivációs állapotától, mind a kináz inaktív, mind az aktív formájához kötődve gátolja annak működését [34]. Napjainkra számos összehasonlító klinikai vizsgálat áll rendelkezésünkre, melyek a dasatinib hatékonyságát bizonyítják a CML, és a Philadelphia kromoszóma pozitív akut limfoid leukémia (Ph+ALL) kezelésében másodvonalbeli szerként adva imatinib-rezisztencia vagy imatinib-intolerancia esetén [35]. A dasatinib elsővonalbeli szerként az újonnan diagnosztizált betegek terápiájában is szignifikáns különbséget eredményezett az imatinibbel szemben: az antitumorális hatás korábban megjelent, a hatás nagyobb volt, és tovább tartott dasatinib kezelés esetén, mint imatinib adása mellett [35]. Mellékhatás profilja nem elhanyagolható, azonban kezelhetőnek tekinthető, a kezelés mellett megjelenő káros reakciók visszafordíthatók. A dasatinib terápia mellett jelentkező leggyakoribb mellékhatások a mieloszuppressszió (főként neutropénia, trombocitopénia), folyadékretenció, vérzések és pleurális folyadékgyülem kialakulása, illetve fokozott fogékonyság jelenik meg a különböző (bakteriális, virális, gombás) fertőzésekkel szemben [35,36]. Ezeken túl gyakoriak a gasztrointesztinális tünetek, fejfájás, kiütés, kardiális diszfunkciók, hipertónia kialakulása [35,36]. Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (Food and Drug Administration, FDA)

és az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) 2006-ban engedélyezte elsőként a dasatinib terápiás alkalmazását CML és Ph+ ALL kezelésére [37,38].

A dasatinib több kináz működését képes befolyásolni, ezért számos jelátviteli útvonalra hat a különböző sejtekben. Drámai mértékben képes gátolni az Src-családba tartozó kinázokat, illetve számos (fentebb már felsorolt) kinázt is, melyek többségének rosszul szabályozott működése rendkívül fontos szereppel bír a különböző tumoros elváltozások megjelenésében [39-45]. Ezen tulajdonságánál fogva elkezdték kiterjesztett preklinikai és klinikai vizsgálatokban elemezni a hatását monoterápiában és kombináltan adva a hematológiai daganatok szélesebb körében és egyéb nem-hematológiai daganatok, szolid tumorok (emlőrák, prosztratarák, melanóma, kolorectális karcinóma, nem-kissejtes tüdőkarcinóma, fej-nyaki daganatok) esetén is [46-54].

Azon túl, hogy számos részletes analízis áll rendelkezésünkre a dasatinib hatékony gátló hatásáról tumorsejteken/sejtvonalakon, ma már egyre szélesebb körű irodalmi adat lelhető fel a normál, egészséges sejtekre gyakorolt off-target hatásairól is. A dasatinib gátolja a T-limfociták T-sejt receptoron (TCR) keresztüli jelátviteli folyamatait, így a sejtek TCR-en keresztüli aktivációját, proinflammatórikus citokintermelését, proliferációját *in vitro* és *in vivo* [55]. A T-sejtek TCR-en keresztüli folyamatainak blokkolása, feltehetően a dasatinib egyik fő célmolekulájának, az Lck gátlásának köszönhető [56]. A dasatinib továbbá gátolja a $CD4^+CD25^+$ regulációs T-sejtek (Treg) működését is [57]. Figyelemre méltó, hogy *in vitro* képes gátolni a HIV-fertőzött pácienseekből származó primer $CD4^+$ T-limfociták HIV1 termelését [58]. A kialakult képet azonban tovább árnyalja a dasatinib (és más kismolekulás Src-kináz inhibitorok pl. bosutinib, saracatinib) paradox hatása a T-sejtek proliferációjára, mely alapvetően befolyásolhatja a kemo-immunterápia jövőjét. Ugyanis a dasatinib T-sejt proliferációra gyakorolt közvetlen szuppresszív hatása mellett felmerül, hogy a dasatinib jelenlétében érlelt humán mieloid eredetű dendritikus sejtek (részben az általuk termelt IL-12 citokinen keresztül) fokozzák az antigén-specifikus T-sejtek proliferációját [59]. A Treg sejtek gátlásával együtt ez a $CD8^+$ sejtek elszaporodásához vezethet, mely a klinikai terápia szempontjából egyaránt hordozhat előnyöket (antitumorális hatás) és hátrányokat (autoimmunitás fokozódása) is [60]. A dasatinib

ezeken túl dózis-függő módon csökkenti a természetes ölő sejtek (NK sejtek) citotoxicitását K562 és Jurkat sejtekkel szemben [61]. Továbbá gátolja a bazofil granulociták Fcε-receptor-I-en keresztüli aktivációját, többek között az IgE-függő, és allergén-kiváltotta hisztamin-termelését, valamint az interleukin-4 citokin felszabadítását, mely hatás hátterében feltehetően központi szerepet játszik a Btk gátlása [62]. A dasatinib gátolja a vérlemezkék kollagén-indukált aktiválódását is, valamint a trombus képződést *in vitro*, és meghosszabbítja a vérzési időt *in vivo* kísérleti állatokban [63]. A megakariociták működésének gátlása révén károsítja a vérlemezke-képződést [64]. Szintén gátolja az oszteoklasztok képződését, és aktivitását [65], mely *in vivo* csonttömeg növekedést eredményez [66].

Annak ellenére, hogy a szakirodalom a fenti példák alapján is bővelkedik információanyaggal a dasatinib normál, érett (immun-) sejtekre gyakorolt hatásairól, ezidáig a vérben legnagyobb számban keringő fehérvérsejtekre, a neutrofil granulocitákra gyakorolt hatása nem volt ismeretes.

3.2 A neutrofil granulociták jellemzése

A neutrofil granulociták rövid életű, a vérben legnagyobb számban keringő, terminálisan differenciált fehérvérsejtek. A veleszületett immunrendszer katonáiként az első vonalbeli védelmi apparátust képezik a szervezetbe behatoló kórokozókkal, mikróbákkal szemben. Jellegzetes szegmentált maggal (polimorfonukleáris sejtek – PMN) és karakterisztikus festődést nem mutató granulumokkal rendelkeznek. Nagy számban keletkeznek a csontvelőben, majd érett formában kerülnek a keringésbe, ezt követően apoptózissal elpusztulnak. A keringésbe került neutrofilek féléletidejével kapcsolatos általánosan elfogadott nézet szerint az néhány órára tehető, azonban a közelmúltban napvilágot látott közleményekben a féléletidőt már néhány napra becsülik [67].

3.2.1 A neutrofil granulociták homeosztázisa

A neutrofil granulociták homeosztázisa, ezáltal számuk a keringésben (mely normál körülmények között 1-2%-a csupán a teljes érett neutrofilszámnak) három ponton keresztül áll szigorú szabályozottság alatt: keletkezés, keletkezési helyükről történő felszabadulás, és a cirkulációból történő eliminálás révén.

A neutrofil granulociták keletkezése az IL-23–IL-17–G-CSF tengelyen keresztül szabályozott [68]. Keletkezésüknek legfontosabb reguláló tényezője a perifériás szövetekben programozott sejthalállal történő pusztulásuk mértéke, mely az őket fagocitáló szöveti makrofágok és dendritikus sejtek IL-23 képzését csökkenti. Amennyiben a periférián az apoptózissal pusztuló neutrofilek száma alacsony, az IL-23 képződés fokozódik, mely serkenti az IL-17A neutrofil-szabályozó T sejtek (γδ T-sejt, NKT-sejt) általi termelődését. A szabályozó hurok zárásaként az IL-17 fokozza a G-CSF termelődését, ezáltal közvetetten a granulopoiesist [69,70].

A periférián keringő neutrofil granulociták száma azonban nemcsak a keletkezés mértékén, hanem a csontvelőből történő kiáramláson keresztül is szabályozott. A neutrofilek sejtfelszínén expresszálódó kemokin receptor CXCR4 és legfőbb ligandja a csontvelői sztróma sejtek által konstitutívan expresszált kemokin, a CXCL12 kapcsolódása jelenti a legjelentősebb csontvelői retenciós szignált a neutrofilek számára [70,71]. A CXCR4/CXCL12 tengely jelentőségét mutatja a CXCR4

receptor mutációja révén kialakuló WHIM (*w*arts, *h*ypogammaglobulinemia, *i*nfections, *m*yelokathexis) immundeficienciával járó szindróma, melynek jellemzője a túlzott CXCR4 szignál és ennek következményeként a perifériás neutropénia mellett az érett neutrofilek csontvelőben történő felhalmozódása [72]. A G-CSF, mint legfőbb mobilizáló citokin többek között a CXCR4 és CXCL12 expressziójának csökkentése révén serkenti a neutrofilek csontvelői kiáramlását. A CXCR4 szignalizáció készenlétben tartja a csontvelői neutrofil-készletet az azonnali kiáramlásra fertőzés vagy stresszhelyzet esetén. Ezen jelátviteli mechanizmusra antagonisztikus hatással bír a CXCR2/CXCL1–CXCL2 szignalizáció [73].

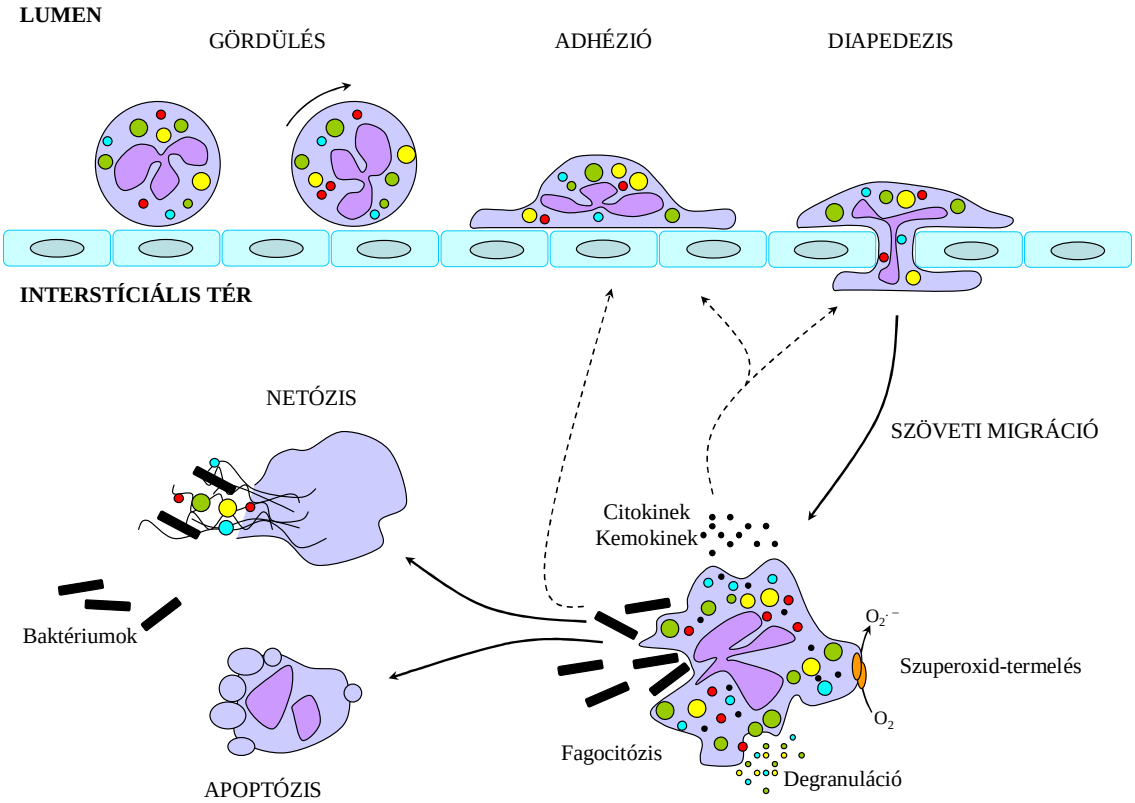
A keringésbe kerülő, majd ott elöregedő (szeneszcens) neutrofilek CXCR4 expressziója újból fokozódik, mely ezáltal biztosítja a neutrofilek „hazatalálását" (homing), extravazációját a csontvelőbe, illetve más CXCL12-t nagymértékben expresszáló szövetekbe (máj, lép), ahol megtörténhet eliminációjuk programozott sejthalál révén [74].

3.2.2 A neutrofil granulociták működése

A neutrofil granulociták legfontosabb feladata a gazdaszervezet védelme a behatoló patogén mikróbákkal (baktériumokkal, gombákkal) szemben. A feladat ellátásához bonyolult folyamatsor vezet, mely áll a patogének, illetve a gyulladásos szövet felismeréséből, a keringésből a gyulladás helyére, a szövet közötti térbe történő kilépésből, majd a gyulladást okozó patogének eliminációjából. A neutrofil granulociták rendkívül gazdag sejtfelszíni receptor-készlettel rendelkeznek élettani funkciójuk betöltéséhez. A klasszikus formil-peptid felismerő, kemokin-, illetve kemoattraktáns receptoraik G-fehérjéhez kapcsolt, hét transzmembrán doménnel rendelkező receptorok. A neutrofil granulociták számos sejtfelszíni adhéziós molekulát is expresszálnak, melyek közé tartoznak az endotélsejtekhez történő kitapadáshoz, majd a transzendoteliális, illetve a szöveti migrációhoz szükséges molekulák, úgymint szelektinek és a heterodimer integrinek. Bizonyos citokinek az immunválasz szabályozásában fontos szerepet betöltő molekulákként (melyek főként más, a gyulladás helyén lévő immunsejtekből, illetve nem-immunsejtekből származnak), szintén képesek a neutrofilek aktiválására, azok citokin-receptorain keresztül. A neutrofilek rendelkeznek továbbá immunglobulinnal opszonizált részecskék felismerésére szolgáló

Fc-receptorokkal, valamint különböző mintázatfelismerő (például Toll-like, C-típusú lektin) receptorokkal.

Nyugalmi környezetben a neutrofilek az érfalon történő kitapadás nélkül keringenek a vérárammal, azonban kórokozók behatolásakor, vagy gyulladásos környezetben a neutrofilek az érfalon keresztül a gyulladt területre vándorolnak (extravazáció) (3. ábra).



3. ábra: A neutrofil granulociták működésének sematikus ábrázolása. (Saját rajz)

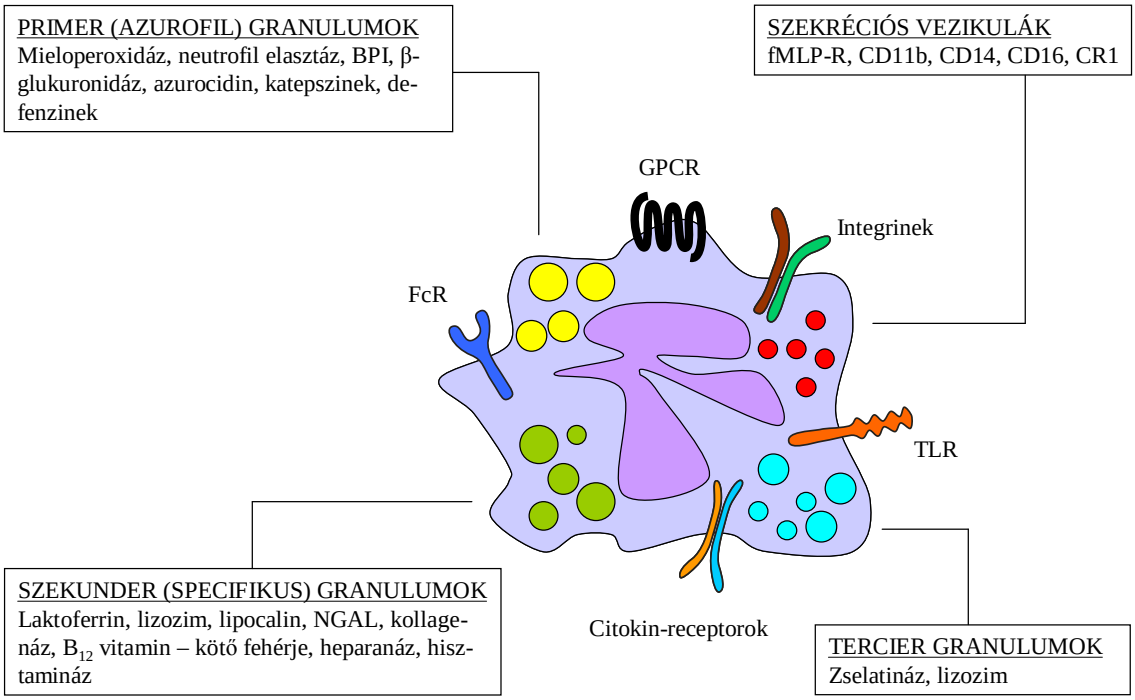
A neutrofilek érfalon keresztüli átjutása a szövetközti térbe főként a posztkapilláris venulák falán keresztül történik soklépcsős folyamat során [75]. A neutrofilek gyors gördülése (rolling) az érfalon nyugalomban is létrejön az érfal P-szelektin és a neutrofilek felszínén lévő PSGL-1 (P-szelektin glikoprotein ligand 1) molekulák kapcsolata révén. A gyulladás területén az aktivált endotélen az E-szelektin expressziója is fokozódik, mely tovább erősíti a neutrofilek és az endotélsejtek közötti kapcsolatot, illetve a PSGL-1-en keresztül megnöveli a β_2-integrin LFA-1 affinitását, ezáltal lassítja a gördülési folyamatot (slow rolling) (6. ábra) [75]. Másrészt a TNFα, IL-1β, illetve IL-17 hatására aktiválódott endotélsejt maga is citokineket termel, tovább

fokozva a neutrofilek aktiválódását. Az ily módon aktivált neutrofilek felszínén lévő LFA-1 (továbbá feltehetően a Mac-1, illetve a VLA-4) nagy affinitásúvá érik, ligandjaikkal kapcsolódva (ICAM-1, VCAM-1) a gördülési folyamat leállításával a neutrofilek szoros letapadását, szétterülését eredményezik [75]. Az érfal átlépése előtt a neutrofilek Mac-1 és ICAM-1-függő módon az érfal belső felszínén „kúszva” keresik meg a legmegfelelőbb helyet a transzmigrációra (crawling) [75]. Ezt követően szintén β_2-integrin-függő módon főként paracelluláris, esetleg transzcelluláris módon lépnek át a neutrofilek az endotélrétegen, majd a bazális membránon keresztüli áthaladásukat különböző proteázok (mátrix metalloproteázok, elasztáz) ürítésével könnyítik meg, ezt követően a fertőzés helyének megtalálásához a kemotaktikus grádiensnek megfelelően haladnak a szövetközti térben [75]. A szövetközti térben lévő stimulált neutrofilek transzkripciós programjuk aktiválásával számos kemokint (pl. IL-8) és citokint (pl. IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-18) termelnek, melyekkel képesek további immunsejteket a gyulladás helyszínére toborozni, illetve azok működését befolyásolni [76].

A kórokozó mikroorganizmusok és a neutrofilek közötti kapcsolat létrejöhet közvetlenül, a neutrofilek mintázatfelismerő receptorain keresztül, melyek a patogén-asszociált molekulákat (például egyes szénhidrátokat, peptidoglikánokat, lipoproteineket) ismernek fel, vagy közvetetten Fcγ-, vagy komplement-receptorokon (CR3) keresztül, melyek a szervezet által termelt immunglobulinokkal vagy komplementtel opszonizált kórokozók felismerésében játszanak szerepet. A felismerést követően a neutrofilek a kórokozók működését egyrészt gátolják a környezetükbe ürített antimikrobiális fehérjék, illetve szabadgyökök révén, másrészt a patogéneket fagocitálják, és azokat a fagoszómán belül széles spektrumú fegyvertáruk (szabadgyökök, lizoszómális enzimek) segítségével végleg elpusztítják.

A mikróbák ellen bevetett fehérjék különböző citoplazmatikus granulumokba csomagoltan alakulnak ki szekvenciálisan a csontvelői érés során, és a gyulladás helyén degranuláció révén (exocitózis) az extracelluláris térbe vagy a fagoszómába ürülnek (4. ábra). A granulumok négy típusát különböztetjük meg kelekezésük sorrendjében: primer (azurofil), szekunder (specifikus), illetve tercier granulumokat és szekréciós vezikulumokat [77]. A degranulációjuk is szigorú sorrendiséget követ, mely éppen ellentétes keletkezésük sorrendjével, ezáltal legelőször a szekréciós vezikulák és legvégül a primer granulumok ürülése történik meg [78]. A primer (azurofil)

granulumok jellemzője a peroxidáz-pozitivitás, a mieloperoxidáz mellett számos egyéb hidrolitikus és baktericid fehérjét tartalmaznak, többek között elasztázt, defenzineket, baktérium permeábilitást okozó fehérjét (BPI), katepszint [79]. A jelentős szövetkárosító hatásuk miatt ezen granulumok csaknem kizárólag a bekebelezett kórokozó fagoszómán belüli elpusztítására szolgálnak. A szekunder (specifikus) granulumok fehérjéi már a fagoszómán kívül az extracelluláris térbe is ürülnek. Domináns képviselőjük az antimikrobiális hatású laktoferrin, mely vaskötő fehérjeként gátolja a baktérium növekedését. Tartalmaznak továbbá szintén antimikrobiális hatással bíró B_{12}-kötő fehérjét és lizozimet, valamint a szövetközti térben a neutrofilek mozgását könnyítő proteolitikus enzimeket: kollagenázt, zselatinázt [79].



4. ábra: A neutrofil granulociták legfőbb sejtfelszíni receptorai és granulum-típusai. (Saját rajz)

A tercier granulumok főként lizozimet és az extracelluláris mátrix bontásáért felelős zselatinázt tartalmaznak. A szekréciós vezikulák endocitotikus eredetűek, mátrixuk plazmafehérjéket tartalmaz. A exocitózisukkal nem ürülnek proteolitikus enzimek a külvilágba. Plazmamembránnal történő fúziójukkal azonban membránjukban őrzött sejtfelszíni receptorokat (pl. fMLP-receptor, komplement-receptor 1) és adhéziós molekulákat (pl. Mac-1) juttatnak a felszínre, melyek az aktivált érfalhoz való

kitapadáshoz és a kemotaktikus migrációhoz szükséges sejtfelszíni molekulákat biztosítják [77,79].

A neutrofilek az antimikrobiális fehérjék degranulációja mellett a fagoszóma-, és plazmamembránban aktiváció hatására összeálló NADPH-oxidáz (NOX2, fagocita-oxidáz) enzimrendszerük segítségével termelt szabadgyökökkel is pusztítják a kórokozókat. Az ún. oxidatív robbanás (respiratory burst) során oxigén-fogyasztásuk drámai fokozásával reaktív oxigéngyökök termelését végzik. Az elsőként létrejövő erőteljesen toxikus oxidáló hatású oxigén-szabadgyök ($O_2^{\cdot -}$) egyrésze enzimatikus lépés során szintén oxidatív hidrogén-peroxiddá alakul, illetve kémiai reakciókba lépve más molekulákkal további reaktív oxigénszármazékok keletkezéséhez vezet (hidrogén-peroxid, hidroxil-gyökök, hipoklórossav, ózon) [80].

Az utóbbi néhány évben egyre több irodalmi adat támasztja alá, hogy a neutrofilek gyulladásos környezetben képesek lehetnek többnyire alternatív sejthalál révén neutrofil extracelluláris csapda (neutrophil extracellular traps, NETs) képzésére, mely hozzájárul az antimikrobiális aktivitásukhoz. A NETózis során az addig többnyire kondenzált kromatinállomány fellazul, és kilökődik a sejtből és magával sodorja a citoplazma-, granulum-, és kromatinállomány-fehérjéket, melyek csapdába ejtik és elpusztítják a környező mikróbákat [81].

A veleszületett immunrendszerben betöltött elengedhetetlen szerepükön túl a neutrofilek a legújabb kutatások nyomán számos ponton képesek befolyásolni az adaptív immunitást is. Egyes neutrofilek a nyirokcsomóba vándorolva versengenek az antigénbemutató-sejtekkel (dendritikus sejtekkel, makrofágokkal), negatívan befolyásolják a dendritikus sejt–T-sejt kapcsolatot, a $CD4^+$ T-sejt- és B-sejt választ [82], illetve maguk is professzionális antigén-prezentáló sejtekként fokozzák a T_H1 és T_H17-sejtválaszt [83]. A lép marginális zónájában lévő T-sejt független immunglobulin-válaszokért felelős B-sejtek segítőiként a perimarginális zónában lévő neutrofilek immunoglobulin-osztályváltást, szomatikus hipermutációt és antitest-termelést váltanak ki, az általuk termelt BAFF, APRIL és IL-21 citokineken keresztül [84].

A neutrofilek szerteágazó védelmi funkcióiból adódóan rendellenes működésük számos betegség patogenezisében szerepet játszik (krónikus fertőzések, autoimmun betegségek, krónikus gyulladásos megbetegedések, tumorok kialakulása). A neutrofilek NADPH-oxidáz enzimkomplexének működésképtelensége nyomán

kialakuló krónikus granulomatózis (CGD), valamint a különböző granulumok kialakulásával és funkciókiesésével járó megbetegedések (pl. mieloperoxidáz-hiány, Chédiak-Higashi szindróma) súlyos, rekurrens fertőzések kialakulásához vezet [85]. A leukocita adhéziós deficiencia (LAD) szintén súlyos bakteriális fertőzéseket okoz, ebben az esetben a neutrofilek érfalhoz történő kitapadása, illetve az érfalon történő transzmigrációja szenved zavart [86]. Jelenleg három típusa ismert, a β_2-integrin adhéziós molekula CD18 láncának hiánya vezet a LAD 1, míg a fukóz transzporter genetikai hibájából eredően hiányzó szelektin vezérelt sejt-sejt kapcsolat a LAD 2 kialakulásához. Az utóbbi években derült fény arra, hogy a LAD 3 hátterében a kindlin-3 hiány okozta β_2-integrin aktiváció elmaradása áll [87].

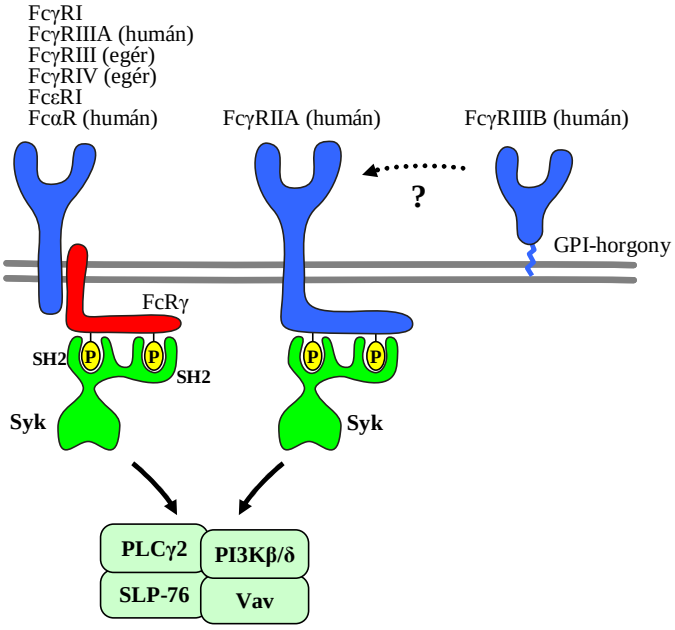
3.3 A neutrofil granulociták jelátviteli mechanizmusai

Az alábbi alfejezetekben áttekintem a neutrofil granulociták sejtfelszíni receptorairól induló jelátviteli folyamatokat, melyek a neutrofilek effektor sejtválaszainak megjelenéséhez vezetnek. A terület szerteágazó, információgazdag jellege miatt összefoglalómban elsősorban a legfontosabb és leginkább körüljárt mechanizmusokat emelném ki, különös tekintettel a tirozin-kinázok szerepére.

3.3.1 Fc-receptorok jelátvitele neutrofilekben

Az Fc-receptorok számos veleszületett és adaptív immunválasz kialakulásában és szervezésében kulcsfontosságú molekulák. A neutrofilek többféle Fc-receptort is kifejeznek sejtfelszínükön, melyek a szervezetben termelődött immunglobulinokkal opszonizált kórokozók felismerésében, és számos, a kórokozó elpusztítására irányuló jelátviteli mechanizmus beindításában (reaktív oxigén-származékok termelése, antimikrobiális granulumok exocitózisa) játszanak esszenciális szerepet, emellett részt vesznek különböző immunkomplex által kiváltott autoimmun betegség patogenezisében is.

A neutrofilek sejtfelszíni Fc-receptorai közül a legfontosabbak az IgG felismerésére képes Fcγ-receptorok. A humán IgG receptorok között megtalálható több aktiváló (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB), valamint egy, a neutrofilek negatív szabályozásáért felelős, ITIM (immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum) szekvenciát tartalmazó gátló receptor (FcγRIIB) [88]. Egérben az aktiváló FcγRI, FcγRIII, FcγRIV mellett szintén kifejeződik a gátló FcγRIIB receptor



5. ábra: A neutrofil granulocitákban expresszálódó aktiváló Fc-receptorok. (Forrás: [III])

[88]. Az Fcγ-receptorok tovább csoportosíthatók affinitásuk szerint: mind a humán, mind pedig az egér Fcγ-receptorok közül nagy affinitású FcγRI kivételével a többi Fcγ-receptor alacsony, illetve közepes affinitással bír [88]. A humán neutrofilek nyugalomban FcγRIIA-t expresszálnak, mely citoplazmatikus részén aktiváló ITAM-szekvenciát (immunreceptor tirozin-alapú aktiváló motívum; a rövid, konszenzus ITAM szekvencia képlete: YxxL/I$x_{(6-12)}$YxxL/I, ahol x, bármely aminosavat jelölhet) hordoz, illetve FcγRIIIB-t, mely valószínűleg az FcγRIIA-n keresztül képes szignalizálni, a plazmamemránban glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgonnyal rögzül [88]. Immunkomplex mediált aktivációhoz mind az FcγRIIA, mind az FcγRIIIB szükséges [89]. Nyugalmi körülmények között a humán neutrofilek kis számban expresszálnak nagy affinitású FcγRI-et is, ez fokozódik különböző gyulladásos stimulusra [90]. Ezzel szemben az egér neutrofilek sejtfelszínén kifejeződő több fehérjeláncból álló (multimer) FcγRIII és FcγRIV a sejtmembránban egy transzmembrán adapter fehérjéhez, az ún. Fc-receptor γ-lánchoz nem kovalensen kötődve rögzül, e két receptor funkciója az immunkomplex-mediált neutrofil aktiváció során átfedő [89]. Humán neutrofilek expresszálnak továbbá FcαRI-et, mely Fc-receptor γ-lánchoz kötődik, és a monomer IgA molekulát képes felismerni [91], ezáltal vesz részt a neutrofilek anti-tumor immunválaszaiban [92]. Bizonyos körülmények között a humán neutrofilek kifejeznek FcεR-t is, mely főként allergiás reakciókban játszik szerepet [93].

A klasszikus immunreceptorok (TCR, BCR, FcR) kezdeti szignalizációs mechanizmusai hasonló lépéseken keresztül zajlanak, melyekben esszenciális szerepet játszanak egyes tirozin-kinázok [94]. Az Fc-receptor szignalizáció első lépésében a receptorok ligandkötését követően a receptor-komplex segédláncán, vagy az Fcγ-receptor citoplazmatikus régiójában lévő ITAM szekvencia két kitüntetett tirozinját feltehetően az Src-családba tartozó nemreceptor tirozin-kinázok foszforilálják [95-97]. Az ITAM tirozinok foszforilációját követően a Syk tirozin kináz (BCR, FcR esetében), vagy a ZAP70 (TCR esetében) két SH2-doménjével kötődik a foszforilált tirozinokhoz, majd aktiválódik és kináz-szubsztrátjainak foszforilációjával beindítja a downstream szignalizációs mechanizmusokat (5. ábra) [94]. A Syk tirozin-kináz, ellentétben a ZAP70 molekulával az Src családba tartozó kinázok nélkül is képes az ITAM szekvencia kritikus tirozinjainak foszforilálására B-sejtekben és makrofágokban [96-100]. A neutrofilek Fcγ-receptorain keresztül zajló szignalizációs lépések egyes pontjai

– többek között a neutrofil granulocitákban expresszálódó Src-kinázok (Hck, Fgr, Lyn) szerepe – még tisztázásra várnak. A neutrofil granulociták Fcγ-receptorokon keresztül létrejövő aktivációjához a Syk tirozin-kináztól downstream zajló jelátviteli folyamatokban esszenciális az intracelluláris SLP-76 adapter molekula [101], a foszfolipáz PLCγ2 [102], a Rho családba tartozó GTPáz Rac2 [103], Rho/Rac guanin nukleotid kicserélő faktor Vav fehérjék [104] és egyes PI3K izoformák (PI3Kβ és PI3Kδ) [105].

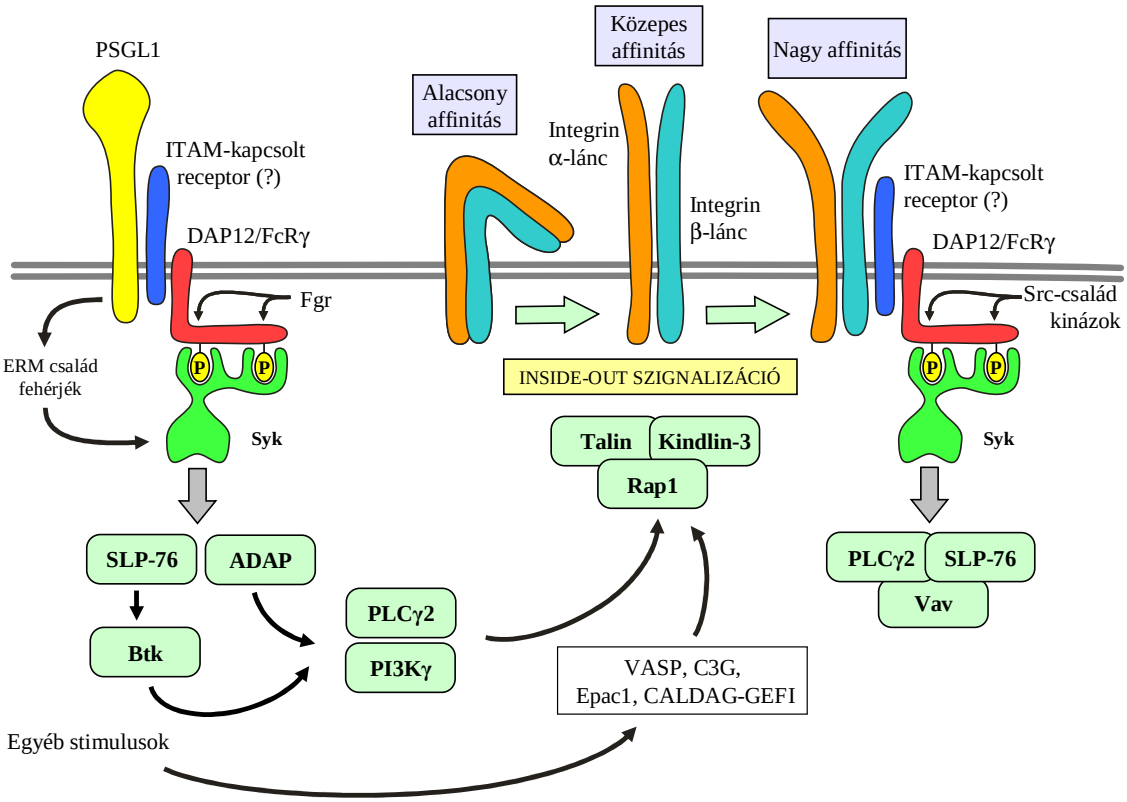
A neutrofilekben expresszálódó Src-típusú tirozin-kinázok (Hck, Fgr és Lyn) Fc-receptor jelpályában betöltött szerepének munkacsoportunk számos aspektusát vizsgálta, melynek eredményeit tartalmazza egy jelenleg publikálás alatt lévő kézirat [IV]. Felmerült, hogy (ezen kézirat keretein belül) megvizsgáljuk e három tirozin-kináz szerepét egy immunkomplex-mediált *in vivo* gyulladásos betegségmodellben, a reverz passzív Arthus reakcióban is.

3.3.2 β_2-integrinek és szelektinek jelátvitele neutrofilekben

A neutrofil granulociták legjelentősebb adhéziós molekulái a szelektinek és a β_2-integrinek, melyek elengedhetetlen szereppel bírnak a gyulladás helyén történő neutrofil granulocita toborzáshoz szükséges adhéziós lépések és transzendoteliális migráció létrejöttében.

A szelektinek a C-típusú lektinek közé tartoznak, melyek képesek a specifikus szénhidrát determinánsokat tartalmazó szelektin ligandok felismerésére és megkötésére Ca^{2+}-függő módon. Emlősökben expresszálódó szelektinek az L-szelektinek (leukociták felszínén), a P-szelektinek (vérlemezkék és endotél-sejtek felszínén) és az E-szelektinek (endotél-sejtek felszínén gyulladásos környezetben) [106]. Ligandjaik heterogén molekulacsoportba tartoznak, legtöbbjük tartalmaz egy tetraszacharid szialil Lewis X (sLe^X) struktúrát. Míg a leukociták felszínén expresszálódó P-szelektin glikoprotein 1 (PSGL-1) a P- és E-szelektinek ligandjaként, a CD44 és ESL-1 az E-szelektinekkel kapcsolódva vesz részt a neutrofil granulociták gördülési (rolling) folyamatában [106]. Szerepük egyrészt rövid, átmeneti kapcsolat létrehozása a leukociták és az érfal endotél sejtjei között, másrészt a PSGL-1–E-szelektin komplex intracelluláris szignalizációs folyamatot indít be, mely révén többek között az LFA-1 integrin részleges aktivációja során alacsony affinitású állapotából közepes affinitású állapotba kerül (inside-out

szignalizáció), ezáltal lehetővé téve a neutrofil granulociták lassú gördülését az ICAM-1-en (6. ábra) [75].



6. ábra: A neutrofil granulociták szelektinen és integrinen zajló jelátviteli folyamatai. (Forrás: [III])

Az integrinek transzmembrán α és β láncból álló heterodimer adhéziós molekulák, melyek a sejt-sejt, sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat kialakításában játszanak kulcsfontosságú szerepet [107]. Az integrinek ezáltal központi jelentőségűek a fehérvérsejtek endotéliumhoz tapadásában, és a transzendoteliális átjutás, a szövet közötti térben történő migráció, valamint az opszonizált részecskék fagocitózisának levezénylésében [108]. A neutrofil granulociták szempontjából legfontosabbak a β_2-integrin családba (CD11/CD18) tartozó fehérjék, emellett jóval kisebb mértékben ugyan, de expresszálnak β_1- és β_3-integrineket is [109]. A β_2-integrin családba tartozó fehérjék egy közös β-láncot (CD18) tartalmaznak, mely nem kovalens módon kapcsolódik valamely α-lánccal (CD11), ezáltal jön létre a CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$, LFA-1), CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1, CR3), a CD11c/CD18 ($\alpha_X\beta_2$, CR4) és a CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$) heterodimer [110]. Az LFA-1 az endotéliumon található ICAM molekulákkal, míg a Mac-1 ezeken túl komplement fehérjékkel (C3bi), fibrinogénnel, fibrinnel,

kollagénnel és a X-es véralvadási faktorral is képes kapcsolódni [108,110]. Az integrinek jelátviteli folyamatai két irányban zajlanak: beszélünk inside-out és outside-in szignalizációról. Az inside-out szignalizáció (integrin aktiváció) során az integrinek ligandkötő affinitásának növekedése, valamint a sejtmembránban való csoportosulásuk, megnövekedett sejtfelszíni expressziójuk együttesen a ligandkötő képesség fokozódásához vezet, míg az outside-in szignalizáció révén jönnek létre a ligandkötés hatására megjelenő sejtválaszok (sejtszétterülés, migráció, szuperoxid-termelés, degranuláció, citokin-termelés) [108,111].

A fentebb említett PSGL-1-E-szelektin komplex jelátvitelén kívül az inside-out szignalizáció lépései viszonylag kevéssé ismertek neutrofil granulocitákban. Általánosságban jól ismert a Rap-1 kis GTP-áz szabályozó szerepe a β_2-integrin aktivációjában [112], mely fagocitasejteken, makrofágokban is bizonyítást nyert [113]. A Rap-1 aktiválódását számos kemoattraktáns, többek között különböző bakteriális eredetű molekulák (fMLP, LPS) válthatják ki [114], egyrészt a NO/guanozin-3′,5′-ciklikus monofoszfát–függő protein-kináz (cGKI) útvonalon keresztül, mely a VASP fehérjén, majd a C3G GEF-en át aktiválja a Rap1 molekulát [115]. Másrészt a Rap1 cAMP-függő módon is aktiválódhat, melyben az Epac1 játszik kulcsszerepet [116]. Továbbá, ahogyan korábban is említettem a LAD 3-as típusának hátterében a β_2-integrinek inside-out szignalizációjának sérülése áll, mely rámutatott a kindlin-3 folyamatban betöltött esszenciális szerepére [117,118].

A β_2-integrin outside-in szignalizáció hatására megjelenő különböző gyulladásos sejtválaszok (sejtszétterülés, szuperoxid-termelés, degranuláció stb.) ún. ko-aktiváció eredményeképp következnek be, mely során az integrin-ligand felszín mellett szükséges valamely gyulladásos citokin (pl. TNF) jelenléte is [119,120]. A β_2-integrin jelátviteli mechanizmusai a klasszikus immunreceptorokhoz (BCR, TCR, FcR) hasonló módon zajlanak [94,121]. A ligandkötést követően aktiválódnak az Src-családba tartozó kinázok (Hck, Fgr és Lyn), melyek genetikai hiányában a β_2-integrinen keresztüli neutrofil aktiváció elmarad [122-124]. Az Src-családba tartozó kinázok ITAM-motívumot tartalmazó adaptermolekulák (DAP12, FcRγ) tirozinjainak foszforilálásán keresztül vezetnek a Syk tirozin-kináz aktivációjához [124], mely szintén elengedhetetlen a neutrofilek integrinen keresztüli aktivációjához [120]. A jelátviteli

folyamatban a Syk tirozin-kináztól disztálisan helyezkednek el az SLP-76 [101], a PLCγ2 [102] és a Vav fehérjék [125].

A neutrofil granulociták β_2-integrin jelpályájának disztális szakasza, szemben a fentebb leírt proximális eseménysorral, sokkal kevésbé tisztázott. Irodalmi adatok alapján a sejtválaszok egy része (sejtadhézió, fagocitózis) az mAbp1 (mammalian actin-binding protein 1) molekulán keresztül jönnek létre [126], valamint felvetették az Abl-kináz [127] lehetséges szerepét is. Továbbá kiemelkedő szerepet játszanak ezen disztális jelátviteli szakaszban a Rho kis G-fehérje család tagjai. A kis G-fehérjék jellegzetes aktivációs ciklussal rendelkeznek. Az inaktív GDP-kötött formák guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) segítségével aktív GTP-kötött formákká változnak, míg azok inaktivációjában a GTP hidrolízist katalizáló GTP-áz aktiváló fehérjék (GAP-ok) játszanak szerepet. Annak ellenére, hogy számos kis G-fehérje szerepe bizonyított a neutrofil granulociták β_2-integrin jelátvitelében (például Rac1, Rac2, Cdc42, RhoA) [128-131], azok szabályozásáról viszonylag kevés adat áll rendelkezésre.

3.3.2.1 A p190RhoGAP szerepe az integrin jelátvitelben

A nem-hemopoetikus sejtekben zajló integrin-jelátviteli folyamatok egészéről jóval több információ áll rendelkezésünkre, mint hemopoetikus sejtek esetén. Ezekben a sejtekben az integrinről induló szignáltranszdukciós útnak szintén jelentős állomását képezik az Src-kinázok, melyek részben egy 190 kD nagyságó fehérje, a p190RhoGAP (Grlf1, ARHGAP35) segítségével szabályozzák a jelátvitelben részt vevő kis G-fehérjéket. Az integrin jelátvitelben betöltött szerepére utal többek között, hogy a p190RhoGAP fibroblasztokban és idegsejtekben jelentős Src-szubsztrátként viselkedik [132-134], továbbá képes a Rho kis G-fehérjék aktivációs ciklusában GTP-áz aktiváló fehérjeként viselkedni [135,136]. Mindemellett a fehérje hiánya csökkenti a fibroblasztok szétterülését és migrációs képességét, ellenben overexpressziója fokozza mind a szétterülést, mind a sejtek motilitását [137], illetve a p190RhoGAP az idegsejtekben a Rho GTPázon keresztül továbbítja az adhéziós jelet, mely a neurit-növekedésért felelős [134]. Ezen nem-hemopetikus sejtek esetében nyert adatok felvetik a p190RhoGAP szerepét a hemopetikus sejtek β_2-integrin jelátvitelében is. Az általunk vizsgált neutrofil granulocitákban a fehérje expresszálódik és különböző stimulusok hatására a citoszólból a sejtmembránhoz transzlokálódik [138], továbbá felmerül

szerepe a NADPH-oxidáz szabályozásában is [139], illetve a humán neutrofilekben az integrin keresztkötést követően a membránban lokalizálódik és fokozza a RhoA GAP aktivitását és egy p190RhoGAP-asszociált fehérje, a p120RasGAP tirozin foszforilációját [140].

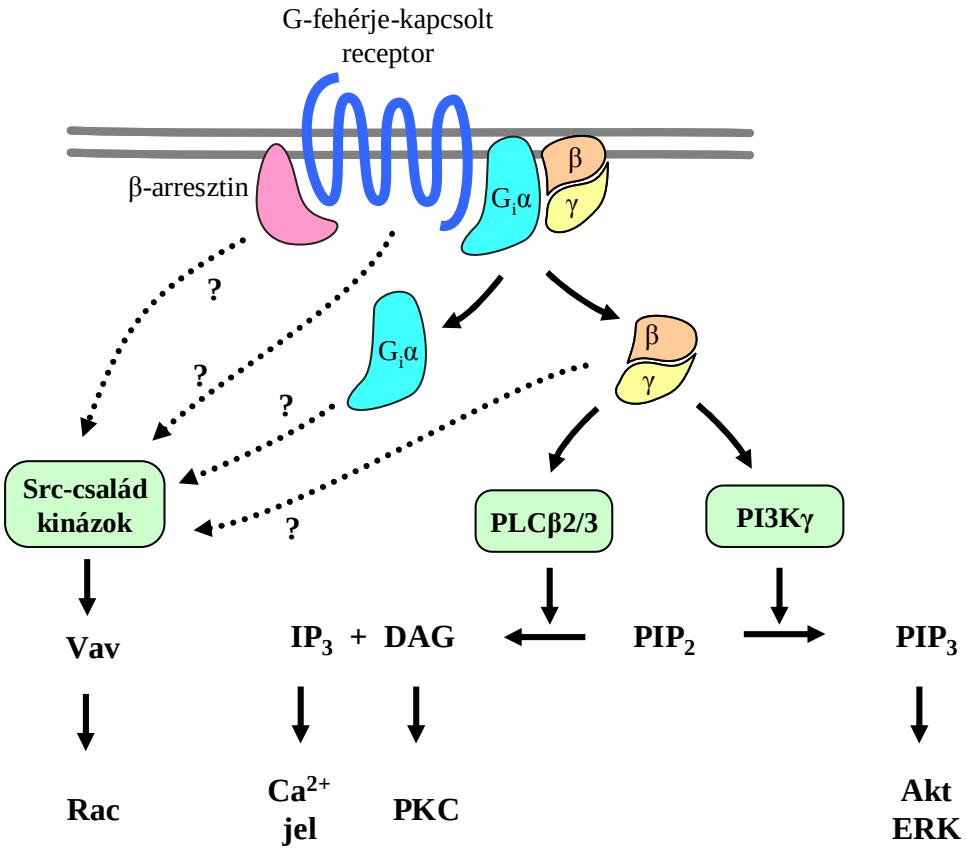
Míg a nem-hemopoetikus sejtekben (fibroblasztok, idegsejtek) a p190RhoGAP szerepe a sejtek integrin-jelátvitelében jól ismert, addig a hemopoetikus sejtekben funkciójuk kevésbé tisztázott, mely felveti további vizsgálatok szükségességét. A p190RhoGAP szerepét a neutrofil granulociták integrin-függő sejtválaszaiban munkatársam, Dr. Németh Tamás vizsgálta. Genetikai megközelítéssel nyert *in vitro* eredményei alapján elmondható, hogy a p190RhoGAP nem játszott elengedhetetlenül fontos szerepet többek között a neutrofil granulociták β_2-integrin-függő szuperoxid-termelésében, szétterülésében, migrációjában [I]. Felmerül azonban, hogy a p190RhoGAP a β_2-integrin-függő folyamatokon túl szerepet játszhat a neutrofil granulociták β_2-integrintől független jelpályáiban is, ennek tisztázására egyes β_2-integrin-független sejtválaszok vizsgálata vált szükségessé.

3.3.3 G-fehérjéhez kapcsolt jelátvitel neutrofil granulocitákban

A neutrofil granulociták számos a $G_{i/o}$ családba tartozó G-fehérje-kapcsolt receptort kifejeznek sejtfelszínükön, ezek legfőképp ún. kemoattraktáns molekulák (például a bakteriális eredetű fMLP, a lipid mediátor leukotrién B_4, különféle CXC és CC kemokinek, a komplementrendszerhez tartozó C5a, a vérlemezke aktiváló faktor PAF) felismerésére képesek [141-144]. A neutrofilek kemotaxisán kívül számos egyéb sejtválaszt kiváltanak (úgymint szuperoxid-termelés, degranuláció), illetve a kiváltott sejtválasz mértékét képesek fokozni a „priming effektus” révén [145-147].

A sejtválaszok kialakulásához vezető szignalizációs lépések a heterotrimer G-fehérje βγ alegységén keresztül zajlanak [148-150]. A GPCR-en keresztül kialakuló jelátvitel klasszikusan két útvonalon halad (7. ábra). Az egyik, a foszfolipáz-Cβ (PLCβ) molekulán (PLCβ2 és PLCβ3 izoformán) keresztül inozitol-trifoszfátot (IP3) és diacil-glicerint (DAG) generál, mely Ca^{2+} jelet, illetve a protein-kináz C (PKC) aktiválódását eredményezi, mely többek között a neutrofilek szuperoxid-termeléséhez vezet [151]. A másik jelátviteli út a szuperoxid-termelés mellett a kemotaxis létrejöttéért felel, ebben az esetben szintén a Gβγ alegységen keresztül a foszfatidilinozitol-3-kináz-γ (PI3Kγ)

segítségével foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát (PIP3) keletkezik, majd a jelátviteli út a protein-kináz B/Akt fehérjéken keresztül halad tovább [151-154]. A GPCR-en aktiválódó jelátvitel révén létrejövő fMLP-kiváltotta szuperoxid-termelés és granulum-ürítés megjelenésében kiemelkedő szerepük van a neutrofil granulocitákban expresszálódó Src-kinázoknak (Hck, Fgr, Lyn), ezt farmakológiai és genetikai megközelítéssel nyert adatok is alátámasztják [155-157], azonban a jelátviteli folyamatban betöltött helyük a mai napig tisztázatlan. Feltehetően a PLCβ és PI3K útvonalaktól függetlenül aktiválódnak közvetlenül a GPCR, vagy a hozzá kapcsolódó, adapter molekulaként funkcionáló β-arresztin által [158-160]. Ezzel szemben meglepő módon az Src családba tartozó kinázok a neutrofilek fMLP kiváltotta kemotaxisához nem szükségesek [120].



7. ábra: A neutrofil granulociták G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztüli jelátviteli folyamatai. (Forrás: [III])

Korábbi vizsgálatokban a szintén tirozin-kináz Syk szerepe ellentmondásosnak tűnt a G-fehérje-kapcsolt jelátvitelben [156,161,162], azonban a genetikai megközelítéssel nyert adatok alapján elmondható, hogy a Syk teljes genetikai hiánya

nem okoz károsodást ezen jelátviteli utakban, ezáltal feltehetően nem vesz részt a GPCR szignalizációban [163].

3.3.4 Citokin-receptorok jelátvitele neutrofil granulocitákban

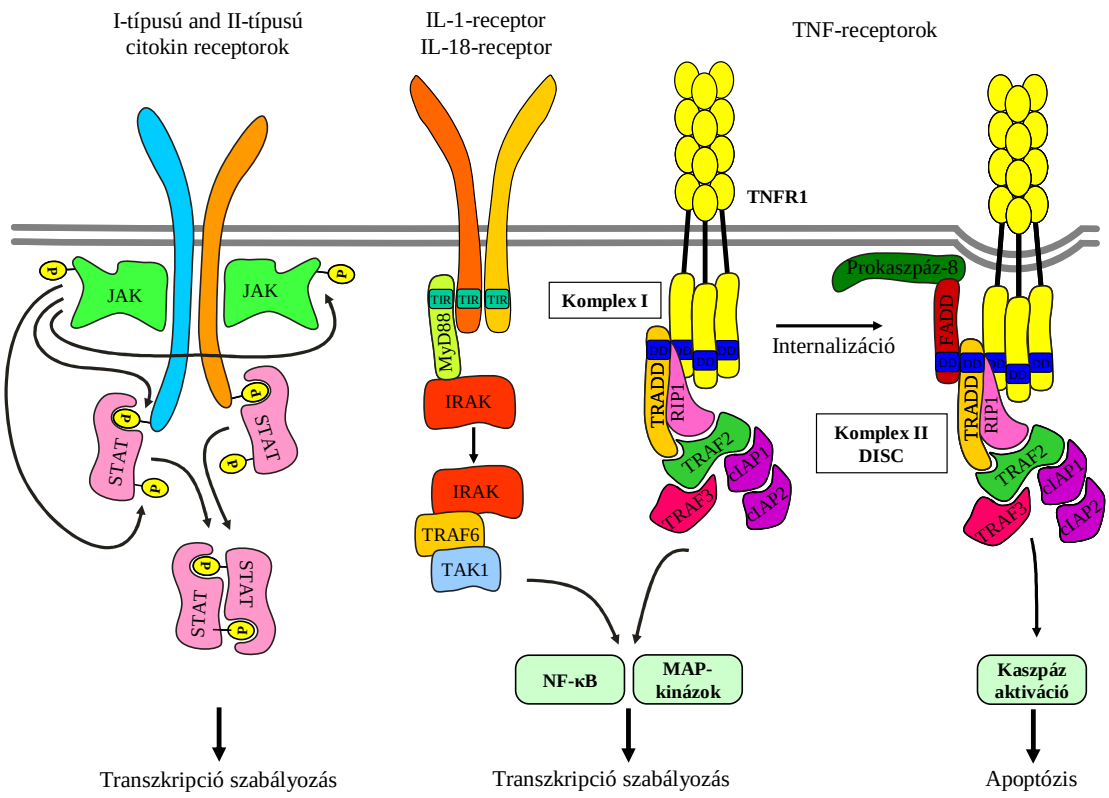
A humorális faktorként működő citokinek elengedhetetlen szereppel bírnak a különböző immunológiai válaszok kialakulásában a sejtek közötti kommunikáció létrehozásán keresztül. A neutrofilek sokféle citokin-receptort expresszálnak, úgymint a klasszikus citokin-receptorok, az IL-1 receptor család és a TNF receptorok (8. ábra).

A neutrofilek működésében szerepet játszó klasszikus citokin-receptorok közül kiemelkedő fontosságúak a differenciációban, túlélésben fontos G-CSF, GM-CSF receptorok [164], a neutrofilek aktivációjában szereplő IL-4 [165], IL-6 [166], IL-15 [167] citokineket és az interferonokat (IFNα/β és IFNγ) felismerő különböző sejtfelszíni receptorok [168,169] és a neutrofilek működését gátló IL-10 receptor [170]. Valamennyi klasszikus citokin receptor a JAK-STAT útvonalon szignalizál. A nem receptor tirozin-kinázok közé tartozó Janus-kinázok a receptor ligand kötését követően aktiválódnak, autofoszforilálódnak, illetve foszforilálják a receptor intracelluláris részén lévő tirozinokat, majd ezen tirozin helyeket felismerő, és ahhoz kapcsolódó STAT molekulákat. Ennek hatására a STAT molekulák dimerizálódnak és a sejtmagba transzportálódnak, ahol a megfelelő DNS szekvenciákhoz kötődve szabályozzák a génátíródást [171-173]. A receptorok ligandkötését követően további jelátviteli utak is bekapcsolódnak, többek között aktiválódnak az Src-családba tartozó kinázok [174-177], a PI3-kinázok [175,176], valamint az ERK és p38 MAP-kinázok [178].

Az IL-1 családba tartozó citokinek (IL-1α és IL-1β izoformák, valamint az IL-18) alapvető jelentőségűek a gyulladásos folyamatok vezénylésében. A neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásaik (túlélés fokozása [179], citokin- és szuperoxid-termelés [180]) a neutrofilek sejtfelszínén is expresszálódó receptoraikon (IL-1RI [181], a csapdareceptor IL-1RII [179] és az IL-18R [180]) keresztül érvényesülnek. Ezen receptorok az IL-1/Toll-like receptorok szupercsaládjába tartoznak, valamennyi rendelkezik az ún. Toll-IL-1 (TIR) doménnel. Ligandkötést követően intracellulárisan a TIR doménen keresztül MyD88 adapter molekulával kapcsolódnak, mely az IRAK-családba tartozó kinázok toborzásához és aktiválódásához vezet. Az IRAK kinázok az aktivációt követően disszociálódnak a receptorkomplexről és az E3 ubikvitin ligáz

TNFR asszociált faktor (TRAF) 6-al kapcsolódnak, mely auto-ubikvitinálódást követően a TAK1-gyel létesít kapcsolatot, és egyrészről aktiválja az IKK komplexet, ezáltal az NFκB-t, másrészről foszforilálja a p38 és JNK MAP-kinázokat, és ily módon vesz részt a génátíródás szabályozásában [182].

A tumor nekrózis faktor (TNF) receptorok két csoportba sorolhatók: a haláldoménnel rendelkező (pl. TNFR1, Fas), illetve haláldoménnel nem rendelkező TNF-receptorok (pl. TNFR2, LTβR, RANK). A neutrofil granulociták számos TNF-receptort expresszálnak: úgymint TNFR1 és TNFR2 [183], Fas receptor [184], TRAIL-receptorok (főként TRAIL-R2 és TRAIL-R3) [185], LTβR [186] és RANK [187].



8. ábra: A neutrofil granulociták citokin-receptorairól induló jelátviteli utak. (Forrás: [III])

A neutrofilek szempontjából kiemelkedő jelentőségű a proinflammatórikus hatással bíró a tumor nekrózis faktor α (TNFα), mely a neutrofilek aktivációjában és túlélésük szabályozásában is kulcsfontosságú citokinnek számít. A TNFα neutrofilek aktivációjához vezet, többek között szuperoxid-termelést, degranulációt vált ki, hatására nő a letapadt sejtek száma adherens körülmények között, fokozza a CD11b/CD18 integrinek sejtfelszíni expresszióját [119,188,189], valamint felerősíti egyéb stimulusok

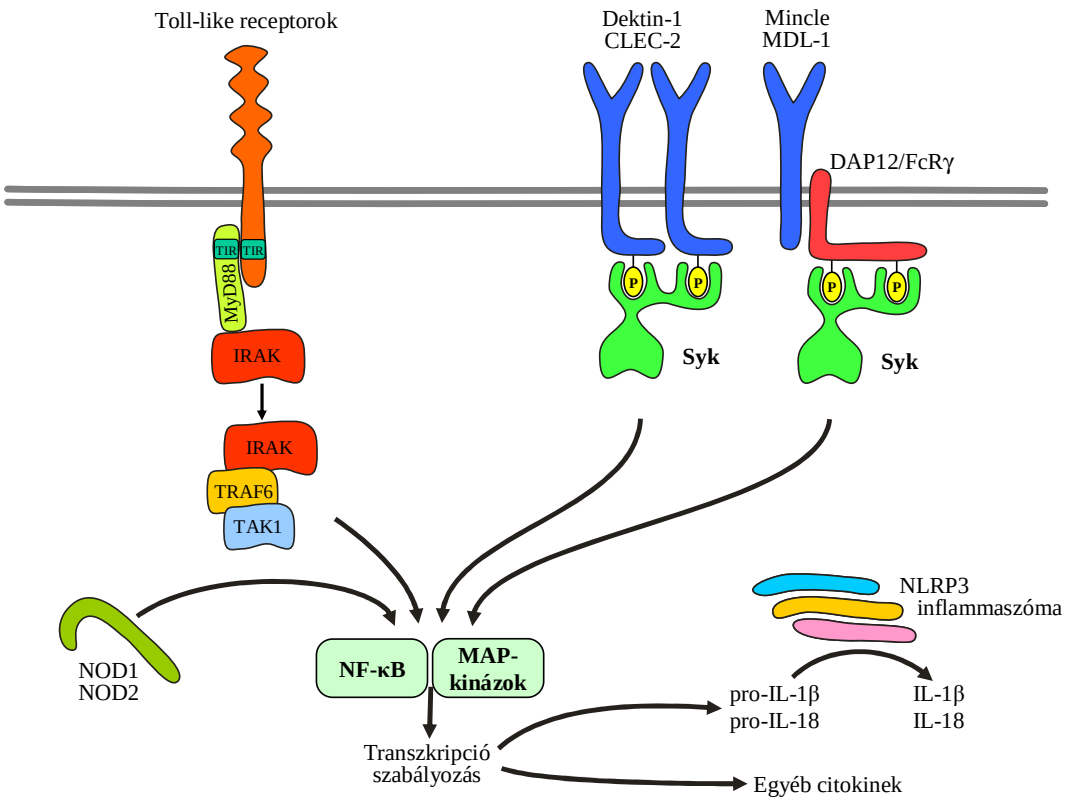
hatását a priming-effektus révén [190,191]. A TNFR1 és TNFR2 a ligandkötést követően homotrimerizálódnak, majd az intracelluláris adapter-molekulák kapcsolódásával létrehozzák a Komplex I-et (amely tartalmazza a TRADD, RIP1, TRAF, cIAP molekulákat), mely a MAP-kináz és az NFκB aktiváción keresztül anti-apoptótikus hatást generál, míg a haláldoménnel rendelkező TNFR1 képes a haláldoménjén keresztül a fentebb említett molekulákon túl a FADD és prokaszpáz-8 molekulával is kapcsolódni, és ezáltal létrehozni a Komplex II-t, másnéven DISC-et, mely kaszpáz-aktiváción keresztül proapoptótikus hatást közvetít [192,193]. A neutrofilekben a jelátvitelben részt vesz még a PKCδ, PI3K, az ERK és a p38 MAP-kináz is [194,195].

3.3.5 Mintázatfelismerő receptorok jelátvitele neutrofil granulocitákban

A veleszületett immunrendszer normális működéséhez elengedhetetlen a patogének, illetve a szervezetre veszélyt jelentő egyéb jelek felismerése. A természetes immunvédekezésben résztvevő sejtek, ahogyan a neutrofil granulociták is, számos, erre a feladatra szakosodott sejtfelszíni és intracelluláris receptort expresszálnak. Ezen ún. mintázatfelismerő receptorok (angol rövidítéssel PRR) a patogénekre vagy saját szövet károsodása nyomán keletkező veszélyt jelző molekulákra („danger signal”, úgymint például ATP, urát, DNS darabok) jellemző molekuláris mintázatok (PAMP-ok, DAMP-ok) felismerésére képesek. A neutrofil granulocitákra jellemző mintázatfelismerő receptorok közé tartoznak a Toll-like receptorok, a C-típusú lektin receptorok, a NOD-like receptorok, a RIG-like receptorok, illetve egyéb a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok családjába tartozó bakteriális eredetű peptidek felismerését végző receptorok (9. ábra).

A neutrofil granulociták szempontjából kiemelkedő jelentőségűek a Toll-like receptorok. A TLR3 kivételével a receptorcsalád valamennyi tagja expresszálódik, melyek a sejtfelszínen vagy a sejten belül, az endocitotikus kompartmenten jelennek meg [196]. A TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 és TLR6 elsősorban a sejtek felszínén expresszálódnak, és baktérium eredetű mintázatok felismerésére képesek. A TLR7, TLR8 és TLR9 inkább a sejt belsejében található kompartmenteken jelennek meg és nukleinsavakat ismernek fel (ideértve a virális duplaszálú RNS-t és a metilálatlan CpG DNS-t is) [197,198]. A Toll-like receptorok az IL-1 receptorokkal közös szupercsaládot alkotnak, így szignalizációjuk a korábban (az IL-1 receptoroknál) említett séma szerint

zajlik. Extracellulárisan tartalmazzák a mintázatfelismeréséért felelős leucin-gazdag régiót, intracellulárisan pedig a szignalizációért felelős Toll-like/IL-1 receptor (TIR) domént. A jelátvitel végső szakaszán az NFκB és MAP-kinázok aktivációján keresztül a gyulladásért felelős és az immunválaszban szereplő gének szabályozódnak [199] (9. ábra).



9. ábra: A neutrofil granulociták mintázatfelismerő receptorairól induló jelátviteli folyamatok. (Forrás: [III])

A szintén mintázatfelismerő C-típusú lektinek számos tagját expresszálják a neutrofilek (Dectin-1, Mincle, MDL-1, Mcl, CLEC2) [200-204]. A Dectin-1 a gombafal alkotó β-glukán felismerésére képes, ezáltal az egyik legfontosabb receptornak tekinthető a gomba-ellenes védekezésben [200]. A Dectin-1-re jellemző, hogy ITAM-szerű motívumot, ún. hemITAM-et tartalmaz a receptor citoszólikus részén. A ligand kötést követően a receptor dimerizálódik, ezáltal a hemITAM-ek funkcionális ITAM motívumként egy Fc-receptorhoz hasonló jelátvitelt indítanak be, melynek proximális szakaszán kulcsfontosságú a Syk, majd ettől disztálisan többek között a PLCγ2, a PKCδ, a CARD9-Bcl10-Malt1 komplex, melyek révén aktiválódik az NLRP3

inflammaszóma, az NFκB és az NFAT, melyek citokinek és kemokinek termelődésének szabályozását vezénylik [205] (9. ábra).

A NOD-like receptorok és RIG-like receptorok intracellulárisan ismerik fel a különböző kórokozókat és veszélyjeleket. A NOD-like receptorok esetén ez kaszpáz aktiváción keresztüli citokin-termeléshez [206], a RIG-like receptorok esetén interferon-termeléshez és antivirális gének kifejeződéséhez vezet [207].

A neutrofil granulociták jelátviteli mechanizmusainak rövid összefoglalója alapján elmondható, hogy sejtfelszíni receptorairól induló jelátviteli utak többnyire kináz-kaszkádokon keresztül vezetnek az effektor sejtválaszok megjelenéséhez. A neutrofil granulociták különböző jelpályáiban számos tirozin-kináz játszik esszenciális szerepet. Ezek közül az Src-típusú tirozin-kinázok elengedhetetlenek a neutrofilek integrin-mediált és G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztül zajló jelátviteli folyamataihoz [122,123,156,208]. A Syk tirozin-kináznak alapvető szerepe van a neutrofilek integrinek jelátvitelében [120], aktiválódik az Fc-receptorról induló szignalizáció során [209], valamint részt vesz egyes mintázatfelismerő receptoron – elsősorban a C-típusú lektin receptoron – keresztül létrejövő sejtválaszok kialakulásában [205]. Továbbá munkacsoportunk publikálás előtt álló eredményei alapján az Src-típusú tirozin-kinázok és a Syk tirozin-kináz részt vesznek a neutrofilek Fc-receptoron keresztül létrejövő sejtválaszaiban is. A neutrofilek integrin-mediált folyamataiban [127], szuperoxid-termelésében [210] és L-szelektin leválásában [211] farmakológiai megközelítéssel nyert adatok alapján leírták az Abl-kináz szerepét. Ezen túlmenően a neutrofilek citokin-receptor jelátvitelében kulcsfontosságúak a szintén nemreceptor tirozin-kinázok közé tartozó Janus-kinázok [171]. Különböző neutrofil-funkciókban a Tec-családba tartozó Bruton-féle tirozin-kináz szerepe is bizonyítást nyert [212]. Mindezek alapján felmerült a lehetősége annak, hogy ezen kinázokat megcélozva, azok gátlása révén gyulladásgátló hatással rendelkező vegyületeket azonosíthatunk, ezért doktori munkám során egy rendelkezésünkre álló kismolekulás kináz gátló vegyülettár elemei közül szűrővizsgálat segítségével gyulladásgátló hatással rendelkező vegyületeket kerestünk a neutrofil granulociták működésére gyakorolt hatásvizsgálat alapján. Majd az egyik leghatékonyabb vegyülettel, a dasatinibbel részletes *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat végeztünk.

3.4 A reumatoid artritisz

A saját antigénekkel szembeni immunválasz-hiány, az immuntolerancia károsodása következtében kialakuló autoimmun kórképek közül az egyik legnagyobb csoportot az autoimmun ízületi gyulladások alkotják. Az idetartozó reumatoid artritisz (RA) vagy a különböző spondilartritiszek komoly terhet jelentenek a betegeknek, a hozzátartozóknak, valamint a direkt és indirekt költségeken keresztül a társadalomnak [213]. Az RA a nyugati populáció 0,5-1 %-át érintő szisztémás autoimmun betegség, mely az ízületek krónikus gyulladása révén komoly ízületi funkcióvesztéshez és deformitáshoz vezethet [214,215]. Az RA tipikusan a kéz kisízületein (a proximális interfalangeális és a metakarpofalangeális ízületekben) indul gyakran lappangó formában, poliartikuláris kezdettel. A betegségre jellemző a szinoviális gyulladás és a hiperplázia, valamint a következményes porc- és csontdestrukció, mely megfelelő kezelés nélkül irreverzibilis funkciókárosodásokat okozhat [216]. Az ízületi érintettségen kívül azonban RA-ban szenvedő betegekben megjelenhetnek különböző extraartikuláris manifesztációk is, így például tüdőfibrózis, mellhártya-gyulladás vagy vaszkulitisz [217,218]. Ezeken túlmenően RA-ban gyakoribb a kardiovaszkuláris megbetegedés: a szívinfarktus, a stroke vagy a szívelégtelenség, melyek komoly szerepet játszanak abban, hogy a páciensek várható élettartama több évvel elmarad az átlagpopulációétól [219]. A miokardiális infarktus kialakulására RA esetén például 1,5-2-szeres a rizikó a normál populációhoz viszonyítva, mely összevethető a 2. típusú cukorbetegség által jelentett kockázattal [220]. Mindezek együttesen rámutatnak a korai és agresszív terápia fontosságára, mely az ízületi funkciókárosodásokat, valamint a szisztémás gyulladás okozta szövődményeket hivatott megelőzni. Ebben kulcsszerepet játszanak a betegség-módosító antireumatikus „bázisterápiás” szerek (disease-modifying antirheumatic drug, DMARD; a legújabb nomenklatúra szerint konvencionális szintetikus DMARD, csDMARD [221]), melyek közül az aranystandard a metotrexát [222]. Amennyiben egy DMARD 3-6 hónapon belül sem mutat lényegi gyulladáscsökkentő hatást, akkor egy újabb bázisterápiás szerrel érdemes próbálkozni és/vagy biológiai terápiát javasolt bevezetni [222]. A biológiai terápiák során egy endogén molekulára (például a TNFα-ra, az IL-6-ra, a CD20-ra stb.) specifikus antitestet vagy receptor-antitest fúziós fehérjét juttatnak parenterális módon (szubkután

vagy intravénásan) a szervezetbe, mely a target hatásának semlegesítéséhez vagy a markert a felszínén hordozó sejtek depléciójához vezet (ez utóbbira jó példa a B-sejtszám-csökkenést eredményező CD20-ellenes rituximab). A biológiai terápiák reumatológiában történő megjelenése szépen mutatja az elmúlt évtizedek komoly előrelépését az RA patomechanizmusának pontosabb megértésében, így a kórképben szereplő citokinek azonosításában. Ezek révén a terápiába bevezetett biológiai terápiák (így a TNF-inhibitorok) forradalmasították az RA kezelését [223]. Ugyanakkor a betegek egy része nem, vagy csak részben reagál a biológiai terápiákra, sokan rezisztenssé válnak a gyógyszerekre a kezelés során (például blokkoló antitestek termelése révén), továbbá nem lebecsülendők a mellékhatások sem (például a fertőzések iránti fokozott fogékonyság). Mindezek felvetik újabb gyógyszeres terápiák kifejlesztésének igényét. Egyes tirozin-kinázok patomechanizmusban betöltött szerepének tisztázása ráirányította a figyelmet a tirozin-kináz gátlók lehetséges terápiás szerként való alkalmazására.

3.5 Tirozin-kinázok és neutrofilek szerepe a reumatoid artritisz patomechanizmusában

3.5.1 A tirozin-kinázok és a reumatoid artritisz

Az RA kialakulásában és lefolyásában számos intercelluláris molekula szerepel, melyek közül kiemelkedő jelentőségűek a gyulladásos citokinek [223]. A citokinek parakrin mediátorként hatva kapcsolatot teremtenek a különböző immunsejtek között, ezáltal befolyásolva a sejtek működését. A természetes immunválasz sejtjei, így például a neutrofil granulociták sejtfelszínükön többféle citokin-receptort fejeznek ki: I-es és II-es típusú citokinreceptorokat (például az IL-6 vagy a G-CSF receptorát), IL-1-receptort, valamint TNF-receptorokat [III]. Ezek közül az I-es és II-es típusú citokinreceptorok jelátvitelében fontos szerepet játszanak egyes tirozin-kinázok, így például a Janus-kinázok, melyek a receptorok ligandkötésének hatására foszforilálják a receptort, ezáltal a transzkripciós faktor STAT molekulák aktivációját eredményezve [III]. A JAK-STAT útvonal számos, az RA patogenezisében kulcsszerepet betöltő citokin receptorának jelátvitelében is szerepel (például az IL-6-receptor szignalizációjában) [224]. Ennek klinikai jelentőségét szépen mutatja, hogy a JAK1 és a

JAK3 specifikus gátlószere, a tofacitinib hatékonynak bizonyult RA-s betegekben [28], mely alapján az FDA engedélyezte a tofacitinibet az RA kezelésére az Amerikai Egyesült Államokban 2012-ben.

Az immunreceptorok, egyes integrinek és mintázatfelismerő receptorok jelátvitelében szerepet játszó Syk tirozin-kináz az RA K/BxN szérum transzfer artritisz modelljében nélkülözhetetlennek bizonyult a gyulladás kialakulásában [225], mely hatásban részben a Syk neutrofilekben történő expressziója játszott szerepet [226]. A Syk tirozin-kináztól az immunreceptor jelátvitelben disztálisan elhelyezkedő Bruton tirozin-kináz (Btk) CGI1746 nevű inhibitorral történő gátlása pedig jelentősen csökkentette a kollagén-indukált artritisz kialakulását [227].

Mindezek az adatok jól mutatják, hogy számos tirozin-kináz szerepet játszik az autoimmun ízületi gyulladások kialakulásában, mely lehetőséget biztosít új kis molekulasúlyú inhibitorok kifejlesztésére és terápiás alkalmazására, ahogy azt a JAK-gátló tofacitinib RA terápiájában való megjelenése jól példázza.

3.5.2 A neutrofilek és a reumatoid artritisz

Több más immunsejt mellett a neutrofil granulociták is fontos résztvevői az RA-nak. Egyik kísérletes modelljében, a betegség effektor fázisának tanulmányozására használt K/BxN szérum transzfer artritiszben például a neutrofil granulociták antitesttel történő depléciója megakadályozta a gyulladás kialakulását [228]. Ezen kísérletek alapján a neutrofilek nem csupán a betegség beindításában jeleskednek, hanem a későbbiekben is jelentős kóroki tényezők, amennyiben nem csupán az artritogén szérum beadása előtti neutrofil-depléció bizonyult hatékonynak, hanem a szérum-kezelést követő napok során alkalmazott is [228]. Ezekkel az adatokkal összhangban vannak a neutrofil-hiányos Gfi-1 knockouttal, illetve a Foxo3a-hiányos egereken mért artritiszes kísérletek [229,230]. A Gfi-1$^{-/-}$ hemopoetikus sejtekkel végzett kevert csontvelői kimérák segítségével pedig feltételezhető, hogy az aktiváló Fcγ-receptorok, a kemotaxisban fontos C5a-receptor, valamint a migrációban lényeges LFA-1 molekulák a neutrofil granulociták felszínén (is) elengedhetetlenek a kísérletes artritisz kialakulásához [229].

A kísérletes adatokon túlmenően azonban humán megfigyelések is alátámasztják a neutrofilek szerepét RA-ban. Így az érintett ízületek szinoviális

folyadékában nagy mennyiségben találhatók neutrofilek [231]. Ezek a perifériára vándorolt sejtek jellegzetes aktivációs fenotípust mutatnak, amennyiben megjelenik plazmamembránjukban a nagy affinitású Fcγ-receptor I [232]. A gyulladt ízületekben ezen túlmenően számos olyan mediátor található, mely részben a neutrofilekből származhat, illetve rajtuk fejti ki hatását [233].

A tirozin-kinázok és a neutrofilek autoimmun ízületi gyulladásban betöltött szerepe alapján logikusan következett, hogy amennyiben a dasatinib érett polimorfonukleáris sejteken *in vitro* körülmények között hatékonynak bizonyult, megvizsgáljuk az inhibitor hatását neutrofil-dependens autoimmun gyulladásos modellben, a K/BxN szérum transzfer artritiszben, továbbá egy másik immunkomplex-mediált gyulladásos állatmodellben is, a reverz passzív Arthus-reakcióban.

4. CÉLKITŰZÉSEK

PhD-munkám során az alábbi öt témakörrel foglalkoztam:

1. Egy hierarchikus felépítésű, kismolekulás kináz-gátló vegyülettár viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálata humán neutrofil granulocitákban

2. A kismolekulás tirozin-kináz gátlószer, a dasatinib részletes hatásvizsgálata érett humán neutrofil granulociták sejtválaszain *in vitro* körülmények között

3. A dasatinib hatásának vizsgálata *in vivo* kísérletes gyulladásos betegség-modellekben (K/BxN szérum-transzfer artritiszben és Arthus-reakcióban)

4. A neutrofilekben expresszálódó Src-kinázok (Hck, Fgr, Lyn) szerepének vizsgálata Arthus-reakcióban

5. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata a neutrofil granulociták β_2-integrintől független degranulációs folyamataiban.

5. MÓDSZEREK

5.1 A neutrofil granulociták izolálása

5.1.1 Humán neutrofil granulociták preparálása

A humán neutrofil granulociták preparálása egészséges önkéntes donorok perifériás véréből történt. A vénás vért vákummentes körülmények között, 18 G-s tű segítségével (végkoncentrációban 0,2 % heparint tartalmazó) PBS-oldatba „csepegtetve” nyertük. A preparálás Ca^{2+}- és Mg^{2+}-mentes oldatban, endotoxin-mentes környezetben, szobahőmérsékleten zajlott. A vörösvértestek ülepítése a levett vérhez adott 0,4% dextrán 500 (Sigma) oldat segítségével 20 perc alatt történt. Az ülepítést követően a fehérvérsejt-gazdag felülúszót („buffy coat”) centrifugáltuk, majd a neutrofil granulocitákat Ficoll gradiensen (GE Healtcare) centrifugálva szeparáltuk a többi fehérvérsejttől (monocitáktól, limfocitáktól). Ezt követően a maradék vörösvérsejtet hipotóniás (0,2%) nátrium-klorid oldattal lizáltuk, majd a tonicitást azonos mennyiségű 1,6%-os sóoldattal állítottuk helyre. Kétszeri mosást követően a sejteket Ca^{2+}- és Mg^{2+}-mentes 20 mM HEPES-t (Sigma) tartalmazó HBSS (Hank’s Balanced Salt Solution; pH=7,4), rövidítve HBSS/H-oldatban szuszpendáltuk, és a kísérletek végrehajtásáig szobahőmérsékleten tároltuk.

A sejtek életképessége 99% feletti volt és a protokoll alapján nyert sejtek legalább 98%-a neutrofil granulocitákra jellemző sejtmorfológiát mutatott.

5.1.2 Egér neutrofil granulociták preparálása

Az egér neutrofil granulociták preparálása egér csontvelőből történt szobahőmérsékeleten, endotoxin-mentes oldatok felhasználásával. A kísérleti állatok cervikális diszlokációját követően comb- és lábszárcsontjaikat Ca^{2+}- és Mg^{2+}-mentes HBSS/H-oldattal mostuk ki, majd centrifugáltuk, és a fent említett módon a vörösvértesteket hipotóniás lízissel távolítottuk el. A neutrofil granulociták többi csontvelői fehérvérsejt-populációtól való elkülönítéséhez 62%-os Percoll gradiensen (GE Healthcare) keresztül nagy sebességgel centrifugáltuk a sejtszuszpenziót. A centrifugálást követően a neutrofil granulociták a cső alján, a Percoll-oldatban képződő sejtfelhőben jelentek meg, míg a többi sejt (többek között monociták, limfociták) a

HBSS/H- és Percoll-oldat fázishatárán gyűlt össze. Többszöri mosási lépést követően a neutrofil granulocitákat felhasználásig Ca^{2+}- és Mg^{2+}-mentes HBSS/H-oldatban tároltuk szobahőmérsékleten. Az egér neutrofil preparátum tisztasága 90% feletti volt, a sejtek életképessége korábbi eredmények alapján 98% felettinek adódott [120].

5.1.2.1 Kísérleteimhez használt egértörzsek, csontvelői kimérák

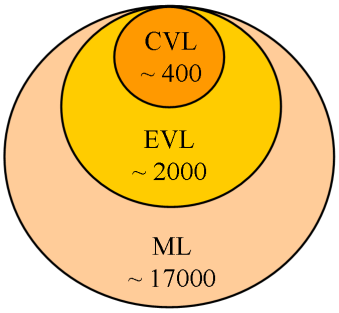
A p190RhoGAP szerepének vizsgálatához egy p190RhoGAP mutáns allélt (*Grlf1*^{tm2JSet}, továbbiakban p190RhoGAP^{-}) hordozó egértörzset használtunk, melyet Jeffrey Settleman és munkacsoportja hozott létre. A mindkét aléllon mutáns allélt hordozó egyedek (*Grlf1*$^{tm2JSet/tm2JSet}$, vagy p190RhoGAP$^{-/-}$) perinatális letalitása miatt kísérleteinket heterozigóta állatok időzített terhességéből származó 15-18 napos donor embriók fötális májának letálisan besugárzott recipiens egyedekbe való transzplantációjával nyert csontvelői kimérákon végeztük [I]. Az integrin-függő vizsgálatokhoz CD18-hiányos (*Itgb2*$^{tm2Bay/tm2Bay}$, a továbbiakban CD18$^{-/-}$) egereket használtunk, melyek Arthur Beaudet-tól származtak [234]. A neutrofil granulocitákban expresszálódó Src-kinázok (Hck, Fgr, Lyn) hiányának vizsgálatához mindhárom Src-kinázra nézve génhiányos (*Hck*^{tm1Hev}, *Fgr*^{tm1Hev}, *Lyn*^{tm1Sor}, továbbiakban Hck^{-}, Fgr^{-}, Lyn^{-} mutációkat homozigóta formában hordozó, azaz Hck$^{-/-}$Fgr$^{-/-}$Lyn$^{-/-}$ egereket használtunk, melyeket Clifford A. Lowell munkacsoportja hozott létre [235]. Vad típusú kontrollként genetikai módosításoktól mentes C57BL/6 egereket alkalmaztunk, melyek a Charles Rivers-től származtak. Az autoantitest-indukált artritisz (K/BxN szérum transzfer artritisz) modell kivitelezéséhez használt háttérkolóniának számító transzgénikus T-sejt receptort hordozó (KRN) egértörzs Diane Mathis és Christophe Benoist laboratóriumából (Harvard Egyetem, Boston, USA) származott, míg a NOD egereket a Jackson Laboratory-tól vásároltuk. Az autoreaktív T-sejt receptort hordozó egyedek azonosítása PCR technikával történt. Valamennyi általunk használt génhiányos egértörzs C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkezett.

A kísérleteimben szereplő valamennyi egeret egyedileg szellőztetett ketrecekben, konvencionális körülmények között tartottuk.

5.2 A kináz-gátló vegyülettár felépítése

A viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatokhoz használt kináz-gátlók a Vichem Kft. jelenleg közel 30.000 molekulát tartalmazó hierarchikusan felépülő vegyülettárának tagjai (Nested Chemical Library™) [236].

A racionális gyógyszertervezés alapját adó vegyülettár magját a 110 core-struktúra (alapstruktúra) köré épülő közel 400 anyagot tartalmazó validációs (Chemical Validation Library – CVL) és a közel 2000 vegyületet tartalmazó kiterjesztett validációs vegyülettár (Extended Validation Library – EVL) adja (10. ábra). A core-struktúra jelenti azt a szerkezeti alapvázat, melynek megléte feltétlenül szükséges a biológiai hatás megjelenéséhez. Ezen alap struktúrák köré épülő CVL és EVL olyan kináz-gátló molekulákat tartalmaz, melyek a leghatékonyabb kináz-gátló molekulákként ismertek a szakirodalomban, megbízható hatástani adatok állnak rendelkezésünkre működésükről, és közülük több klinikumban használt és/vagy klinikai és preklinikai vizsgálatok fókuszában áll. Ezek a molekulák lehetővé teszik az általuk gátolt célmolekula bizonyos biológiai (kór-) folyamatokban betöltött szerepének megerősítését, továbbá kiindulópontjai lehetnek további analógok szintézisének, melyek fókuszált alkönyvtárak létrehozásával növelik az alapvegyülettár diverzitását. Nem utolsósorban ezek a validációs gátlószerek virtuális gyógyszertervezési modelleknek válhatnak az alapjaivá, melyek a gyógyszertervezés kezdeti szakaszában új vezérmolekulák virtuális felkutatásának lehetőségét adják. A CVL és EVL könyvtárakban szereplő molekulák köré tervezett új molekulákat és analógokat is magában foglalja a hozzávetőlegesen 17000 molekulát tartalmazó mester-könyvtár (Master Library; ML). (A molekulatár folyamatosan bővül az újabb validációs molekulák, illetve a saját, Vichem Kft. által szintetizált molekulák megjelenésével.)



10. ábra: A Vichem Kft. kismolekulás kináz-gátlókból álló fókuszált vegyülettárának felépítése. (Sematikus ábra)

A vegyületek tisztasága 98% feletti, melyet tömegspektrometriás (LC-MS), illetve analitikai nagyfelbontású folyadékkromatográfiás (HPLC) vizsgálatokkal igazoltak.

5.3 A neutrofil granulociták gátlószerrel történő előkezelése

Az inhibitorok a folyadék állapotú vegyülettárban 100% DMSO (Sigma) oldatban 5 mM koncentrációban vannak oldva. A viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatokban a sejtek előkezeléshez a gátlószerek folyadék-vegyülettárból történő kiválogatását és előhígítását egy a Vichem Kft. tulajdonában lévő Tecan Freedom EVO 150/4 folyadékkezelő robot végezte, egy sokcsatornás pipettázásra kifejlesztett 1,1 ml-es polipropilén csöveket (Continental Lab Products) tartalmazó (96-lyukú lemeznek megfelelő kiosztással rendelkező) állványban. Az előhígítás a sejtek assay-médiumában (Mg^{2+}-mentes HBSS/H-oldatban) történt. Ezt követően a neutrofil granulocitákat 0,5 mM Ca^{2+}-ot és 125 μM ferricitokróm c-t tartalmazó HBSS/H-oldatban szuszpendáltuk, és adtuk az előzőleg állványzatban előkészített, előhígított gátlószeres oldatokhoz. A mérést 10^6/ml sejtkoncentrációban végeztük, a 10 μM koncentrációban jelenlevő gátlószereket és a kontrollként használt 0,2% DMSO (vivőanyag) oldatot, illetve 1 μM staurosporint tartalmazó minták mellett. Az előinkubálás 37°C-on 30 percig zajlott.

A további dasatinibbel végzett mérések kivitelezéséhez a (> 99% tisztaságú dasatinibet a Selleck Chemicals-tól vásároltuk, tisztaságát a Vichem Kft. HPLC-MS módszerrel megerősítette. A dasatinibet szintén DMSO-ban oldottuk, így a dasatinibbel kezelt minták ≤0,01% DMSO-t tartalmaztak, a dasatinib-mentes kontroll mintákhoz 0,01% DMSO-t adtunk. A neutrofil granulociták a nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatnál leírtak szerint ebben az esetben is 0,5 mM Ca^{2+}-ot tartalmazó HBSS/H oldatban lettek szuszpendálva, és a különböző koncentrációban lévő gátlószer, illetve a kontrollként használt vivőanyag jelentétében a sejteket 37°C-on 30 percen át előinkubáltuk.

A sejtek életképességét és a bazális apoptózis mértékét (Cell Lab Annexin V-PE ApoScreen Kit (Beckman-Coulter) segítségével mérve) a 6 órán keresztül, 1 μM koncentrációban alkalmazott dasatinib nem befolyásolta (nem mutatott eredmények).

5.4 A viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatok kivitelezésénél használt Z-faktor analízis

A nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatok minőség ellenőrzésére használják a Z-faktor analízist, mely a pozitív és a negatív kontrollok értékeiből és szórásaiból számolt paraméter. A számoláshoz használt képlet a következő:

$$Z = 1 - \frac{3 \times (\text{pozitív kontroll szórása} + \text{negatív kontroll szórása})}{\text{pozitív kontroll} - \text{negatív kontroll}}$$

Maximális értéke 1 lehet, nincs minimális érték, tehát negatív értéket is felvehet. Rendszerünkben a pozitív kontrollok a vivőanyagot, 0,2% DMSO-t tartalmazó minták, míg a negatív kontrollok a teljes gátlást okozó staurosporinnal kezelt minták voltak. Ezek adott kísérletben felvett értékeiből és szórásaiból számoltuk a Z-faktorokat. A Z-faktor analízist általában *in vitro* sejtmentes assay-rendszerre vonatkoztatva értékelik, a szigorú kritériumokat az értékelhetőséget figyelembe véve tapasztalati úton határoztuk meg a sejtes rendszerünkben. Ez alapján az általunk számolt Z-faktorok alapján a méréseket a következő kategóriákba soroltuk: 0,5 felett kiváló mérés, 0,3 és 0,5 között jó mérés, 0,3 alatt gyenge mérés, mely legfeljebb egyedi esetekben értékelhető. A bemutatott eredmények értékeléseibe csak azokat a méréseket vettük figyelembe, melyek esetén a Z érték meghaladta a 0,3 értéket.

5.5 Neutrofil granulociták aktivációja

A vizsgálatok nagy részében a sejteket lemezeken aktiváltuk, ehhez a szűrővizsgálatokban 384-lyukú Nunc MaxiSorp lemezeket, ezen kívül 96-lyukú Nunc MaxiSorp lemezeket, vagy szövetkultúra lemezeket (BD BioSciences) használtunk. Az **adhézió-függő aktivációhoz** a kísérletek során a lemezek aljának fedéséhez PBS-ben 150 μg/ml humán fibrinogént (Fbg; Calbiochem) vagy 10% FCS-t (Invitrogen) tartalmazó oldatot használtunk, és szobahőmérsékleten az oldatokkal 30 percet inkubáltuk a lemezeket, majd a kísérletek megkezdése előtt a lemezeket HBSS oldattal mostuk. A humán neutrofil granulocitákat 20 ng/ml humán TNFα (Peprotech), 50 ng/ml humán C5a (R&D Systems), 1 μg/ml Pam_3CSK_4 (EMC Microcollections), 1 μg/ml tisztított (ultrapurified) lipopoliszacharid (továbbiakban upLPS; InVivoGen), vagy 100

nM forbol-12-mirisztát-acetát (PMA; Sigma-Aldrich) segítségével aktiváltuk [102,120,122], [I]. A szolubilis agonista nélküli adhézió-függő vizsgálatainkban egyrészt humán monoklonális integrin ellenes antitestet (anti-CD18; IB4 klón), illetve izotípus kontrollját (K9 klón) immobilizáltuk 20 μg/ml koncentrációban karbonát-pufferben (35 mM $NaHCO_3$ és 15 mM Na_2CO_3; pH 9,6) a lemez felszínéhez, majd 10% FCS tartalmú PBS-oldattal blokkoltuk az így létrehozott felszínt, mielőtt a sejteket ráhelyeztük aktiválás céljából. Másrészt polivalens integrin-ligand felszínre helyezve a neutrofileket, azok szintén további szolubilis agonista nélkül képesek aktiválódni. Ez esetben a lemez felszínét 20 μg/ml poly-RGD-tartalmú (Sigma-Aldrich) PBS-oldattal kezeltük elő [102,120,237]. **Immunkomplex aktiváció** esetén az immobilizált immunkomplex felszín létrehozásához 20 μg/ml humán laktoferrint (LFR; Sigma-Aldrich; 1 óra, szobahőmérséklet) helyeztünk az ELISA lemezek furataiba karbonát-pufferben (pH 9,6), majd az aspecifikus kötőhelyek elfedésére a felszínt blokkoltuk (blokkoló puffer: 10% FCS PBS-ben; 1 óra, szobahőmérsékleten), majd ezt követően 1:400 arányban blokkoló pufferben hígított poliklonális nyúl anti-humán laktoferrin antitestet (anti-LFR; Sigma-Aldrich; 1 óra, szobahőmérséklet) adtunk a felszínhez. A laktoferrin degranuláció méréseknél az immunkomplex felszín létrehozásához 20 μg/ml humán szérum albumint (HSA; Sigma-Aldrich) és anti-humán szérum albumin antitestet használtunk (1:400 hígítás; anti-HSA; Sigma-Aldrich) a laktoferrinnél leírt módon. A jelátviteli folyamatok vizsgálatánál a sejteket 24 lyukú szövetkultúra lemezeken, vagy 6 cm átmérőjű Petri-csészékben aktiváltuk, ez esetben a felület fehérje-kötőképességének növeléséhez az immunkomplexek létrehozása előtt további előkezelésre volt szükség. PBS-ben hígított 0,1 mg/ml poli-L-lizinnel (Sigma-Aldrich) inkubáltuk a felszínt 1 órán át szobahőmérsékleten, majd mosást követően 15 percig inkubáltuk 2,5% glutáraldehid oldattal (Sigma-Aldrich). Ezt követően többszöri mosás után használtuk a felületet immobilizált immunkomplex felszín létrehozásához. A sejtek felszínre helyezését mindenesetben megelőzte a felszín mosása HBSS-oldattal [89]. A neutrofilek adherens aktivációja minden esetben 1 mM $MgCl_2$-ot tartalmazó oldatban történt, a $MgCl_2$-ot közvetlenül az aktiváció előtt adtuk a sejtszuszpenzióhoz.

A neutrofil granulociták **adhéziótól független aktivációja** minden esetben Mg^{2+}-mentes környezetben, sejtszuszpenzióban történt polipropilén csövekben, vagy 10% FCS-sel fedett felszínen 20 ng/ml TNF, 1 μM fMLP (Sigma-Aldrich), 50 ng/ml

C5a, 100 ng/ml humán IL-8 (Peprotech), 50 ng/ml LTB_4 (Santa Cruz Biotechnology), 1 μg/ml Pam_3CSK_4, 1 μg/ml upLPS és opszonizálatlan, vagy hőinaktivált humán szérummal, vagy normál humán szérummal opszonizált 10 mg/ml zimozán (Sigma-Aldrich) segítségével. Az fMLP segítségével történő aktiválás esetén egyes esetekben 10 μM citokalazin B (Sigma-Aldrich) előkezelést is alkalmaztunk 30 percen át.

A egér neutrofil granulociták aktiválásához a humán neutrofil granulocitáknál leírtaktól eltérő módon 50 ng/ml egér TNFα-át (Peprotech), 10 ng/ml GM-CSF-et (Peprotech) és 3 μM fMLP-t használtunk.

5.6 A neutrofil granulociták sejtválaszainak mérése és biokémiai vizsgálatai

5.6.1 A neutrofilek szuperoxid-termelésének mérése

A neutrofil granulociták bizonyos stimulusok hatására szuperoxidot termelnek, melyet az esetek többségében spektrofotometriás módszerrel, citokróm c redukciós teszttel, illetve egy esetben luminometriásan mértünk. A citokróm c redukciós módszerrel történő mérés esetén az aktiválás előtt a sejtekhez 100 μM ferricitokróm c-t (Sigma-Aldrich) adtunk, majd a sejtek által az aktiváció hatására (amit a megfelelő felszínre helyezéssel különböző szolubilis stimulusok jelenlétében vagy anélkül értünk el) termelt szuperoxidot 2 percenként detektáltuk egy ELISA-leolvasó (Labsystems Multiskan Ascent multiplate reader; Thermo Fischer Scientific) segítségével több, mint egy órán át 37^oC-on. A méréshez 10^5 sejtet helyeztünk a 96-lyukú lemezek furataiba. A mérés során a sejtek által termelt szuperoxid szabadgyökök az oxidált ferricitokróm c-t redukált ferrocitokróm c-vé alakítják, mely szabad szemmel is látható színváltozással jár, és ez a redox-reakció fotométer segítségével jól követhető. A citokróm c elnyelési spektrumának vizsgálata során a redukció hatására 550 nm-es hullámhosszon egy elnyelési csúcs jelenik meg, ehhez képest a többi hullámhosszon mérve az elnyelés mértéke kevésbé függ a citokróm c redox-állapotától (Dr. Mócsai Attila mérése alapján). Ennek alapján méréseinket 550 nm-es mérő-hullámhosszon és 540 nm-es referencia-hullámhosszon végeztük. A mérő-hullámhosszon kapott abszorbancia értékekből levontuk a referencia-hullámhosszon kapott értékeket (a viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatokban levontuk a stimulálatlan kontroll görbe értékeit is), levontuk továbbá a „nulla” időpontbeli értéket, és a termelt szuperoxid

mennyiségét 10^6 sejtre vonatkoztatva ábrázoltuk [102,120]. A luminometriás módszerrel történő mérés esetén a sejtszuszpenzióhoz mérés előtt 50 μg/ml lucigenint (Sigma-Aldrich) adtunk, majd a lumineszcenciában bekövetkező változásokat Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent FL luminométerben detektáltuk több, mint egy órán keresztül 37°C-on.

5.6.2 A neutrofilek szétterülésének és letapadásának vizsgálati módszerei

A sejtszétterülést 24-lyukú lemezen vizsgáltuk. A 30 perces stimulációt követően 3,7%-os formaldehiddel fixált sejteken fáziskontraszt mikroszkópiával vizsgáltuk egy Leica DMI 6000B mikroszkóp segítségével (Leica Microsystems), 20x nagyítású fáziskontraszt objektívvel. A felvételeket a mikroszkóphoz csatlakoztatott Leica DFC480 CCD kamerával készítettük. Az aktiváció során szétterült, poligonálissá vált sejteket a lemezek furatainak három meghatározott lokalizációban lévő látóterében leszámoltuk és az adott látótérben lévő összes sejt számához viszonyítottuk.

A neutrofil granulociták letapadásának vizsgálata során szintén 30 percig aktiváltuk a sejteket 96-lyukú lemezeken, majd többszöri lemosást követően a lemez aljához tapadt sejteket savas foszfatáz assay segítségével mértük. A sejteket 10 μM pNPP-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó savas foszfatáz puffer (Triton, nátrium-acetát, ecetsav, pH 5,3) segítségével lizáltuk. Ezt követően egy tiszta 96-lyukú ELISA lemezre vittük át a mintákat, amiben 90 percig, 37°C-on inkubáltuk, majd az enzimreakciót 5 N nátrium-hidroxid oldattal állítottuk le, és a színreakciót fotométerben 405 nm-es hullámhosszon detektáltuk. A migrált sejtek arányát az adott kísérlethez tartozó kalibrációs görbe alapján határoztuk meg [120].

5.6.3 A neutrofilek degranulációs folyamatainak vizsgálatai

A **laktoferrin degranulációt** szendvics-ELISA módszerrel mértük. A sejtek felülúszóját 30 perces aktivációt követően gyűjtöttük, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk. A méréshez anti-humán laktoferrin antitesteket (1:1000) immobilizáltunk 96-lyukú ELISA lemezeken karbonát-pufferben 4°C-on egész éjszakán át. Ezt követően a felszínt blokkoltuk 0,5% BSA-t (bovine serum albumin; Sigma-Aldrich) és 0,1% Tween 20-at (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldattal 1 órán át szobahőmérsékleten. Majd a lemezeket a vizsgálni kívánt neutrofil-felülúszókkal, és a kalibrációs görbékhez

szükséges ismert koncentrációjú LFR-t tartalmazó oldatokkal inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően többszöri mosási lépés után peroxidáz-jelölt anti-LFR antitesttel (1:1000 hígításban) inkubáltuk a mintákat 1 órán át, szobahőmérsékleten. Többszöri mosást követően a peroxidáz-aktivitás detektálásához szubsztrátként o-feniléndiamint (Sigma-Aldrich) tartalmazó előhívó-oldatot (citromsav, Na_2HPO_4, H_2O_2, pH 5) használtunk (15 perc, szobahőmérsékleten), majd a reakciót 3 N sósavval állítottuk le, és az optikai denzitást fotométerrel olvastuk le 492 nm hullámhosszon. Az ürített laktoferrin mennyiséget a kalibrációs görbe alapján 10^6 sejtre vonatkoztatva ábrázoltuk [156].

A **zselatináz degranulációt** zselatináz zimográfia segítségével vizsgáltuk. A sejteket fMLP stimulus esetén 10 percig, a többi stimulus esetén 30 percig aktiváltuk, majd az ezután gyűjtött felülúszókat nem-redukáló mintapufferrel elegyítettük, és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A mintákat 1 mg/ml zselatin tartalmú 8%-os poliakrilamid gélen futattuk meg. A géleket futtatás után 2,5% Triton (Sigma-Aldrich) tartalmú oldatban renaturáltuk 30 percen át, szobahőmérsékleten, majd 14-16 órán át előhívó-oldatban (Tris-klorid pH 7,5, NaCl, 0,2% Triton X-100, $CaCl_2$) inkubáltuk 37°C-on. Ez idő alatt a felülúszó mintákban lévő zselatináz bontotta a gélben lévő szubsztrátját, melyet aspecifikus gélfestéssel (Coomassie) festődési hiányként detektáltunk [124].

5.6.4 Az intracelluláris jelátviteli folyamatok vizsgálatai

A jelátviteli folyamatok vizsgálatánál a sejteket szuszpenzióban 3 percig (fMLP), 5 percig (IL-8, C5a, LTB_4), 10 percig (TNF, Pam_3CSK_4, zimozán) és 20 percig (upLPS), illetve felszínhez kötötten 10 percig (immunkomplex) vagy 15 percig (TNF stimulus fibrinogénen, poly-RGD) aktiváltuk, majd egy radioimmunprecipitációs vizsgálatokhoz használt Triton X-100-alapú, 0,1% SDS-t és 0,5% deoxikolátot, valamint proteáz és foszfatáz inhibitorokat (aprotinint, proteáz és foszfatáz inhibitor komplexet, nátrium-ortovanadátot, PMSF-et, DFP-t) tartalmazó lízis pufferrel (RIPA) lizáltuk. Egyes esetekben a sejtlizátumok inszolubilis frakciójának centrifugálással történő eltávolítása után a mintákból 4D10 monoklonális anti-Syk antitesttel (Santa Cruz Biotechnology) precipitáltuk a Syk-et, majd az antigén-antitest komplexeket szefaróz-gyöngyökhöz kötött protein A/G (Invitrogen) segítségével nyertük ki [120],

majd (és egyéb esetekben közvetlenül) a centrifugálási lépést követően a mintákat redukáló (β-merkaptoetanolt is tartalmazó) mintapufferrel elegyítettük, ezt követően 10 percig 96°C-on főztük, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk. A mintákat poliakrilamid gélen futtatuk meg, majd foszfotirozin (PY; 4G10 klón, Millipore), foszfo-Syk (#2701 Cell Signaling Technology) p38 MAPK, ERK (Santa Cruz Biotechnology), foszfo-p38 MAPK, foszfo-ERK (Cell Signaling Technology) elleni antitestekkel, Western-blot technika segítségével hívtuk elő [102,120].

5.6.5 A neutrofilek migrációjának vizsgálata

A neutrofil granulociták migrációjának vizsgálatára Transwell-migrációs assay-t használtunk. A Transwell inzertek (Corning) alja 3 μm átmérőjű pórusokat tartalmazó polikarbonát-filter, melynek mindkét oldalát 10% FCS-t (PBS-ben) tartalmazó oldattal fedtünk (1 óra, szobahőmérsékleten). A neutrofil granulocitákat tartalmazó sejtszuszpenziókkal együtt az inzerteket egy 24-lyukú lemez furataiba helyeztük, melyek előzetesen már tartalmazták a kemoattraktánst tartalmazó oldatot (100 nM fMLP-t vagy 10 ng/ml IL-8-at). A Transwell-kamrát ezek után 60 percig 37°C-on inkubáltuk, majd a sejtválaszt jégen állítottuk le. Centrifugálás és az inzertek eltávolítását követően a filteren átvándorolt sejtek mennyiségét savas foszfatáz assay segítségével határoztuk meg (a letapadás vizsgálatoknál leírt módon) [120,124]. A migrációs kamrát oly módon módosítottuk egyes kísérleteinkben, hogy a sejtek inzertekbe helyezése előtt 100 μl nyolcszorosára hígított Matrigel (BD Biosciences) oldattal töltöttük fel, és a sejteket ezen át vándoroltattuk 3 órán át.

5.6.6 A baktériumölési-teszt

A neutrofil granulociták baktériumölési képességét egy baktérium túlélésen alapuló 96-lyukú lemezre adoptált protokoll segítségével vizsgáltuk [238]. A *Staphylococcus aureus* és *Escherichia coli* baktériumokat egészséges önkéntes donorok perifériás vérének kevert szérumával opszonizáltunk, majd 30 percen keresztül inkubáltuk neutrofil granulocitákkal (neutrofil:baktérium arány 1:10; mintavétel 10 perces időintervallumokkal). A mintavételt követően a sejteket 1 mg/ml saponin tartalmú 4°C-os HBSS-oldatban lizáltuk, ezt követően a mintákat -80°C-on tartottuk 20 percig, majd a mintákat jégen 96-lyukú lemezre osztottuk szét Luria-Bertani (LB)

táptalaj jelenlétében mintánként 4 párhuzamossal, és emellett a kiindulási baktériumokat tartalmazó szuszpenzióból párhuzamosan kalibrációs sort is készítettünk. A baktériumnövekedéssel párhuzamosan változó optikai denzitást ELISA leolvasó segítségével követtük nyomon 37°C-on 650 nm hullámhosszon percenként mérve 10 órán át. A kiértékelés alapja az a tény, hogy a mintákban lévő baktériumok kezdeti koncentrációja fordítottan arányos volt azzal az időtartammal (inkubációs idő, t_{ink}), mely alatt a baktérium koncentrációja elért egy megadott értéket, ideális feltételek között növesztett baktériumok esetén. Minden mintához rendelhettünk tehát egy inkubációs idő értéket, mely segítségével az ismert koncentrációjú baktérium mintákból kapott kalibrációs görbe alapján számoltuk a baktériumkoncentrációt az egyes mintákban. A mérés feltétele, hogy a baktériumok exponenciálisan szaporodó fázisban legyenek, vagyis a növekedési sebességük a mérés folyamán egyenletes maradjon. A kiértékeléshez használt képlet a következő: [baktérium]=f x $e^{g \times tink}$, ahol t_{ink} az inkubációs idő, *e* a természetes logaritmus alapja, *g* az egyenes meredeksége, és az *f* szorzófaktor.

5.7 Adhéziós vizsgálatok humán és egér neutrofil granulocitákon teljes szérum jelenlétében

A preparálási lépések elhagyásával a fehérvérsejtek (köztük főként a neutrofil granulociták) funkcióinak a fiziológiás körülményekhez közelebb álló vizsgálatát állítottuk be. Az egészséges önkéntes donorok perifériás véréből a vörösvértesteket 0,4% dextrán 500 (Sigma-Aldrich) segítségével ülepítettük, majd az így kapott fehérvérsejt-gazdag felülúszót további izolálási lépések nélkül kezeltük különböző koncentrációban dasatinibbel, majd ezt követően a felülúszót FCS-sel fedett 96-lyukú lemezre vittük, ahol a sejteket 20 ng/ml humán TNFα, 100 ng/ml humán C5a, 1 μg/ml Pam_3CSK_4, illetve 1 μg/ml upLPS jelenlétében aktiváltuk 30 percen keresztül 37°C-on. Az aktiváció hatására felszínhez tapadt sejtek mennyiségét többszöri lemosást követően a fentebb részletezett savas foszfatáz assay segítségével határoztuk meg.

A szájon át beadott dasatinib hatását kísérleti állatokon, C57BL/6 egereken végeztük. Az egereket különböző dózisú dasatinibbel kezeltük gyomorszonda segítségével. A beadáshoz a dasatinibet 1% hidroxietil-cellulóz tartalmazó vízben

szuszpendáltuk. A dasatinib beadását követően másfél órával heparinnal kezeltük, majd ezután fél órával altatás (2,5% tribromoetanol; Sigma-Aldrich) mellett a retroorbitális vénás plexusból üvegkapilláris segítségével kivéreztettük az állatokat. Az így nyert vér dextrános ülepítését követően a fehérvérsejt-gazdag felülúszót további izolálási lépések nélkül FCS-sel fedett lemezre helyeztük, és 50 ng/ml egér TNF segítségével aktiváltuk. Az adherens sejteket szintén savas foszfatáz assay-el határoztuk meg. Mind a humán, mind az egér perifériás vérből származó letapadt sejtek zöme a neutrofil granulocitákra jellemző morfológiát mutatott (nem mutatott adat).

5.8 A kísérleteim során alkalmazott *in vivo* gyulladásos állatmodellek

5.8.1 A KBxN szérum transzfer artritisz

A KRN transzgénikus „autoreaktív" T-sejt receptort hordozó, C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkező egértörzs és az „autoimmun" MHC II haplotípussal rendelkező NOD egerek keresztezésével nyertük a kísérleteinkhez használt (transzgén-pozitív, artritiszes) K/BxN, illetve a transzgént nem hordozó (transzgén-negatív, kontroll) BxN egereket [239]. A K/BxN utódokban spontán megjelenő poliartritisz jellemző (K/BxN artritisz), mely hisztopatológiáját tekintve hasonló a humán RA-hoz [102,239]. A spontán artritiszes utódok szérumával – mely gazdag glükóz-6-foszfát izomeráz (GPI) ellenes antitestekben – a betegség átvihető egészséges állatokra is (K/BxN szérum transzfer artritisz) [240].

A kísérleteink kivitelezéséhez három hónapnál idősebb K/BxN egyedektől vett vérből nyert szérumot felhasználásig -20°C-on tároltuk. A kísérletek indításához a transzgén-pozitív és -negatív szérumokat PBS-ben hígítottuk, majd 37°C-ra melegítve intraperitoneálisan (i.p.; egyedenként 300 μl szérum) adtuk be a kísérleti állatoknak a kísérlet 0. napján. Ezután 14 napon keresztül naponta megvizsgáltuk a kísérleti állatokat. Az ízületi gyulladás klinikai tüneteit súlyosságuk alapján 0-10-ig terjedő skálán pontoztuk, illetve a bokavastagság változását egy erre alkalmas mérőműszer segítségével követtük nyomon. Az ízületi funkció vizsgálatára az egereket 2 percen keresztül fejjel lefelé fordított rácson késztettük kapaszkodásra. Míg az egészséges állatok számára ez a feladat nem jelentett nehézséget, addig az ízületi gyulladás jeleit

mutató állatok néhány másodpercen belül elengedték a rácsozatot. A kapaszkodási-teszt során rácson maradt állatok arányát az idő függvényében ábrázoltam.

5.8.2 Reverz passzív Arthus-reakció

A fentebb bemutatott kísérletes *in vivo* autoimmun ízületi gyulladás állatmodellje mellett, vizsgálataink során egy mechanisztikusabb, szintén immunkomplex-mediált gyulladásos modellt, a reverz passzív Arthus-reakciót is alkalmaztuk [241,242]. A III. típusú hiperszenzitivitási reakciók közé tartozó reverz passzív Arthus-reakció kiváltásához a kísérleti állatoknak (a gátlószeres kísérletekben vad típusú C57BL/6 egereknek, míg a genetikai megközelítés esetén vad típusú, valamint $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ – Src-család KO – egereknek) anesztéziában (2,5% tribromoetanol; Sigma-Aldrich) 20 µl PBS-ben kétszeresére hígított poliklonális anti-ovalbumin antitesteket tartalmazó teljes antiszérumot (Sigma-Aldrich) injektáltunk a jobb fülük bőrébe (intradermálisan, i.d.). Ugyanilyen módon kontrollként a bal fülük bőrébe kétszeresére hígított nyúl szérumot fecskendeztünk. Közvetlenül ezt követően az állatok szisztémásan (intravénásan, i.v.) 0,4 mg ovalbumint (Sigma-Aldrich) kaptak. Két órával később az állatoknak i.v. 80 MBq ^{99m}Tc-jelölt humán szérum albumint adtunk be (Albumon HSA ^{99m}Tc labeling kit; Medi-Radiopharma). Majd újabb két órával később a kísérleti állatokat 10% uretán segítségével mély altatásba helyeztük, és a Mediso Kft. tulajdonában lévő NanoSPECT/CT készülékkel követtük nyomon a radioaktivitás szervezeten belüli eloszlását. Az adatokat VivoQuant (inviCRO) szoftver segítségével értékeltük. Az állatok fülének radioaktivitás értékeit a teljes fej radioaktivitására vonatkoztattuk.

5.9 A bemutatott eredmények prezentációja, statisztikai analízis

Az értekezésben bemutatott eredmények 3 vagy több egymástól független kísérletből származnak. A reprezentatív kísérletekben az adott méréshez tartozó párhuzamosok értékeinek átlagát és szórását (SD) ábrázoltuk. A kísérleteinkben minden esetben legalább két-három párhuzamos mérést végeztünk. A szuperoxid-termelés mérésénél a nulladik időpont, valamint a nem stimulált kontroll görbék levonásra

kerültek. Az immunblotok értékelésénél a denzitometriát ImageJ Launcher 1.38x szoftverrel végeztük.

A dózis-hatás görbéknél, illetve a sejtválaszok százalékos megadásánál a nem stimulált kontroll értékek levonásra kerültek, és az eredményt a DMSO-val (a gátlószer vivőanyagával) kezelt minták százalékában adtuk meg, a független kísérleteket átlagoltam, és az átlag hibáját (SEM) ábrázoltuk. A kinetikai mérések esetén a dózis-hatás görbe meghatározásához a 60. percben felvett értéket, vagy a luminometriás mérés esetén a görbe alatti területet vettük figyelembe. A dózis-hatás görbéknél feltüntetett maximális gátlás, illetve IC_{50} értékeket 4 paraméteres logisztikus függvény segítségével IBDS XLFit szoftver segítségével számoltuk.

A statisztikai analíziseknél (a kísérleti felállásnak megfelelően) Student-féle kétmintás t-próbát, vagy ismétléses kétfaktoros variancia-analízist végeztünk (Tukey-féle post hoc teszttel). A statisztikai kiértékelésekhez STATISTICA programot használtunk, ahol szignifikánsnak a $p<0,05$ értéket tekintettük.

6. EREDMÉNYEK

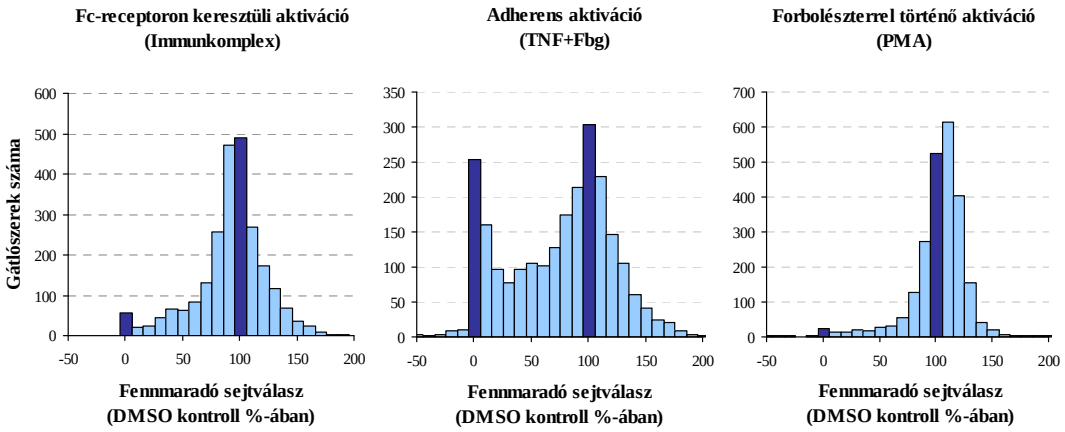
6.1 Egy kináz-gátló vegyülettár viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálata humán neutrofil granulocitákon

A gyulladásos betegségek kutatásának és az új gyulladásgátló vegyületek fejlesztésének egyik legígéretesebb területe a különböző kinázok szerepének a vizsgálata. A vizsgálataink középpontjában lévő célsejtek a gyulladásos folyamatok során létrejövő szövetkárosításban jelentős szereppel bíró fagocita-sejtek, a neutrofil granulociták voltak. A neutrofil granulociták effektor sejtválaszaihoz vezető (a bevezetőben részletesen tárgyalt) intracelluláris jelátviteli utak elengedhetetlen szereplői a különböző tirozin-kinázok. Ezen tirozin-kinázokat megcélozva új támadáspontú, a neutrofil granulociták sejtválaszait gátolni képes molekulákat kerestünk a Vichem Kft. által létrehozott fókuszált, kismolekulás kináz-gátló vegyülettárban. Ehhez egy viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálati rendszer beállítását és közel 2500 molekula tesztelését végeztük el.

A szakirodalom alapján *in vitro* szűrővizsgálatokban általánosan használt 10 μM koncentrációban vizsgáltuk a vegyülettár gátlószereinek hatását a neutrofil granulociták egyik jól mérhető sejtválaszára, a szuperoxid-termelésre. A sejtekre gyakorolt hatást két fiziológiás (Fc-receptoron keresztüli, illetve adhézió-függő aktivációs) rendszerben és egy nem-fiziológiás (forbol-észterrel történő) aktivációs rendszerben teszteltük. A gátlószerek jelenlétében fennmaradó sejtválasz mértékét, a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését spektrofotometriás módszerrel (citokróm c redukciós teszttel) követtük nyomon.

Az Fc-receptoron keresztüli aktiváció során a sejteket immobilizált immunkomplex (IC) felszínre helyezve modelleztük az immunkomplex-mediált autoimmun gyulladásos folyamatokat [89]. A neutrofilek adhézió-függő (adherens) aktivációja során egy gyulladásos citokin (TNFα) jelenlétében stimuláltuk a sejteket integrin-ligand felszínen (fibrinogén–Fbg), ezzel modellezve a gyulladásos környezetben megfigyelhető sejtaktiválódást [120,122]. A nem-fiziológiás (vagy szuprafiziológiás) rendszerben történő aktiválás során a protein-kináz C-t aktiváló forbol-észtert (PMA) használtuk, mely nemspecifikus mechanizmussal, az eddig vizsgált sejtfelszíni receptorok és kinázok jelenléte nélkül is képes létrehozni a

neutrofilek kifejezett aktiválódását [120,122,155]. Ezt a nem-fiziológiás aktivációt gátló vegyületek feltételezhetően alapvetően befolyásolják a sejtek életképességét vagy válaszkészségét. A kísérleteink során tehát olyan találati-, vagy „hit”-molekulákat kerestünk, melyek a fiziológiás stimulálási rendszerben képesek gátolni a neutrofilek sejtválaszait, de nem befolyásolják a nemspecifikus aktiválási rendszerben adott sejtválaszokat, azaz nem befolyásolják a sejtek életképességét, válaszadó képességét. A Vichem Kft. hierarchikus felépítésű, fókuszált vegyülettárának központi elemét adó úgynevezett validációs könyvtárát (EVL), illetve néhány további alkönyvtárát, összesen 2417 molekulát teszteltünk le átlagosan 1,6-szoros ismétlésszámmal, az *in vitro* neutrofil granulociták szuperoxid-termelésének mérésén alapuló assay-rendszereinkben, melyek összesített eredményét az 11. ábra mutatja.



11. ábra: Az általunk vizsgált kináz-gátló vegyületek hatásának megoszlása a különböző stimulálási rendszerekben. (10 μM gátlószer koncentráció, Z>0,3, a 0±5%-os és a 100±5%-os válaszképességi tartományok külön kiemelve)

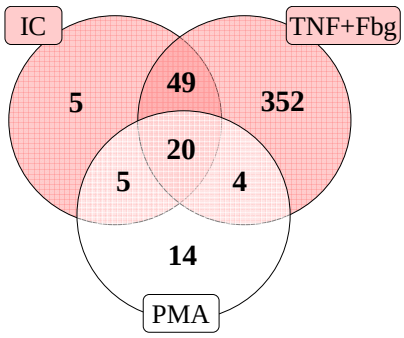
A gátlószerek hatásának jellemzésére hisztogram x-tengelyén ábrázoltuk a gátlószerekkel kezelt sejtek által mutatott fennmaradó sejtválaszoknak a vivőanyag (DMSO) jelenlétében mért sejtválaszhoz viszonyított százalékos megoszlását. Az ábra oszlopai az adott értékhez képest ±5% tartományba eső fennmaradó sejtválaszt eredményező gátlószerek számát ábrázolják. Az áttekinthetőség kedvéért külön kiemelten szerepeltettem a 100±5%-os (nincs gátlás) és a 0±5%-os (teljes gátlás) sejtválasz tartományba eső oszlopokat. Az általunk letesztelt gátlószerek többsége a 100%-os fennmaradó sejtválaszt eredményező inhibitorok megoszlási csúcsába esett mindhárom aktiválási rendszerben, azaz ezen inhibitorok nem gátolták az egyes

aktiválási rendszerekben a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését. Mindhárom rendszerben kirajzolódott egy, a vivőanyaggal kezelt kontroll sejtek (100%-os sejtválasz, nincs gátlás) sejtválaszainál nagyobb sejtválaszt eredményező gátlószercsoport. Ezt egyrészt magyarázhatja a sejtválaszokat nem gátló vegyületekkel (100%-os sejtválasz) történő mérések nagy szórása, mely szinte elkerülhetetlen ilyen rendkívül összetett sejtes assay-rendszerben. Továbbá felmerülhet a sejten belüli negatív szabályozó rendszerek (például foszfatázokat aktiváló kinázok, autoinhibitoros foszforiláció) gátlása, mely a sejtválasz mértékének növekedését eredményezhette. A többszörös normalizálási lépéssel és levonásokkal történő kiértékelés matematikailag negatív sejtválaszokat eredményezhet, mely a teljes gátlást eredményező gátlószerek negatív tartományba eső szórását okozta. Ezeken túl jelentős számban találtunk mindhárom aktiválási rendszerben a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését részben vagy egészében gátolni képes molekulákat. A 11. ábrán feltüntetett hisztogramokon egyértelműen kirajzolódtak olyan molekula-csoportok, melyek kifejezetten a teljes gátlást (0±5%) vagy közel teljes gátlást (0±15%) eredményező tartományba estek. Amíg ezen gátlószerek száma és aránya a fiziológiás rendszereinkben, – vagyis az immunkomplex felszínen, illetve a TNF jelenlétében fibrinogén felszínen stimulálva a sejteket – magas volt, addig a nemfiziológiásnak tekinthető forbolészterrel (PMA) történő aktiválás során kevesebb inhibitor volt azonosítható ebben a tartományban (12. ábra/A).

A

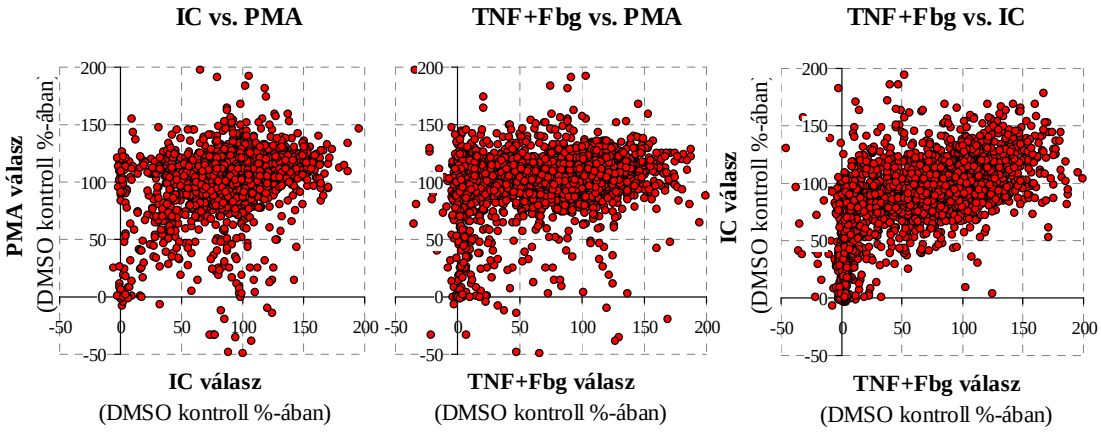
Aktiválási rendszer	Gátlószerek száma		Teljes gátlást mutató gátlószerek aránya
	Teljes gátlás (0±15%)	Összes	
IC	79	2417	3,3%
TNF+Fbg	425		17,6%
PMA	43		1,8%

B



12. ábra: A szűrővizsgálataink eredményeinek bemutatása. (A) A teljes gátlást eredményező vegyületek aránya a különböző aktiválási rendszerekben. (B) A teljes gátlást eredményező vegyületek megoszlása az egyes aktiválási rendszerekben.

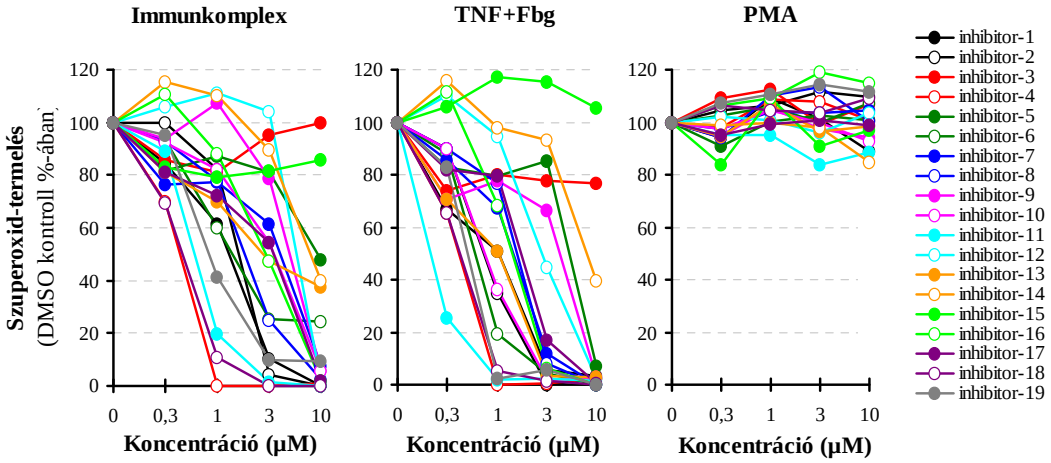
Elmondható, hogy a viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálataink során nagy arányban tűntek ki fiziológiás sejtválaszokat gátló, de nemfiziológiás válaszokat nem befolyásoló molekulák, melyek a szűrővizsgálatok találati-molekuláiként voltak azonosíthatók. Az egyes aktiválási rendszereinkben teljes gátlást eredményező 547 vegyület közül 406 molekula eredményezett teljes gátlást kizárólag a fiziológiás rendszerekben (12. ábra/B).



13. ábra: A vizsgált gátlószerek hatásainak párhuzamos elemzése két-két aktiválási rendszerben.

Az egyes aktiválási rendszerekben a gátlószerek hatásának összehasonlítására az egyes inhibitorok hatását két-két aktiválási rendszerben mutatva közös koordináta rendszerben ábrázoltuk (13. ábra). Az ábrán minden egyes pont egy-egy gátlószernek felelt meg, és hatásukat az összehasonlított két aktiválási rendszerben a két tengelyen felvett koordináta jellemezte. Az IC és PMA aktiválási rendszer összehasonlításában a vegyületek többsége az egyik stimulálási rendszert sem gátló (100%-os sejtválasz) tartomány körül helyezkedett el. A gátlószerek egy kisebb populációja, – feltehetően nemspecifikus hatást kifejtve – mindkét rendszerben blokkolta a sejtválaszokat (0%-os sejtválasz). Ezen kívül jól láthatóvá vált egy harmadik, körülírt populáció, mely az IC-választ teljes mértékben gátolta, azonban a PMA-választ nem befolyásolta. Ezek feltehetően specifikusan képesek az immunkomplex-mediált fiziológiás folyamat gátlására. A TNF+Fbg és PMA rendszerek összevetésekor ehhez nagyon hasonló képet kaptunk. Lényegesen nagyobb volt azonban a fiziológiásnak tekinthető TNF+Fbg aktiválási rendszerben gátló, ugyanakkor a nemfiziológiás rendszert (PMA-kiváltotta sejtválaszokat) nem befolyásoló vegyületek száma, mely feltehetően a TNF+Fbg rendszer nagyfokú érzékenységét jelzi a vizsgált vegyülettár molekuláival szemben.

Mindkét összehasonlításban azok a molekulák, melyek gátolták a PMA-kiváltotta sejtválaszokat szinte kivétel nélkül gátolták a fiziológiás rendszerben mért sejtválaszokat is. A két fiziológiás rendszer összehasonlításakor szintén kirajzolódtak a kétféle módon kiváltott sejtválaszt gátló (IC-gátló és TNF+Fbg-gátló) vegyületek, azonban ezek egy populációban maradtak, szinte valamennyi gátlószer, mely gátolta az IC-választ egyúttal gátló hatással volt a TNF+Fbg rendszerre is. Amellett, hogy a TNF+Fbg rendszer összességében érzékenyebbnek bizonyult a vizsgált vegyülettár gátlószerei iránt, az IC-választ és a TNF+Fbg-választ gátló vegyületek szinte teljesen átfedtek.



14. ábra: A kiválasztott 19 molekula hatásának koncentráció-függése a neutrofilek szuperoxid-termelésére IC, TNF+Fbg és PMA aktiválást követően. (Z>0,3, ismétlésszám átlagosan 2,7)

A vizsgált gátlószerek közül kiválasztottunk összesen 19 molekulát, melyből 17 mindkét fiziológiás rendszerben jelentős gátlást fejtett ki a sejtválaszokra, emellett a PMA-kiváltotta sejtválaszokat nem befolyásolta, tehát szűrési feltételeinknek leginkább megfelelő, farmakológiailag is ígéretes molekula volt. A 19 molekula közül 2 (inhibitor-3, -15) nem gátolta a sejtválaszokat egyik rendszerben sem, ezeket referenciaként szerepeltettem az ábráimon. A következő lépésben ezen vegyületek neutrofil-aktivációra gyakorolt hatásának koncentrációfüggését vizsgáltuk meg (14. ábra).

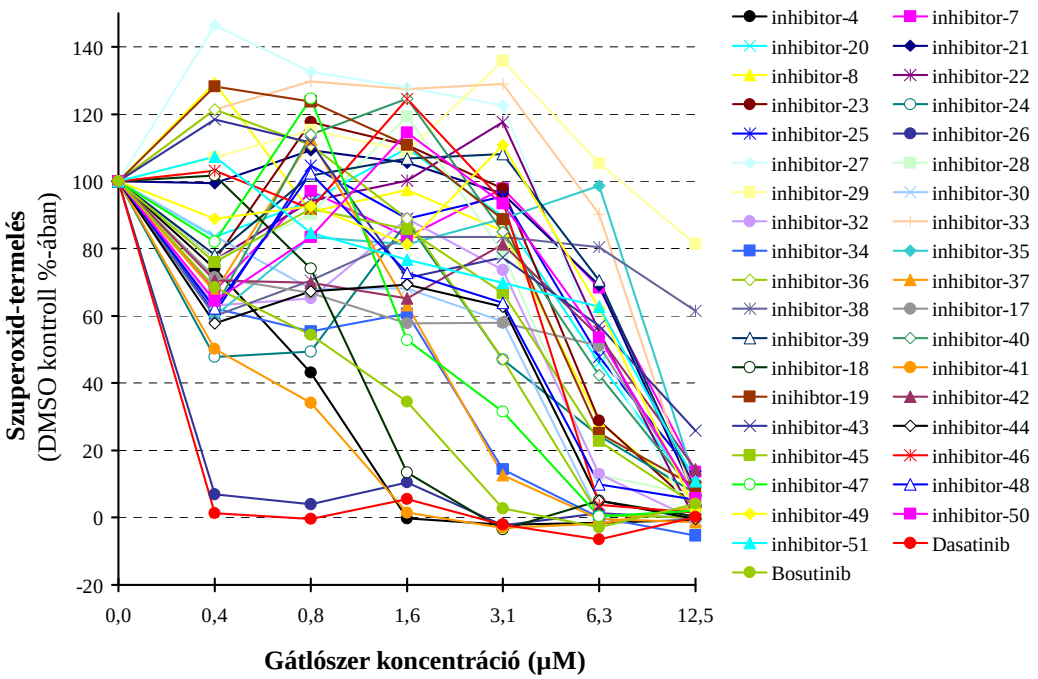
A kiválasztott gátlószerek hatását 0,3, 1, 3 és 10 µM koncentrációban vizsgáltuk párhuzamosan mindhárom aktiválási rendszerben. A Z érték minden esetben 0,3 feletti érték volt, az esetek 91%-ban 0,5 feletti. A 17 gátlószer dózis-hatás vizsgálataiban a félgátló-koncentráció (IC_{50}) értékek IC-stimulálás esetén elsősorban a 1-10 µM koncentráció-tartományba estek, míg az érzékenyebb rendszernek bizonyuló

TNF+Fbg aktiválás esetén a legtöbb gátlószer 0,3–3 μM IC_{50} érték mellett gátolta a sejtek válaszát. A kiválasztott molekulák egyike sem gátolta érdemben a PMA-kiváltotta sejtválaszokat. A 1. táblázat összefoglalva mutatja a 19 molekula koncentráció-függésének vizsgálataiban kapott IC_{50} értékek megoszlását.

Aktiválási rendszer	**IC_{50}**			
	0,3 μM alatt	**0,3-1 μM között**	**1-3 μM között**	**3-10 μM között**
IC	–	4	8	5
TNF+Fbg	3	6	6	2
PMA	–	–	–	–

1. táblázat: A gátlószerek hatásának koncentráció-függés vizsgálataiban kapott IC_{50} értékek. (A 19 molekulából 2 nem mutatott gátlást egyik aktiválási rendszerben sem).

A farmakológiai tulajdonságok, illetve szabadalmazhatóság tekintetében a legígéretesebbnek tűnő molekulák és a köréjük tervezett, újonnan szintetizált fókuszált alkönyvtárak szűrővizsgálataiban kapott leghatásosabb vegyületeket újbóli dózis-hatás vizsgálatoknak vetettük alá, és meghatároztuk a félgátló-koncentrációjukat.



15. ábra: A leghatékonyabb gátlószerek dózis-hatás összefüggése a neutrofil granulociták IC-aktivációval kiváltott sejtválasza esetén.

Az inhibitorok IC rendszerben mért koncentráció-függésének görbéit a 15. ábra mutatja. A Vichem Kft. molekulatárának neutrofil sejtaktiválási rendszerben mért leghatásosabb vegyületei, a 2. táblázat tanúsága szerint már 1 μM alatti IC_{50} értékek mellett képesek voltak gátolni a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését, köztük a Philadelphia kromoszóma pozitivitást mutató leukémiák terápiájában alkalmazott két kismolekulás tirozin-kináz inhibitorral: a dasatinibbel és a bosutinibbel.

Gátlószer	**IC_{50}**	**Gátlószer**	**IC_{50}**	**Gátlószer**	**IC_{50}**
inhibitor-4	**0,6**	inhibitor-30	2,2	inhibitor-19	5,0
inhibitor-7	7,7	inhibitor-32	3,2	inhibitor-42	4,8
inhibitor-20	6,0	inhibitor-33	8,3	inhibitor-43	6,7
inhibitor-21	7,3	inhibitor-34	1,0	inhibitor-44	1,9
inhibitor-8	4,9	inhibitor-35	9,9	inhibitor-45	3,9
inhibitor-22	6,3	inhibitor-36	3,0	inhibitor-46	4,3
inhibitor-23	5,5	inhibitor-37	1,8	inhibitor-47	2,0
inhibitor-24	1,5	inhibitor-38	**< 0,4**	inhibitor-48	3,2
inhibitor-25	6,3	inhibitor-17	2,7	inhibitor-49	6,5
inhibitor-26	**< 0,4**	inhibitor-39	7,5	inhibitor-50	6,5
inhibitor-27	6,3	inhibitor-40	5,7	inhibitor-51	5,7
inhibitor-28	4,2	inhibitor-18	1,0	Bosutinib	**0,8**
inhibitor-29	**< 0,4**	inhibitor-41	**0,4**	Dasatinib	**< 0,4**

2. táblázat: A leghatékonyabb molekulák IC_{50} értékei a neutrofilek IC-aktiváció során kiváltott sejtválasza esetén. A feltüntetett koncentrációk μM-ban értendők.

A leghatásosabb vegyületek célpontjainak (célkinázainak) meghatározására végzett szelektivitási vizsgálatok során kitűnt egy kináz-család, az Src-családba tartozó tirozin-kinázok, melyeken kiemelkedő mértékű gátlást mutattak az általunk azonosított, hatékony vegyületek.

Összefoglalva az eddigi eredményeinket elmondhatjuk, hogy a 2417 letesztelt molekula közül 39 találati molekulát azonosítottunk. A találati molekulák szelektivitási vizsgálatai során kapott eredmények alapján felmerül a lehetőség, hogy az Src-családba tartozó kinázok ígéretes célpontok lehetnek a neutrofil granulociták által mediált gyulladásos folyamatok gátlásában.

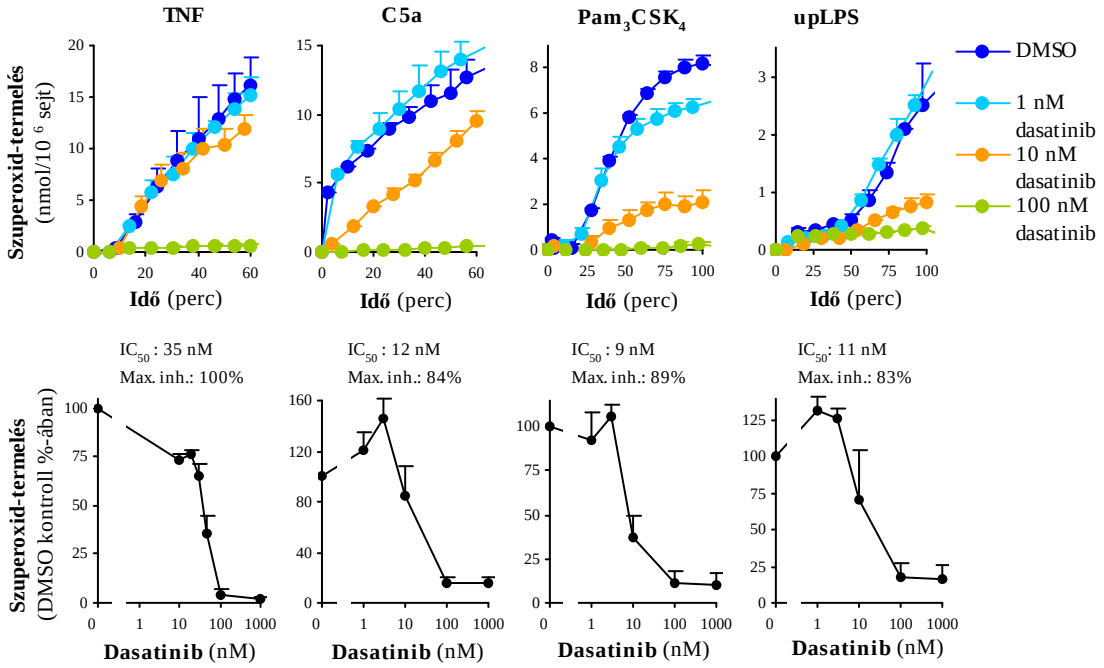
6.2 A dasatinib hatásának részletes vizsgálata érett humán neutrofil granulocitákon *in vitro*

A dasatinib hatása különböző eredetű tumorsejten, illetve több normál, érett sejten a fentebb részletezett irodalmi adatok alapján jól ismert. Azonban a veleszületett immunrendszer elsővonalbeli katonáin, a neutrofil granulocitákon a dasatinib hatását korábban nem vizsgálták. Ennek, illetve annak a ténynek a tükrében, hogy a dasatinib legfőbb célmolekulái – az Src-kinázok, illetve az Abl-kináz – a neutrofil granulociták különböző jelátviteli útvonalaiban kiemelkedő szereppel bírnak, felmerül az igény a dasatinib neutrofil granulociták sejtválaszaira gyakorolt hatásának vizsgálatára.

Tovább erősíti a kísérletek megalapozottságát, hogy a fentebb részletezett kináz-gátló vegyülettár viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálata során a dasatinib szintén a neutrofil granulociták sejtválaszait leghatékonyabban gátló (az előző fejezetben részletezett szempontok alapján kiválasztott) találati-molekulák között jelent meg.

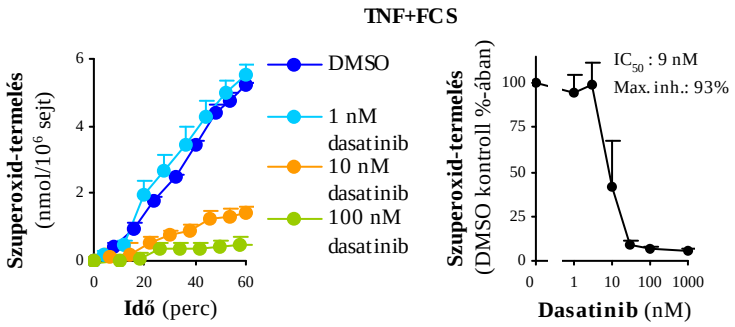
6.2.1 A dasatinib hatása a humán neutrofil granulociták szuperoxid-termelésére adhézió-függő aktiváció során

A gyulladásos folyamatok során az érfalhoz tapadt, vagy a szövetek között migráló, extracelluláris mátrixszal kapcsolatban lévő neutrofil granulocitákat számos gyulladásos mediátor képes aktiválni. Kísérleti körülmények között *in vitro* jól modellezhető a neutrofil granulociták β_2-integrin-függő [102,111,120], gyulladásos térben történő aktivációja, egyes gyulladásos mediátorok jelenlétében, amennyiben a sejteket adherens felszínre helyezzük [119]. Kísérleteinkben a neutrofil granulocitákat fibrinogénnel fedett felszínre helyezve aktiváltuk a gyulladásos mediátorként használt TNFα, C5a, és a TLR2- (Pam_3CSK_4), valamint TLR4-agonista (LPS) jelenlétében. Az így kiváltott adhézió-függő aktiváció mind a négy gyulladásos mediátor alkalmazásakor a neutrofil granulociták spektrofotometriásan jól mérhető szuperoxid-termelését eredményezte, melyet a dasatinib már 100 nM alatti koncentrációban jelentős mértékben gátolt (16. ábra). A félgátló-koncentrációk a felsorolt stimulusok mellett 9 és 35 nM közötti értéknek adódtak.



16. ábra: A dasatinib gátolta a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését adhézió-függő aktivációt követően különböző gyulladásos mediátorok jelenlétében. A sejteket fibrinogén felszínen aktiváltuk 20 ng/ml humán TNF, 50 ng/ml C5a, 1 µg/ml Pam_3CSK_4 és 1 µg/ml tisztított ún. upLPS jelenlétében. Reprezentatív kinetikai görbék (átlag + SD); dózis-hatás görbék (4-11 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). upLPS: ultrapurified LPS. Publikálva: [II].

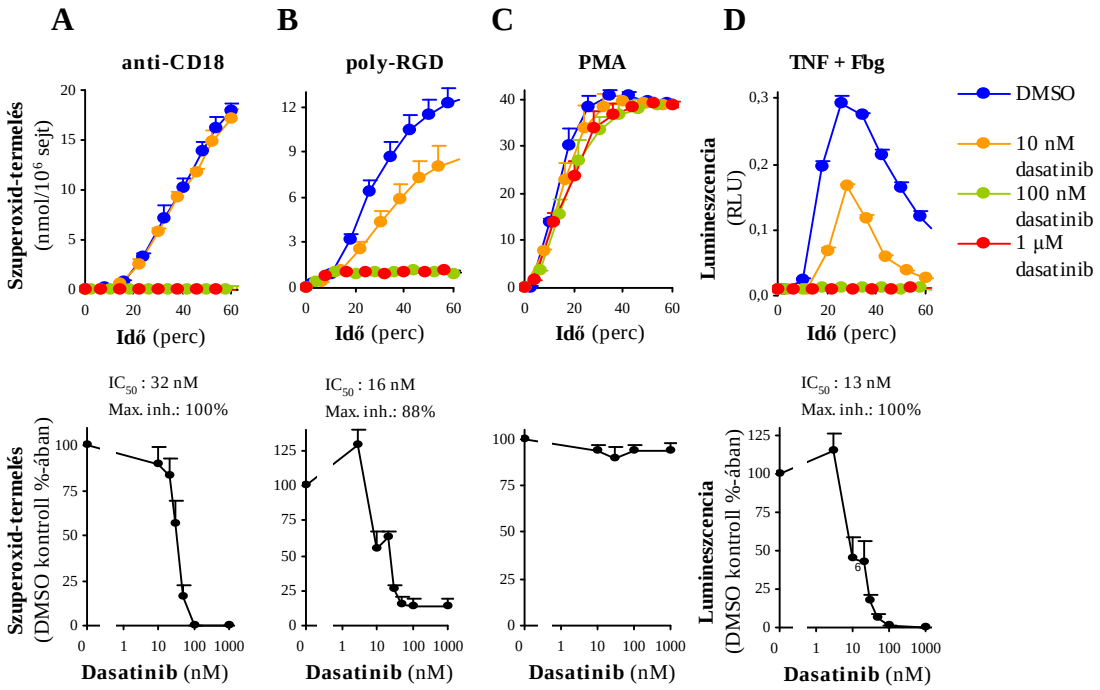
Egy másik adherens felszínre, FCS-sel fedett lemezre helyezve a sejteket TNF stimulus jelenlétében a dasatinib szintén drámai mértékben csökkentette a sejtválaszt, a fibrinogén felszínen mért 35 nM dasatinib koncentrációval szemben az FCS felszínen jóval alacsonyabb, 9 nM félgátló-koncentrációt mértünk (17. ábra).



17. ábra: A dasatinib gátolta a neutrofil granulociták adhézió-függő szuperoxid-termelését FCS-sel borított felszínen. A sejteket 20 ng/ml humán TNF segítségével FCS-sel borított felszínen aktiváltuk. Reprezentatív kinetikai görbe (átlag + SD); dózis-hatás görbe (n=3, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

A neutrofil granulociták adhézió-függő aktivációját kiválthatjuk (a fentiektől eltérően) szolubilis stimulus jelenléte nélkül is, többek között immobilizált β_2-integrin ellenes antitestek (anti-CD18) segítségével [237,243], valamint polivalens integrin-ligand

(poly-RGD) felszínre helyezve a sejteket [120].

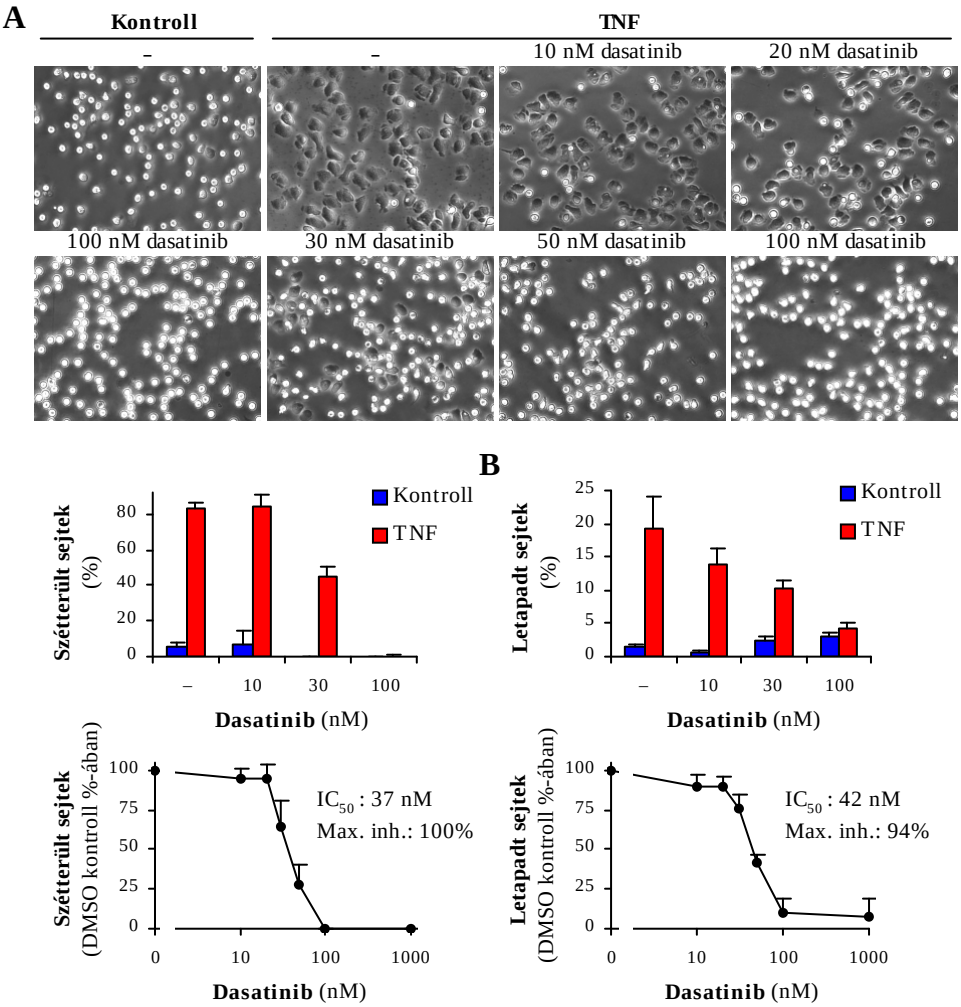


18. ábra: A dasatinib gátolta az anti-integrin (A), a poly-RGD felszín (B) által kiváltott sejtválaszt, de nem befolyásolta a 100 nM PMA (C) által kiváltott szuperoxid-termelést. A dasatinib kezelés által kiváltott drámai mértékű gátlást luminometriás módszerrel történő mérés során is megfigyeltük (D). Reprezentatív kinetikai görbék (átlag + SD); dózis-hatás görbék (3-5 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). RLU: relatív lumineszcens egység. Publikálva: [II].

A dasatinib teljes mértékben gátolta az ily módon anti-integrin antitestekkel és poly-RGD felszínen kiváltott sejtválaszt is (18. ábra/A, B). Annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy a dasatinib befolyásolja-e a szuperoxid-termelésért felelős NADPH-oxidáz rendszer összeállását és működését, nemfiziológiás módon forbol-észterrel (PMA) stimuláltuk a sejteket. Összhangban a korábbi szűrővizsgálatokkal, a dasatinib nem befolyásolta az ily módon kiváltott sejtválasz mértékét még a legnagyobb alkalmazott dózisban sem (18. ábra/C). Bizonyítva, hogy a dasatinib nem interferál az általunk szuperoxid-termelés mérésére használt citokróm c redukciós teszttel, luminometriás módszerrel is végeztünk méréseket. A fibrinogén felszínen TNF segítségével stimulált sejtek szuperoxid-termelését luminometriás módszerrel mérve szintén azt az eredményt kaptuk, miszerint a dasatinib már 100 nM koncentrációban képes volt a sejtválasz teljes mértékű gátlására (18. ábra/D), a félgátló-koncentráció 13 nM értéknek adódott.

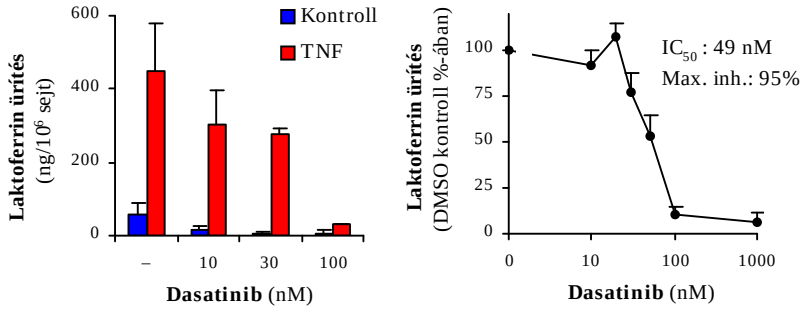
6.2.2 A dasatinib hatása a neutrofil granulociták további adhézió-függő sejtválaszaira

A neutrofil granulociták adhézió-függő aktivációja során a szuperoxid-termelés mellett számos további sejtválasz is megjelenik. Az aktivációt követően a sejtek szétterülnek, az adhezív felszínhez tapadnak, és különböző granulumokat ürítenek [102,122].



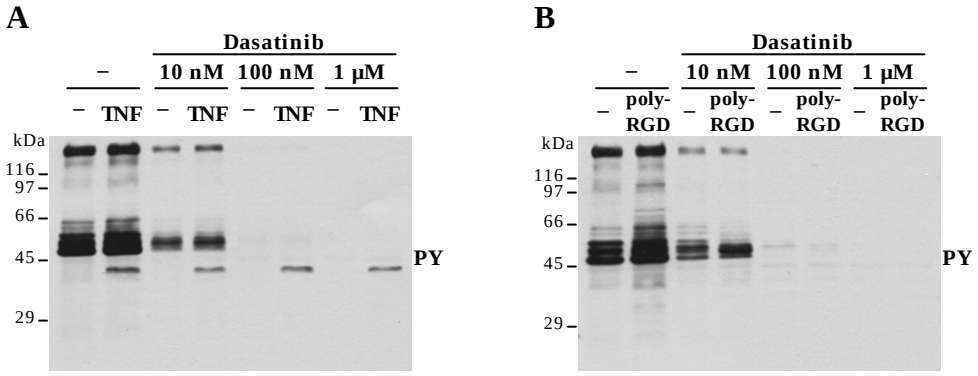
19. ábra: A dasatinib gátolta a neutrofilek adhézió-függő szétterülését és letapadását. A sejtek aktivációja 20 ng/ml humán TNF segítségével fibrinogén felszínen történt. (A) A felvételeken a neutrofil granulociták szétterülése látható (fáziskontraszt mikroszkóp, 20x nagyítás, 3 független kísérletből származó reprezentatív kísérlet), melyek alatt számszerűsítve egy reprezentatív kísérlet (átlag + SD) és a dózis-hatás görbe látható (n=3, kontrollok levonva, átlag + SEM). (B) A neutrofil granulociták letapadás vizsgálatából származó eredmények láthatók az oszlopdiagramon (reprezentatív kísérlet, átlag + SD), és a dózis-hatás görbén (n=9, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

A dasatinib ezen sejtválaszokra gyakorolt hatásának vizsgálatára a sejteket fibrinogén felszínre helyeztük, és szolubilis TNF jelenlétében stimuláltuk. Vizsgálatainkban a dasatinib gátolta mind a sejtek szétterülését (IC_{50}: 37 nM), mind a sejtek integrin-ligand felszínhez történő letapadását (IC_{50}: 42 nM) (19. ábra).



20. ábra: A dasatinib gátolta a neutrofil granulociták adhézió-függő szekunder granulumürítését. Sejtaktiváció 20 ng/ml humán TNF jelenlétében fibrinogén felszínen. Reprezentatív oszlopdiagram (átlag + SD); dózis-hatás görbe (n=5, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

A dasatinib eredményesen csökkentette a neutrofil granulociták szekunder granulumának, a laktoferrinnek az ürülését is (IC_{50}: 49 nM), melyet ELISA-módszerrel detektáltunk (20. ábra). A dasatinib nem gátolta viszont a sejtek szétterülését abban az esetben, amikor a stimulálás PMA segítségével történt, mely azt feltételezi, hogy a szétterüléshez szükséges citoszkeletális átrendeződést nem befolyásolta a kezelés (megfigyelésünket nem ábrázoltam).

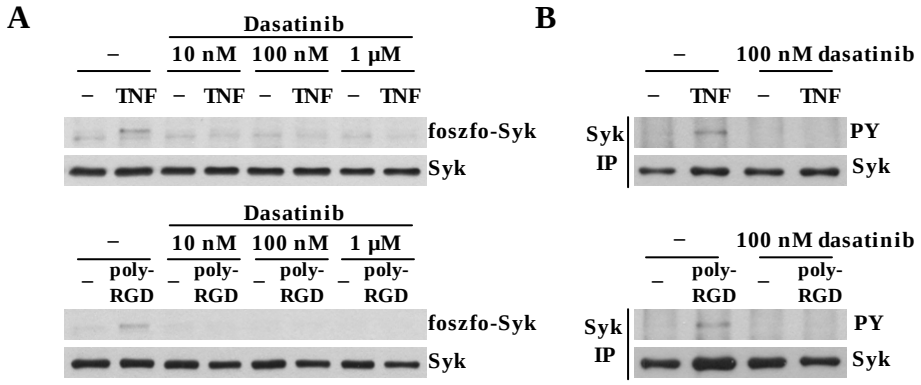


21. ábra: A dasatinib csökkentette a neutrofil granulociták adhézió-függő aktiváció hatására megjelenő teljes tirozin foszforilációját. A gátlás megfigyelhető mind fibrinogén felszínen stimulálva a sejteket 20 ng/ml humán TNF segítségével (A), mind poly-RGD felszínre helyezve a sejteket (B). Reprezentatív immunblotok (n=3). PY: foszfotirozin. Publikálva: [II].

A neutrofil granulociták adhézió-függő aktivációja során intracelluláris jelátviteli utak indulnak, melyek során a bevezetőben említettek szerint protein tirozin-kinázok aktiválódnak, melyek tirozin-foszforilációs lépések segítségével vesznek részt a

jeltovábbításban [244]. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a dasatinib hatását a neutrofil granulociták adhézió-függő tirozin foszforilációjának alakulására Western-blot technika segítségével. Szolubilis TNF jelenlétében fibrinogén felszínen, illetve poly-RGD felszínen stimulálva a sejteket azt tapasztaltuk, hogy már a legkisebb, 10 nM koncentrációban alkalmazott dasatinib képes volt csökkenteni a teljes sejtlizátumban vizsgált tirozin-foszforilációt (21. ábra/A, B). A 100 nM dasatinibbel kezelt sejtekben nemcsak az aktiváció hatására létrejövő tirozin-foszforilációs jel, hanem az alap tirozin-foszforiláció is teljesen megszűnt (21. ábra/A, B). Ez alól kivétel volt a fibrinogén felszínen TNF stimulációra megjelenő hozzávetőlegesen 40 kDa magasságban lévő foszforilációs jel, mely a későbbiekben részletezésre kerülő foszforilált p38 MAP-kináz jelenlétére utal (21. ábra/A).

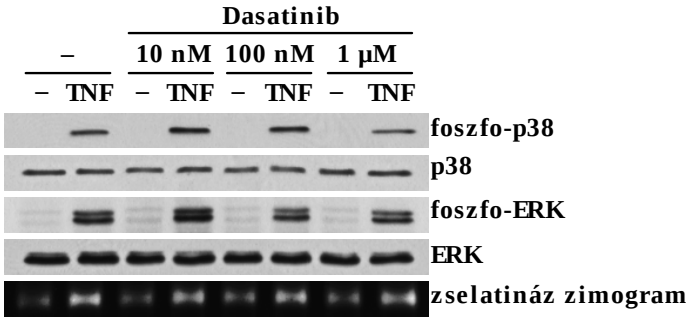
A neutrofil granulociták integrin-jelátvitelében esszenciális szerepet játszik a Syk tirozin-kináz [120]. A dasatinib már 10 nM koncentrációban drámai mértékben csökkentette a Syk tirozin-kináz Tyr352 helyen történő foszforilációját az adhézió-függő aktivációt követően, mind TNF jelenlétében stimulálva a sejteket fibrinogén felszínen, mind poly-RGD felszínen (22. ábra/A). Az adhézió-függő aktivációt követően a Syk tirozin-kinázt immunprecipitáltuk, majd Western-blot technikával vizsgáltuk annak foszforilációját foszfotirozin antitest segítségével. Az így kapott eredmény is megerősítette a teljes sejtlizátum alapján történő megfigyeléseinket, miszerint 100 nM dasatinib teljes mértékben képes volt gátolni a Syk tirozin-kináz foszforilációját (22. ábra/B).



22. ábra: A dasatinib gátolta a Syk tirozin-kináz foszforilációját adherens aktivációt követően. A sejteket fibrinogén felszínen 20 ng/ml humán TNF segítségével, illetve poly-RGD felszínre helyezve aktiváltuk. A Syk tirozin foszforilációját (Tyr352) vizsgáltuk teljes sejtlizátumból (A) és immunprecipitációt követően (B). Reprezentatív immunblotok 3 független kísérletből. IP: immunprecipitáció, PY: foszfotirozin. Publikálva: [II].

A fentebb említett kísérleteket követően megvizsgáltuk a dasatinib hatását az adhézió-függő aktiváció kiváltásához használt szolubilis gyulladásos citokin, a TNFα által generált sejtválaszokra és jelátviteli folyamatokra nem adherens körülmények között. A tercier granulumokból ürülő zselatináz degranulációjához, a laktoferrinnel ellentétben nem szükséges az adhezív felszín jelenléte. A neutrofil granulociták sejtszuszpenzióban TNF stimulus jelenlétében képesek voltak a zselatináz tartalmú granulumaikat üríteni, melyet még a legnagyobb koncentrációban alkalmazott dasatinib kezelés sem befolyásolt számottevően (23. ábra). Az általunk alkalmazott koncentrációkban a dasatinib nem gátolta a citokin jelátvitel során létrejövő ERK-foszforilációt, valamint csupán az 1 μM koncentrációban okozott részleges gátlást a p38 MAP-kináz foszforilációjában (23. ábra).

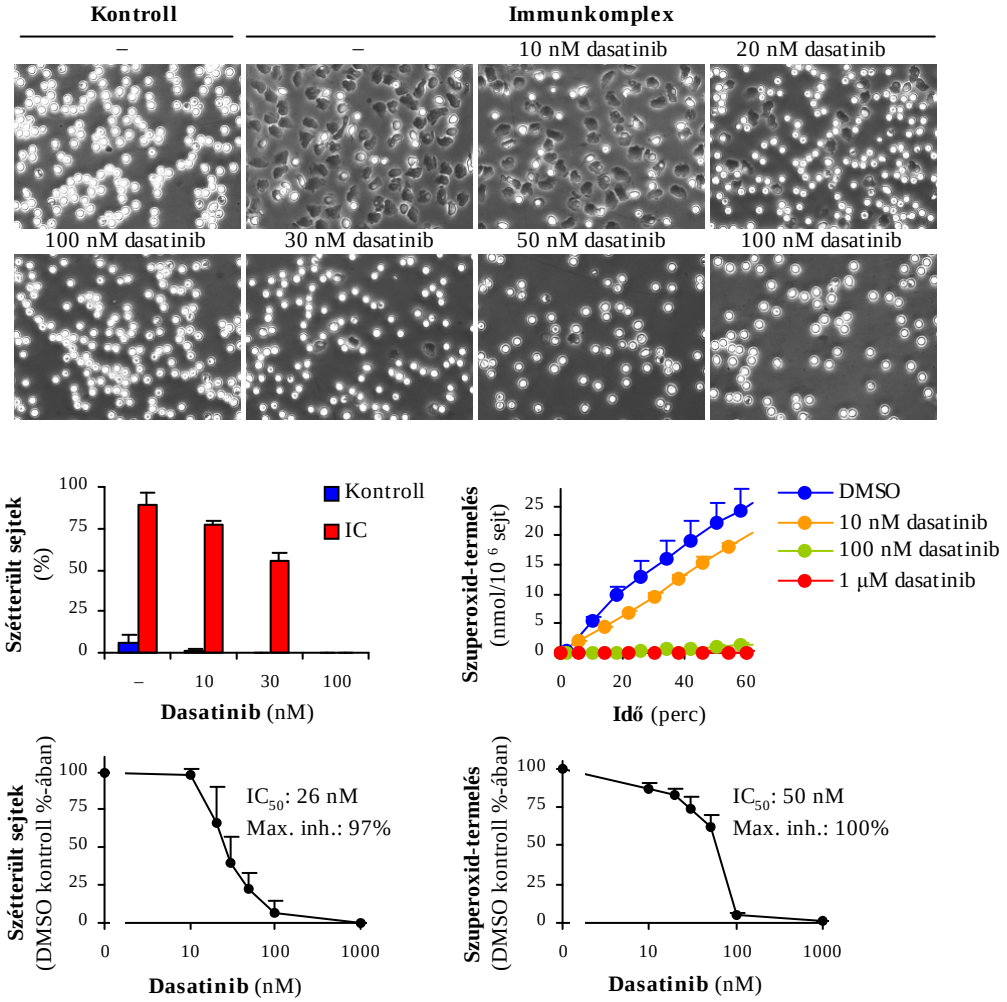
Összességében elmondható, hogy míg a dasatinib az adhézió-függő sejtválaszokat már rend-kívül alacsony koncent-rációban is képes volt gátolni, addig az adhéziótól független TNF-receptorról induló jelátviteli folya-matokat a dasatinib 10-100 nM koncentráció-tarto-mányban nem befolyásolta számottevő mértékben.



23. ábra: A dasatinib nem befolyásolta jelentős mértékben a 20 ng/ml humán TNF hatására sejtszuszpenzióban létrejövő p38 MAP-kináz és az ERK foszforilációját, valamint nem gátolta a zselatináz-ürítést. Reprezentatív immunblotok (n=3), reprezentatív zselatináz zimogram (n=3) Denzitometria alapján a 10 nM, 100 nM, 1 μM dasatinib koncentrációnál megfigyelhető foszforilációs jelek a DMSO kezelt minták százalékában rendre: 101±18%, 94±17% és 56±8% (p38 MAP-kináz) és 89±31%, 85±26% és 89±20% (ERK). Publikálva: [II].

6.2.3 A dasatinib hatásának vizsgálata a neutrofil granulociták immunkomplex által kiváltott sejtválaszaira

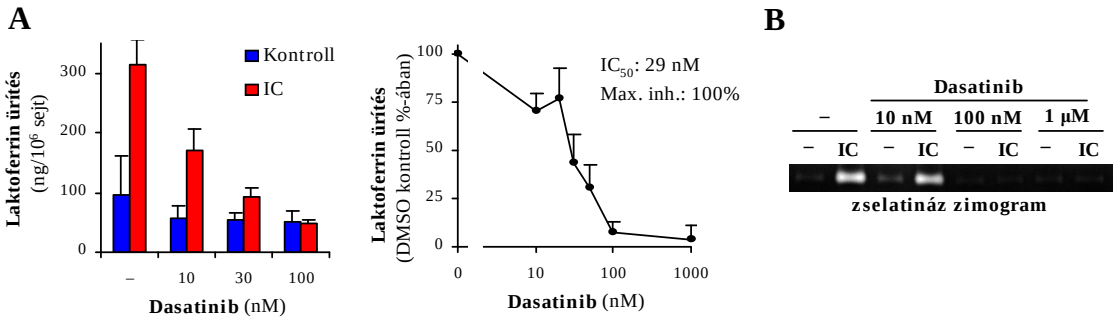
A neutrofil granulociták számos autoimmun betegség (RA, szisztémás lupus eritematózusz, bullózus pemfigoid, epidermolízis bullóza) patomechanizmusában szerepet játszanak, és a legtöbb ilyen esetben aktivációjukért a betegség során létrejött immunkomplexek tehetők felelőssé [245].



24. ábra: A dasatinib gátolta az immunkomplex által kiváltott sejtszétterülést és szuperoxid-termelést. Reprezentatív felvételek (n=3, fáziskontraszt mikroszkóp, 20x nagyítás), illetve reprezentatív oszlopdiagram és kinetikai görbe (átlag + SD); dózis-hatás görbék (3-4 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

A neutrofil granulociták ezen aktivációja *in vitro* körülmények között jól modellezhető immobilizált immunkomplex felszín segítségével. Az immunkomplexek általi aktiváció során többek között megfigyelhető a sejtek szétterülése, szuperoxid-termelése, granulumürítése. Kísérleteinkben a dasatinib hatékonyan gátolta a neutrofil

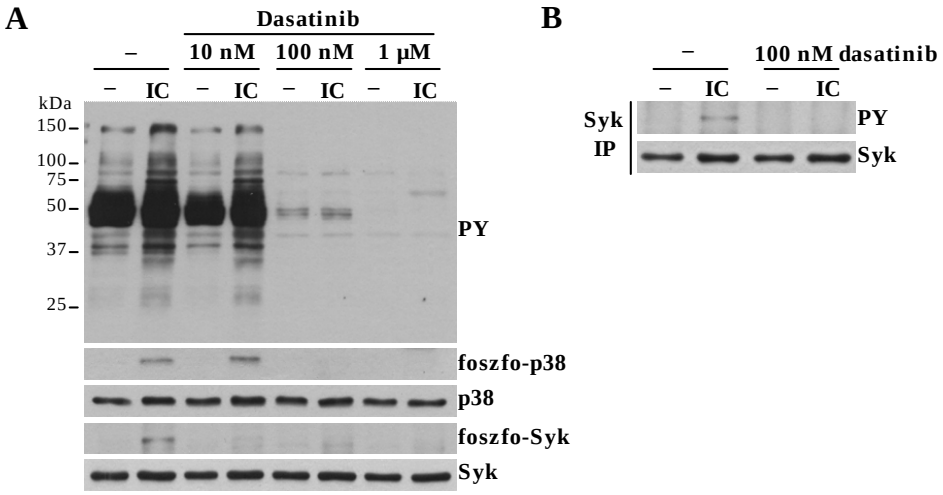
granulociták immunkomplex felszínen fáziskontraszt mikroszkóppal nyomon követett szétterülését (IC_{50}: 26 nM; 24. ábra), valamint a spektrofotometriásan detektált szuperoxid-termelését (IC_{50}: 50 nM; 24. ábra) is. Továbbá a dasatinib blokkolta a neutrofilek szekunder (laktoferrin; IC_{50}: 29 nM; 25. ábra/A) és tercier (zselatináz) granulumainak degranulációját (25. ábra/B).



25. ábra: A dasatinib gátolta a neutrofil granulociták laktoferrin (A) és zselatináz-ürítését (B) immunkomplex-aktiváció hatására. (A) Reprezentatív oszlopdiagram (átlag + SD); dózis hatás görbe (n=3, kontrollok levonva, (átlag + SEM), (B) reprezentatív zselatináz zimogram (n=3). IC: immunkomplex. Publikálva: [II].

A következőkben kíváncsiak voltunk arra, hogy a dasatinib miként befolyásolja a neutrofilek intracelluláris fehérjéinek aktiváció hatására létrejövő foszforilációját. Foszfotirozin antitest alkalmazásával azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib hatékonyan csökkentette a teljes sejtlizátumból származó fehérjék immunkomplex-aktiváció hatására megjelenő foszforilációs állapotát. A 100 nM koncentrációjú dasatinibbel kezelt sejtek esetén nemcsak az immunkomplex-aktiváció által eredményezett fokozott foszforiláció szűnt meg, hanem az alap tirozin-foszforilációs jel is drámai mértékben csökkent, továbbá nem jött létre a p38 MAP-kináz aktivációja sem (26. ábra/A).

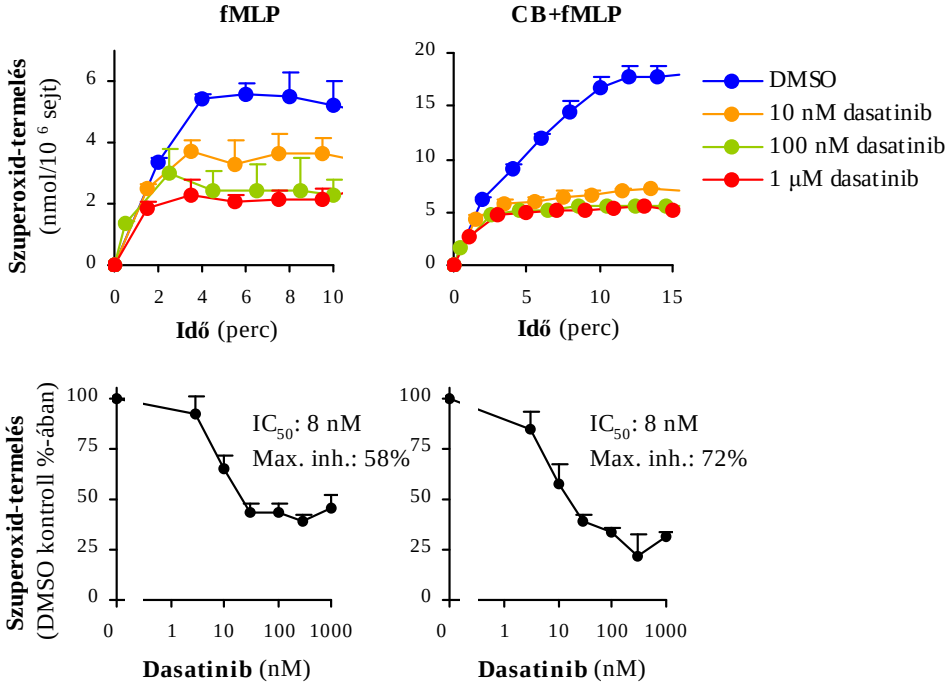
A Syk tirozin-kináz az integrin-jelpályáján kívül elengedhetetlen az Fc-receptorokról induló proximális jelátviteli utak létrejöttében is [94,209]. Kísérleteinkben immunblot-technikával mind a teljes sejtlizátumból, mind a Syk immunprecipitációját követően nyert minták foszfotirozin antitesttel történő előhívása nyomán azt tapasztaltuk, hogy a Syk tirozin-kináz Tyr352 helyén immunkomplex aktiválás hatására létrejövő foszforiláció már 10 nM koncentrációjú dasatinib kezelés hatására nagy mértékben csökkent, és 100 nM dasatinib jelenlétében meg is szűnt (26. ábra/B).



26. ábra: A dasatinib gátolta a neutrofil granulociták intracelluláris fehérjéinek immunkomplex aktiváció hatására bekövetkező tirozin-foszforilációját. A tirozin-foszforilációt vizsgáltuk teljes sejtlizátumban (A), és immunprecipitációt követően (B). Reprezentatív immunblotok (3-4 független kísérletből). PY: foszfotirozin, IP: immunprecipitáció, IC: immunkomplex. Publikálva: [II].

6.2.4 A dasatinib hatásának vizsgálata a neutrofil granulociták G-fehérje kapcsolt jelátviteli folyamataira

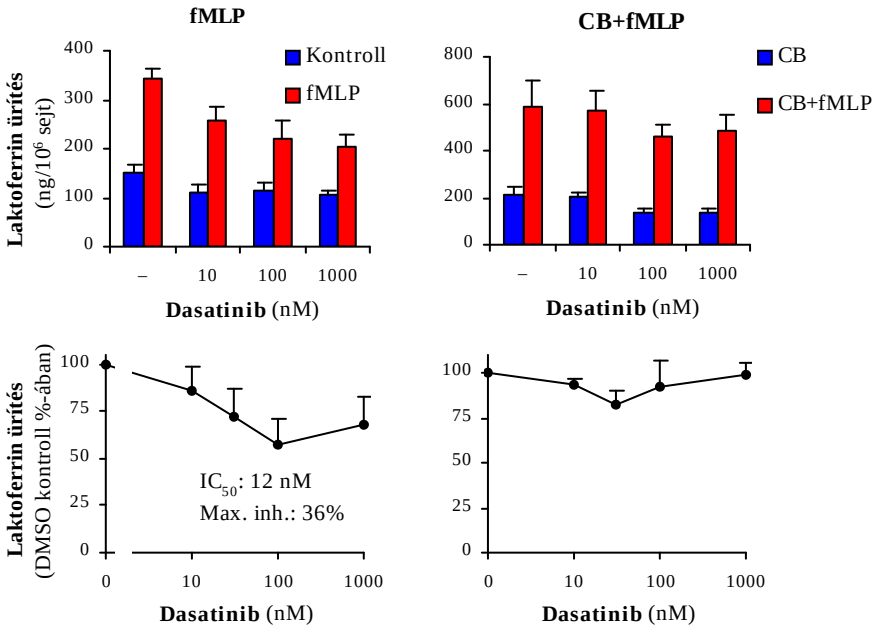
A neutrofil granulociták a bevezetőben említettek szerint számos G-fehérje-kapcsolt receptort expresszálnak a sejtfelszínükön, melyek révén többek között a bakteriális eredetű (pl. fMLP), illetve a szövetkárosodás révén a sejtekből kiszabaduló mitokondriális formil-peptidek, a gyulladás helyén keletkező kemoattraktáns molekulák (CXC, CC kemokinek, leukotriének) és a komplementrendszer aktiválódása során keletkező molekulák (pl. C5a) felismerésére képesek. A G-fehérje-kapcsolt receptorokról induló jelátviteli folyamatok – melyekben kiemelkedő szereppel bírnak egyes tirozin-kinázok – szintén számos effektor sejtválasz megjelenését eredményezik, úgymint szuperoxid-termelés, degranulációs folyamatok, és a gyulladás helyére történő vándorlás [III].



27. ábra: A dasatinib részleges gátlást fejtett ki a neutrofil granulociták fMLP által kiváltott szuperoxid-termelésére CB jelenlétében és anélkül. A sejteket 1 µM fMLP segítségével aktiváltuk, 10 µM CB jelenlétében, vagy anélkül. Reprezentatív kinetikai görbék (átlag + SD); dózis-hatás görbék (n=5, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

Munkám során megvizsgáltuk, miként hat a dasatinib a neutrofilek G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztül létrejövő sejtválaszaira. A neutrofileket a bakteriális eredetű formil-peptiddel (fMLP) stimuláltuk az aktin polimerizációt gátló, s ezáltal a

citoszkeletális rendszert roncsoló citokalazin B (CB) jelenlétében, illetve anélkül. (CB jelenlétében a neutrofil granulociták sejtválaszai fokozódnak [156]).

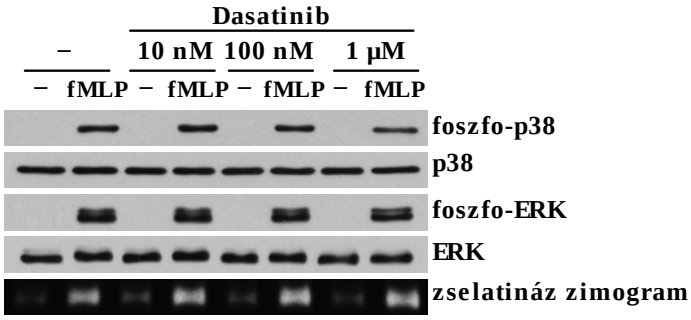


28. ábra: A dasatinib hatása a neutrofil granulociták fMLP-indukált laktoferrin degranulációjára CB jelenlétében és anélkül. A sejteket 1 μM fMLP segítségével stimuláltuk 10 μM CB előkezelést követően, vagy anélkül. Reprezentatív oszlopdiagramok (átlag + SD), valamint dózis-hatás görbék (3–4 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

Az fMLP stimulust követően azt tapasztaltuk, hogy a dasatinib már nagyon alacsony koncentrációban (IC_{50}: 8 nM) képes volt hatékonyan gátolni a neutrofil granulociták szuperoxid-termelését, azonban még a legnagyobb általunk alkalmazott dózisban sem volt a gátlás teljes, sem CB jelenlétében, sem anélkül (27. ábra).

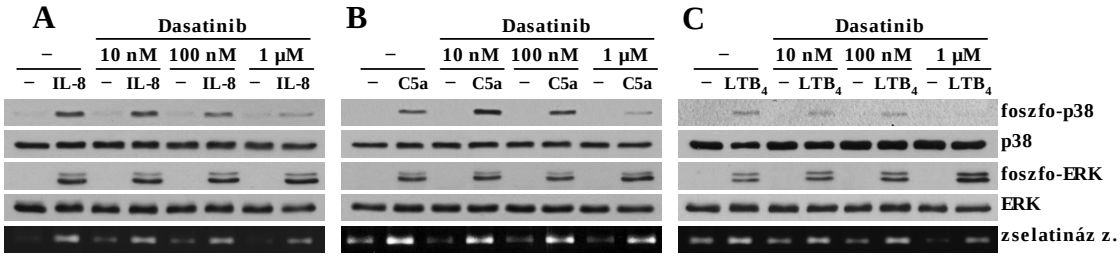
Megvizsgáltuk továbbá a dasatinib laktoferrin-ürítésre gyakorolt hatását is. A neutrofil granulociták által fMLP stimulus hatására ürített laktoferrin mennyiségét ELISA módszerrel detektáltuk. A dasatinib a – szuperoxid-termelés mérésnél kapott eredményekhez hasonlóan – részlegesen gátolta a laktoferrin-ürítést CB jelenléte nélkül (28. ábra). Ezzel szemben azonban nem tapasztaltuk a laktoferrin degranuláció csökkenését a dasatinib kezelés hatására, amennyiben az fMLP stimulus mellett CB előkezelést is alkalmaztunk (28. ábra). A dasatinib nem befolyásolta emellett jelentősen a neutrofil granulociták fMLP hatására létrejövő p38 MAP-kináz, valamint az ERK

foszforilációját (29. ábra). Nem gátolta továbbá az aktiváció nyomán a tercier granulumokból történő zselatináz felszabadulást sem (29. ábra).



29. ábra: A dasatinib nem befolyásolta a neutrofil granulociták fMLP stimulus hatására létrejövő p38-, és ERK-foszforilációját, valamint zselatináz degranulációját. A sejteket 1 µM fMLP segítségével aktiváltuk. Reprezentatív immunblotok (n=3), reprezentatív zselatináz zimogram (n=3) Denzitometria alapján a 10 nM, 100 nM, 1 µM dasatinib koncentrációnál megfigyelhető foszforilációs jelek a DMSO kezelt minták százalékában rendre: 103±10%, 99±14% és 77±17% (p38 MAP-kináz), 99±9%, 94±6% és 100±2% (ERK). Publikálva: [II].

Vizsgálataim során a szintén G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztül ható IL-8, C5a és az LTB_4 stimulus nem váltott ki jelentős mértékű szuperoxid-termelést (megfigyelésemet nem ábrázoltam). Ezzel szemben robosztus zselatináz degranulációt, p38-, illetve ERK-foszforilációt eredményezett (30. ábra).



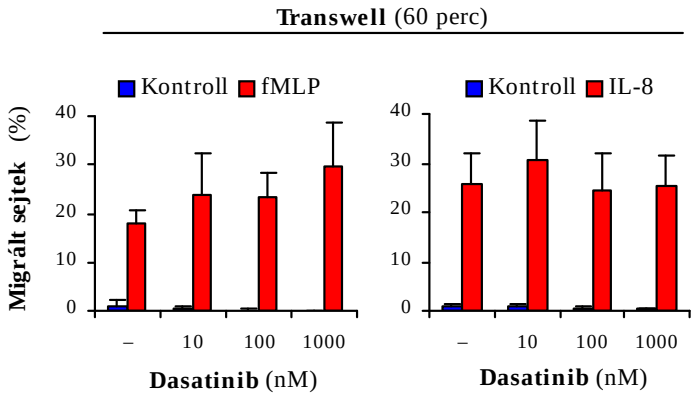
30. ábra: A dasatinib nem befolyásolta lényegesen 10-100 nM koncentrációban az IL-8 (A), a C5a (B) és az LTB_4 (C) hatására létrejövő p38 MAP-kináz és ERK-foszforilációt, valamint zselatináz degranulációt. A sejteket 100 ng/ml humán IL-8, 50 ng/ml C5a, 50 ng/ml LTB_4 segítségével stimuláltuk. Reprezentatív immunblotok (3–4 független kísérletből), reprezentatív zselatináz zimogramok (n=3). Denzitometria alapján a 10 nM, 100 nM, 1 µM dasatinib koncentrációnál megfigyelhető foszforilációs jelek a DMSO kezelt minták százalékában rendre: IL-8 aktiváció esetén 90±17%, 53±5% és 16±5% (p38 MAP-kináz), 123±39%, 112±11% és 169±42% (ERK); C5a stimulus esetén 102±52%, 75±27% és 24±12% (p38 MAP-kináz), 98±5%, 98±12% és 195±55% (ERK); LTB_4 aktiváció esetén 113±53%, 79±29% és 62±60% (p38 MAP-kináz) 89±14%, 173±32% és 236±49% (ERK). Zselatináz z.: zselatináz zimogram. Publikálva: [II].

A dasatinib nem gátolta jelentős mértékben ezen sejtválaszokat (30. ábra/A-C). Jelentősebb gátlás a p38 MAP-kináz foszforilációjában a legnagyobb, 1 μM koncentrációban alkalmazott dasatinib kezelés esetén volt megfigyelhető, azonban érdekes módon az ERK-foszforiláció ebben a koncentráció-tartományban inkább fokozódott mindhárom G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztüli aktiváció során (30. ábra).

Összességében elmondható, hogy míg a dasatinib már nagyon alacsony félgátló-koncentráció értékek mellett részlegesen gátolta az fMLP kiváltott szuperoxid-termelést, addig a többi esetben csupán a legnagyobb (1 μM) koncentrációban volt hatással a neutrofil granulociták sejtválaszaira.

6.2.5 A dasatinib hatása a neutrofil granulociták migrációjára

A neutrofil granulociták egy rendkívül összetett folyamat révén kemotaktikus ágensek vezénylete mellett képesek a véráramból az érfalon keresztül kilépni (extravazáció), majd a szövetközti migráció során a gyulladás helyére vándorolni.

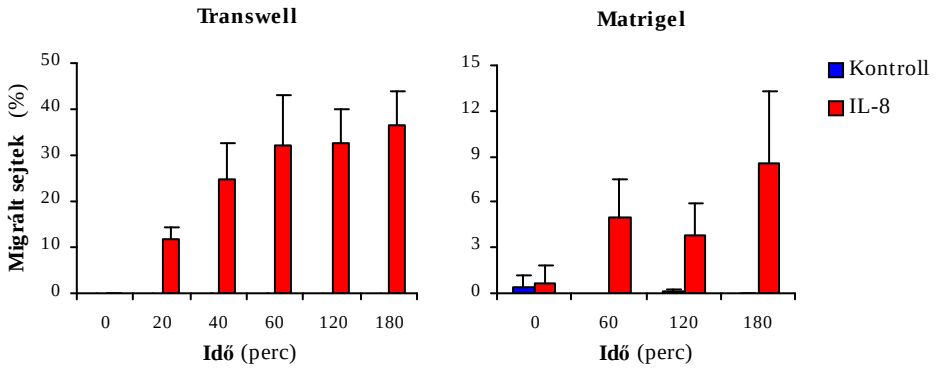


31. ábra: A dasatinib nem gátolta a neutrofil granulociták migrációját Transwell-kamrában. A sejtek FCS-sel fedett polikarbonát filteren át vándoroltak 60 percig a kemoattraktánsként használt 100 nM fMLP, vagy 10 ng/ml IL-8 felé. (n=4, átlag + SEM). Publikálva: [II].

Vizsgálataink során kíváncsiak voltunk arra, hogy a dasatinib miként befolyásolja a sejtek úgynevezett Transwell-kamrában végzett migrációs képességét. A sejtek Transwell-kamrában β_2-integrin-függő módon vándorolnak át egy FCS-sel borított 3 μM átmérőjű pórusokkal rendelkező polikarbonát-filteren, valamely kemoattraktáns irányába. Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a kemoattraktánsként használt fMLP, illetve IL-8 hatására bekövetkező migrációt a dasatinib még 1 μM koncentrációban sem gátolta (31. ábra).

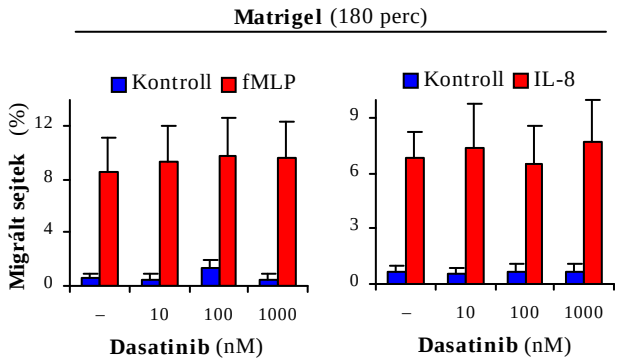
Annak érdekében, hogy az *in vitro* Transwell migrációs assay-rendszerünket jobban közelítsük a fiziológiás állapothoz, a sejteket a Transwell-kamrában egy

komplex extracelluláris mátrixot alkotó Matrigel rétegre helyeztük. Várakozásainknak megfelelően a Matrigel egyértelműen migrációs akadályt képzett a kemoattraktánsként használt fMLP és IL-8 felé vándorló sejtek számára.



32. ábra: A neutrofil granulociták migrációjának időkinetika-vizsgálata Transwell membránon, illetve Matrigel mátrixon keresztül. A sejtek adott ideig vándoroltak Matrigel réteget nem tartalmazó, illetve tartalmazó Transwell kamrában, kemoattraktánsként 10 ng/ml IL-8-at használtunk. (n=3, átlag + SEM).

Matrigel jelenlétében a neutrofil granulociták migrációja jelentősen lelassult és jóval kevesebb sejt volt képes adott idő alatt a polikarbonát-filteren áthaladni (32. ábra). Az ily módon Matrigel mátrixon keresztül vándorló sejtek migrációját a dasatinib lényegében nem befolyásolta (33. ábra). Kísérleteink alapján elmondható, hogy a dasatinib nem befolyásolta érdemben a sejtek migrációját Transwell-kamrában sem extracelluláris mátrix réteg (Matrigel) jelenléte nélkül, sem annak jelenlétében.

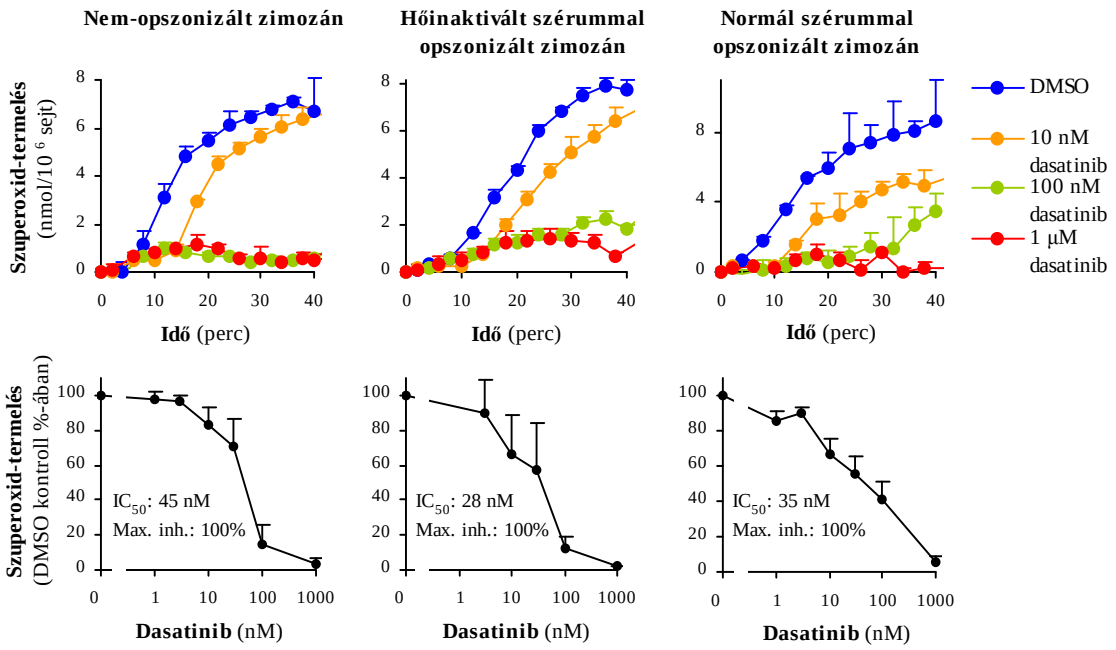


33. ábra: A dasatinib nem gátolta a neutrofil granulociták Matrigel mátrixon keresztüli vándorlását. A sejtek 180 percig vándoroltak a Matrigel réteget tartalmazó filteren át, kemoattraktánsként 100 nM fMLP-t vagy 10 ng/ml IL-8-at használtunk. (4-5 független kísérletből, átlag + SEM). Publikálva: [II].

6.2.6 A dasatinib hatása a mintázatfelismerő receptorokon keresztül létrejövő sejtválaszokra

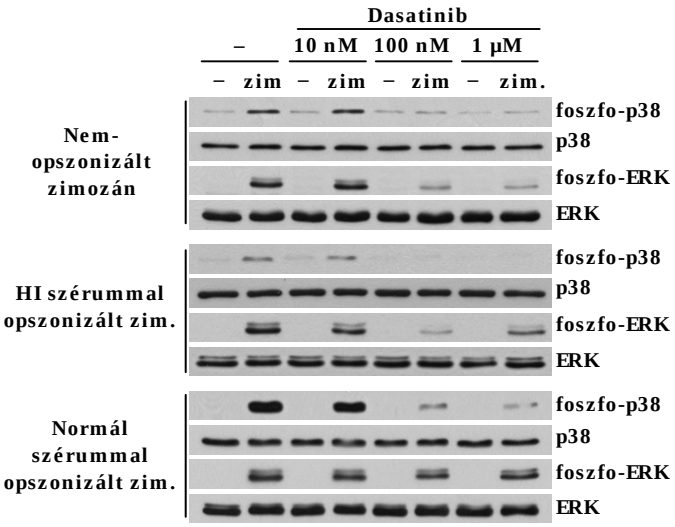
A neutrofil granulociták számos (a bevezetőben ismertetett) mintázatfelismerő receptort expresszálnak. Segítségükkel képesek a mikrobiális eredetű, illetve saját veszélyt jelző molekulák felismerésére, melyek elengedhetetlenek a kórokozók eliminálásában. Kiemelkednek közülük a Toll-like receptorok, valamint a C-típusú lektin receptorok. A neutrofil granulociták működésében betöltött jelentős szerepükből kiindulva adódott a következő kérdésünk, mely szerint a dasatinib képes-e gátolni ezen receptorokon keresztül zajló jelátviteli folyamatokat.

Elsőként megvizsgáltuk a gombafal-alkotó zimozán által kiváltott sejtválaszok alakulását dasatinib jelenlétében.



34. ábra: A dasatinib gátolta a nem-opszonizált és opszonizált zimozánnal aktivált neutrofil granulociták szuperoxid-termelését. A sejteket 10 mg/ml opszonizálatlan, hőinaktivált humán szérummal, vagy normál humán szérummal opszonizált zimozánnal aktiváltuk. Reprezentatív kinetikai görbék (átlag + SD); dózis-hatás görbék (3–5 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

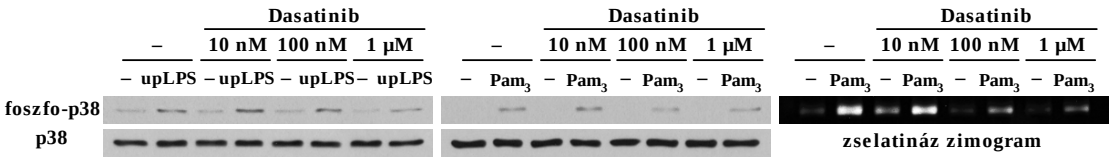
A β-glukán egységekből álló zimozán számos receptoron keresztül képes aktiválni a neutrofil granulocitákat, nevezetesen Toll-like receptorokon, C-típusú lektin receptorokon át, illetve amennyiben a zimozán opszonizált formában kerül kölcsönhatásba a neutrofilekkel, úgy azok Fc-receptorai, illetve komplement-receptorai is bekapcsolódnak az aktiválási folyamatba. Kísérleteinkben a dasatinib gátolta az opszonizálatlan és hőinaktivált szérummal opszonizált zimozán által kiváltott szuperoxid-termelést (34. ábra), illetve a p38 MAP-kináz és az ERK foszforilációját (35. ábra).



35. ábra: A dasatinib hatása a neutrofil granulociták zimozán aktivációt követő p38- és ERK-foszforilációra. 10 mg/ml (hőinaktivált vagy normál szérummal) opszonizált, vagy opszonizálatlan zimozánnal (zim) aktiváltuk a sejteket. Reprezentatív immunblotok (n=3). Denzitometria alapján a 10 nM, 100 nM, 1 μM dasatinib koncentrációnál megfigyelhető foszforilációs jelek a DMSO kezelt minták százalékában rendre: 62±27%, 5±2% és 5±3% (nem-opszonizált zim.; p38 MAP-kináz), 81±23%, 43±9% és 52±26% (nem-opszonizált zim.; ERK), 42±19%, 7±7% és 5±5% (HI szérum-opszonizált zim.; p38 MAP-kináz), 56±24%, 37±16% és 72±38% (HI szérum-opszonizált zim; ERK), 73±12%, 9±4% és 4±4% (normál szérum-opszonizált zim.; p38 MAP-kináz), 84±1%, 69±2% és 89±11% (normál szérum-opszonizált zim.; ERK). HI: hőinaktivált. Publikálva: [II].

A normál, nem hőinaktivált szérum jelenlétében ez a gátló hatás valamelyest gyengébb, különösképp az ERK-foszforiláció esetén, melyet még 1 μM koncentrációban sem csökkentett a dasatinib (35. ábra). Feltehetően a hőinaktiválás nélküli opszonizálással a komplementrendszer egyes elemei, – melyek hőkezelés hatására denaturálódnak – okozta a neutrofil granulociták sejtválaszainak dasatinibbel szemben mutatott kisebb érzékenységét. (A 30. ábra tanúsága szerint a komplementrendszer C5a komponense által kiváltott neutrofil-aktivációt sem befolyásolta lényegesen a dasatinib kezelés.) A továbbiakban megvizsgáltuk két további

TLR agonista, a Pam_3CSK_4, és az LPS hatását a neutrofil granulociták egyes sejtválaszaira. Mind az LPS, mind a Pam_3CSK_4 fokozta a p38 MAP-kináz foszforilációját, továbbá a Pam_3CSK_4 képes volt a neutrofil granulociták zselatináz degranulációját is kiváltani. A dasatinib csökkentette az LPS és a Pam_3CSK_4 által kiváltott p38 MAP-kináz foszforilációt. Az LPS stimulus esetén a csökkenés szignifikáns volt 1 μM dasatinib jelenlétében (36. ábra). A Pam_3CSK_4 által eredményezett degranuláció szintén jelentősen csökkent 100 nM és 1 μM koncentrációjú dasatinib kezelés hatására (36. ábra).

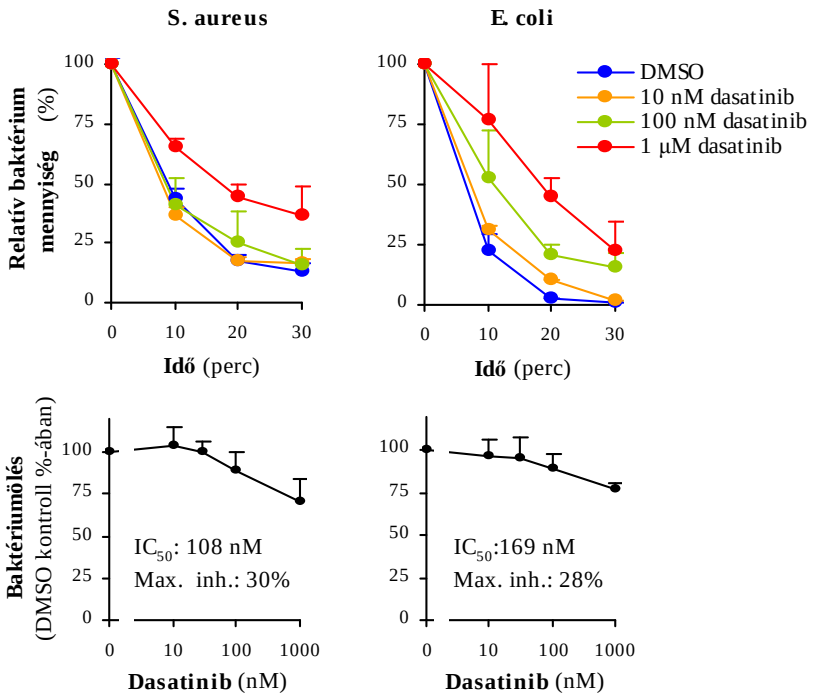


36. ábra: A dasatinib hatása a Toll-like receptor agonisták által kiváltott sejtválaszokra. A sejteket 1 μg/ml tisztított LPS (upLPS), 1 μg/ml Pam_3CSK_4 (Pam_3) segítségével aktiváltuk. Reprezentatív immunblotok (n=3); reprezentatív zselatináz zimogram (n=3). Denzitometria alapján a 10 nM, 100 nM, 1 μM dasatinib koncentrációnál megfigyelhető foszforilációs jelek a DMSO kezelt minták százalékában rendre: 154±31%, 72±24% és 15±14% (upLPS), 160±38%, 138±57% és 55±24% (Pam_3). Publikálva: [II].

Összeségében a dasatinib gátolta az opszonizálatlan és hőinaktivált szérummal opszonizált zimozán által kiváltott sejtválaszokat, azonban a komplementrendszer jelenlétében történő opszonizációt követően ez a gátlás kevésbé volt kifejezett. Továbbá a dasatinib részleges gátlást eredményezett a TLR agonisták segítségével kiváltott sejtválaszokon.

6.2.7 A dasatinib hatása a neutrofil granulociták baktériumölési képességére

Arra, hogy miként befolyásolja az általunk vizsgált tirozin-kináz inhibitor a neutrofil granulociták direkt antimikrobiális aktivitását, egy baktériumölési teszt segítségével kerestük a választ [238]. A teszt során humán szérummal opszonizált *Staphylococcus aureus* és *Escherichia coli* baktériumok túlélését vizsgáltuk, miután 10, 20, 30 perces időintervallumban együtt inkubáltuk a baktériumokat a neutrofil granulocitákkal, melyeket különböző koncentrációban előkezeltünk dasatinibbel. Eredményeink szerint – ahogyan a 37. ábra is mutatja – a dasatinib előkezelésben részesült neutrofil granulociták direkt baktériumölési képessége részben csökkent, a hatás azonban mérsékelten jelentkezett és csupán a legnagyobb általunk használt koncentráció-tartományban jelent meg (az IC_{50} érték mindkét esetben 100 nM fölötti értéknek adódott).

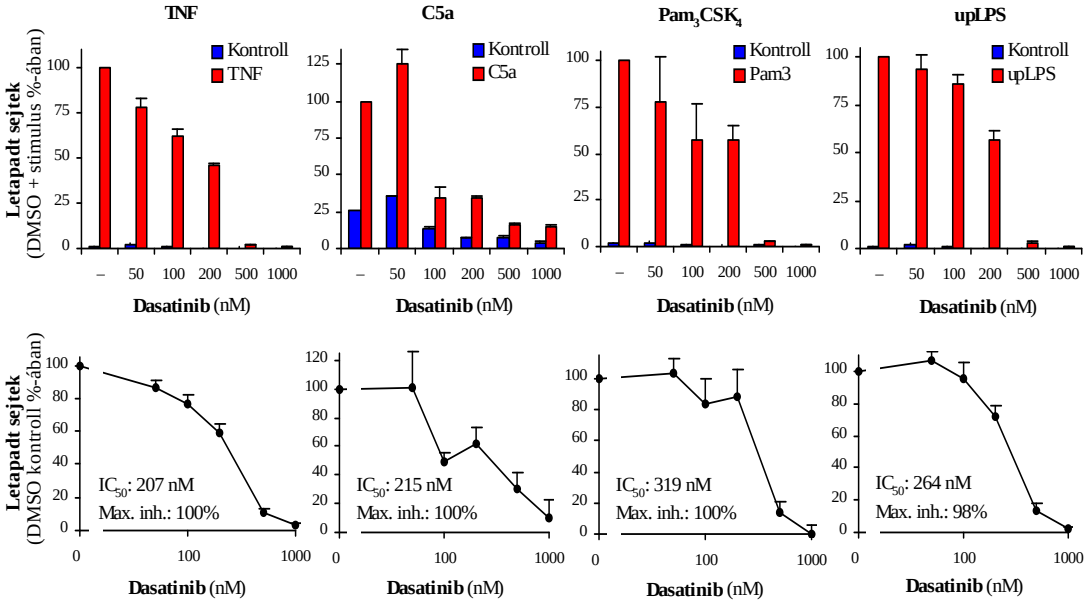


37. ábra: A dasatinib részlegesen gátolta a neutrofil granulociták baktériumölési képességét. Reprezentatív kinetikai görbék (átlag + SD); dózis–hatás görbék (3–6 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

Összeségében tehát ezek alapján elmondható, hogy a dasatinib nem gyakorol drámai hatást a neutrofil granulociták antimikrobiális aktivitására.

6.2.8 A dasatinib hatása a fehérvérsejtek letapadására humán szérum jelenlétében

Valamennyi fentebb bemutatott kísérletünkben a neutrofil granulocitákat egy preparálási eljárás során nemcsak elkülönítettük a többi véráramban keringő sejttől (vörösvértestektől, többi fehérvérsejttől), hanem eltávolítottuk a természetes közegüket jelentő szérumfehérjékben gazdag vérplazmát is. A következőkben kíváncsiak voltunk arra, hogy a szérumfehérjékhez nagy hatékonysággal kötődni képes dasatinib [37] hatása érvényesülhet-e a fiziológiás környezethez közelebb álló rendszerben, azaz teljes szérum jelenlétében.



38. ábra: A dasatinib gátolta a fehérvérsejtek letapadását adherens körülmények között teljes szérum jelenlétében. A sejteket FCS-sel borított felszínen 20 ng/ml humán TNF, 50 ng/ml C5a, 1 µg/ml Pam_3CSK_4 és 1 µg/ml tisztított LPS (upLPS) segítségével aktiváltuk. Reprezentatív kinetikai görbék (átlag + SD); dózis-hatás görbék (6–9 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

Ezen vizsgálataink során a vörösvértestek ülepítését követően a fehérvérsejt gazdag felülúszót további tisztítási eljárás nélkül használtuk. A felülúszóban található sejtek többsége neutrofil granulocitákra jellemző morfológiával rendelkezett (megfigyelésünket nem ábrázoltam). Az így nyert sejteket a saját szérum jelenlétében adherens (FCS-sel borított) felszínre helyezve, a korábbi kísérletekben bemutatott stimulusok segítségével aktiváltuk. Bár mindegyik általunk alkalmazott aktiválás során (TNF, C5a, Pam_3CSK_4, upLPS) képes volt a dasatinib gátolni a neutrofil granulociták

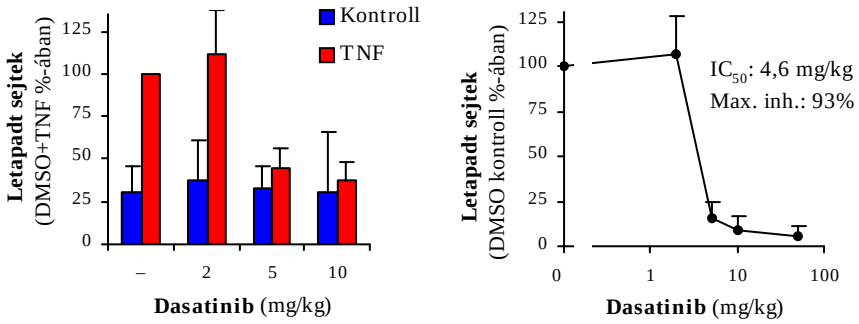
adhéziós képességét, azonban a félgátló-koncentráció (mind a négy aktivációs rendszerben 200 nM körüli) értékek ez esetben jóval magasabbnak adódtak az adhézió-függő szuperoxid-termelésnél (16. ábra) kapott értékeknél (38. ábra). Ez 200 nM körüli félgátló-koncentráció a dasatinibbel kezelt betegek terápiás plazmakoncentráció-tartományába esik [37].

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy valóban csökkent a dasatinib hatékonysága szérumfehérjék jelenlétében. Ennek ellenére kiemelendő, hogy a legérzékenyebb rendszerekben, a TNF segítségével történő aktiválást követően a letapadt sejtek számát már 50 nM koncentrációban kismértékben, de szignifikánsan (p=0,013; n=9) gátolta az inhibitor, míg a C5a stimulus esetén a jelentős mértékű és szignifikáns (p=0,00074; n=6) gátlás már 100 nM koncentrációnál jelentkezett (38. ábra).

6.2.9 Az orálisan adott dasatinib hatása az egér fehérvérsejtek *ex vivo* adhéziójára

A kísérleteink fókuszában álló kismolekulás tirozin-kináz inhibitor hatékonyan gátolta *in vitro* a neutrofil granulociták sejtválaszainak többségét. Ez arra sarkallt bennünket, hogy megvizsgáljuk, vajon szájon át adva a gátlószert kísérleti állatoknak képes-e befolyásolni a beadást követően kinyert fehérvérsejtek működését *ex vivo* körülmények között.

Ennek tesztelésére a kísérleti állatainkat szájon át különböző dózisú dasatinibbel kezeltük, majd a kezelés után 2 órával az állatoktól nyert perifériás vérből a vörösvértesteket ülepítettük, és a fehérvérsejtekben gazdag felülúszót az előző pontban bemutatott adhéziós vizsgálatnak vetettük alá.



39. ábra: A szájon át adott dasatinib gátolta az egér fehérvérsejtek *ex vivo* adhézióját. A sejteket FCS-sel borított felszínen 50 ng/ml egér TNF segítségével aktiváltuk. Reprezentatív oszlopdiagram (átlag + SD); dózis-hatás görbe (3-5 független kísérletből, kontrollok levonva, átlag + SEM). Publikálva: [II].

A sejteket TNF segítségével aktiváltuk FCS-sel fedett felszínen, melynek hatására jól mérhető adhéziós sejtválaszt kaptunk. A dasatinib kezelés 4,6 mg/kg félgátló-koncentráció mellett eredményesen gátolta a sejtek felszínhez történő letapadását (39. ábra).

Ezen eredmények alapján a dasatinib azon túl, hogy gátolta az érett humán neutrofil granulociták sejtválaszait *in vitro*, képes volt csökkenteni szájon át történő adagolást követően a kísérleti egerek *ex vivo* vizsgált fehérvérsejteinek adhéziós képességét is.

6.3 A dasatinib hatásának vizsgálata *in vivo* gyulladásos állatmodellekben

Az autoimmun gyulladások kialakulásában elengedhetetlen immunsejtek intracelluláris szignalizációjában kulcsfontosságú szerepet játszanak egyes tirozin-kinázok/tirozin-kináz kaszkádok, mely felveti a lehetőségét annak, hogy (az onkológia területén már oly nagy sikert aratott) kismolekulás gátlószerek fejlesztésével, a célzott tirozin-kináz gátlás a jövőben alternatívát hozhat az autoimmun gyulladások kezelésében is. Az első példa erre az FDA által 2012-ben az RA kezelésére engedélyezett (a bevezetőben már említett) Janus-kináz gátló tofacitinib.

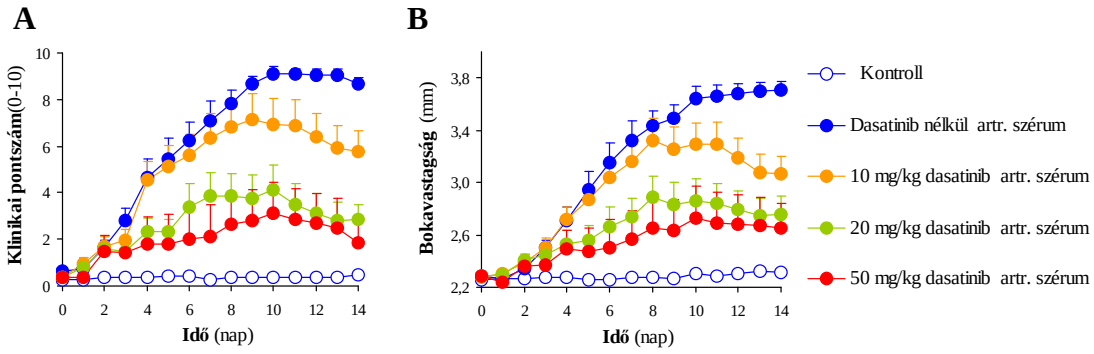
A PhD munkám jelentős részében egy kismolekulás tirozin-kináz gátlószer, a dasatinib hatását vizsgáltam az autoimmun gyulladások patogenezisében kiemelkedő szereppel bíró neutrofil granulociták működésére *in vitro* körülmények között. Az előző fejezetrészben részletezett *in vitro* hatásvizsgálatok jelentős részében a dasatinib rendkívül hatékonyan gátolta a neutrofil granulociták sejtválaszait [II]. Ezek alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy a dasatinib-kezeléssel gátolható-e olyan autoantitest-indukált *in vivo* betegség-modellekben a gyulladás kialakulása, melyekben mind a neutrofil granulociták, mind egyes tirozin-kinázok jelentős szerepet játszanak [225,228,241,242]. Ezzel kapcsolatos eredményeinket még nem publikáltuk.

6.3.1 A dasatinib hatásának vizsgálata autoimmun ízületi gyulladásmodellben

A neutrofil granulociták a gazdaszervezet kórokozókkal szembeni védelmén túl, – amennyiben a gazdaszervezet immun-működésének szigorú szabályozottsága sérül – egyes autoimmun gyulladásos betegségek során fellépő szövetkárosodás létrehozásában is aktív szereplők [245]. Az autoimmun ízületi gyulladás egyik jól ismert kísérletes állatmodellje a K/BxN artritisz, mely számos hasonlóságot mutat az emberekben előforduló RA-val [239]. A K/BxN artritisz jellemzője, hogy a betegség az egerek (anti-GPI antitesteket tartalmazó) szérumával egészséges egyedekre is átvihető (K/BxN szérum transzfer artritisz), és ezáltal lehetőség nyílik arra, hogy a betegség későbbi, főként neutrofil granulociták, makrofágok, hízósejtek által mediált effektor fázisát elkülönítve vizsgáljuk a korai, főként limfociták működésének köszönhető immunizációs fázistól [228,240].

Kísérleteimben a K/BxN szérum transzfer modellt, mint az autoantitest-indukált ízületi gyulladás kísérletes állatmodelljét használtam. A kísérleti egereknek betegséget nem okozó kontroll (transzgén-negatív) szérumot, valamint ezzel párhuzamosan artritogén (transzgén-pozitív) szérumot injektáltunk intraperitoneálisan a 0. napon. Ezt követően 14 napig követtük nyomon az állatok hátsó végtagjain az ízületi gyulladásra jellemző klinikai tünetek (pl. ízületi deformitás, duzzanat, bőrpír) kialakulását és a bokavastagság változását. A vizsgálat során (a szérum beadását megelőző naptól) a gátlószer plazmakoncentrációjának szinten tartásához naponta két alkalommal gyomorszonda (etetőtű) segítségével dasatinib-kezelésben részesítettük a kísérleti állatokat. A kontroll csoportba tartozó, dasatinib-kezelés nélküli (jelölés: „Dasatinib nélkül") állatok a por állapotú dasatinib szuszpendálására használt hidroxietil-cellulóz oldatot kapták azonos térfogatban.

Előzetes kísérleteinkben egy dózis-függés vizsgálatot végeztünk el. A dasatinib nélküli kontroll kezelésben részesülő csoport mellett különböző dózisú dasatinib-kezelt csoportokat különítettünk el: testtömeg kilogrammonként naponta kétszer 10, 20, 50 mg dasatinibbel kezeltük az állatokat.



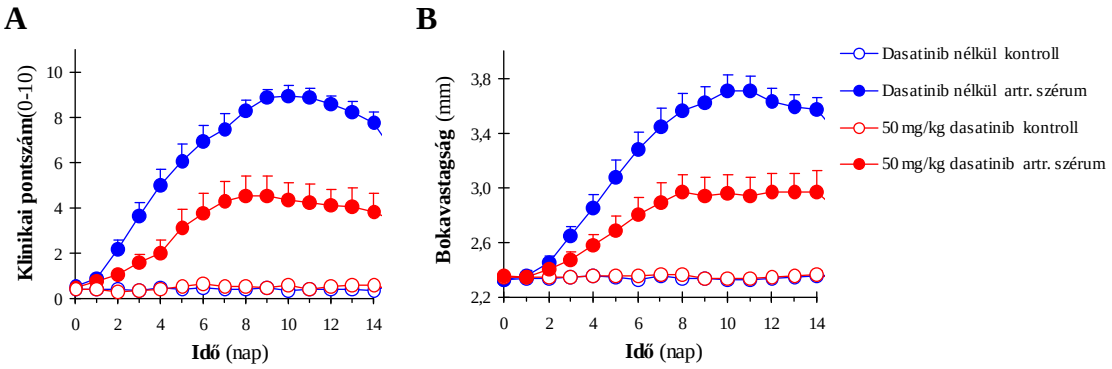
40. ábra: A dasatinib-kezelés dózis-függése K/BxN szérum transzfer artritiszben. (A) Klinikai pontszám-változás, (B) bokavastagság-változás a kísérleti állatok hátsó végtagjain. Valamennyi kontroll szérumot kapott állat értékeit összesítve ábrázoltam. A kísérlet ideje alatt az állatokat a feltüntetett dózisokkal naponta kétszer kezeltük. (Reprezentatív kísérlet, csoportonként 4-5 állat bevonásával, átlag + SEM).

Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy az állatok a naponta két alkalommal, 12 óránként kapott kezeléseket jól tolerálták, toxicitásra utaló jeleket nem (magasabb dózisban csupán kismértékű testsúlyvesztést) tapasztaltunk. Tapasztalataink szerint a dasatinib dózis-függő módon csökkentette az ízületi gyulladásra jellemző klinikai

tünetek súlyosságát, valamint az objektív paraméterként vizsgált bokavastagság növekedését a K/BxN szérum transzfer artritisz során (40. ábra/A, B).

Kísérleteinket az előzőekben alkalmazott legmagasabb, egyben leghatékonyabb dózisssal, az 50 mg/kg dasatinib kezeléssel végeztük. A napi kétszer 50 mg/kg dózisban adott dasatinib szignifikáns mértékben csökkentette az ízületi gyulladás makroszkópos jeleit (41. ábra). Ez a csökkenés megfigyelhető volt mind a klinikai tünetekre kapott pontszám-, mind a bokavastagság-változáson (42. ábra/A, B). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a dasatinib a gyulladás külső jegyeinek enyhítésén túl, a gyulladás során jelentkező ízületi funkcióvesztést is képes-e befolyásolni.

41. ábra: A K/BxN szérum transzfer artritisz morfológiai képe az indítástól számított 8. napon. A kísérlet ideje alatt naponta kétszer dasatinib nélküli vagy 50 mg/kg dasatinib-kezelést kaptak az állatok.

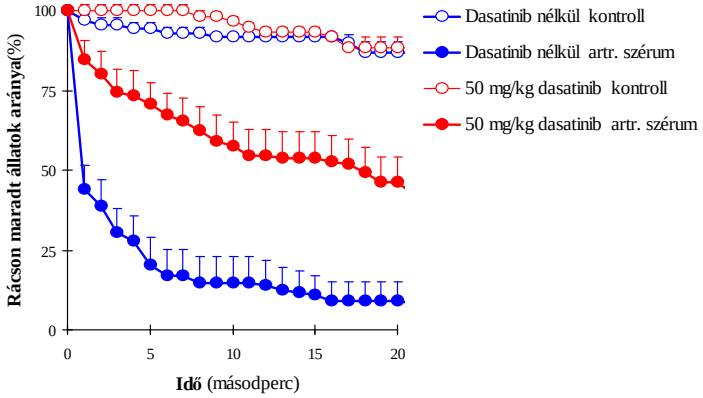


42. ábra: A dasatinib kezelés hatása a K/BxN szérum transzfer artritisz során megjelenő (A) klinikai tünetekre és (B) bokavastagság-változásra. Az állatokat a vizsgálat ideje alatt naponta kétszer kontroll és 50 mg/kg dasatinib-kezelésben részesítettük. (A görbék a 3 független kísérletből származó értékeket összesítve ábrázolják, csoportonként összesen 9 állat bevonásával; átlag + SEM). (A) $p<0,05$ dasatinib nélkül artr. vs. 50 mg/kg dasatinib artr., <3.nap, (B) $p<0,05$ dasatinib nélkül artr. vs. 50 mg/kg dasatinib artr., <5.nap

Erre kapaszkodási tesztet végeztünk, mely során a kísérleti állatokat két percen keresztül egy fejjel lefelé fordított rácson késztettük kapaszkodásra, miközben mértük

az általuk a rácson eltöltött időt. Az egészséges állatok kedvelt elfoglaltságai közé tartozik a rácson való függeszkedés. Az artritogén szérummal kezelt, ízületi gyulladásban szenvedő állatok azonban néhány másodperc után elengedik a rácsot, és a rács alá helyezett alomra esnek.

A dasatinib kezelés jelentős mértékben megnövelte az állatok rácson való függeszkedésének az idejét, tehát az ízületi gyulladás tüneteinek csökkentésén túl képes volt a gyulladással együttjáró funkcióvesztést is mérsékelni (43. ábra).

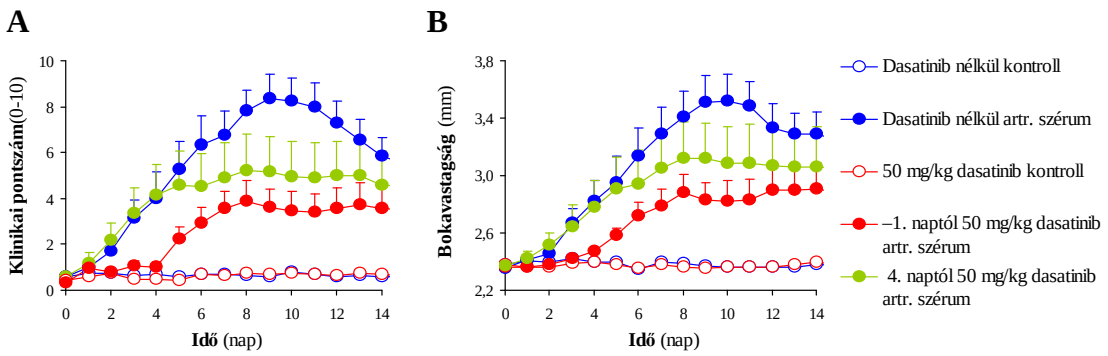


43. ábra: A dasatinib csökkentette az ízületi gyulladás során létrejövő ízületi funkcióvesztést. A kísérlet ideje alatt az állatok napi kétszeri kontroll vagy 50 mg/kg dasatinib kezelésben részesültek. (A bemutatott diagram a 3 független kísérlet összesített eredményét mutatja; csoportonként összesen 9 állat bevonásával; átlag + SEM, $p<0,05$ Dasatinib nélkül artr. vs. 50 mg/kg dasatinib).

Kísérleteinkben a gátlószerrel történő kezelést a betegség indítását (K/BxN egerektől gyűjtött szérumok injektálását) megelőző napon (a –1. napon) kezdtük. Kíváncsiak voltunk, hogy a hatékonynak bizonyuló preventív kezelés mellett a dasatinib képes-e befolyásolni a már meglévő gyulladás klinikai jeleit. Ennek tesztelésére az eddigi eljárásnak megfelelően az 1. naptól indított preventív kezelés mellett elkülönítettünk egy állatcsoportot, melynél a szérum beadását követő 4. napon kezdtük a dasatinibbel történő kezeléseket. A K/BxN szérum transzfer artritisz 4. napján már egyértelműen felismerhetőek a gyulladás jelei, valamint jól kimérhető a bokavastagság növekedése is. A mérési eredményeink szerint a dasatinib-kezelés nemcsak csökkentette a K/BxN szérum transzfer artritisz kialakulásával együttjáró ízületi gyulladásra jellemző tünetek megjelenését, hanem a már meglévő gyulladás továbbfejlődését, a betegség progresszióját is képes volt megakadályozni (44. ábra/A, B).

Összegzésként elmondható, hogy vizsgálatainkban a dasatinib preventíven adva hatékonyan csökkentette az általunk vizsgált kísérletes autoantitest-indukált ízületi gyulladás modellben az ízületi gyulladásra jellemző morfológiai elváltozások mértékét,

illetve mérsékelte a gyulladással együttjáró ízületi funkcióvesztést. Emellett a dasatinib nemcsak a gyulladás kialakulását gátolta, hanem a már meglévő gyulladás progresszióját is képes volt korlátozni.



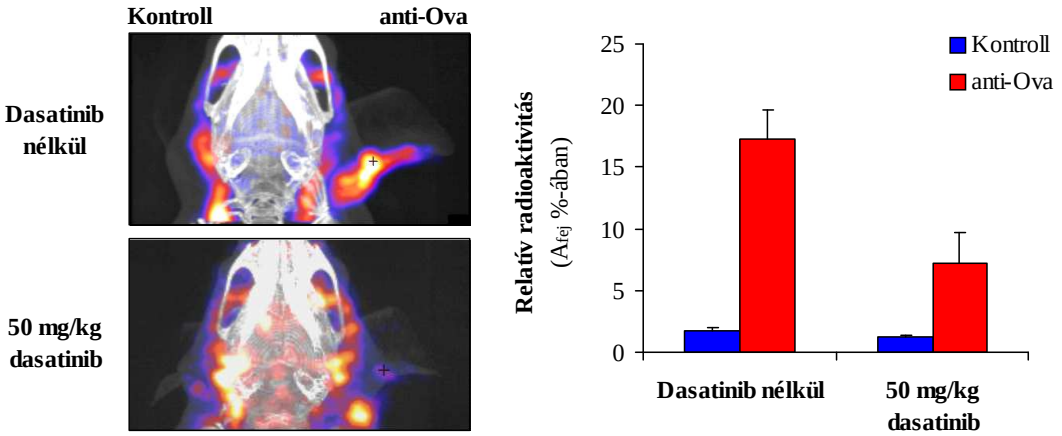
44. ábra: A dasatinib gátolta a már meglévő ízületi gyulladás progresszióját, mind a gyulladás klinikai tünetei (A), mind a bokavastagság-változás (B) esetén. A kísérlet során az állatok a kontroll kezelés mellett a –1. vagy a 4. naptól kezdve 50 mg/kg dasatinib-kezelésben részesültek. (Reprezentatív kísérlet, csoportonként 5 állat bevonásával; átlag + SEM). (A) $p<0,05$ dasatinib nélkül artr. vs. 4. naptól 50 mg/kg dasatinib artr., <5.naptól, (B) $p<0,05$ dasatinib nélkül artr. vs. 4. naptól 50 mg/kg dasatinib artr., <5. naptól.

6.3.2 A dasatinib hatásának vizsgálata reverz passzív Arthus-reakcióban

Az antigén-antitest kapcsolódása nyomán keletkező immunkomplexek természetes résztvevői a szervezet szolubilis antigénekkel szembeni védelmi reakcióinak. Normálisan a veleszületett immunrendszer sejtjei képesek megsemmisíteni az antigént, anélkül, hogy bármilyen patológiás elváltozást okoznának. Abban az esetben, ha bármilyen oknál fogva a keletkező immunkomplexek mégsem eliminálódnak a szervezetből, lerakódva a szövetekben gyulladásos folyamatokat indíthatnak be, mely számos autoimmun betegség kiindulópontját képezheti. Az immunkomplex-mediált betegségek (a Gell–Coombs-féle besorolás szerinti III. típusú hiperszenzitivitási reakciók) közé tartozik többek között az Arthus-reakció, a szérum betegség, de hasonló feltételek mellett alakulnak ki olyan komplex betegségek is, mint a szisztémás lupus eritematózus, egyes vaszkulitiszek és nefritiszek, illetve az RA [246].

Az immunológiai kutatásokban az Arthus-reakciót széles körben használják az immunkomplex-mediált gyulladásos folyamatok egyszerű és gyors modellezésére [247]. A kísérletes reverz passzív Arthus-reakció során az antitest lokális bőrbe (intradermálisan, i.d.) fecskendezését az antigén szisztémás (intravénás) beadása követi. A bőrben ily módon képződő immunkomplexek lokális gyulladást eredményeznek

(hozzávetőlegesen két órán belül), mely ödémaképződéssel, neutrofil inflitrációval, esetleg vérzéssel jár. A reverz passzív Arthus-reakció mértékének meghatározásánál a immunbiológiai kutatások során klasszikusan a plazmafehérjékhez kötődő Evans-kék festéket használják. A gyulladás helyén a fokozott érpermeabilitásnak köszönhetően a véráramból a szövetek közé jutó Evans-kék festék helyi felszaporodása könnyen kimutatható [241]. A módszer hátránya azonban a nehézkes kvantifikálhatóság mellett az, hogy a kiértékelés minden esetben a kísérleti állat feláldozásával jár, ezáltal lehetetlenné téve a gyulladás kinetikájának vizsgálatát egyazon állatban.



45. ábra: A dasatinib hatásának vizsgálata reverz passzív Arthus-reakcióban. A kísérlet előtt az állatok 50 mg/kg dasatinib, vagy annak vivőanyagával történő kezelésben részesültek. A_{fej} a teljes fejben mért radioaktivitás értéke. Reprezentatív képek; az oszlopdiagramon a mérési eredmények 3 független kísérletből származnak, kezelésenként összesen 7-8 állat bevonásával; átlag + SEM, $p<0,05$ dasatinib nélkül anti-Ova vs. 50 mg/kg dasatinib anti-Ova.

A saját kísérleteimben egy olyan új, Arthus-reakcióra épülő módszer kidolgozását végeztük el, mely során jól kvantifikálható módon ugyanazon kísérleti állatban lehetővé vált a gyulladásos reakció időbeni utánkövetése. Az általunk kiváltott reverz passzív Arthus-reakció során a kísérleti egerek jobb fülének bőrébe anti-ovalbumin (anti-Ova) antitesteket tartalmazó nyúlszérumot fecskendeztünk, míg ugyanazon állat bal fülébe normál nyúlszérumot injektáltunk kontrollként. Az ovalbumin, mint antigén szisztémás beadását követő 2 órával az állatok intravénásan radiofarmakonnal (^{99m}Tc-) jelölt humán szérum albumint tartalmazó oldatot kaptak. A gyulladás helyén a fokozott érfal permeabilitásnak köszönhetően lokálisan feldúsuló radioaktivitást NanoSPECT-CT készülékkel követtük nyomon. A kiértékelés során az állatok egész fejére vonatkoztattuk a relatív radioaktivitás értékeket. A dasatinib Arthus-

reakcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához a reakció indítása előtt az állatokat a korábban említett módon kezeltük a gátlószerrel, vagy annak vivőanyagával. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy 50 mg/kg dasatinib képes volt szignifikáns mértékben gátolni az Arthus-reakció során létrejövő gyulladás mértékét, a tirozin-kináz gátlót nem kapott állatokhoz képest (45. ábra).

A dasatinib tehát amellett, hogy képes volt az általunk használt autoantitest-mediált ízületi gyulladás mértékét csökkenteni, hatékonyan gátolta a reverz passzív Arthus-reakcióval járó ödémaképződést és ezáltal a gyulladás mértékét is egy új radioaktivitás-mérésen alapuló mérési rendszerben.

6.4 Az Src-típusú tirozin kinázok szerepének vizsgálata reverz passzív Arthus-reakcióban

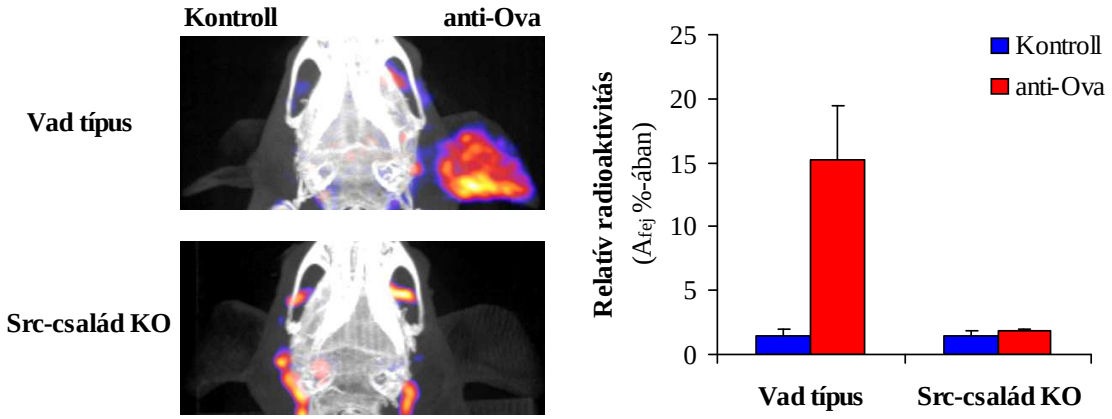
Az Src-családba tartozó tirozin-kinázok a legjelentősebb nemreceptor tirozin-kinázok közé tartoznak, melyek számos alapvető sejtfunkció szabályozásában (például túlélés, proliferáció, differenciáció, valamint sejtmigráció) vesznek részt [248]. Ennél fogva hibás működésük nem meglepő módon súlyos megbetegedések, főként daganatos elváltozások kialakulásához vezet, melynek révén – ahogyan a bevezetőben már említettem – az elmúlt években a daganatkutatás kiemelt célmolekuláivá váltak [249].

Az immunsejtekben az Src-családba tartozó kinázok közül több is expresszálódik. A mieloid sejtekben – így a neutrofil granulocitákban, makrofágokban, dendritikus sejtekben – elsősorban a Hck, Fgr, és Lyn található meg [97]. Régóta ismert tény, hogy a neutrofil granulocitákban kulcsfontosságú szerepet játszanak a β_2-integrin-mediált jelátviteli folyamatokban [122,123]. Azonban a korábbi irodalmi adatok arra utaltak, hogy ezen Src-típusú tirozin-kinázoknak nincs esszenciális szerepe a neutrofil granulociták Fc-receptoron keresztül zajló szignalizációjában [123].

Munkacsoportunk vizsgálatai (és publikálás alatt lévő eredményei) alapján azonban fény derült arra, hogy az immunkomplex-aktiváció hatására a neutrofil granulocitákban létrejövő sejtválaszok (szuperoxid-termelés, citokin-termelés), valamint a jelátvitel proximális szakaszában jelentős Syk tirozin-kináz és FcRγ-lánc ITAM tirozinjainak foszforilációja a Hck, Fgr és Lyn tirozin-kinázok együttes genetikai hiánya esetén teljesen elmaradtak [IV]. Ezek után felmerült bennünk a kérdés, hogy amennyiben az Fc-receptoron keresztüli jelátvitelben ezen tirozin-kinázok elengedhetetlen szerepet töltenek be, vajon szükségesek-e *in vivo* immunkomplex-mediált betegségmodellek kialakulásához. A vizsgálat szükségességét tovább erősítették a (előző fejezetrészben tárgyalt) gátlószeres kísérletek során kapott eredmények is, melyek során azt tapasztaltuk, hogy az Src-családba tartozó tirozin-kinázokat rendkívüli hatékonysággal gátló dasatinib csökkentette az immunkomplex-mediált K/BxN szérum transzfer artritisz során létrejövő ízületi gyulladás mértékét és a reverz passzív Arthus-reakcióval járó ödémaképződést kísérleti állatokban.

A kérdés megválaszolására munkacsoportunk több immunkomplex-mediált betegségmodellben vizsgálta a Hck, Fgr, és Lyn szerepét, melyek közül saját munkám

során az előző fejezetrészben ismertetett reverz passzív Arthus-reakcióban vizsgáltam a gyulladás kialakulását vad típusú, valamint $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ egerekben. A reverz passzív Arthus-reakció kiváltásának és mérésének körülményei teljes mértékben megegyeztek az előző fejezetrészben leírtakkal. Míg kísérleteinkben a vad típusú egerek esetén az antitestek beadásának helyén (a jobb fülben) az ödémaképződéssel és a gyulladás kialakulásával együtt jól mérhető módon fokozott radioaktivitást detektáltunk, addig a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ (az ábrán Src-család KO) egerekben a radioizotóp-dúsulás az állatok jobb fülében elmaradt (46. ábra).



46. ábra: Az Src-családba tartozó kinázok szerepe a reverz passzív Arthus-reakcióban. Reprezentatív képek; Az oszlopdiagramon 3 független kísérlet átlagát ábrázoltam, genotípusonként összesen 4-8 állat bevonásával; átlag+SEM, $p<0,05$ Vad típus anti-Ova vs. Src-család KO anti-Ova. A_{fej} a teljes fejben mért radioaktivitás értéke. Src-család KO: $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$. Kézirat: [IV].

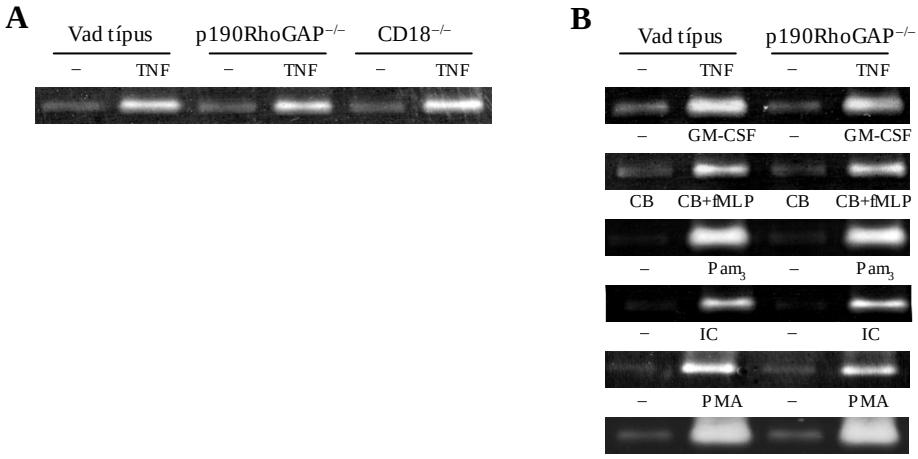
Eredményeink alapján elmondható, hogy az Src-családba tartozó, mieloid sejtekben expresszálódó Hck, Fgr és Lyn kulcsfontosságú szerepet játszik az immunkomplex-mediált reverz passzív Arthus-reakció kialakulásában.

6.5 A p190RhoGAP szerepe a neutrofil granulociták β_2-integrin-független zselatináz degranulációjában

A bevezetőben említett irodalmi előzmények alapján, mely szerint annak ellenére, hogy a p190RhoGAP GTP-áz aktiváló fehérje a fibroblasztokban és idegsejtekben kulcsfontosságú szerepet játszik az integrin-függő jelátviteli folyamatokban (úgymint sejtszétterülés, migráció). Munkatársam, Dr. Németh Tamás kimutatta, hogy a p190RhoGAP genetikai hiánya nem befolyásolja nagymértékben a neutrofil granulociták ezen β_2-integrin-függő folyamatait [I]. Azon túl, hogy a p190RhoGAP hiányában nem csökkent drámai mértékben a neutrofilek szétterülési képessége, illetve a p190RhoGAP nem befolyásolta érdemben a neutrofilek adhézió-függő szuperoxid-termelését és migrációs képességét, kíváncsiak voltunk ezen GTP-áz aktiváló fehérje szerepére a β_2-integrin független jelpályákban is.

Jelen munkám során a p190RhoGAP szerepét vizsgáltam a neutrofil granulociták β_2-integrin független zselatináz degranulációjában. A neutrofil granulociták szekunder és tercier granulumaiból (szekvenciálisan ezek a leghamarabb, legkönnyebben ürülő granulumok) felszabaduló zselatináz, mátrix metalloproteáz lévén kulcsfontosságú szerepet játszik a neutrofil granulociták extravazációjában, és a szövetközti térben történő migrációja során az érfal bazális membránjában lévő kollagén és extracelluláris mátrix bontása révén. Adherens körülmények között (fibrinogén felszínre helyezve) a neutrofil granulocitákat, koaktivátorként szolubilis TNF molekulával stimulálva azokat, zselatináz zimográfiával jól detektálható mértékű zselatináz-ürítés figyelhető meg [102]. Kísérleteimben fibrinogén felszínen TNF aktivációt követően a vad típusú neutrofil granulocitákkal összevethető mértékű zselatináz degranulációt tapasztaltunk mind a p190RhoGAP$^{-/-}$, mind a (β_2-integrin-függő folyamatok vizsgálatánál referenciaként használt) β_2-integrin-hiányos CD18$^{-/-}$ neutrofilek esetén. Ez utóbbi arra engedett következtetni, hogy az adhézió-függő aktiváció kiváltásához használt gyulladásos citokin, a szolubilis TNF képes adhéziótól független módon is kiváltani a neutrofil granulociták zselatináz granulumainak ürülését, ugyanis a sejtválasz a β_2-integrin-hiányos egér neutrofilekben sem károsodott (47. ábra/A).

Ezt követően a β_2-integrintől független zselatináz degranuláció további vizsgálatára a sejteket sejtszuszpenzióban (polipropilén csövekben, Mg^{2+}-mentes környezetben) aktiváltam szolubilis TNF segítségével (47. ábra/B). Az ily módon kiváltott zselatináz-ürítésben sem mutatkozott különbség a vad típusú és a p190RhoGAP-hiányos neutrofilek között. Egy másik citokin-stimulus, a neutrofilek túléléséért, differenciálódásáért felelős GM-CSF hatására megfigyelhető degranuláció sem változott a p190RhoGAP hiányában (47. ábra/B).



47. ábra: A p190RhoGAP nem elengedhetetlen az egér neutrofil granulociták zselatináz degranulációjához. A neutrofil granulocitákat 50 ng/ml egér TNF, 10 ng/ml GM-CSF, 3 μM fMLP 1 μg/ml Pam_3CSK_4, HSA–anti-HSA immunkomplex felszín és 100 nM PMA segítségével aktiváltuk (A) fibrinogén felszínen, (B) sejtszuszpenzióban. A CB előkezelés 10 μM koncentrációban történt,. Reprezentatív zselatináz zimogramok (n=3). Publikálva: [I].

A neutrofilek mintázatfelismerő receptorain keresztüli jelátvitel eredményeként létrejövő zselatináz-ürítés nem sérült továbbá a G-fehérje-kapcsolt receptoron keresztül szignalizáló fMLP-vel (ez esetben a bakteriális tripeptiddel történő aktiváció előtt az intenzívebb, ezáltal egyértelműen detektálható sejtválasz kialakulása érdekében citokalazin B-vel kezeltük elő a sejteket), illetve a Toll-like receptor 2 szintetikus agonistával, a Pam_3CSK_4-el kiváltott sejtválasz esetén (47. ábra/B). A továbbiakban kíváncsiak voltunk, vajon a p190RhoGAP hiánya befolyásolja-e a neutrofil granulociták Fc-receptoron keresztüli szignalizációját. Az immobilizált immunkomplex-felszínen (HSA–anti-HSA) történő aktivációt követően a p190RhoGAP$^{-/-}$ neutrofil granulociták felülúszóiból detektált zselatináz-mennyiség, összevetve a vad típusú neutrofilek esetén kapott eredménnyel azonban nem mutatott érdemi különbséget (47. ábra/B). A

p190RhoGAP nem befolyásolta továbbá a nemfiziológiás (illetve nem receptoron keresztül ható) aktivátor forbolészter (PMA) által kiváltott nagy mértékű degranulációt sem, mely arra utal, hogy ezen fehérje hiánya nem befolyásolta a sejtek válaszadó képességét (47. ábra/B).

Összefoglalva, eredményeink alapján elmondható, hogy a gyulladásos mediátor TNF képes volt adherens felszín nélkül, β_2-integrintől független módon kiváltani a neutrofilek zselatináz degranulációját. A p190RhoGAP hiánya nem befolyásolta a neutrofilek zselatináz-ürítését, amennyiben a sejteket TNF-receptoron, G-fehérje-kapcsolt receptorokon, Toll-like receptoron keresztül, Fc-receptoron, valamint nemfiziológiás agonistával, PMA segítségével aktiváltuk. Ezek alapján elmondható, hogy a p190RhoGAP nem játszik elengedhetetlen szerepet a neutrofil granulociták β_2-integrin független jelátviteli folyamataiban.

7. MEGBESZÉLÉS

A neutrofil granulociták a veleszületett immunrendszer tagjaiként biztosítják a szervezetünk kórokozókkal szembeni védelmét, ezáltal kulcsfontosságú szerepet töltenek be a gyulladásos folyamatok kialakulásában. Kóros körülmények között működésük nagyban hozzájárul az autoimmun gyulladásos folyamatok során kialakuló, sokszor funkcióvesztéssel is járó szövetkárosodás létrejöttéhez. A neutrofil granulociták effektor sejtválaszainak megjelenéséhez többnyire sejtfelszíni receptoraikról induló intracelluláris jelátviteli utak vezetnek, melyekben esszenciális szerepet töltenek be az egyes tirozin-kinázok.

PhD-munkám során a neutrofil granulociták tirozin-kinázokon keresztül zajló jelátviteli mechanizmusainak vizsgálatával foglalkoztam, főként farmakológiai megközelítéssel. Elvégeztünk egy viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálatot, mely során a neutrofil granulociták sejtválaszait gátolni képes tirozin-kináz gátlókat azonosítottunk. Munkám nagyrészében egy klinikumban antileukémiás szerként használt kis molekulasúlyú tirozin-kináz gátló vegyület – a dasatinib – hatását vizsgáltam a neutrofil granulociták effektor sejtválaszainak, valamint egyes neutrofil-függő autoimmun betegségmodellek kialakulására. Vizsgáltam továbbá ezen tirozin-kináz gátlószer fő célmolekuláinak, az Src-típusú tirozin-kinázoknak a genetikai hiányát egy kísérletes autoimmun betegségmodellben, illetve az Src-kinázok egyik szubsztrátjának, a p190RhoGAP molekulának a neutrofil granulociták integrin-független jelátviteli folyamataiban betöltött szerepét szintén genetikai megközelítést alkalmazva.

A PhD-munkám első részében gyulladásgátló hatással rendelkező molekulák keresését végeztük el egy viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálat segítségével, mely során a Vichem Kft. kis molekulasúlyú tirozin-kináz gátló vegyülettárából származó gátlószerek hatását vizsgáltuk a humán neutrofil granulociták effektor sejtválaszaira. Találati-, vagy úgynevezett hit-molekuláknak tekintettük azokat a molekulákat, melyek az általunk alkalmazott 10 μM koncentrációban teljes mértékben gátolták a fiziológiás (integrinen és Fc-receptoron keresztüli) aktiválási rendszerben mutatott sejtválaszokat, de nem befolyásolták a nem-fiziológiás (forbolészter) stimulus hatására megjelenő szuperoxid-termelést. A szűrővizsgálat során 2417 molekula tesztelését végeztük el, melyből közel 40 találati-molekulát azonosítottunk. A találati-

molekulák nagyrésze nagy hatékonysággal gátolta az Src-családba tartozó tirozin-kinázokat, melyek közül kitűnt a klinikai használatban lévő antileukémiás Abl és Src tirozin-kináz gátló dasatinib és bosutinib. A szűrővizsgálat alapján felmerült, hogy a gyulladásgátlásban ígéretes terápiás célponttá válhatnak a daganatellenes terápiákban már ismert támadáspontnak számító Src-típusú tirozin-kinázok.

Doktori munkám második részében a tirozin-kináz gátló dasatinib hatását vizsgáltuk érett humán neutrofil granulociták működésére *in vitro* körülmények között (publikálva [I]). A kis molekulasúlyú tirozin-kináz gátlószerek klinikai alkalmazása forradalmi áttörést jelentett egyes daganatos megbetegedések kezelésében az elmúlt években [250]. A 2000-es évek elején elsőként klinikai bevezetésre kerülő tirozin-kináz gátló az imatinib-mezilát (Gleevec) volt, mely drámai mértékben növelte a krónikus mieloid leukémiában szenvedő betegek túlélési esélyeit [251]. Az imatinib a betegség hátterében lévő Bcr-Abl fúziós fehérje konstitutív kinázaktivitását képes nagy specificitással gátolni. Bár a betegek nagyrészénél az imatinib terápia hatékonynak bizonyult, de egyes esetekben a hatás elveszett, vagy súlyos mellékhatások jöttek létre [21]. Az imatinib-rezisztencia, illetve -intolerancia kiküszöbölésére tett erőfeszítések nyomán fejlesztették ki a második generációs Bcr-Abl gátlókat, köztük a vizsgálataink fókuszában is álló dasatinibet [34]. Amellett, hogy a dasatinib hatását széles körben vizsgálták tumorsejtekre/tumorsejtvonalakra, jelenleg egyre több irodalmi adat áll rendelkezésre egészséges, érett sejtekre (pl. T-limfocitákra, NK-sejtekre, bazofil granulocitákra, oszteoklasztokra) gyakorolt hatásairól is. Befolyása a vérben legnagyobb számban keringő fehérvérsejtek, a neutrofil granulociták működésére azonban ezidáig nem volt ismeretes. Eredményeink alapján elmondható, hogy a dasatinib drámai mértékben gátolta a neutrofil granulociták adhézió-függő és immunkomplex-aktiváció hatására létre jövő sejtválaszait, úgymint a neutrofilek szuperoxid-termelését, letapadását, szétterülését, laktoferrin-ürítését. Szérummentes körülmények között a félgátló-koncentrációt minden esetben 50 nM alatti koncentráció-tartományban találtuk, a legérzékenyebbnek mutatkozó adhézió-függő aktivációs rendszerben ez az IC_{50} érték 10 nM körüli volt. Az adhézió-függő aktiváció során tapasztalt markáns hatással szemben a dasatinib nem gátolta ebben a koncentráció-tartományban a kostimulusként használt gyulladásos citokin, a TNFα receptorán keresztül létrejövő p38 MAPK-, ERK-foszforilációt, zselatináz-ürítést. Ezen túlmenően

a dasatinib csak a legmagasabb alkalmazott dózisban csökkentette szignifikáns mértékben a munkatársam, Dr. Németh Tamás méréseiben a TNF hatására a β_2-integrin Mac-1 CD11b-láncának sejtfelszíni upregulációját és aktivációját [II]. Az adhézió-függő aktiváció és az immunkomplex-mediált folyamatok során megjelenő sejtválaszokra gyakorolt erőteljes gátló hatásával szemben mérsékelten vagy csupán nagy koncentrációban gátolta a G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli aktivációt követő szuperoxid-termelést, laktoferrin-ürítést, p38 MAPK- és ERK-foszforilációt, valamint zselatináz-ürítést. Továbbá munkatársam, Dr. Németh Tamás méréseiben nem gátolta szignifikáns mértékben a G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztül létrejövő CD11b sejtfelszíni upregulációját és aktivációját [II]. A dasatinib a mintázatfelismerő receptorokon keresztül létrejövő sejtválaszokat (szuperoxid-termelés, p38 MAPK-, ERK-foszforiláció, zselatináz-ürítés) szintén csupán a legnagyobb általunk alkalmazott dózisokban befolyásolta. A dasatinib nem gyakorolt drámai hatást a neutrofil granulociták direkt antimikróbiális aktivitására sem. Kísérleteimben mérsékelten gátolta a neutrofilek direkt baktériumölési képességét, munkatársam, Dr. Németh Tamás méréseiben a dasatinib nem befolyásolta jelentősen a baktériumok neutrofil granulociták általi fagocitózisát sem [II]. Háromdimenziós körülmények között Transwell-kamrában vizsgálva a dasatinib jelenlétében nem károsodott a neutrofil granulociták polikarbonát-filteren és extracelluláris mátrix rétegen keresztüli migrációs képessége sem. Ezzel szemben müncheni kollaborátoraink, Barbara Walzog és munkatársai szintén β_2-integrin-függő módon, Zigmond-kamrában videomikroszkópia segítségével vizsgálták a dasatinib hatását a neutrofilek migrációjára statikus körülmények és folyadékáramlás alatt. Azt tapasztalták, hogy a dasatinib nagymértékben gátolta a neutrofilek migrációját statikus körülmények között, fibrinogén felszínen vándoroltatva a sejteket fMLP (IC_{50}: 17-28 nM) és IL-8 koncentrációgrádiens mellett [II]. Ezzel szemben a folyadékáramlás alatt végzett kétdimenziós mechanotaktikus migrációs vizsgálatok során a sejteket integrin-ligand (fibrinogén, ICAM-1) felszínen, egyenletes fMLP koncentráció mellett késztették vándorlásra. Ezen körülmények között jól modellezhető (szelektinek jelenléte nélkül) az intraluminális mászás (crawling) folyamata [126,252]. Kísérleteikben a felszínhez letapadt kezeletlen sejtek hozzávetőlegesen 50%-a vált le a felszínről a 10 perces időintervallumban alkalmazott folyadékáramlást követően [II]. A 100 nM dasatinib

kezelés csökkentette a letapadt sejtek számát már a folyadékáramlás beindítása előtt, illetve az után is [II]. Ugyanakkor a felszínhez letapadva maradt sejtek migrációját érdemben nem befolyásolta [II]. Ez alapján felmerül, hogy a dasatinib ezen kísérletekben a neutrofil granulociták letapadását gátolta csupán, és érintetlenül hagyta a mechanotaktikus migrációt. Az adhézió-függő aktiváció során megfigyelt sejtválaszok és a kétdimenziós rendszerben mutatott migráció drámai csökkenése dasatinib hatására ellentmondásban áll a háromdimenziós körülmények között mutatott normál sejtvándorlással, mely azt feltételezi, hogy ezen két folyamat különböző jelátviteli utak eredménye [102,120,124].

A szervezetben a dasatinib döntő része (96%-a) szérumfehérjékhez kötődik, így a bevitt dasatinib mennyiségnek csupán a (plazmában szabadon maradt) néhány százaléka felelős a terápiás hatás létrejöttéért. A dasatinib hatását ezért a szérummentes feltételek mellett megvizsgáltuk a terápiás körülményekhez közelebb álló rendszerben, teljes szérum jelenlétében is. Kísérleteinkben a humán perifériás vérből a preparálási eljárás elhagyásával nyert fehérvérsejtek adhéziós képességét vizsgáltuk. A dasatinib szignifikánsan gátolta a fehérvérsejtek (főként neutrofil granulociták) letapadását 50-100 nM koncentráció tartományban, stimulustól függően 200-300 nM félgátló-koncentráció mellett. Kísérleteinkben teszteltük miként hat a dasatinib élő szervezetben a fehérvérsejtek működésére. Kísérleti állatoknak szájon át adva a gátlószert vizsgáltuk annak hatását a fehérvérsejtek adhéziójára *ex vivo* autológ szérum jelenlétében. A különböző kísérletes leukémia állatmodellekben használt dózissal [32,34,253] nagyságrendben egyező 5 mg/kg dasatinib szájon át adva teljes mértékben megakadályozta a kísérleti egerek perifériás véréből származó fehérvérsejtek letapadását *ex vivo*.

A dasatinib jelenlegi terápiás adagolása a krónikus mieloid leukémiában és Philadelphia-kromoszóma pozitív akut limfoid leukémiában szenvedő betegek esetén napi egyszer, esetleg kétszer 70 mg, vagy napi egyszer 100-140 mg [36,254]. A legrészletesebben vizsgált 70 mg dasatinib dózis mellett mért legmagasabb plazmakoncentráció (C_{max}) 50-100 ng/ml, mely hozzávetőlegesen 100-200 nM dasatinib koncentrációt jelent [36,255,256]. Magától értetődően a 70 mg-ot meghaladó dózis esetén ennél magasabb C_{max} értékkel kell számolni, illetve a plazmakoncentráció meghatározásánál nem elhanyagolhatóak az egyéni és etnikai különbségek sem [36,255-

257]. A gyermekek esetén a felnőtteknél alkalmazott terápiás mennyiségnél magasabb dózisú dasatinib jóval magasabb plazmakoncentrációt eredményezett. Megközelítőleg a C_{max} 100-200 ng/ml, azaz 200-400 nM koncentráció-tartományban volt, míg néhány esetben a C_{max} kiugró 240 ng/ml, azaz 480 nM fölötti értéket is felvett [257]. Ezek alapján elmondható, hogy a dasatinib kezelés hatására a plazmában található dasatinib koncentrációja a 100-200 nM tartományt eléri, sőt nagymértékben meg is haladhatja. Ebben a koncentráció-tartományban a teljes szérum jelenlétében végzett vizsgálatainkban már szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fehérvérsejtek adhéziós képességében, mely arra utal, hogy az érett humán neutrofil granulocitákra gyakorolt hatások egy része nagy valószínűséggel megjelenik a dasatinib terápiás alkalmazása során.

A tirozin-kináz gátló dasatinib fő célmolekulái az Abl és az Src tirozin-kinázok, melyeket szubnanomólos koncentrációban képes gátolni *in vitro* kináz-szelektivitási vizsgálatok alapján [32]. A legtöbb kismolekulás tirozin-kináz inhibitor multikináz-gátló, azaz fő célmolekuláikon kívül más tirozin-kinázokra is hatnak, így a dasatinib is képes egyéb tirozin-kinázokat (pl. Btk, c-Kit, Efrin-család) gátolni, ugyan az Abl- és Src-kinázoknál nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban [258]. Fő célmolekulái közül mind az Abl-, mind az Src-kinázok részt vesznek a neutrofil granulociták jelátviteli folyamataiban [122,123,127,156,211]. A dasatinib neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásmechanizmusának vizsgálata során saját, a dolgozatban nem mutatott, eddig nem publikált eredményeink alapján azt találtuk, hogy az Abl-kináz genetikai hiányában az egér neutrofil granulocitáknak mind az integrin-, mind az Fc-receptor-függő folyamatai megtartottak, emellett *in vivo* a K/BxN szérum transzfer artritiszben az Abl-hiányos egerekben megjelenő ízületi gyulladás mértéke megegyezett a vad típusú egerekben tapasztalttal. Ezzel szemben az Src-családba tartozó tirozin-kinázok elengedhetetlenek az integrin-mediált [122,123] és Fc-receptoron keresztül zajló jelátviteli folyamatokhoz [IV] neutrofilekben. Kísérleteink során a dasatinib jelenlétében drámai mértékű intracelluláris tirozin-foszforiláció gátlást tapasztaltunk, mely nagyon hasonlított az Src-kinázok genetikai hiánya esetén egér neutrofilekben látott nagymértékű tirozin-foszforiláció csökkenéshez [120]. Az alapján, hogy az Abl-kináz hiányában a neutrofil granulociták funkciói saját kísérleteinkben nem mutattak károsodást, ezzel szemben az Src-kinázok hiányában mind az integrin, mind az Fc-

receptorról induló jelpályák érintettek, felmerül, hogy a dasatinib az Src-kinázok gátlásán keresztül fejti ki hatását. Az Src-családba tartozó tirozin-kinázok aktiválják a jelátvitel során az integrintől downstream elhelyezkedő Syk tirozin-kinázt [120,124]. A Syk elengedhetetlen a neutrofil granulociták integrinről induló jelátviteli folyamataihoz [120], illetve a Syk az Fc-receptorról induló jelpálya során is aktiválódik [209]. Ezek alapján, valamint a Syk foszforilációjának saját kísérleteinkben dasatinib jelenlétében tapasztalt drámai csökkenése arra utal, hogy a dasatinib gátló hatása az integrin- és Fc-receptor mediált folyamatokra (legalábbis részben) a Syk aktiválódásához szükséges foszforilációs lépés gátlása révén érvényesül.

Azon gyógyszerek, melyek befolyásolják a különböző immunsejtek működését, feltehetően hatnak a szervezet kórokozókkal szembeni védelmére is. A dasatinib-terápia sem kivétel ez alól. Nagyon gyakori mellékhatásai között szerepel a (bakteriális, virális, valamint gombás eredetű) fertőzésekkel szembeni fokozott fogékonyság megjelenése [36]. Ennek hátterében egyrészt a gyógyszer hatására kifejlődő gyakori mieloszuppreszió és neutropénia állhat [36]. Ezen túlmenően eredményeink alapján dasatinib jelenlétében a neutrofilek közvetlen antibakteriális aktivitása részleges csökkenést mutatott, illetve az adherens körülmények között különböző szolubilis agonistákkal (TNF, C5a, LPS) aktivált sejtek effektor sejtválaszai drámai mértékben csökkentek, mely mind hozzájárulhat az antimikróbiális aktivitás csökkenéséhez.

A PhD-munkám harmadik részében a korábbi *in vitro* mérések alapján a neutrofilek effektor funkcióit hatékonyan gátló dasatinib hatását két *in vivo* gyulladásos betegségmodellben vizsgáltuk. A neutrofil granulociták kulcsfontosságúak egyes autoimmun gyulladásos betegségek effektor fázisának létrejöttében és a következményes szövetkárosodás kialakulásában [245]. Az autoimmun gyulladásos betegségmodellek közül a humán RA-hoz morfológiailag és hisztopatológiai szempontból is nagyon hasonló K/BxN szérum transzfer artritisz modellt, illetve az immunkomplex-képződés által létrehozott gyulladásos bőrreakciót, a reverz passzív Arthus-reakciót használtuk. A K/BxN szérum transzfer artritisz modellben a dasatinib dózis-függő módon csökkentette az ízületi gyulladás klinikai tüneteit. Az 50 mg/kg dasatinib napi kétszeri szájon át történő adagolásával szignifikánsan csökkentek a gyulladás klinikai tünetei, valamint a gyulladás során kialakuló bokavastagodás

mértéke, továbbá csökkent a gyulladással járó ízületi funkció-vesztés is. Nemcsak a betegség indításával egyidőben megkezdett preventív kezelés bizonyult hatékonynak, hanem az 50 mg/kg dasatinib kétszeri dózisban a már kialakult gyulladás továbbfejlődését is mérsékelte. Az általunk használt másik gyulladásos betegségmodellben, a reverz passzív Arthus reakcióban az 50 mg/kg dasatinib szintén szignifikánsan csökkentette a gyulladással járó ödémaképződést.

A dasatinib jelentős gátló hatása az *in vivo* gyulladásos betegségmodellekben, valamint a neutrofil granulociták integrin-, és Fc-receptor-függő folyamataiban felveti a lehetőségét a dasatinib, vagy hasonló szerkezettel, támadáspont profillal rendelkező dasatinib-származékok alkalmazhatóságának a túlzott neutrofil aktivációval járó (autoimmun) gyulladásos folyamatokban. Azonban meg kell jegyeznem, hogy a kísérletes állatmodellekben általunk alkalmazott dasatinib dózis a különböző leukémiás állatmodellekben használt mennyiségnél jóval magasabb [32,34,253]. Figyelembe véve a leukémiás betegek dasatinibbel történő kezelése során megjelenő nem elhanyagolható mellékhatásokat, amennyiben a jövőbeni kutatások során esetleg felmerül a dasatinib, vagy dasatinib-származékok gyulladásgátlásban történő vizsgálata, az feltehetően jobb mellékhatás profilt eredményező szerkezeti változtatásokkal, esetleg alternatív adagolási módszer (pl. lokális kezelés, vagy szabályozott hatóanyag-felszabadulást biztosító készítmények) beállításával válhat valóra.

A doktori munkám negyedik részében a dasatinib fő célkinázai közé is tartozó, neutrofilekben expresszálódó Src-típusú tirozin-kinázok (Hck, Fgr, Lyn) szerepét vizsgáltuk az immunkomplex-mediált Arthus-reakcióban transzgénikus technológiával (kézirat [IV]). Eredményeink szerint az Src-típusú tirozin-kinázok genetikai hiányában a reverz passzív Arthus-reakcióval járó ödémaképződés drámai mértékben csökkent a vad típusú állatokhoz képest. A transzgénikus egértörzs felhasználásával nyert eredményeink tovább erősítik azt a feltételezést, miszerint a dasatinib (legalább is részben) Src-típusú tirozin-kinázok gátlásán keresztül érvényesíti gátló hatását, illetve támogatja a munkacsoportunk által végzett további vizsgálatok eredményét, mely szerint a Src-típusú tirozin-kinázok kulcsfontosságúak az autoantitest-indukált gyulladásos folyamatok kialakulásában.

A PhD munkám ötödik részében az Src-típusú tirozin-kinázok egyik szubsztrátjának, a p190RhoGAP GTP-áz aktiváló fehérjének a szerepét vizsgáltuk a

neutrofil granulociták β_2-integrin független jelátviteli folyamataiban. Irodalmi adatok alapján a p190RhoGAP többek között a neuronok és fibroblasztok integrin-mediált jelátviteli folyamataiban tölt be kulcsfontosságú szerepet egyes alacsony intrinsic GTP-áz aktivitással rendelkező kis G-fehérjék (pl. Rho család) aktiválásán keresztül [133-136]. Azok alapján, hogy a vizsgálataink fókuszában lévő neutrofil granulociták működésében esszenciális szerepet töltenek be a β_2-integrinek, az Src-kinázok, valamint számos kis G-fehérje, továbbá, hogy a p190RhoGAP a neutrofilekben kifejeződik és bizonyos stimulusok hatására aktiválódik [138-140] felmerült a p190RhoGAP szerepe a neutrofil granulociták integrin-függő folyamataiban. Munkatársam, Dr. Németh Tamás részletes *in vitro* és *in vivo* vizsgálataiban azonban azt találta, hogy a p190RhoGAP nem játszik fontos szerepet a neutrofil granulociták integrinen keresztül létrejövő jelátviteli folyamataiban [I]. Ezen munka keretein belül kíváncsiak voltunk arra, hogy a p190RhoGAP szükséges-e az integrin-független jelátviteli folyamatokhoz. A neutrofil granulociták effektor sejtválaszai közül a zselatináz degranulációt vizsgáltuk a kérdés megválaszolásához. Eredményeink arra utaltak, hogy a p190RhoGAP hiánya nem befolyásolta érdemben a neutrofilek zselatináz-ürítését adhéziótól független módon aktiválva a sejteket TNF-receptor, G-fehérje-kapcsolt receptor, Toll-like receptor agonisták, illetve forbolészter jelenlétében, valamint immobilizált immunkomplex hatására. A zselatináz degranulációs vizsgálatok során kapott eredmények összhangban állnak munkatársam, Dr. Németh Tamás eredményeivel, melyben további integrin-független sejtválaszokat (szuperoxid-termelés, p38-foszforiláció, CD11b-upreguláció) vizsgált [I]. Összefoglalva elmondható, hogy a p190RhoGAP GTP-áz aktiváló fehérje a neutrofil granulociták integrin-függő folyamatai mellett nem játszik esszenciális szerepet az integrin-független sejtválaszokban sem. Eredményeinket magyarázhatja egyrészt, hogy a különböző kis G-fehérjék (pl. Cdc42, Rho, Rac) működésük során antagonisztikus hatást fejthetnek ki [259,260], ezáltal esetleg a p190RhoGAP hiánya nem tudott érvényesülni. Másrészt a neutrofilekben expresszálódó többi RhoGAP fehérje (pl. p190-B, Bcr, p50RhoGAP) esetleg funkcionális kompenzációs folyamatok révén fedhették el a p190RhoGAP hiányát [261-265]. Bár számos adat szól a kompenzációs folyamatok ellen (pl. a szerkezetileg nagyon hasonló p190-B nem képes Src-kinázok általi foszforilációra, nem képes a p120RasGAP-pal asszociálódni,

valamint a p190-B hiányában megjelenő általános fenotípus eltér a p190RhoGAP-hiányában tapasztalttól) [263-266].

8. KÖVETKEZTETÉSEK

A célkitűzések alapján a következtetéseimet az alábbi öt pontban foglalom össze.

1. Egy fókuszált, kismolekulás kináz-gátló vegyülettár elemeinek hatását vizsgáltam a neutrofil granulociták funkcionális sejtválaszán egy általunk beállított viszonylag nagyáteresztő képességű szűrővizsgálat segítségével. A 2417 letesztelt molekulából közel 40, a neutrofil granulociták fiziológiás működését gátolni képes kináz-gátló molekulát azonosítottam. A szűrővizsgálatok eredményeként felmerül, hogy a neutrofilekben lévő Src-típusú kinázok gátlása révén gyulladásgátló hatás érhető el.

2. Az Abl- és Src-kináz gátló dasatinib hatását érett humán neutrofil granulociták működésére részletes *in vitro* vizsgálatok segítségével elemeztem. A dasatinib drámai mértékben gátolta a neutrofil granulociták integrin-, és Fc-receptor-függő folyamatait. Ezzel szemben a dasatinib részlegesen gátolta, vagy nem befolyásolta a G-fehérje-kapcsolt receptorokon, illetve a mintázatfelismerő receptorokon keresztüli aktivációt követően létrejövő sejtválaszokat. Szérum jelenlétében a dasatinib a terápiás koncentráció-tartományban gátolta a fehérvérsejtek letapadási képességét. Összességében eredményeink alapján elmondható, hogy a dasatinib hatékonyan képes gátolni az érett humán neutrofil granulociták számos jelátviteli útvonalát.

3. A dasatinib gátolta az általunk vizsgált neutrofil-függő gyulladásos betegségmodellekben, a K/BxN szérum-transzfer artritiszben és a reverz passzív Arthus-reakcióban a gyulladás klinikai tüneteit. Ezáltal felmerül a dasatinib-származékokban rejlő terápiás lehetőség a túlzott neutrofil aktivációval járó (autoimmun) gyulladásos megbetegedésekben.

4. A mieloid sejtekben expresszálódó Src-típusú tirozin-kinázok (Hck, Fgr és Lyn) genetikai hiányában a reverz passzív Arthus-reakció drámai mértékben csökkent. Munkacsoportunk további eredményeivel együtt ez az Src-típusú tirozin-kinázok kulcsfontosságú szerepére utal az immunkomplex-mediált gyulladásos folyamatokban.

5. A p190RhoGAP nem játszott elengedhetetlen szerepet a neutrofil granulociták β_2-integrintől független degranulációs folyamataiban.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A neutrofil granulociták kulcsfontosságú szerepet játszanak szervezetünk kórokozókkal szembeni védelmében, valamint kóros esetekben egyes autoimmun betegségek kialakulásában. Doktori ösztöndíjasként a tirozin-kinázok szerepét vizsgáltam a neutrofil granulociták jelátviteli folyamataiban, illetve egyes neutrofil-függő gyulladásos betegségmodellekben.

Munkám első részében egy kismolekulás kináz-gátló vegyülettár részhalmazának tesztelése során közel 40, a neutrofil granulociták fiziológiás működését gátló kináz-inhibitort azonosítottam. A legígéretesebb molekulák nagyrésze hatékonyan gátolta az Src-típusú tirozin-kinázokat.

PhD-munkám második részében vizsgált Abl- és Src-kináz gátló dasatinib hatékonyan gátolta a neutrofilek integrin-függő és Fc-receptoron keresztül létrejövő sejtválaszait, azonban nem befolyásolta jelentősen ebben a koncentráció-tartományban a G-fehérjéhez-kapcsolt, illetve a mintázatfelismerő receptorokon keresztüli sejtaktivációt. A dasatinib gátló hatása szérum jelenlétében is megjelent az egyes leukémiák kezelésére használt terápiás koncentráció-tartományban. Eredményeink alapján elmondható, hogy a dasatinib gátolja a neutrofil granulociták működését. A dasatinib *in vivo* vizsgálataimban a kísérleti állatoknak szájon át adva csökkentette az autoantitest-indukált ízületi gyulladás klinikai jeleit, illetve az immunkomplex-mediált reverz passzív Arthus-reakció során kialakuló ödémaképződést. Ezen *in vivo*, illetve korábbi *in vitro* eredményeink alapján felmerül a dasatinib-származékok jövőbeni túlzott neutrofil aktivációval járó gyulladásos betegségekben történő terápiás alkalmazhatósága.

További vizsgálataimban a neutrofilekre jellemző Src-családba tartozó kinázok (Hck, Fgr és Lyn) genetikai hiányában a reverz passzív Arthus-reakció következményeként megjelenő ödémaképződés drámai mértékben csökkent a vad típusú egerekhez képest. Továbbá az Src-szubsztrát p190RhoGAP nem bizonyult elengedhetetlenek a neutrofilek β_2-integrin-független degranulációs folyamataiban.

A neutrofilek jelátviteli folyamatainak megismerése hozzásegíthet bennünket a gyulladásos folyamatok alaposabb megértéséhez, és olyan célmolekulák azonosításához, melyek megalapozhatják a gyulladásos betegségekben alkalmazható újabb terápiás megoldások kifejlesztését.

10. SUMMARY

Neutrophils are essential effector cells against invading microorganisms and in the pathogenesis of some autoimmune diseases. During my PhD work, I investigated the role of tyrosine kinases in neutrophil signaling pathways and in two neutrophil-mediated autoimmune disease models.

First, I tested several potential tyrosine kinase inhibitors from a molecular library on human neutrophil functions and I identified approximately 40 effective molecules, the most of which significantly blocked the activity of different Src family kinases.

During the second part, I found that the Src/Abl dual specificity inhibitor dasatinib effectively inhibited the integrin- and Fc receptor-mediated cell responses of human peripheral neutrophils, while being less potent in altering G protein-coupled and pattern recognition receptor triggered activations. The above mentioned inhibitory effect could also be observed in the present of serum in the concentration range seen in dasatinib-treated leukemic patients. Furthermore, per os dasatinib treatment could significantly reduce the clinical signs and ankle thickening of an autoantibody-induced experimental arthritis in mice and the immune complex-mediated oedema formation in the reverse passive Arthus reaction. Based on these *in vivo* results, dasatinib-related molecules may serve as therapeutic agents in the control of autoimmune conditions characterized by a massive neutrophil overactivation in the future.

During my further studies, I observed a dramatic reduction in oedema formation in the absence of the myeloid-specific Src family kinases Hck, Fgr and Lyn in the reverse passive Arthus reaction compared to wild type animals. The Src kinase substrate p190RhoGAP seemed not to be essential in β_2-integrin mediated degranulation processes in mouse neutrophils.

A better understanding of the participating molecules in neutrophil signaling pathways improves our knowledge on inflammatory processes. The identified critical components can serve as new therapeutical targets and can be the basis of novel treatment strategies in autoimmune diseases.

11. IRODALOMJEGYZÉK

[1] Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:33-44.

[2] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. Science 2002;298:1912-1934.

[3] Johnson SA, Hunter T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. Nat Methods 2005;2:17-25.

[4] Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Neuron 1992;9:383-391.

[5] Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. J Biol Chem 1998;273:11987-11990.

[6] Hunter T. Oncoprotein networks. Cell 1997;88:333-346.

[7] Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. Annu Rev Biochem 2000;69:373-398.

[8] Kornev AP, Taylor SS. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. Biochim Biophys Acta 2010;1804:440-444.

[9] Lemmon MA, Ferguson KM. Pleckstrin homology domains. Curr Top Microbiol Immunol 1998;228:39-74.

[10] Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. Oncogene 2004;23:7918-7927.

[11] Yeatman TJ. A renaissance for SRC. Nat Rev Cancer 2004;4:470-480.

[12] Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. Sci Signal 2010;3:re6.

[13] Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smithgall TE. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. J Biol Chem 2013;288:5443-5450.

[14] Hubbard SR. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. Curr Opin Struct Biol 2002;12:735-741.

[15] Lewis JA, Lebois EP, Lindsley CW. Allosteric modulation of kinases and GPCRs: design principles and structural diversity. Curr Opin Chem Biol 2008;12:269-280.

[16] Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? Nat Immunol 2009;10:356-360.

[17] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ, Investigators I. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003;348:994-1004.

[18] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA, Investigators I. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2006;355:2408-2417.

[19] Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science 2000;289:1938-1942.

[20] Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). Cancer Res 2002;62:4236-4243.

[21] Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2002;2:117-125.

[22] Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med 2006;354:2531-2541.

[23] Uitdehaag JC, Verkaar F, Alwan H, de Man J, Buijsman RC, Zaman GJ. A guide to picking the most selective kinase inhibitor tool compounds for pharmacological validation of drug targets. Br J Pharmacol 2012;166:858-876.

[24] Thanopoulou E, Judson I. The safety profile of imatinib in CML and GIST: long-term considerations. Arch Toxicol 2012;86:1-12.

[25] Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2006;355:2733-2743.

[26] Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. Nature 1995;378:298-302.

[27] Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco MG, Frattini A, Porta F, Ugazio AG, Johnston JA, Candotti F, O'Shea JJ, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). Nature 1995;377:65-68.

[28] Fleischmann R, Cutolo M, Genovese MC, Lee EB, Kanik KS, Sadis S, Connell CA, Gruben D, Krishnaswami S, Wallenstein G, Wilkinson BE, Zwillich SH. Phase IIb dose-ranging study of the oral JAK inhibitor tofacitinib (CP-690,550) or adalimumab monotherapy versus placebo in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs. Arthritis Rheum 2012;64:617-629.

[29] Das J, Chen P, Norris D, Padmanabha R, Lin J, Moquin RV, Shen Z, Cook LS, Doweyko AM, Pitt S, Pang S, Shen DR, Fang Q, de Fex HF, McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Behnia K, Schieven GL, Wityak J, Barrish JC. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazinyl)]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino)]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor. J Med Chem 2006;49:6819-6832.

[30] Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. Nat Rev Cancer 2007;7:345-356.

[31] Hantschel O, Rix U, Schmidt U, Burckstummer T, Kneidinger M, Schutze G, Colinge J, Bennett KL, Ellmeier W, Valent P, Superti-Furga G. The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:13283-13288.

[32] Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweyko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl- phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. J Med Chem 2004;47:6658-6661.

[33] O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. Cancer Res 2005;65:4500-4505.

[34] Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. Science 2004;305:399-401.

[35] Hochhaus A, Kantarjian H. The development of dasatinib as a treatment for chronic myeloid leukemia (CML): from initial studies to application in newly diagnosed patients. J Cancer Res Clin Oncol 2013;139:1971-1984.

[36] EMEA. European Medicines Agency Product information - Dasatinib. 2010.

[37] EMEA. European Medicines Agency Scientific discussion - Dasatinib. 2006.

[38] FDA. SPRYCEL® (dasatinib) Tablet for Oral Use 2010.

[39] Demetri GD. Targeting c-kit mutations in solid tumors: scientific rationale and novel therapeutic options. Semin Oncol 2001;28:19-26.

[40] Ostman A, Heldin CH. Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. Adv Cancer Res 2001;80:1-38.

[41] Andres AC, Reid HH, Zurcher G, Blaschke RJ, Albrecht D, Ziemiecki A. Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. Oncogene 1994;9:1461-1467.

[42] Chen J, Elfiky A, Han M, Chen C, Saif MW. The Role of Src in Colon Cancer and Its Therapeutic Implications. Clin Colorectal Cancer 2014;13:5-13.

[43] Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev 2003;22:337-358.

[44] Guarino M. Src signaling in cancer invasion. J Cell Physiol 2010;223:14-26.

[45] Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. Nat Rev Clin Oncol 2009;6:587-595.

[46] Kater AP, Spiering M, Liu RD, Doreen Te Raa G, Slinger E, Tonino SH, Beckers MM, Daenen S, Doorduijn JK, Lankheet NA, Luijks DM, Eldering E, van Oers MH. Dasatinib in combination with fludarabine in patients with refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase 2 study. Leuk Res 2014;38:34-41.

[47] Scher KS, Somlo G. Dasatinib : a novel therapy for breast cancer? Expert Opin Investig Drugs 2013;22:795-801.

[48] Algazi AP, Weber JS, Andrews SC, Urbas P, Munster PN, DeConti RC, Hwang J, Sondak VK, Messina JL, McCalmont T, Daud AI. Phase I clinical trial of the Src inhibitor dasatinib with dacarbazine in metastatic melanoma. Br J Cancer 2012;106:85-91.

[49] Sharma MR, Wroblewski K, Polite BN, Knost JA, Wallace JA, Modi S, Sleckman BG, Taber D, Vokes EE, Stadler WM, Kindler HL. Dasatinib in previously treated metastatic colorectal cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. Invest New Drugs 2012;30:1211-1215.

[50] Jia J, Starodub A, Cushman I, Liu Y, Marshall DJ, Hurwitz HI, Nixon AB. Dual inhibition of alphaV integrins and Src kinase activity as a combination therapy strategy for colorectal cancer. Anticancer Drugs 2013;24:237-250.

[51] Johnson FM, Bekele BN, Feng L, Wistuba I, Tang XM, Tran HT, Erasmus JJ, Hwang LL, Takebe N, Blumenschein GR, Lippman SM, Stewart DJ. Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2010;28:4609-4615.

[52] Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, Johnson FM, Ginsberg LE, El-Naggar A, Culotta KS, Takebe N, Wright J, Tran HT, Papadimitrakopoulou VA. Phase 2

study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 2011;117:2112-2119.

[53] Montero JC, Seoane S, Ocana A, Pandiella A. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. Clin Cancer Res 2011;17:5546-5552.

[54] Araujo J, Logothetis C. Dasatinib: a potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. Cancer Treat Rev 2010;36:492-500.

[55] Schade AE, Schieven GL, Townsend R, Jankowska AM, Susulic V, Zhang R, Szpurka H, Maciejewski JP. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. Blood 2008;111:1366-1377.

[56] Lee KC, Ouwehand I, Giannini AL, Thomas NS, Dibb NJ, Bijlmakers MJ. Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation. Leukemia 2010;24:896-900.

[57] Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Gotz M, Dohner H, Bunjes D, Schmitt M. Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Br J Haematol 2009;144:195-205.

[58] Pogliaghi M, Papagno L, Lambert S, Calin R, Calvez V, Katlama C, Autran B. The tyrosine kinase inhibitor Dasatinib blocks in-vitro HIV-1 production by primary CD4+ T cells from HIV-1 infected patients. AIDS 2014;28:278-281.

[59] Wölfl M, Schwinn S, Yoo YE, Ress ML, Braun M, Chopra M, Schreiber SC, Ayala VI, Ohlen C, Eyrich M, Beilhack A, Schlegel PG. Src-kinase inhibitors sensitize human cells of myeloid origin to Toll-like-receptor-induced interleukin 12 synthesis. Blood 2013;122:1203-1213.

[60] Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hoglund M, Kovanen P, Laurinolli T, Liesveld J, Paquette R, Pinilla-Ibarz J, Rauhala A, Shah N, Simonsson B, Sinisalo M, Steegmann JL, Stenke L, Porkka K. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. Leukemia 2009;23:1398-1405.

[61] Blake SJ, Bruce Lyons A, Fraser CK, Hayball JD, Hughes TP. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. Blood 2008;111:4415-4416.

[62] Kneidinger M, Schmidt U, Rix U, Gleixner KV, Vales A, Baumgartner C, Lupinek C, Weghofer M, Bennett KL, Herrmann H, Schebesta A, Thomas WR, Vrtala S, Valenta R, Lee FY, Ellmeier W, Superti-Furga G, Valent P. The effects of dasatinib on IgE receptor-dependent activation and histamine release in human basophils. Blood 2008;111:3097-3107.

[63] Gratacap MP, Martin V, Valera MC, Allart S, Garcia C, Sie P, Recher C, Payrastre B. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. Blood 2009;114:1884-1892.

[64] Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. Blood 2011;117:5198-5206.

[65] Vandyke K, Dewar AL, Farrugia AN, Fitter S, Bik To L, Hughes TP, Zannettino AC. Therapeutic concentrations of dasatinib inhibit in vitro osteoclastogenesis. Leukemia 2009;23:994-997.

[66] Vandyke K, Dewar AL, Diamond P, Fitter S, Schultz CG, Sims NA, Zannettino AC. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib dysregulates bone remodeling through inhibition of osteoclasts in vivo. J Bone Miner Res 2010;25:1759-1770.

[67] Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. J Leukoc Biol 2013;94:595-601.

[68] von Vietinghoff S, Ley K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. J Immunol 2008;181:5183-5188.

[69] Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. Cytokine 2008;42:277-288.

[70] Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity 2010;33:657-670.

[71] Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. Blood 2009;113:4711-4719.

[72] Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. Nat Genet 2003;34:70-74.

[73] Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. J Clin Invest 2010;120:2423-2431.

[74] Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. Immunity 2003;19:583-593.

[75] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol 2007;7:678-689.

[76] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 2011;11:519-531.

[77] Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood 1997;89:3503-3521.

[78] Ligeti E, Mocsai A. Exocytosis of neutrophil granulocytes. Biochem Pharmacol 1999;57:1209-1214.

[79] Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol 2007;28:340-345.

[80] Robinson JM. Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. Histochem Cell Biol 2009;131:465-469.

[81] Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ 2011;18:581-588.

[82] Yang CW, Strong BS, Miller MJ, Unanue ER. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. J Immunol 2010;185:2927-2934.

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

[84] 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. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. Nat Immunol 2011;13:170-180.

[85] Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. N Engl J Med 2000;343:1703-1714.

[86] Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving β_2 integrins and selectin ligands. Curr Opin Hematol 2002;9:30-35.

[87] Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. Ann N Y Acad Sci 2012;1250:50-55.

[88] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol 2008;8:34-47.

[89] Jakus Z, Németh T, Verbeek JS, Mócsai A. Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. J Immunol 2008;180:618-629.

[90] Petroni KC, Shen L, Guyre PM. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-g and glucocorticoids. J Immunol 1988;140:3467-3472.

[91] Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. J Exp Med 1990;171:597-613.

[92] van Egmond M, Bakema JE. Neutrophils as effector cells for antibody-based immunotherapy of cancer. Semin Cancer Biol 2013;23:190-199.

[93] Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role in asthma. FASEB J 2001;15:940-949.

[94] Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. Nat Rev Immunol 2010;10:387-402.

[95] Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A. The structure, regulation, and function of ZAP-70. Immunol Rev 2009;228:41-57.

[96] Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL, Lowell CA. Fcg receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. J Exp Med 2000;191:669-682.

[97] Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. Mol Immunol 2004;41:631-643.

[98] Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. Immunol Today 2000;21:148-154.

[99] Saijo K, Schmedt C, Su IH, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, Adachi T, Patke A, Santana A, Tarakhovsky A. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kB activation during B cell development. Nat Immunol 2003;4:274-279.

[100] Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. J Exp Med 1997;186:1027-1039.

[101] Newbrough SA, Mócsai A, Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, Lowell CA, Koretzky GA. SLP-76 regulates Fcγ receptor and integrin signaling in neutrophils. Immunity 2003;19:761-769.

[102] Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, Mócsai A. Critical role of phospholipase Cγ2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. J Exp Med 2009;206:577-593.

[103] Kim C, Dinauer MC. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. J Immunol 2001;166:1223-1232.

[104] Utomo A, Cullere X, Glogauer M, Swat W, Mayadas TN. Vav proteins in neutrophils are required for FcgR-mediated signaling to Rac GTPases and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase component $p40^{phox}$. J Immunol 2006;177:6388-6397.

[105] Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mócsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR, Hawkins PT. PI3Kβ plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. Sci Signal 2011;4:ra23.

[106] Sperandio M, Gleissner CA, Ley K. Glycosylation in immune cell trafficking. Immunol Rev 2009;230:97-113.

[107] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 2002;110:673-687.

[108] Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. Annu Rev Immunol 2009;27:339-362.

[109] Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. J Biol Chem 2000;275:23409-23412.

[110] Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. Neutrophil activation via β_2 integrins (CD11/CD18): Molecular mechanisms and clinical implications. Thromb Haemost 2007;98:262-273.

[111] Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: Dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. J Cell Biol 1989;109:1341-1349.

[112] Bos JL, de Bruyn K, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de Rooij J, van Mansfeld F, Zwartkruis F. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. Biochem Soc Trans 2003;31:83-86.

[113] Caron E, Self AJ, Hall A. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. Curr Biol 2000;10:974-978.

[114] M'Rabet L, Coffer P, Zwartkruis F, Franke B, Segal AW, Koenderman L, Bos JL. Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. Blood 1998;92:2133-2140.

[115] Deevi RK, Koney-Dash M, Kissenpfennig A, Johnston JA, Schuh K, Walter U, Dib K. Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates inside-out signaling of beta2 integrins in neutrophils. J Immunol 2010;184:6575-6584.

[116] Dash-Koney M, Deevi RK, McFarlane C, Dib K. 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 2011;90:741-749.

[117] Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, Moser M, Metin A, Fried M, Tomlinson I, Hogg N. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. Nat Med 2009;15:306-312.

[118] 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. A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. Nat Med 2009;15:313-318.

[119] Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. J Clin Invest 1987;80:1550-1560.

[120] Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. Immunity 2002;16:547-558.

[121] Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA, Mócsai A. Immunoreceptor-like signaling by β_2 and β_3 integrins. Trends Cell Biol 2007;17:493-501.

[122] Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. J Immunol 1999;162:1120-1126.

[123] Lowell CA, Fumagalli L, Berton G. Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58$^{c\text{-}fgr}$ results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. J Cell Biol 1996;133:895-910.

[124] Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. Nat Immunol 2006;7:1326-1333.

[125] Gakidis MA, Cullere X, Olson T, Wilsbacher JL, Zhang B, Moores SL, Ley K, Swat W, Mayadas T, Brugge JS. Vav GEFs are required for b_2 integrin-dependent functions of neutrophils. J Cell Biol 2004;166:273-282.

[126] 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. A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on β_2 integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. Blood 2009;114:4209-4220.

[127] Cui L, Chen C, Xu T, Zhang J, Shang X, Luo J, Chen L, Ba X, Zeng X. c-Abl kinase is required for b_2 integrin-mediated neutrophil adhesion. J Immunol 2009;182:3233-3242.

[128] Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. Science 2003;302:445-449.

[129] Szczur K, Zheng Y, Filippi MD. The small Rho GTPase Cdc42 regulates neutrophil polarity via CD11b integrin signaling. Blood 2009;114:4527-4537.

[130] Filippi MD, Szczur K, Harris CE, Berclaz PY. Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung. Blood 2007;109:1257-1264.

[131] Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA, Dinauer MC, Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. Blood 2004;104:832-839.

[132] Moran MF, Polakis P, McCormick F, Pawson T, Ellis C. Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. Mol Cell Biol 1991;11:1804-1812.

[133] Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ. c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. J Cell Biol 1995;130:355-368.

[134] Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. Nat Cell Biol 2001;3:361-367.

[135] Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. Nature 1992;359:153-154.

[136] Ridley AJ, Self AJ, Kasmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, Ellis C. rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. EMBO J 1993;12:5151-5160.

[137] Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. Mol Biol Cell 2001;12:2711-2720.

[138] Dusi S, Donini M, Wientjes F, Rossi F. Translocation of p190rho guanosine triphosphatase-activating protein from cytosol to the membrane in human neutrophils stimulated with different agonists. Biochem Biophys Res Commun 1996;219:859-862.

[139] Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). Mol Biol Cell 1993;4:1217-1223.

[140] Dib K, Melander F, Andersson T. Role of p190RhoGAP in β_2 integrin regulation of RhoA in human neutrophils. J Immunol 2001;166:6311-6322.

[141] Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, Lee DM. Neutrophil-derived leukotriene B_4 is required for inflammatory arthritis. J Exp Med 2006;203:837-842.

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

[143] Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D.

Arthritis critically dependent on innate immune system players. Immunity 2002;16:157-168.

[144] McMeekin SR, Dransfield I, Rossi AG, Haslett C, Walker TR. E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophils. Blood 2006;107:4938-4945.

[145] Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B4 potentiates CpG signaling for enhanced cytokine secretion by human leukocytes. J Immunol 2009;183:2650-2658.

[146] Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 2009;20:289-298.

[147] Karnad AB, Hartshorn KL, Wright J, Myers JB, Schwartz JH, Tauber AI. Priming of human neutrophils with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine by a calcium-independent, pertussis toxin-insensitive pathway. Blood 1989;74:2519-2526.

[148] Neptune ER, Bourne HR. Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:14489-14494.

[149] Neptune ER, Iiri T, Bourne HR. Gai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. J Biol Chem 1999;274:2824-2828.

[150] Lehmann DM, Seneviratne AM, Smrcka AV. Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. Mol Pharmacol 2008;73:410-418.

[151] Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-b2 and -b3 and PI3Kg in chemoattractant-mediated signal transduction. Science 2000;287:1046-1049.

[152] Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. Cell 1994;77:83-93.

[153] Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi

PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kg in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. Science 2000;287:1040-1046.

[154] Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase g in inflammation. Science 2000;287:1049-1053.

[155] Mócsai A, Bánfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L, Faragó A, Ligeti E. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. Biochem Pharmacol 1997;54:781-789.

[156] Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. J Immunol 2000;164:4321-4331.

[157] Fumagalli L, Zhang H, Baruzzi A, Lowell CA, Berton G. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. J Immunol 2007;178:3874-3885.

[158] McGarrigle D, Huang XY. GPCRs signaling directly through Src-family kinases. Sci STKE 2007;2007:pe35.

[159] Barlic J, Andrews JD, Kelvin AA, Bosinger SE, DeVries ME, Xu L, Dobransky T, Feldman RD, Ferguson SS, Kelvin DJ. Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCRI. Nat Immunol 2000;1:227-233.

[160] Luttrell DK, Luttrell LM. Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. Oncogene 2004;23:7969-7978.

[161] Wan Y, Kurosaki T, Huang XY. Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. Nature 1996;380:541-544.

[162] Cambien B, Pomeranz M, Millet MA, Rossi B, Schmid-Alliana A. Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. Blood 2001;97:359-366.

[163] Mócsai A, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T, Lowell CA. G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. Blood 2003;101:4155-4163.

[164] Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. Dev Comp Immunol 2004;28:509-554.

[165] Boey H, Rosenbaum R, Castracane J, Borish L. Interleukin-4 is a neutrophil activator. J Allergy Clin Immunol 1989;83:978-984.

[166] Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity 2001;14:705-714.

[167] McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. Blood 1998;92:4828-4835.

[168] Scheel-Toellner D, Wang K, Henriquez NV, Webb PR, Craddock R, Pilling D, Akbar AN, Salmon M, Lord JM. Cytokine-mediated inhibition of apoptosis in non-transformed T cells and neutrophils can be dissociated from protein kinase B activation. Eur J Immunol 2002;32:486-493.

[169] Ellis TN, Beaman BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. Immunology 2004;112:2-12.

[170] Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. Eur J Immunol 2010;40:2360-2368.

[171] Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. Immunol Rev 2009;228:273-287.

[172] Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. Biochem Pharmacol 2006;72:1538-1546.

[173] O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. Immunity 2012;36:542-550.

[174] Mermel CH, McLemore ML, Liu F, Pereira S, Woloszynek J, Lowell CA, Link DC. Src family kinases are important negative regulators of G-CSF-dependent granulopoiesis. Blood 2006;108:2562-2568.

[175] Zhu QS, Robinson LJ, Roginskaya V, Corey SJ. G-CSF-induced tyrosine phosphorylation of Gab2 is Lyn kinase dependent and associated with enhanced Akt and differentiative, not proliferative, responses. Blood 2004;103:3305-3312.

[176] Zhu QS, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ. G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. Blood 2006;107:1847-1856.

[177] Corey SJ, Burkhardt AL, Bolen JB, Geahlen RL, Tkatch LS, Tweardy DJ. 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 1994;91:4683-4687.

[178] Pelletier M, Ratthe C, Girard D. 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 2002;532:164-170.

[179] Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science 1993;261:472-475.

[180] Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. A role for IL-18 in neutrophil activation. J Immunol 2001;167:2879-2886.

[181] Rhyne JA, Mizel SB, Taylor RG, Chedid M, McCall CE. Characterization of the human interleukin 1 receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Clin Immunol Immunopathol 1988;48:354-361.

[182] O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. Immunol Rev 2008;226:10-18.

[183] Dri P, Haas E, Cramer R, Menegazzi R, Gasparini C, Martinelli R, Scheurich P, Patriarca P. Role of the 75-kDa TNF receptor in TNF-induced activation of neutrophil respiratory burst. J Immunol 1999;162:460-466.

[184] Renshaw SA, Timmons SJ, Eaton V, Usher LR, Akil M, Bingle CD, Whyte MK. Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor. J Leukoc Biol 2000;67:662-668.

[185] Kamohara H, Matsuyama W, Shimozato O, Abe K, Galligan C, Hashimoto S, Matsushima K, Yoshimura T. Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils. Immunology 2004;111:186-194.

[186] Wimmer N, Huber B, Barabas N, Rohrl J, Pfeffer K, Hehlgans T. Lymphotoxin beta receptor activation on macrophages induces cross-tolerance to TLR4 and TLR9 ligands. J Immunol 2012;188:3426-3433.

[187] Riegel A, Maurer T, Prior B, Stegmaier S, Heppert V, Wagner C, Hansch GM. Human polymorphonuclear neutrophils express RANK and are activated by its ligand, RANKL. Eur J Immunol 2012;42:975-981.

[188] Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorph AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J Immunol 1986;136:4220-4225.

[189] Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegri F, Ottonello L. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. Cell Signal 2008;20:557-568.

[190] McColl SR, Beauseigle D, Gilbert C, Naccache PH. Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. J Immunol 1990;145:3047-3053.

[191] Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. Immunology 1996;89:105-111.

[192] MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. Cell Signal 2002;14:477-492.

[193] Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. Cell Signal 2012;24:1297-1305.

[194] Kilpatrick LE, Sun S, Korchak HM. Selective regulation by delta-PKC and PI 3-kinase in the assembly of the antiapoptotic TNFR-1 signaling complex in neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol 2004;287:C633-642.

[195] Geering B, Gurzeler U, Federzoni E, Kaufmann T, Simon HU. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. Blood 2011;117:5953-5962.

[196] Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood 2003;102:2660-2669.

[197] Suresh R, Mosser DM. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. Adv Physiol Educ 2013;37:284-291.

[198] Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. Immunity 2010;32:305-315.

[199] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 2011;34:637-650.

[200] Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. Eur J Immunol 2007;37:467-478.

[201] Lee WB, Kang JS, Yan JJ, Lee MS, Jeon BY, Cho SN, Kim YJ. Neutrophils Promote Mycobacterial Trehalose Dimycolate-Induced Lung Inflammation via the Mincle Pathway. PLoS Pathog 2012;8:e1002614.

[202] Batliner J, Mancarelli MM, Jenal M, Reddy VA, Fey MF, Torbett BE, Tschan MP. CLEC5A (MDL-1) is a novel PU.1 transcriptional target during myeloid differentiation. Mol Immunol 2011;48:714-719.

[203] Graham LM, Gupta V, Schafer G, Reid DM, Kimberg M, Dennehy KM, Hornsell WG, Guler R, Campanero-Rhodes MA, Palma AS, Feizi T, Kim SK, Sobieszczuk P, Willment JA, Brown GD. The C-type lectin receptor CLECSF8 (CLEC4D) is expressed by myeloid cells and triggers cellular activation through Syk kinase. J Biol Chem 2012;287:25964-25974.

[204] Kerrigan AM, Dennehy KM, Mourao-Sa D, Faro-Trindade I, Willment JA, Taylor PR, Eble JA, Reis e Sousa C, Brown GD. CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. J Immunol 2009;182:4150-4157.

[205] Plato A, Willment JA, Brown GD. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. Int Rev Immunol 2013;32:134-156.

[206] Ekman AK, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. Immunology 2010;130:55-63.

[207] Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. Immunity 2011;34:680-692.

[208] Pereira S, Zhou M, Mócsai A, Lowell C. Resting murine neutrophils express functional α_4 integrins that signal through Src family kinases. J Immunol 2001;166:4115-4123.

[209] Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. Mol Cell Biol 1998;18:4209-4220.

[210] El Jamali A, Valente AJ, Clark RA. Regulation of phagocyte NADPH oxidase by hydrogen peroxide through a Ca^{2+}/c-Abl signaling pathway. Free Radic Biol Med 2010;48:798-810.

[211] Ball CJ, King MR. Role of c-Abl in L-selectin shedding from the neutrophil surface. Blood Cells Mol Dis 2011;46:246-251.

[212] Lopez-Herrera G, Vargas-Hernandez A, Gonzalez-Serrano ME, Berron-Ruiz L, Rodriguez-Alba JC, Espinosa-Rosales F, Santos-Argumedo L. Bruton's tyrosine kinase--an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system. J Leukoc Biol 2014;95:243-250.

[213] Furneri G, Mantovani LG, Belisari A, Mosca M, Cristiani M, Bellelli S, Cortesi PA, Turchetti G. Systematic literature review on economic implications and pharmacoeconomic issues of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 2012;30:S72-84.

[214] Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. Lancet 2001;358:903-911.

[215] Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. Lancet 2009;373:659-672.

[216] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2011;365:2205-2219.

[217] Marigliano B, Soriano A, Margiotta D, Vadacca M, Afeltra A. Lung involvement in connective tissue diseases: a comprehensive review and a focus on rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev 2013;12:1076-1084.

[218] Turesson C. Extra-articular rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2013;25:360-366.

[219] Crowson CS, Liao KP, Davis JM, 3rd, Solomon DH, Matteson EL, Knutson KL, Hlatky MA, Gabriel SE. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. Am Heart J 2013;166:622-628 e621.

[220] Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, Visser M, Stehouwer CD, Dekker JM, Nijpels G, Heine R, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. Arthritis Rheum 2009;61:1571-1579.

[221] Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP, Aletaha D, Landewe R. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. Ann Rheum Dis 2014;73:3-5.

[222] Keystone EC, Smolen J, van Riel P. Developing an effective treatment algorithm for rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2012;51 Suppl 5:v48-54.

[223] Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. Immunol Rev 2008;223:7-19.

[224] Walker JG, Smith MD. The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2005;32:1650-1653.

[225] Jakus Z, Simon E, Balázs B, Mócsai A. Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. Arthritis Rheum 2010;62:1899-1910.

[226] Elliott ER, Van Ziffle JA, Scapini P, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA. Deletion of Syk in Neutrophils Prevents Immune Complex Arthritis. Journal of immunology 2011.

[227] Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, Carano RA, Darrow J, Davies DR, DeForge LE, Diehl L, Ferrando R, Gallion SL, Giannetti AM, Gribling P, Hurez V, Hymowitz SG, Jones R, Kropf JE, Lee WP, Maciejewski PM, Mitchell SA, Rong H, Staker BL, Whitney JA, Yeh S, Young

WB, Yu C, Zhang J, Reif K, Currie KS. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. Nat Chem Biol 2011;7:41-50.

[228] Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. J Immunol 2001;167:1601-1608.

[229] Monach PA, Nigrovic PA, Chen M, Hock H, Lee DM, Benoist C, Mathis D. Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis: critical producers of Fc receptor gamma, the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1. Arthritis and rheumatism 2010;62:753-764.

[230] Jonsson H, Allen P, Peng SL. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. Nat Med 2005;11:666-671.

[231] Mohr W, Westerhellweg H, Wessinghage D. Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. an electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1981;40:396-399.

[232] Quayle JA, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. Immunology 1997;91:266-273.

[233] Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. Immunol Today 1997;18:320-324.

[234] Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. J Exp Med 1998;188:119-131.

[235] Lowell CA, Soriano P, Varmus HE. Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. Genes Dev 1994;8:387-398.

[236] Keri G, Szekelyhidi Z, Banhegyi P, Varga Z, Hegymegi-Barakonyi B, Szantai-Kis C, Hafenbradl D, Klebl B, Muller G, Ullrich A, Eros D, Horvath Z, Greff Z, Marosfalvi J, Pato J, Szabadkai I, Szilagyi I, Szegedi Z, Varga I, Waczek F, Orfi

L. Drug discovery in the kinase inhibitory field using the Nested Chemical Library technology. Assay Drug Dev Technol 2005;3:543-551.

[237] Jakus Z, Berton G, Ligeti E, Lowell CA, Mócsai A. Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on costimulation through low affinity FcγRs: Full activation requires both integrin and nonintegrin signals. J Immunol 2004;173:2068-2077.

[238] Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E. Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. Blood 2004;104:2947-2953.

[239] Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. Cell 1996;87:811-822.

[240] Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. Immunity 1999;10:451-461.

[241] Sylvestre D, Clynes R, Ma M, Warren H, Carroll MC, Ravetch JV. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. J Exp Med 1996;184:2385-2392.

[242] Schymeinsky J, Sindrilaru A, Frommhold D, Sperandio M, Gerstl R, Then C, Mócsai A, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for β_2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. Blood 2006;108:3919-3927.

[243] Berton G, Laudanna C, Sorio C, Rossi F. Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils. J Cell Biol 1992;116:1007-1017.

[244] Zarbock A, Ley K. Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. Arch Biochem Biophys 2011;510:112-119.

[245] Németh T, Mócsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. Immunol Lett 2012;143:9-19.

[246] Shmagel KV, Chereshnev VA. Molecular bases of immune complex pathology. Biochemistry (Mosc) 2009;74:469-479.

[247] Ravetch JV. A full complement of receptors in immune complex diseases. J Clin Invest 2002;110:1759-1761.

[248] Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu Rev Cell Dev Biol 1997;13:513-609.

[249] Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. Trends Pharmacol Sci 2012;33:122-128.

[250] Tibes R, Trent J, Kurzrock R. Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2005;45:357-384.

[251] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001;344:1031-1037.

[252] Schymeinsky J, Sperandio M, Walzog B. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. Trends Cell Biol 2011;21:247-255.

[253] Boulos N, Mulder HL, Calabrese CR, Morrison JB, Rehg JE, Relling MV, Sherr CJ, Williams RT. Chemotherapeutic agents circumvent emergence of dasatinib-resistant BCR-ABL kinase mutations in a precise mouse model of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 2011;117:3585-3595.

[254] Bristol-Myers-Squibb. FDA-approved label for Sprycel (dasatinib) tablet for oral use. 2010.

[255] Demetri GD, Lo Russo P, MacPherson IR, Wang D, Morgan JA, Brunton VG, Paliwal P, Agrawal S, Voi M, Evans TR. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 2009;15:6232-6240.

[256] Kim DW, Goh YT, Hsiao HH, Caguioa PB, Kim D, Kim WS, Saikia T, Agrawal S, Roy A, Dai D, Bradley-Garelik MB, Mukhopadhyay J, Jootar S. Clinical profile of dasatinib in Asian and non-Asian patients with chronic myeloid leukemia. Int J Hematol 2009;89:664-672.

[257] Aplenc R, Blaney SM, Strauss LC, Balis FM, Shusterman S, Ingle AM, Agrawal S, Sun J, Wright JJ, Adamson PC. Pediatric phase I trial and pharmacokinetic

study of dasatinib: a report from the children's oncology group phase I consortium. J Clin Oncol 2011;29:839-844.

[258] Lindauer M, Hochhaus A. Dasatinib. Recent Results Cancer Res 2010;184:83-102.

[259] Ory S, Munari-Silem Y, Fort P, Jurdic P. Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. J Cell Sci 2000;113:1177-1188.

[260] Diebold BA, Fowler B, Lu J, Dinauer MC, Bokoch GM. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. J Biol Chem 2004;279:28136-28142.

[261] Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. Biochem J 2001;355:851-858.

[262] Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, O. D, Bokoch GM, Groffen J, Heisterkamp N. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. Cell 1995;80:719-728.

[263] Sordella R, Classon M, Hu KQ, Matheson SF, Brouns MR, Fine B, Zhang L, Takami H, Yamada Y, Settleman J. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. Dev Cell 2002;2:553-565.

[264] Matheson SF, Hu KQ, Brouns MR, Sordella R, VanderHeide JD, Settleman J. Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. Dev Neurosci 2006;28:538-550.

[265] Chakravarty G, Hadsell D, Buitrago W, Settleman J, Rosen JM. p190-B RhoGAP regulates mammary ductal morphogenesis. Mol Endocrinol 2003;17:1054-1065.

[266] Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. Cell 2003;113:147-158.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló közlemények időrendi sorrendben:

[I] Németh T, **Futosi K**, Hably Cs, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Zs, Walzog Settleman BJ, Mócsai A. Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: Generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol 2010; 185:3064-3075.*
IF: 5,745

[II] **Futosi K**, Németh T, Pick R, Vántus T, Walzog B, Mócsai A. Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood 2012; 119:4981-4991*.
IF: 9,06

[III] **Futosi K**, Fodor Sz, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol 2013; 17:638-50., Review*
IF: 2,417

[IV] Kovács M, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, **Futosi K**, Botz B, Helyes Zs, Lowell CA, Mócsai A. Hck, Fgr and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory milieu without a direct role in leukocyte recruitment
(elbírálás alatt álló kézirat)

A dolgozatomban az itt felsorolt publikációkra a zárójelben lévő római számokkal hivatkozom.

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

[V] Lövey J, Kenessey I, Rásó E, Dobos J, Vágó Á, Kásler M, Futosi K, Döme B, Tímár J, Tóvári J. A rekombináns humán erythropoietin-alpha fokozza a humán laphámrák sugárérzékenységét preklinikai modellben. *Magy Onkol. 2007; 51:(1) pp. 53-61.*
IF: –

[VI] Kenessey I, Simon E, **Futosi K**, Bereczky B, Kiss A, Erdödi F, Gallagher JT, Tímár J, Tóvári J. Antimigratory and antimetastatic effect of heparin-derived 4-18 unit oligosaccharides in a preclinical human melanoma metastasis model. *Thromb Haemost. 2009; 102(6):1265-73.*
IF: 4,451

[VII] Borbély G, Huszár M, Varga A, **Futosi** K, Mócsai A, Őrfi L, Idei M, Mandl J, Kéri Gy, Vántus T. Optimization of important early ADME(T) parameters of NADPH oxidase-4 inhibitor molecules. *Med Chem. 2012; 8(2):174-81.*
IF: 1,37

[VIII] Jani PK, Kajdácsi E, Megyeri M, Dobó J, Doleschall Z, **Futosi K**, Tímár CsI, Mócsai A, Makó V, Gál P, Cervenak L. MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: a novel link between complement system and neutrophil granulocytes. *PLoS One. 2014; 29;9(1):e87104.*
IF: 3,73

[IX] Tóvári J, **Futosi K**, Bartal A, Tátrai E, Gacs A, Kenessey I, Paku S. Boyden Chamber-Based Method for the Characterization of the Distribution of Adhesions and Structure of the Cytoskeleton in HT1080 Fibrosarcoma Cells. *Cell Adh Migr. 2014; doi*: *10.4161/cam.28734 (megjelenés előtt)*
IF: 2,34

13. A TÁRSSZERZŐK KÖZÖTTI MUNKAMEGOSZTÁS

A doktori értekezésemben bemutatott eredmények a munkacsoportunkban folytatott közös munka részei. Az alábbiakban részletezném az egyes közleményekben és projektekben lévő munkamegosztást, különös tekintettel más PhD-hallgatókra.

A kináz-gátló könyvtár nagyáteresztő képességű szűrővizsgálata humán neutrofil granulocitákon
A kináz-gátló könyvtár molekuláit a humán neutrofil granulociták működésén magam teszteltem. A gátlószerek előállítását, előhígítását a Vichem Kft. munkatársai végezték el.

A dasatinib hatásának vizsgálata érett humán neutrofil granulociták sejtválaszaira *in vitro* (Futosi és munkatársai, *Blood* 2012)
A projektért elsősorban én voltam felelős, a cikkben közölt mérések döntő részét is én végeztem el. A dasatinib β_2-integrin inside-out szignalizációra, és a bakteriális fagocitózisra gyakorolt hatását Dr. Németh Tamás vizsgálta. A neutrofil granulociták migrációjának vizsgálatát kétdimenziós Zigmond-kamrában dasatinib jelenlétében Barbara Walzog müncheni munkacsoportja végezte.

A dasatinib hatásának vizsgálata *in vivo* gyulladásos betegségmodellekben
A projekttel elsősorban én foglalkoztam. Az artritiszes mérésekben Dr. Németh Tamás volt segítségemre. Az Arthus-reakció NanoSPECT-CT készülékkel történő mérésében Dr. Szigeti Krisztián munkacsoportja segített.

Az Src-család kinázok szerepének vizsgálata immunkomplex-mediált gyulladásos folyamatokban (Kovács és munkatársai, kézirat)
A projektért elsősorban Dr. Kovács Miklós volt felelős. A projektben az Src-családba tartozó kinázok hiányát reverz passzív Arthus-reakcióban én vizsgáltam, valamint Dr. Németh Tamással közösen végeztük az Src-családba tartozó kinázok szerepének vizsgálatát a makrofágok szuperoxid-, és citokin-termelésében.

A p190RhoGAP szerepének vizsgálata neutrofil granulocitákban és autoimmun artritisz effektor fázisában (Németh és munkatársai, *J Immunol* 2010)
A projektért elsősorban Dr. Németh Tamás volt felelős. A p190RhoGAP szerepét a neutrofilek adhézió-független zselatináz-ürítésében én vizsgáltam. Emellett résztvettem a p190RhoGAP-hiányos magzatok PCR-alapú elkülönítésében, és a CD18-hiányos egértörzzsel összefüggő artritiszes mérésekben.

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

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném köszönetem kifejezni témavezetőimnek Dr. Mócsai Attilának és Dr. Vántus Tibornak. Köszönöm Dr. Mócsai Attilának, hogy ösztöndíjas éveim alatt PhD-hallgatói közé fogadott, és bevezetett a kutatói gondolkodásba. Lehetetlen felsorolni azt a sok segítséget, amit nap, mint nap kaptam tőle a legapróbb kérdésektől kezdve a legnagyobbakig. Megtanított rá, hogy nincsenek lehetetlenek, és kitartással és lelkesedéssel a legnehezebb feladatokra is meg lehet találni a megoldást. Köszönöm Dr. Vántus Tibornak, hogy az egyetemről kilépve doktori ösztöndíjasként elindította a kutatói munkámat és bármikor bátran fordulhattam hozzá támogatásért az elmúlt évek alatt.

Köszönettel tartozom Dr. Kéri Györgynek, aki mint a Patobiokémiai munkacsoport vezetője biztosította és felügyelte PhD ösztöndíjasként a munkámat. Köszönetet szeretnék mondani az Élettani Intézet vezetőjének, Hunyady László professzor úrnak, aki lehetővé tette és támogatta az intézeten belüli munkámat. Külön köszönöm Ligeti Erzsébet professzor asszonynak, hogy gondoskodó figyelemmel támogatta a disszertáció megszületését. Köszönöm az Élettani Intézet, a Patobiokémiai munkacsoport és a Vichem Kft. valamennyi munkatársának azt a baráti és ösztönző légkört, melyben együtt dolgozhattunk.

Köszönöm egykori tudományos diákköri hallgatóimnak Balázs Bálintnak, Trendl Juditnak, Szatmári Zsófiának és Vértes Miklósnak, hogy segítségükkel és lelkes érdeklődésükkel támogattak az elmúlt években. Köszönettel tartozom munkacsoportunk egykori és jelenlegi asszisztenseinek, köztük Simon Edinának és Tóth Annának, akik megbízható és magas színvonalú háttérmunkájukkal segítettek a mindennapokban. Köszönöm a laborban Dr. Jakus Zoltánnak, Dr. Kovács Miklósnak, Dr. Győri Dávidnak, Dr. Csete Dánielnek és Csepregi Jankának segítőkészségét és a közös munka örömét. Köszönöm Dr. Gyöngyösi Norbertnek a statisztikai kiértékelésnél nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Dr. Tóvári József és Dr. Paku Sándor témavezetői munkáját, akik tudományos diákkörösként kutatói példájukkal, baráti és derűs tanításukkal egy életre megszerettették velem a pipetták és mikroszkópok világát.

Végül, de korántsem utolsósorban leírhatatlan hálával tartozom férjemnek Dr. Németh Tamásnak, aki számtalan módon segítette a dolgozat megszületését, akivel

megadatott az az egyedülálló lehetőség, hogy egy munkacsoportban dolgozhattam, aki amellett, hogy társként gondoskodó szeretettel vett körül a mindennapokban, munkatársként kiemelkedő szakmai felkészültségével és páratlan munkabírásával lett számomra példakép. Köszönöm a pótolhatatlan támogatást Családom minden tagjának és barátaimnak, akik biztatása és szeretete nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

A munkámat a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt támogatta.