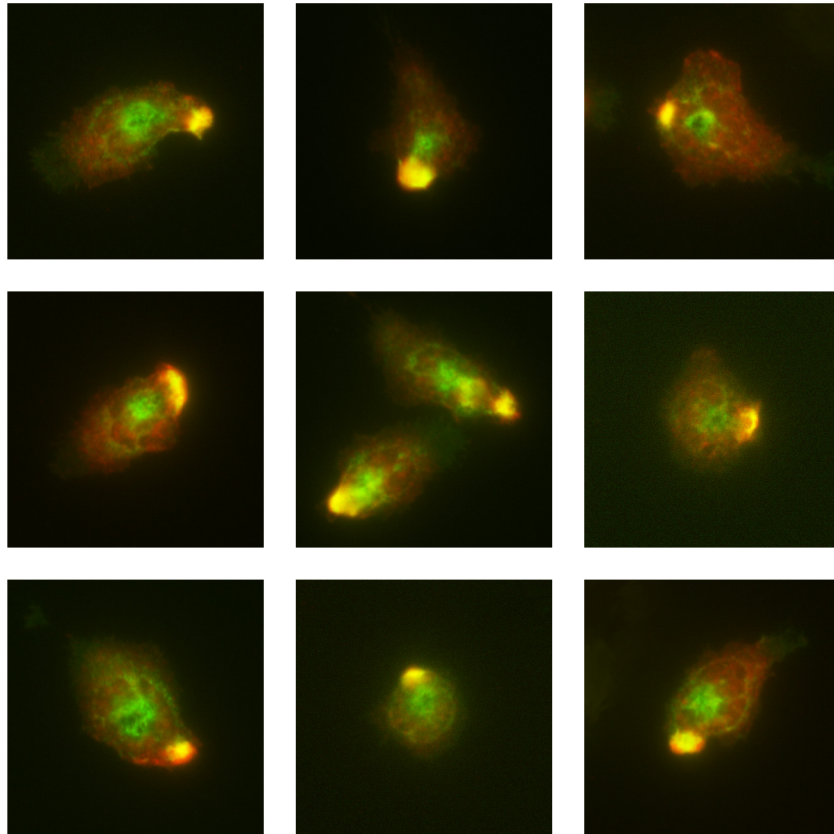


dc_158_11

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Hemopoetikus eredetű sejtek jelátvittele egészséges és kóros körülmények között

Dr. Mócsai Attila



SEMMELWEIS EGYETEM

**Budapest
2011**

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3. ÖSSZEFOGLALÁS	7
4. IRODALMI HÁTTÉR	8
4.1. Hemopoetikus eredetű sejtek működése	8
4.1.1. A neutrofil granulociták	8
4.1.2. A makrofágok működése	11
4.1.3. Az oszteoklasztok fejlődése és működése	12
4.1.4. A hízósejtek működése	13
4.1.5. A vérlemezkék működése	13
4.2. Az egyes receptorcsaládok jelátvittele	14
4.2.1. A klasszikus immunreceptorok jelátvittele	14
4.2.2. Az integrinek jelátvittele	16
4.2.3. A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvittele	18
4.2.4. Egyéb receptorok jelátvittele	19
4.3. Az autoimmun gyulladásos betegségek	19
4.4. Csontlebontás kóros körülmények között	20
5. CÉLKITŰZÉSEK	22
6. MÓDSZEREK	23
6.1. Egerek tenyésztése és genotipizálása	23
6.1.1. A kísérletekben felhasznált egértörzsek	23
6.1.2. Egerek tenyésztése	24
6.1.3. Egerek genotipizálása	24
6.1.4. A p190RhoGAP ⁻ mutáció jellemzése	25
6.2. Csontvelő-kimérák létrehozása és ellenőrzése	26
6.2.1. Magzati májsejtek és csontvelői sejtek transzplantációja	26
6.2.2. A csontvelő-kimérák ellenőrzése	27
6.3. Neutrofilek és makrofágok izolálása és tenyésztése	27
6.3.1. Humán neutrofilek izolálása	27
6.3.2. Egér neutrofilek izolálása	27
6.3.3. Egér csontvelői-eredetű makrofágok tenyésztése	28
6.4. A neutrofilek funkcionális vizsgálata	28
6.4.1. Neutrofilek aktiválása	28
6.4.2. Neutrofilek funkcionális válaszainak vizsgálata	29
6.4.3. A sejtváándorlás vizsgálata	30

6.5. Áramlási citometriás módszerek	31
6.6. Oszteoklasztok tenyésztése és funkcionális vizsgálata	31
6.7. Biokémiai vizsgálatok.....	32
6.7.1. Sejtfehérjék vizsgálata teljes-sejt lizátumból	32
6.7.2. Immunprecipitációs és GST-pulldown módszerek	32
6.7.3. Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának vizsgálata	33
6.8. Hemopoetikus sejtek retrovirális transzdukciója	33
6.9. In vivo gyulladásos modellek	33
6.9.1. K/B×N szérum nyerése	33
6.9.2. A K/B×N szérumtranszfer-arthritis vizsgálata	34
6.10. A csontanyagcsere in vivo vizsgálata.....	34
6.10.1. A nyugalmi csontszerkezet vizsgálata.....	34
6.10.2. Az ovariektómia-kiváltotta csontbontás vizsgálata	35
6.11. Statisztikai módszerek.....	35
7. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	36
7.1. Az integrin-jelátvitel vizsgálata hemopoetikus eredetű sejtekben.....	36
7.1.1. A neutrofilek integrin-függő aktiválódása.....	36
7.1.2. Syk ^{-/-} csontvelői kimerák létrehozása	37
7.1.3. A Syk szerepének vizsgálata neutrofilek integrin-jelátvitelében	38
7.1.4. ITAM-tartalmú adapter-fehérjék szerepe a β_2 -integrinek jelátvitelében.....	41
7.1.5. A PLC γ 2 szerepe neutrofilek integrin-függő aktiválódásában	48
7.1.6. Az SLP-76 szerepe a neutrofil-integrinek jelátvitelében	50
7.1.7. A p190RhoGAP-hiányos egerek létrehozása és általános jellemzése.....	51
7.1.8. A p190RhoGAP vizsgálata neutrofilek integrin-függő aktiválódásában	54
7.1.9. Az Src-kinázok és a Syk szerepe vérlemezék integrin-függő adhéziójában	54
7.1.10. Az Fc-receptorok szerepe az anti-integrin antitestek aktiváló hatásában	55
7.1.11. Megbeszélés	57
7.2. Jelátviteli folyamatok vizsgálata a neutrofilek sejtváándorlása során	59
7.2.1. A Syk szerepének vizsgálata neutrofilek migrációja során.....	59
7.2.2. Az Src-típusú kinázok szerepének vizsgálata	63
7.2.3. A DAP12 ^{-/-} FcR γ ^{-/-} neutrofilek vándorlása	64
7.2.4. A PLC γ 2 részvételének vizsgálata neutrofilek sejtváándorlásában	65
7.2.5. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata a sejtváándorlásban	66
7.2.6. Megbeszélés	66
7.3. Az Fc-receptorok szerepének és jelátvitelének vizsgálata neutrofilekben.....	68
7.3.1. Neutrofilek aktiválódása immobilizált immunkomplexek által	68
7.3.2. Fc-receptorok azonosítása neutrofilek immunkomplex-általi aktivációjában.....	70
7.3.3. A PLC γ 2 szerepe neutrofilek immunkomplex-indukált aktivációjában	72
7.3.4. A p190RhoGAP vizsgálata az immunkomplex-indukált sejtaktivációban.....	73
7.3.5. Megbeszélés	73
7.4. A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitel neutrofilekben és hízósejtekben ...	74

7.4.1. Src-kinázok és a p38 MAP-kináz szerepe az fMLP-kiváltotta degranulációban.	74
7.4.2. A Syk szerepének vizsgálata G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében	76
7.4.3. A PLC γ 2 szerepének vizsgálata G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében ..	78
7.4.4. A p190RhoGAP vizsgálata G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében.....	79
7.4.5. Megbeszélés	79
7.5. Jelátviteli folyamatok vizsgálata in vivo gyulladásos betegségmodellekben....	80
7.5.1. Az autoantitest-indukált K/B $\times$ N szérumszűrő transzfer arthritis modell	80
7.5.2. A Syk szerepe autoantitest-indukált arthritisben	83
7.5.3. A PLC γ 2 szerepe autoantitest-indukált arthritisben.....	86
7.5.4. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata arthritisben.....	87
7.5.5. PI3-kináz-izozomerek szerepe autoantitest-indukált arthritisben	88
7.5.6. Megbeszélés	89
7.6. Immunreceptor-szerű jelátvitel oszteoklasztokban és a csontanyagcserében .	91
7.6.1. A DAP12 és az Fc γ R szerepe az in vivo csontanyagcserében.....	91
7.6.2. Az oszteoklaszt-tenyészetek jellemzése DAP12, Fc γ R és Syk hiányában	93
7.6.3. Immunreceptor-szerű jelátvitel oszteoklasztokban.....	95
7.6.4. Megbeszélés	97
7.7. A PLCγ2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban és a csontanyagcserében	99
7.7.1. A PLC γ 2 szerepe az in vivo csontlebonthatásban	99
7.7.2. A PLC γ 2 szerepe oszteoklasztokban	100
7.7.3. Ovariectomia hatásának vizsgálata PLC γ 2 hiányában	102
7.7.4. Megbeszélés	103
8. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID TÁRGYALÁSA.....	105
8.1. Az értekezésben bemutatott legfontosabb eredmények.....	105
8.2. Immunreceptor-szerű jelátvitel az adaptív immunrendszeren túl	106
8.3. Oszteoimmunológia: Az immun- és csontrendszer közti párhuzamosságok..	106
9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	108
9.1. Összesített tudományometriai adatok	108
9.2. Az értekezés alapját képező közlemények	108
9.3. A PhD-dolgozatban nem szereplő további közlemények.....	110
9.4. A PhD-dolgozatban szereplő közlemények.....	111
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	112
11. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE.....	113
12. ÖT LEGFONTOSABB KÖZLEMÉNY MÁSOLATA.....	122

A címlapon a Syk (vörös) és a CD18 (zöld) ko-lokalizációja látható a sejtek migrációs frontján poly-RGD felszínen fMLP-vel kezelt vad típusú neutrofilek random migrációja során. További részleteket ld. a 54. ábra tárgyalásánál, illetve a [2] sz. hivatkozásban.

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Az értekezésben használt rövidítések

β -Gal	β -galaktozidáz
β -Geo	β -Gal–Neo fúziós fehérje
BSA	marha szérumalbumin
BV/TV	relatív csontmennyiség (bone volume/total volume)
$[Ca^{2+}]_{IC}$	intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció
C5a	komplement 5a fragmens
CB	citokalazin B
Cbl	Casitas B-sejtvonal limfóma onkogén
CHO	kínai aranyhőrcsög ováriumsejtvonal
CTAB	cetiltrimetil-ammonium-bromid (ionos detergens)
DAG	diacil-glicerin
DAP12	DNAX aktiváló fehérje 12
DC-STAMP	dendritikus-sejt-specifikus transzmembrán fehérje
DTA	diftéria-toxin A
eGFP	felerősített zöld fluoreszcens fehérje
ELISA	enzim-kapcsolt immunoszorbens vizsgálat
ERK	extracelluláris szignál által szabályozott kináz
FAK	fokális adhézión kináz
Fbg	fibrinogén
Fc γ R	Fc γ -receptor
FcR	Fc-receptor
FcR γ	Fc-receptor γ -lánc
FCS	magzati bórjúszerum
Fgr	Gardner-Rasheed macska szarkóma kináz
fMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanin (a formil-peptidek prototípusa)
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GM-CSF	granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor
Gp	glikoprotein
Gr1	egér granulocita érési marker (Ly6C és Ly6G közös epitópja)
GST	glutathion-S-transferáz
Hck	Hemopoetikus sejt kináz
HSA	humán szérumalbumin
IC	immunkomplex
IgG	immunoglobulin G
IP ₃	inozitol-trisz-foszfát
IRES	belső riboszóma-belépési hely
ITAM	immunreceptor tirozin-bázisú aktivációs motívum
KO	géntörléses (knockout) mutáns
Lfr	laktoferrin

LPS	lipopoliszacharid
LTB ₄	leukotrién B ₄
MAP kináz	mitogén-aktivált protein-kináz
M-CSF	makrofág kolónia-simuláló faktor
MIP-2	makrofág gyulladásos fehérje 2 (egér CXCL2; a humán Gro-β homológja)
MΦ	makrofág
MFI	átlagos fluoreszcencia-intenzitás
Neo	neomicin-rezisztenciát okozó aminoglikozid-foszfotranszferázt kódoló gén
OB	oszteoblaszt
OC	oszteoklaszt
OSCAR	oszteoklaszt-specifikus sejtadhéziós fehérje
Pam ₃	Pam ₃ CSK ₄ (TLR2 agonista)
PCR	polimeráz láncreakció
PGK	foszfoglicerát-kináz
PI3K	foszfoinozítid-3-kináz
PIP2	foszfatidilinozitol-bisz-foszfát
PKC	protein kináz C
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PMN	polimorfonukleáris sejt (a neutrofil granulocita szinonímája)
PY	foszfortirozin
Pyk2	Prolin-gazdag tirozin-kináz 2
RANK	az NF-κB receptor-aktivátora
RANKL	RANK ligand
RT-PCR	reverz transzkriptáz PCR
SH2	Src-homológia 2 domén
Src	Szarkóma kináz
Syk	lép tirozin-kináz
TLR	Toll-szerű receptor
TNF	tumor-nekrózis faktor
TRAP	tartarát-rezisztens savas foszfatáz
TREM	mieloid sejteken expresszáldó serkentő receptor
TSL	teljes-sejt-lizátum
VT	vad típus

3. ÖSSZEFOGLALÁS

A hemopoetikus eredetű sejtek a szervezet számos élettani folyamatában, köztük az vérgázok szállításában, a vérzéscsillapításban, az immunvédekezésben és a csontanyagcserében is kiemelkedő szerepet játszanak. A hemopoetikus eredetű sejtek számos betegség, köztük a gyulladásos betegségek, a trombotikus folyamatok, a patológiás csontlebontás és a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában is fontos kóroki szereppel bírnak. Az értekezésben bemutatott kísérletek célja különböző hemopoetikus eredetű sejtek jelátviteli folyamatainak molekuláris szintű vizsgálata és ezen mechanizmusok részvételének tanulmányozása volt a teljes szervezet egészséges és kóros működésében.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a β_2 - és β_3 -integrinek számos sejttypusban (neutrofilekben, makrofágokban és vérlemezkékben) a limfociták antigén-receptorainak jelátviteléhez hasonló módon, a Syk tirozin-kináznak két, ún. ITAM-motívumot tartalmazó adapter-fehérjéhez (a DAP12-höz és az FcR γ -hoz) való kapcsolódása révén váltják ki a sejtek aktiválódását. Ezen eredményeink egy új integrin-jelpálya alapjait fektették le. További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PLC γ 2 és az SLP-76 fehérjék szintén részt vesznek ennek a jelpályának a működésében. Érdekes módon ugyanez a jelpálya nem volt szükséges a neutrofilek β_2 -integrin-függő sejtváándorlásához, ami a β_2 -integrinek által kiváltott sejtaktiváció és migráció eltérő jelátviteli mechanizmusaira utal.

Az in vivo gyulladásos folyamatok vizsgálata során kimutattuk, hogy a Syk és a PLC γ 2 elengedhetetlen szerepet játszik az autoantitest-kiváltotta ízületi gyulladás létrejöttében. Ez a megfigyelésünk fontos új információkkal szolgált a rheumatoid arthritis patomechanizmusával kapcsolatban.

A csontanyagcsere vizsgálatával foglalkozó kísérleteinkben kimutattuk, hogy a DAP12, az FcR γ és a Syk egy, a fentihez hasonló ITAM-függő mechanizmuson keresztül szabályozza az oszteoklasztok fejlődését. A jelpálya in vivo szerepét mutatta, hogy a DAP12 és az FcR γ együttes hiánya súlyos oszteopetrotóziást eredményezett. Ezen kísérleteink egy új, immunreceptor-szerű oszteoklaszt-jelpályát azonosítottak. További kísérleteink során kimutattuk, hogy a PLC γ 2 szintén szükséges az oszteoklasztok in vitro és in vivo fejlődéséhez. Bár a PLC γ 2 hiánya a nyugalmi csontállomány növekedését eredményezte, az ovariectomia-kiváltotta csontvesztés (a posztmenopauzális oszteoporózis állatmodellje) nem károsodott a PLC γ 2-hiányos egerekben, ami a nyugalmi és ovariectomia-indukált csontlebontás eltérő mechanizmusaira utal.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy sikerült kimutatnunk a limfociták antigén-receptorainak jelátviteléhez hasonló mechanizmusok szerepét számos, az adaptív immunválasztól független biológiai folyamatban. Más munkacsoportok eredményeivel együtt összességében kimondhatjuk, hogy az ITAM-függő jelátvitel az adaptív immunrendszerénél ősből és számos egyéb biológiai válaszban is szerepet játszó folyamat. In vivo vizsgálataink ezen túlmenően felvetik annak a lehetőségét, hogy az általunk vizsgált fehérjék egyes betegségek (köztük elsősorban az autoimmun gyulladásos betegségek) gyógyszeres kezelésének terápiás célpontjai lehetnek.

4. IRODALMI HÁTTÉR

Dolgozatomban különböző hemopoetikus eredetű sejtípusok jelátviteli folyamataival, illetve ezen folyamatoknak a szervezet egészséges és kóros körülmények között való működésében betöltött szerepével foglalkozom. A következőkben szeretném megvilágítani a vizsgált kérdések irodalmi háttérét és az ezekről a kísérleteink kezdetén rendelkezésre álló információkat. Terjedelmi korlátok miatt ez a bevezetés elsősorban a saját kísérleteink megértéséhez szükséges háttérinformációkat tartalmazza, és nem volt célja a számos érintett témakör irodalmának részletes tárgyalása.

4.1. Hemopoetikus eredetű sejtek működése

In vitro kísérleteink során különböző hemopoetikus eredetű sejtípusok, köztük kiemelten a neutrofil granulociták és az oszteoklasztok működését tanulmányoztuk. Kevésbé részletesen vizsgáltuk továbbá egyéb sejtípusok, köztük makrofágok, hízósejtek és vérlemezkék működését is. A következőkben ezen sejtípusok néhány általános jellegzetességét mutatom be.

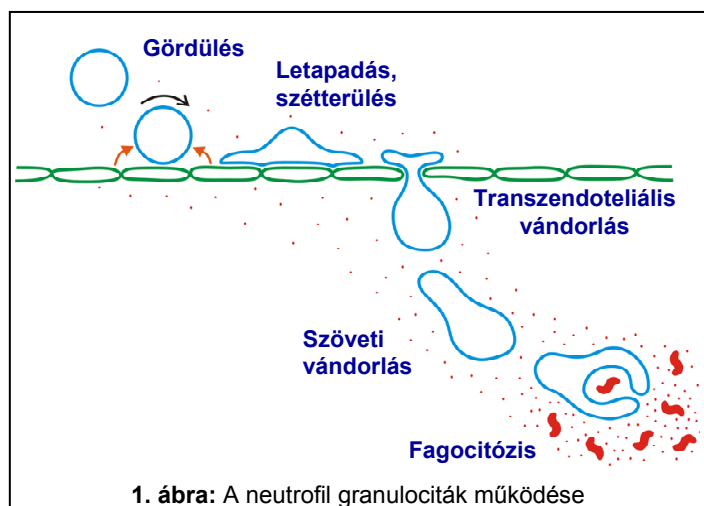
4.1.1. A neutrofil granulociták

A neutrofil granulociták (rövidítve neutrofilek vagy polimorfonukleáris (PMN) sejtek) az emberi vérben legnagyobb számban keringő fehérvérsejtek. A neutrofilek terminálisan differenciálódott, rövid (pár órás) életidejű sejtek, melyek a baktériumok és gombák elleni védelem egyik első vonalát képezik: számos sejtfelszíni receptoruk segítségével felismerik és elimináló mechanizmusuk révén elpusztítják és megemésztik a behatoló kórokozókat.

A neutrofilek életciklusának egyes aspektusait mutatja be az 1. ábra. A neutrofilek nyugalmi körülmények között szabadon sodródnak a vérben, illetve (sejtfelszíni szelektinjeiken keresztül) átmeneti kapcsolatba lépnek az érfal endotélsejteivel. Utóbbi kapcsolatot a neutrofilek gördülési ("rolling") jelenségét hozza létre, melynek során a sejtek a véráramnál lényegesen lassabban gördülnek az endotél felszínén.

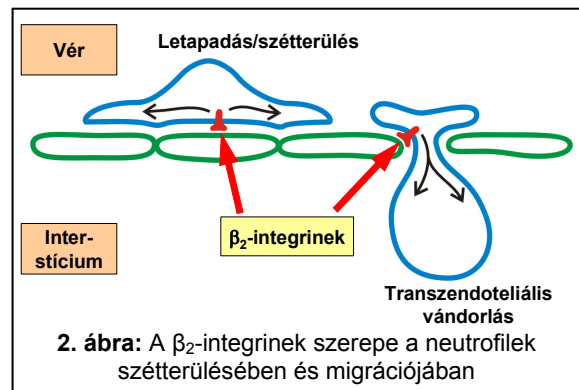
Gyulladás vagy kórokozó behatolása esetén a gyulladt endotélsejtek és a környezetből felszabaduló aktiváló tényezők hatására jelentősen megváltozik a

neutrofilek viselkedése. A sejtek gördülése lelassul, majd teljesen meg is áll, és a sejtek ezzel párhuzamosan szétterülnek az endothel felszínén ("spreading"). A sejt ezután átvándorol az endothelrétegen az intersticiális térbe (transzendoteliális vándorlás), majd a szövetközi térben vándorolva eljut a kórokozók behatolási helyéhez és ott fagocitózis és fagoszómális emésztés révén elpusztítja a kórokozókat.



A neutrofilek normális működéséhez számos receptor jelenléte szükséges. A kórokozók közvetlen felismerésében feltételezhetően részt vesznek a veleszületett immunrendszer receptorai, köztük a Toll-szerű receptorok (pl. TLR2 és TLR4) és a különböző C-típusú lektinek (pl. a dektin-1). A bakteriális eredetű fehérjéket, illetve a szövetkárosodás jelenlétére utaló mitokondriális peptideket a G-fehérjéhez kapcsolt formil-peptid-receptorok ismerik fel (az eukariota sejtek nukleáris DNS-ében kódolt fehérjékkel szemben a prokariota és mitokondriális eredetű fehérjék N-terminális aminosava metionin helyet formil-metionin). A gyulladásos környezetet számos további G-fehérje-kapcsolt receptor, köztük a C5a komplement-fragmentum és az LTB₄ lipid-hírvívő receptora közvetíti a sejt felé. A neutrofilek vándorlását különböző kemokinek (köztük a humán IL-8 (CXCL8) és az egér MIP-1 α (CCL3) és MIP-2 (CXCL2)) irányítják, melyek szintén G-fehérje-kapcsolt receptorokon hatnak. A neutrofilek aktiválódását számos további citokin, köztük a gyulladást közvetítő TNF- α (TNF) és a GM-CSF is kiváltja. A korábban említett szelektinek elsősorban a gyulladásos környezet érzékeléséhez szükséges gördülés folyamatát biztosítva vesznek részt a neutrofilek aktiválódásában. A neutrofilek felszínén található számos Fc-receptor (elsősorban Fc γ -receptorok) a neutrofilek működésének az adaptív immunfolyamatok általi felerősítését, illetve az adaptív immunválasz által megjelölt (opszonizált) kórokozók felismerését biztosítják.

A neutrofilek működésében különös jelentőséggel bírnak a β_2 -integrinek családjába tartozó sejtadhéziós receptorok. Ezek a CD11 családba tartozó valamelyik molekula (leggyakrabban a CD11a (α_L integrin-lánc) vagy a CD11b (α_M integrin-lánc)) és a CD18 (β_2 integrin-lánc) által képzett heterodimer fehérjék. A legismertebb β_2 -integrinek az LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$ integrin) és a Mac-1 (CR3; CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$ integrin), melyek a neutrofilek számos működésében, köztük a endotél-felszínén való korábban említett letapadásban/szétterülésben és a sejtek transzendoteliális migrációjában (2. ábra), valamint számos további folyamatban, köztük a komplement által opszonizált kórokozók és egyes extracelluláris mátrixfehérjék felismerésében vesznek részt. A β_2 -integrinek jelentőségét legjobban a CD18 genetikai hiánya miatt fellépő, súlyos bakteriális fertőzésekre hajlamosító megbetegedés, az I. típusú leukocita adhéziós defektus (LAD) mutatja. A β_2 -integrinek legfontosabb ligandjai az endothel-felszínen kifejeződő intercelluláris sejtadhéziós molekula 1 (ICAM-1), a különböző extracelluláris mátrix-fehérjék (köztük a fibrinogén) és a komplementrendszer C3b fragmentuma.

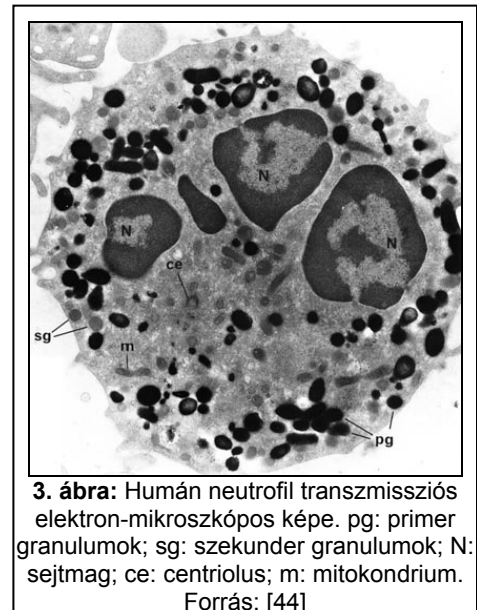


A neutrofilek egyik jellegzetes tulajdonsága a különböző intracelluláris granulumok (és szekretoros vezikulák) jelenléte (3. ábra). Ezek a granulumok a sejtek fejlődésének különböző fázisaiban keletkeznek és a sejtaktiváció során egymás után ürülnek az extracelluláris térbe vagy a fagoszóma terébe. A granulumok belsejében található szolubilis faktorok ekkor kiürülnek a sejtől, míg a granulumok falában található membránfehérjék beépülnek a plazmamembránba, illetve a fagoszóma membránjába, ahol fontos szerepet játszanak a gyulladás és a kórokozók felismerésében, illetve a kórokozók elleni harcban.

A neutrofilek legfontosabb granulumai (és szekretoros vezikulái) a következők:

- **Primer (azurofil) granulumok:** Ezek a granulumok a neutrofilek fejlődésének legkorábbi, részben a makrofágokkal átfedő fázisában keletkeznek. Elsősorban lizoszómális enzimeket és egyéb antibakteriális fehérjéket tartalmaznak. Legjellegzetesebb markerfehérjék a β -glukuronidáz, az elasztáz és a mieloperoxidáz. A primer granulumok a neutrofilek aktiválódásának legkésőbbi szakaszában ürülnek, fiziológias körülmények között elsősorban a fagoszómába. A neutrofilek mesterséges aktiválódásakor lényegében nem ürülnek a külső térbe, kivéve ha a sejtek citokalazin B-vel való előkezelésével lebontjuk a kortikális citoszeleket, miáltal a plazmamembrán a fagoszóma membránjához válik hasonlóvá.

- **Szekunder (specifikus) granulumok:** Ezek már a neutrofilek és a makrofágok fejlődésének szétválása után keletkeznek, ezért a neutrofilekre specifikus granulumoknak tekinthetők. Nagy mennyiségben tartalmaznak különböző antibakteriális fehérjéket, mint a laktoferrin vagy a B₁₂-vitamin-kötő fehérje. Membránjukban megtalálhatóak a β_2 -integrinek (elsősorban a Mac-1) és a NADPH-oxidáz komponensei. A szekunder granulumok a neutrofilek aktiválódásának vége felé ürülnek, a fagoszómába és (kisebb részben) a külső térbe. A neutrofilek mesterséges aktiválásakor a szekunder granulumok jelentős ürülése figyelhető meg a külső térbe, bár ez citokalazin B alkalmazásával még tovább fokozható.



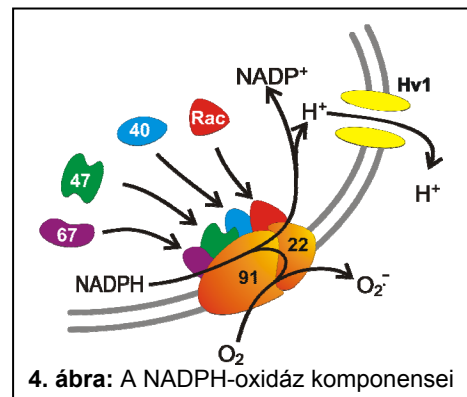
- **Tercier (zselatináz) granulumok:** Ezek a granulumok a neutrofilek fejlődésének késői fázisában keletkeznek. Bár hasonlítanak a szekunder granulumokhoz, azoknál lényegesen kevesebb antibakteriális fehérjét tartalmaznak, miközben jelentős mennyiségben található bennük zselatináz. Membránjukban különböző receptorok és a NADPH-oxidáz komponensei találhatóak. A tercier granulumok a neutrofil-aktiválás korai fázisában ürülnek a külső térbe. Az általuk leadott zselatináznak az extracelluláris mátrix lebontásában lehet esetleges szerepe.

- **Szekretoros vezikulák:** Ezek nem valódi granulumok, hanem endocitózissal keletkező szekretoros kompartmentek, melyek a neutrofilek érésének legvégső fázisában keletkeznek. Mátrixuk plazmafehérjéket (elsősorban albumint) tartalmaz, míg membránjuk különböző receptorokat, adhéziós fehérjéket és a NADPH-oxidáz komponenseit tartalmazza. A szekretoros vezikulák már a neutrofilek leggyengébb ingerlésére is kiürülnek az extracelluláris térbe, szerepük elsősorban a membránjukban található receptorok sejt felszíni megjelenése által a sejt érzékenyítése.

A neutrofilek aktivációjának hatására számos sejt válasz alakul ki, melyek együttesen vezetnek a kórokozók eliminálásához. Mindezeknek egyik közös komponense a kórokozók bekebelezése a fagocitózis során. Normális körülmények között az antibakteriális folyamatok jelentős része a fagoszómán belül zajlik le és a kórokozó megemésztését eredményezi.

A neutrofilek egyik legjellegzetesebb sejt válasza a NADPH-oxidáz aktiválódása, melynek következtében a sejt nagymennyiségű szuperoxid ($O_2^{\cdot -}$) szabadgyököt termel. A NADPH-oxidáz két integráns membránfehérjéből ($gp91^{phox}$ és $p22^{phox}$) álló komplex, melynek működéséhez számos további citoplazmatikus komponens ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ és a Rac

kis G-fehérje) szükséges (4. ábra). Mindezen komponensek összeépülése eredményeképpen a NADPH-oxidáz a citoplazmatikus NADPH-ról egy elektront O_2 -re visz át, melynek következtében a sejten kívüli térben O_2^- szabadgyök keletkezik. A folyamat során felszabaduló protonokat a nemrég azonosított Hv1 protoncsatornán [54,55] keresztüli protonáram kompenzálja (4. ábra). A NADPH-oxidáz jelentőségét jól mutatja a fehérjekomplex bármelyik tagjának (leggyakrabban az X-kromoszómán kódolt gp91^{phox} fehérjének) a genetikai hiánya miatt fellépő, súlyos bakteriális fertőzésekkel járó öröklött kórkép, a krónikus granulomatózis betegsége (CGD).



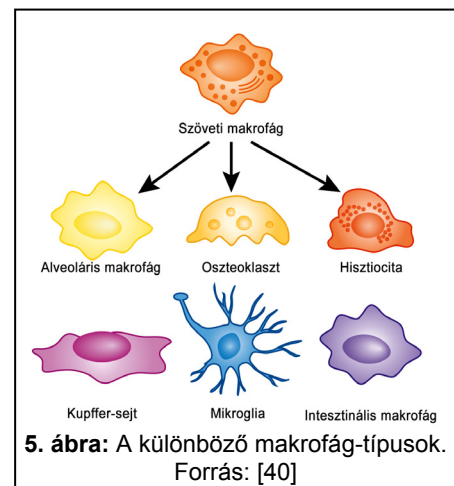
A neutrofilek működésének további következménye a korábban említett granulumok és szekretoros vezikulák kiürülése. A szabadgyök-termelés és a degranuláció jelentős része a fagoszóma membránjában játszódik le, de mindkettő létrejön a plazmamembránban is, aminek következtében a O_2^- szabadgyökök és a granulumfehérjék a környező extracelluláris térbe kerülnek.

Bár a neutrofilek által leadott szabadgyökök és granulumfehérjék elengedhetetlenek a szervezet antibakteriális védelmében, ezek az erősen toxikus anyagok a szervezet saját szöveteit is képesek súlyosan károsítani. Emiatt a neutrofilek működése nagyon szigorú kontroll alatt áll, amivel el lehet kerülni a saját szöveteknek a neutrofilek általi károsodását. Sajnos ez nem mindig sikerül, ezért (elsősorban az immunrendszer szabályozásának zavarával járó autoimmun kórképekben) a neutrofilek kóros aktiválódása egyes betegekben komoly kóros tényező is lehet.

Összességében elmondhatjuk, hogy a neutrofilek a kórokozók felismerésére és elpusztítására szakosodott sejtek, melyek ezáltal az antibakteriális és antifungális védekezés egyik első vonalát képezik. A neutrofilek működésének kóros aktiválódása ugyanakkora a saját szövetek súlyos károsodását hozhatja létre. A neutrofilek tehát kétélű fegyverek, melyek fiziológiás körülmények között az immunvédekezés elemi folyamataiban vesznek részt, de kóros körülmények között a szervezet károsodásához is hozzájárulnak.

4.1.2. A makrofágok működése

A makrofágok a monocitákból kialakuló szöveti fagocita-sejtek. Elsődleges szerepük a kórokozók és a szöveti törmelékek bekebelezése és eltávolítása. Az egyes szövetekben ezen túl a különböző makrofág-típusok jelentősen specializálódtak és az adott szövetre specifikus tulajdonságokat vettek fel (5. ábra). Így alakultak ki többek között az alveoláris tér védelmére specializálódott alveoláris makrofágok, a máj-szinuszoidokban a bélrendszerből származó kórokozók kiszűrését végző Kupffer-sejtek vagy az agyi mikrogliasejtek, és specializálódott makrofágoknak tekinthetők a csontlebonthatásban központi szerepet játszó oszteoklasztok is (ezekről részletesebben ld. alább). A

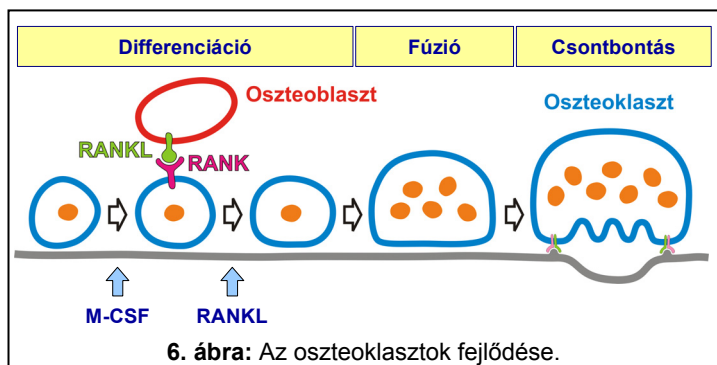


makrofágok működésükben sokban hasonlítanak a neutrofilekhez, bár azoknál kevésbé differenciálódott granulopopulációkkal rendelkeznek, hosszabb ideig élnek, és M-CSF jelenlétében in vitro is tenyészthetők (ld. 8. ábra).

4.1.3. Az oszteoklasztok fejlődése és működése

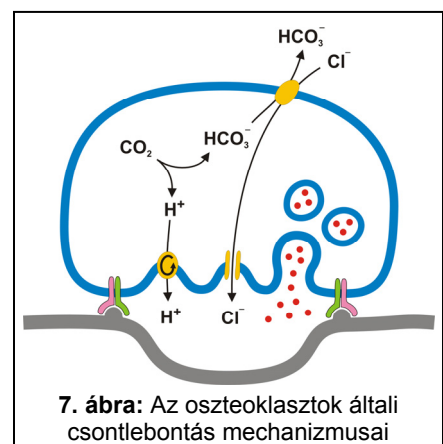
Az oszteoklasztok a makrofágokkal rokon, hemopoetikus eredetű sokmagvú óriás fagocita-sejtek, melyek a csontszövet lebontására specializálódtak. Az oszteoklasztok csontanyagcserében betöltött szerepét mutatja az oszteoklasztok fejlődésének vagy működésének zavara miatt kialakuló, a csontanyagcsere felborulásával és a mineralizálódott csontállomány mennyiségének drámai megemelkedésével járó öröklött betegség, az oszteopetrózis.

Az oszteoklasztok hemopoetikus őssejtekből való fejlődésének (6. ábra) első lépése korai makrofág-oszteoklaszt-előalakok M-CSF citokin hatására való kialakulása. Ezek az előalakok a csontszövetbe jutva érintkeznek az ott található oszteoblasztokkal. Az oszteoklaszt-előalakok felszínén található TNF-receptor-szerű citokin-receptor, a RANK (Receptor Activator of NF- κ B) itt érintkezésbe lép az oszteoblasztok felszínén található ligandjával, a RANK liganddal (RANKL, TNFSF11, TRANCE, OPG, ODF). A RANK-RANKL interakció az oszteoklaszt-előalakok átprogramozását, oszteoklaszt irányba való differenciációját váltja ki. Ennek hatására először biokémiaailag az oszteoklasztokhoz hasonló mononukleáris preoszteoklasztok jönnek létre, majd ezen sejtek egymással való fúziója létrehozza a sokmagvú óriássejt oszteoklasztokat. Az oszteoklasztok fejlődésében alapvető szerepe van két transzkripciós faktornak, a c-Fos-nak és az NFATc1-nek. Az oszteoklasztok fúziójához szükséges egyik fontos sejtfelszíni receptor a DC-STAMP (Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein) [56,57].



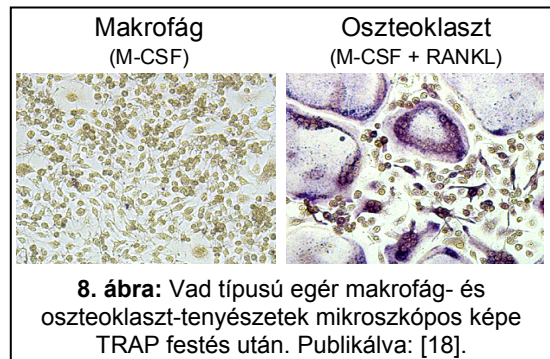
Az érett oszteoklasztok csontfelszínre tapadva a csontszövet lebontását eredményezik (7. ábra). Ennek érdekében az oszteoklasztok körkörösén letapadnak a csontfelszínre, adhéziós molekulákon (köztük $\alpha_v\beta_3$ integrineken) keresztül egy szorosan zárt, a környezettől elszigetelt kompartmentet hoznak létre a csont felszínén, és ebben a kompartmentben (az ún. reszorpciós lakunában) végzik a csontszövet lebontását. A lebontáshoz egyrészt vakuoláris típusú H^+ -ATPáz és az annak a működését elektromosan kompenzáló Cl^- -csatorna (ClC7) segítségével sósavat transzportálnak a reszorpciós térbe, valamint intracelluláris granulumai exocitózisával a csontmátrix lebontására képes enzimeket (pl. katepszin K-t) ürítenek a reszorpciós térbe. A sósav és a katepszin K hatására lebomlik a csontszövet, a fennmaradó törmelék pedig az oszteoklasztok fagocitálják és sejten belül megemésztik vagy a sejt bazolaterális oldalán a szövetközi térbe ürítik.

Az oszteoklasztok működését számos hormonális



tényező befolyásolja. A parathormon (PTH) a kalcitriollal együttműködve elsősorban az oszteoblasztok RANKL-expressziójának fokozása (és az azzal ellentétes hatású oszteoprotegerin (OPG) termelésének a csökkentése) révén fokozza az oszteoklasztok általi csontlebontást. A kalcitonin ezzel szemben közvetlenül az oszteoklasztokon (az oszteoklasztok felszínén található kalcitonin-receptoron) hatva gátolja a csontlebontást. Orvosi szempontból kiemelkedő jelentőségük van még a különböző szteroid-hormonoknak, melyek közül az ösztrogének és az androgének gátolják, míg a glükokortikoidok serkentik az oszteoklasztok fejlődését és működését.

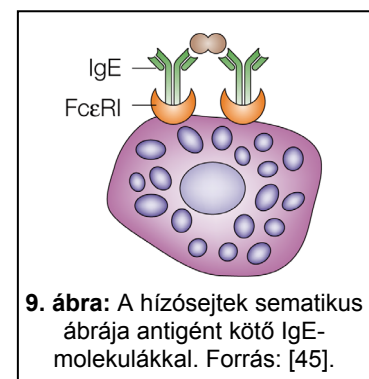
Amint azt a 6. ábra mutatja, az oszteoklasztok fejlődéséhez elengedhetetlenek az M-CSF és RANKL citokinek. Ez a két citokin megfelelő előalakokból (csontvelői sejtekből vagy keringő monocitákból) in vitro önmagában is képes kiváltani oszteoklaszt-szerű sejtek (csontlebontásra képes sokmagvú óriássejtek) kifejlődését (8. ábra). Ezek a sejtek kifejezik az oszteoklaszt-fejlődés egyik jellegzetes markerét, a tartarát-rezisztens savas foszfatázt (TRAP), míg az M-CSF jelenlétében de RANKL nélkül kitenyésztett makrofágok nem hordoznak jelentős TRAP-aktivitást.



A fentiekkel kapcsolatban érdemes megemlíteni, hogy a RANKL az oszteoklasztok fejlődésében és működésében fontos szerepet játszó számos fehérje, köztük a fent említett TRAP, kalcitonin-receptor, katepszin K, β_3 -integrin, Fos, NFATc1 és DC-STAMP génjét aktiválja és fokozza az oszteoklasztok felszínén található OSCAR fehérje kifejeződését is. Ezen fehérjék, illetve az azokat kódoló gének expressziójának a vizsgálata fontos adatokkal szolgál az oszteoklasztok fejlődésével kapcsolatban.

4.1.4. A hízósejtek működése

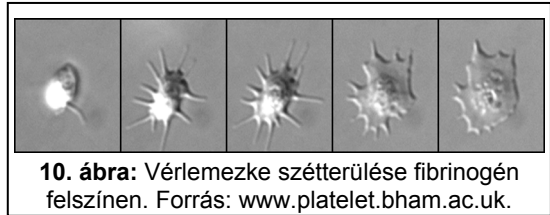
A hízósejtek a bazofil granulocitákkal rokon szöveti immunsejtek, melyeknek központi szerepe van a gyulladásos folyamat létrejöttében, valamint az allergiás betegségek patomechanizmusában. A hízósejtek granulumai nagy mennyiségben tartalmaznak különböző vazoaktív anyagokat, köztük hisztamint. A hízósejtek aktiválódásának legjellegzetesebb módja a sejtek felszínén található $Fc\epsilon$ -receptorok ($Fc\epsilon R$) antigént kötő IgE molekulák általi keresztkötése (9. ábra), melynek hatására a sejt degranulációja révén felszabadulnak a granulumokban tárolt vazoaktív anyagok, illetve további (pl. lipid) mediátorok. Az $Fc\epsilon$ -receptorokon kívül a hízósejtek számos további receptoron, köztük G-fehérje-kapcsolt receptoron (pl. adenozin-receptoron) és Toll-szerű receptorokon keresztül is aktiválhatók.



4.1.5. A vérlemezkék működése

A vérlemezkék sejtmag nélküli keringő sejtfragmentumok, melyek alapvető szerepet játszanak a vérzéscsillapodás létrejöttében. A vérlemezkék számos sejtfelszíni receptoron keresztül érzékelik az érsérülést, és kitapadnak a sérült endothel alatti kollagén-réteghez.

Ennek a lépésnek egyik fontos eleme a vérlemezék felszínén található, az $Fc\alpha$ -receptorokkal rokon GpVI kollagén-receptor kötődése a kollagénhez. A vérlemezék aktivációjának következő fázisában a GpIIb/IIIa glikoproteinen ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrinen) keresztül kötődnek a plazmában jelen levő fibrinogénhez, ami további aktivációjukat és aggregációjukat hozza létre. A mesterséges (pl. üveg) felszínre lekötött fibrinogén saját maga is a képes kiváltani a vérlemezék GpIIb/IIIa általi aktivációját és a felszínen való szétterülését (10. ábra). Ez a folyamat felétetlezéseink szerint jól modellezi a vérlemezék in vivo aktiválódásának késői fázisát.



10. ábra: Vérlemezke szétterülése fibrinogén felszínen. Forrás: www.platelet.bham.ac.uk.

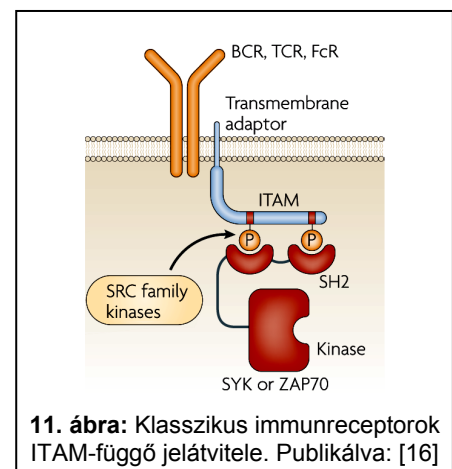
4.2. Az egyes receptorcsaládok jelátvittele

4.2.1. A klasszikus immunreceptorok jelátvittele

Az emlős szervezet klasszikus immunreceptorai a limfociták antigén-receptorai (B-sejt-receptor (BCR) és T-sejt-receptor (TCR)) és a különböző antitest Fc-receptorok (FcR-ek). Utóbbiakon belül legfontosabbak az IgG-t felismerő Fc γ -receptorok (Fc γ R) és az IgE-t felismerő Fc ϵ -receptorok (Fc ϵ R). Az Fc γ -receptorok elsősorban neutrofileken, monocitákon és makrofágokon, míg Fc ϵ -receptorok főleg bazofil granulocitákon és hízósejteken vannak jelen (valószínűleg kisebb jelentősége van a keringő IgA-t felismerni képes Fc α -receptoroknak (Fc α R)). Bár az Fc-receptorok többsége aktiváló szignált közvetít, egyes Fc-receptorok (pl. az Fc γ RIIB) gátló hatást váltanak ki. Utóbbi receptortípussal, illetve az MHC-molekulákhoz hasonló szerkezetű, elsősorban az immunglobulinok transzportjában szerepet játszó neonatális Fc-receptorral (FcRn) dolgozatomban nem foglalkozom.

A fenti klasszikus immunreceptorok (BCR, TCR, FcR) legtöbbször nagyon hasonló receptor-proximális jelátvivő mechanizmussal szignalizál (11. ábra). Ennek a mechanizmusnak az alapja a receptor-komplexben jelenlevő transzmembrán adapter-fehérje, mely egy ún. immunreceptor tirozin-alapú aktivációs motívumot (ITAM) hordoz. A TCR komplexben ez a molekula elsősorban a CD3 ζ lánc, a BCR komplexben az Ig α és Ig β láncok, míg a legtöbb Fc-receptor esetén az Fc γ lánc (ami nem keverendő össze az Fc γ -receptorokkal (Fc γ R)!). Az ITAM motívum tipikus konszenzus-szekvenciája YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I ahol az x tetszőleges aminosavat jelöl.

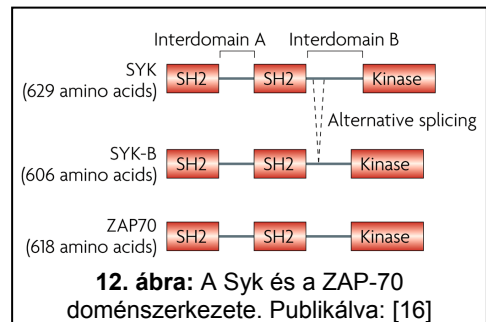
A receptorok aktiválódására hatására Src-típusú tirozin-kinázok foszforilálják az ITAM motívum két tirozin (Y) aminosavát (11. ábra). Ezután a foszforilálódott ITAM-hoz SH2-doménjein keresztül kikötődik a Syk (spleen tyrosine kinase) vagy a ZAP-70 (ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa) tirozin-kináz. A Syk és a ZAP-70 két egymással rokon tirozin-kináz, melyek két SH2-doménből, egy tirozin-kináz katalitikus doménből és az ezeket



11. ábra: Klasszikus immunreceptorok ITAM-függő jelátvittele. Publikálva: [16]

összekötő interdoménekből (Interdomén A és B) állnak (12. ábra). A Syk-nek egy Syk-B nevű, alternatív splicing során keletkező variánsa is létezik.

A Syk elsősorban a BCR és az Fc-receptorok jelátvitelében vesz részt, míg a ZAP-70 elsősorban a TCR jelátviteli molekulája. Mindkét kináz működésére jellemző, hogy a kettősen foszforilált ITAM-hez való kapcsolódás hatására kihorgonyozódnak a membránhoz és a kináz-domén katalitikus

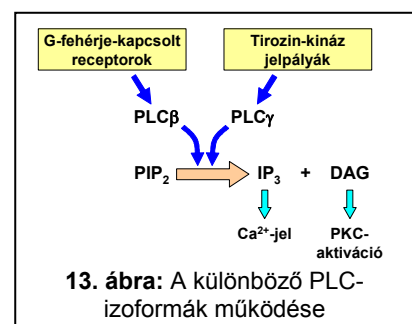


aktiválódását eredményező konformációváltozáson mennek keresztül [16,58]. A Syk és a ZAP-70 aktiválódása és ezek szubsztrátjainak a foszforilációja felelős a klasszikus immunreceptorok további jelátviteléért, amit az is mutat, hogy a Syk genetikai hiányában megreked a B-sejtek BCR-függő fejlődése [53,59] és különböző Fc-receptorok (FcγR és FcεR) jelátvitelére [60-62], ZAP-70 hiányában pedig mind emberben, mind egérben a T-sejtek TCR-függő fejlődésének súlyos károsodása jön létre [63-65].

A Syk vagy a ZAP-70 ITAM-függő kihorgonyozódása és aktiválódása a klasszikus immunreceptorok központi jelátviteli mechanizmusa, és mivel ezen receptorok mindegyike az adaptív immunválaszban vesz részt (az Fc-receptorok esetében ez közvetve, az adaptív immunválasz során keletkező immunglobulinok felismerésén keresztül történik), a fenti mechanizmust sokáig az adaptív immunválaszra specifikus folyamatnak tekintették. Ezen az elképzelésen alig változtattak azok a korábbi megfigyelések, melyek szerint a vérlemezkék Fcα-receptor-szerű kollagén-receptora, a GpVI szintén az ITAM-tartalmú FcRγ-láncon és a Syk-en keresztül szignalizál [66-68], valamint hogy az NK-sejtekben leírtak egy további ITAM-tartalmú adapter-fehérjét, a DAP12-t (DNAX activating protein 12) [69], melynek az élettani funkciója sokáig nem volt ismert.

A klasszikus immunreceptorok jelátvitelének a fentiekén túl számos további közös eleme van. Ezek közül a dolgozat témája szempontjából legfontosabbak a foszfolipáz Cγ (PLCγ) és az SLP-76/SLP-65 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76/65 kDa) fehérjék, melyek a Syk/ZAP-70 kinázok közvetlen kötődési partnerei és szubsztrátjai, és fontos szerepet játszanak a Syk és a ZAP-70 disztális jelátvitelének elindításában [70,71].

A PLC enzimek a sejtmembrán foszfatidil-inozitol-bisz-foszfát (PIP₂) lipidjének inozitol-trisz-foszfátra (IP₃) és diacil-glicerolra (DAG) való bontásával citoplazmatikus Ca²⁺-jelet és a protein-kináz C (PKC) aktiválódását váltják ki (13. ábra). Ezen fehérjék legismertebb képviselői a G-fehérje-kapcsolt receptorok által aktivált PLCβ izoformák. PLC aktivitást ugyanakkor tirozin-kináz jelpályák aktiválódása is létre tud hozni a PLCγ izoformák foszforilációján keresztül. Utóbbiak közül a B-sejtekben és a legtöbb mieloid sejtben a PLCγ2, míg a T-sejtekben a PLCγ1 van jelen. A PLCγ2 hiányában a B-sejtek fejlődésének zavara jön létre [51], míg az Fc-receptorok jelátvitelében betöltött szerepéről kísérleteink kezdetén csak részleges adatok voltak elérhetőek [51,72]. Bár a PLCγ1 szerepének vizsgálatát megnehezíti, hogy a fehérje genetikai hiánya korai embrionális letalitást eredményez [73], humán T-sejtvonalon nyert eredmények arra utalnak, hogy a PLCγ1 fontos szerepet játszik a T-sejtek TCR-on keresztüli aktiválódásában [74].



Az SLP-76 egy összetett doménszerkezettel és számos foszforilálható tirozin-oldallánccal rendelkező adapter-fehérje [70], melynek genetikai hiánya a TCR jelátvitelének és a T-sejtek fejlődésének károsodását [52,75], és a hízósejtek Fc ϵ -receptorokon keresztüli aktiválódásának a zavarát [76] eredményezi. B-sejtekben az SLP-76 homológja, az SLP-65 (másnéven BLNK vagy BASH) van jelen, melynek hiánya a B-sejtek fejlődésének zavarához vezet [77-79]. Az SLP-76 és az SLP-65 működésének vizsgálata arra utalt, hogy ezek a fehérjék a Syk vagy a ZAP-70 általi foszforilációt követően az immunreceptorok proximális jelátviteléhez szükséges jelátviteli komplex szerveződésében játszanak szerepet [70]. Vizsgálataink kezdetén nem volt ismert, hogy az SLP-76 és az SLP-65 szerepet játszik-e a mieloid sejtek működésében.

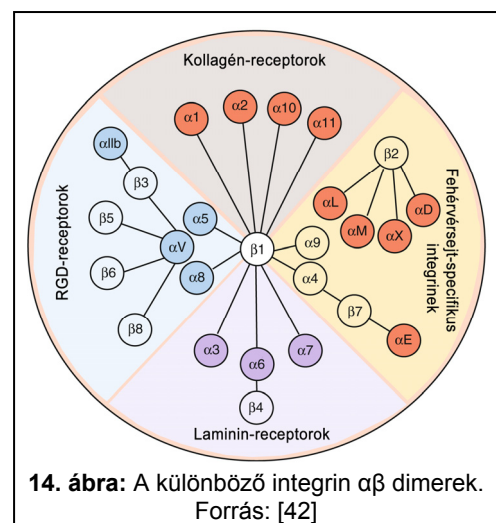
A fentiekén túl a klasszikus immunreceptorok jelátvitelében fontos szerepet játszik a PI3-kináz enzimes család is. Bár az egyes PI3-kináz-izomformák átfedő alegység-összetétele és funkciója jelentősen megnehezíti az egyes izomformák szerepének meghatározását, vizsgálataink kezdetekor nagyjából körvonalazódott, hogy a PI3K fontos szerepet játszik a klasszikus immunreceptorok jelátvitelében [50,80,81].

Összességében elmondhatjuk, hogy a klasszikus immunreceptorok (BCR, TCR, FcR) jelátvitelének központi eleme a receptor-komplexben található ITAM-tartalmú adapter-molekula foszforilációja és a Syk vagy a ZAP-70 kihorgonyozódása a foszforilálódott ITAM-hoz. Utóbbi kinázok a PLC γ izomformák és az SLP-76/SLP-65 részvételével közvetítik az immunreceptorok aktiválódását a sejtek belseje felé.

4.2.2. Az integrinek jelátvitel

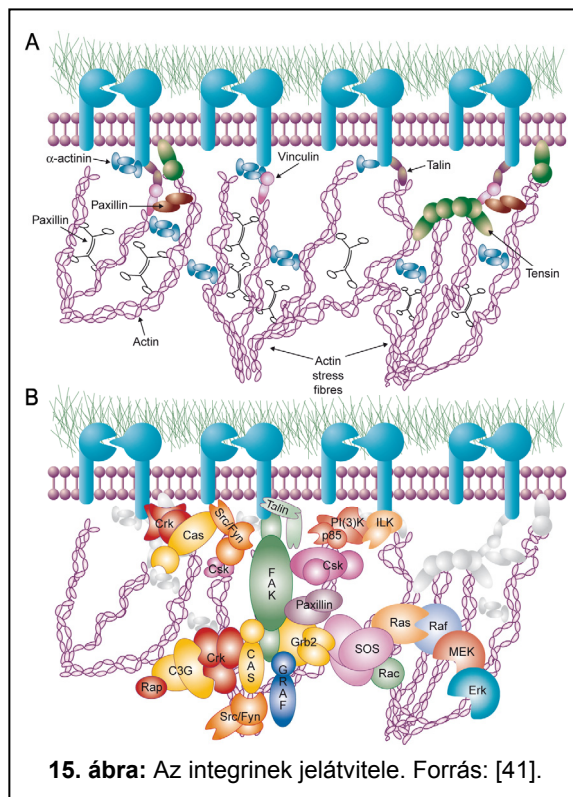
Az integrinek a szervezet szinte minden sejtjében megtalálható, a sejtet kívüli térrel (más sejtekkel és az extracelluláris mátrixszal) kapcsolatot teremtő sejtadhéziós molekulák. Az integrinek egy α - és egy β -láncból álló transzmembrán heterodimer fehérjék, melyek közül a leggyakoribb kombinációkat a 14. ábra mutatja. Az integrinek szinte a szervezet minden működésében szerepet játszanak, ennek megfelelően a különböző integrin-láncok genetikai hiánya a korai embrionális letalitástól a fejlődési rendellenességeken át a vérzéscsillapodás és az immunműködések zavaráig nagyon szerteágazó fenotípusokat eredményez [42].

Az érett hemopoetikus eredetű sejtekben az integrineknek a fehérvérsejtek, a vérlemezkék és az oszteoklasztok működésében van kiemelt szerepe. A fehérvérsejtekben a legfontosabb integrinek a korábban említett β_2 -integrinek, közülük is elsősorban az LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -integrin; CD11a/CD18) és a Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$ -integrin; CD11b/CD18). Ezek a fehérjék az összes fehérvérsejttípus vándorlásában (főleg LFA-1), a T-limfociták aktivációjában (LFA-1) és a mieloid sejtek aktiválódásában (főleg Mac-1) vesznek részt. A vérlemezkék legfontosabb integrinje a korábban említett GpIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin), amely a vérlemezkék késői, fibrinogénnel keresztüli aktiválódásához és aggregációjához szükséges. Az oszteoklasztokban fontos szerepet játszik az $\alpha_V\beta_3$ -integrin, amely a preoszteoklasztok fúziójához és a csontfelszínen kialakuló reszorpciós üreg szigeteléséhez szükséges. A fentieknek megfelelően a β_2 -integrinek genetikai hiánya elsősorban az immunfolyamatok



zavarát (emberben a leukocita-adhéziós defektus (LAD) I. formáját) eredményezi [35,82,83], míg a β_3 -integrinek hiánya a vérzéscsillapodás és a csontlebonthatóság zavarait (emberben a Glanzmann-thrombaszténiát) hozza létre [84-86].

Az integrinek nem csak passzív "molekuláris ragasztó"-ként működnek, hanem aktív és nagyon összetett jelátviteli kapcsolatban vannak a sejt belsejével. Ennek a jelátvitelnek néhány aspektusát mutatja a 15. ábra. Az ábra A része azt mutatja, hogy az integrinek, mint a sejtet az extracelluláris térrel mechanikailag is összekötő fehérjék nagyon szoros kapcsolatban vannak a sejt aktin-citoszkeletonjával. Ennek a kapcsolatnak számos eleme (köztük a talin, a vinkulin, a paxillin és az α -aktinin) létezik. A 15. ábra B része az integrinekből kiinduló jelátviteli lépések egy részét mutatja. Ezen folyamatokban kiemelt szerepe van a különböző tirozin-kinázoknak, közülük is elsősorban az Src-típusú tirozin-kinázoknak és a fokális-adhéziós kináz (FAK) molekulacsaládnak. Az integrinek aktivációja az Src- és a FAK-család aktiválódásán túl (feltételezhetően azon keresztül) számos további jelpálya, köztük a PI3-kinázok és az ERK-jelpálya aktiválódását hozza létre.



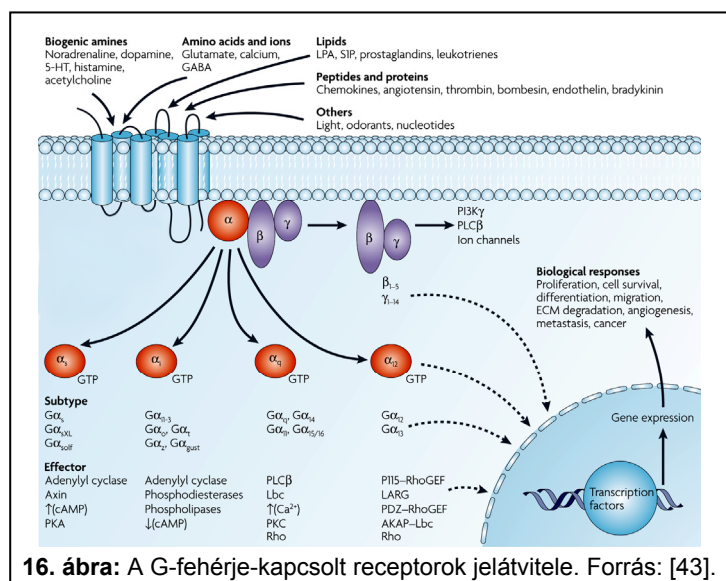
doménjainak foszforilált ITAM-motívumokhoz való kihorgonyzódása [95]. A munkacsoport további in vitro kísérleteiben részleteiben vizsgálta a Syk integrinek általi aktivációjának a mechanizmusát, és kimutatta, hogy a Syk N-terminális SH2-doménje ITAM-függetlenül módon közvetlenül kapcsolódik az integrinek β -láncához, ami felelős lehet a kináz integrinek általi aktivációjáért [96,97]. Ezek az eredmények összességében arra utaltak, hogy a Syk aktiválódása integrinek és immunreceptorok esetében lényegesen különböző mechanizmusokon keresztül jön létre. Amint a későbbiekben láthatjuk, saját, primer sejteken végzett kísérleteink ettől lényegesen eltérő következtetésre vezettek.

A fenti információk az integrinek ligandkötése következtében a sejt belseje felé elinduló jelátviteli folyamatokra vonatkoztak. Ezt a jelátvitelt az integrinek esetében "kintről befelé" ("outside-in") jelátviteli folyamatnak nevezzük. Egyes integrinek (köztük a hemopoetikus sejteken jelen lévő legtöbb integrin) esetében azonban aktiválódik egy másik, "bentről kifelé" ("inside-out") irányuló jelátviteli folyamat is, melynek eredményeképpen a sejt belüli folyamatok szabályozni tudják az integrinek ligandkötő képességét. Az inside-out jelátvitel eredménye egyrészt az integrinek affinitását megnövelő konformációváltozás, másrészt az integrinek citoskeletonról való leválása és következményes aggregációja (melynek révén jelentősen megemelkedik a ligandkötésre képes integrinek lokális koncentrációja; "aviditás"-szabályozás), és ide tartoznak az integrinek sejtfelszíni expresszióját megnövelő folyamatok (pl. az integrinek kihelyeződése az intracelluláris granulumokból a plazmamembránba) is. Az inside-out jelátvitel folyamatairól egyelőre keveset tudunk, de feltételezhetően szerepet játszik benne a Rap kis GTP-kötő fehérje, a kindlin-3 és számos citoskeleton szabályozó folyamat is [98-100].

4.2.3. A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitel

A G-fehérje-kapcsolt receptor 7-transzmembrán receptorok, melyek ligandkötése heterotrimer G-fehérjék aktiválódását hozza létre (16. ábra). A G-fehérje-kapcsolt receptorok az emlős szervezet legnagyobb fehérjecsaldáját képezik és számos különböző élettani folyamatban, köztük az érzékszervek működésében, a neuroendokrin szabályozó mechanizmusokban, a leukociták migrációjában vagy a gyulladás kiváltásában játszanak szerepet.

A G-fehérje-kapcsolt receptorok α -, β - és γ -alegységből álló heterotrimer G-fehérjéket aktiválnak. A receptor ligandkötése a heterotrimer G-fehérje α -alegységre és a továbbiakban együttmaradó $\beta\gamma$ heterodimerre való szétválását eredményezi. Mind az α -alegység, mind a $\beta\gamma$ heterodimer számos különböző mechanizmust képes aktiválni, melyek elsősorban a folyamatban érintett G-fehérje típusától függenek (16. ábra). Az α -alegység elsődleges hatása Gs-fehérjék esetében az adenilát-cikláz aktiválódása (a cAMP-szint emelése), a Gi-fehérjék esetében az adenilát-cikláz gátlása (a cAMP-szint csökkentése), a Gq-fehérjék



esetében pedig a PLC β aktiválása (Ca²⁺-jel és PKC-aktiválódás; ld. 13. ábra). A $\beta\gamma$ -alegységek ezen kívül szintén képesek aktiválni a PLC β -t, valamint számos más mechanizmust, köztük a PI3K γ -t és egyes ioncsatornákat (16. ábra).

A hemopoetikus rendszerben a G-fehérje-kapcsolt receptorok egyik legfontosabb feladata a különböző fehérvérsejtek aktiválódása és vándorlásuk irányítása. A formil-peptid-receptorok a bakteriális behatolást és a mitokondriumok szétesésével járó szövetsérülést, a leukotrién, C5a és adenosin-receptorok pedig a gyulladás folyamatát közvetítik a fehérvérsejtek (pl. a neutrofilek) felé. A kemokinek kiterjedt családja a fehérvérsejtek vándorlását és "hazatalálását" ("homing") irányítja. Ezen receptorok mindegyike Gi-fehérjéhez kapcsolt jelátviteli folyamatok segítségével működik.

4.2.4. Egyéb receptorok jelátvittele

Dolgozatomban a fentiekén túl számos további receptorcsalád tagjait említem. Ezek jellegzetességeit az alábbiakban röviden tárgyalom.

A tumor nekrozis faktor (TNF) receptorcsalád legismertebb tagjai a TNF- α (TNF) és a RANKL receptorai. A TNF-et számos gyulladásos sejtípus (különösen a makrofágok) termelik és elsősorban a gyulladásos folyamatok létrejöttében tölt be sejtek közti jelátvivő szerepet. A RANKL a korábbiakban említett oszteoblasztokon fejeződik ki (6. ábra), elsődleges szerepe az oszteoklasztok fejlődésének a kiváltása. A TNF és a RANKL kötődése receptor-trimerizációt és különböző adapter-fehérjék kihorgonyzódását eredményezi. A jelátvitel későbbi lépései közül említést érdemel az NF- κ B inhibitorának, az I κ B α -nak a foszforilációja és következményes degradációja, ami lehetővé teszi az NF- κ B felszabadulását és a sejtmagba vándorlását.

A különböző Toll-szerű receptorok (TLR) dimerként vannak jelen a sejtmembránban, és a ligandjuk (általában mikrobiális mintázatot hordozó molekulák, mint a Pam₃CSK₄ és a bakteriális lipopoliszacharid (LPS)) megkötődése hatására szintén különböző adapter-fehérjéket aktiválnak. A TLR-ek ligandkötésének szintén jellegzetes következménye az I κ B α foszforilációja, lebomlása és az NF- κ B jelpálya következményes aktiválódása.

Az M-CSF a makrofágok és az oszteoklasztok fejlődésében fontos szerepet játszó citokin. Az M-CSF receptora a c-Fms molekula, ami saját aktivitással rendelkező receptor-tirozin-kináz. A c-Fms aktiválódásának egyik legjellegzetesebb következménye az ERK jelpálya aktiválódása.

A GM-CSF a neutrofilek és makrofágok érésében és aktiválódásában is szerepet játszik. A GM-CSF receptora szintén tirozin-foszforilációs jelpályákat indít be, de ez a receptor önmagában nem rendelkezik tirozin-kináz aktivitással, azt a hozzá kapcsolódó Jak2 tirozin-kináz biztosítja. A GM-CSF jellegzetes hatása a különböző MAP-kináz kaszkádok (ERK, p38 MAP-kináz) aktiválódása.

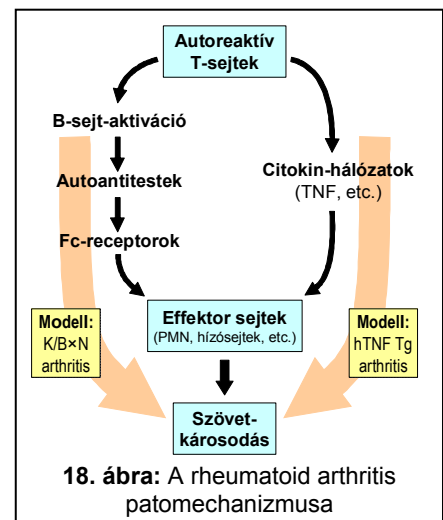
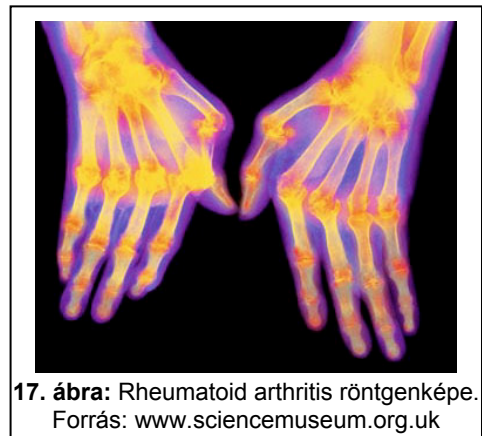
4.3. Az autoimmun gyulladásos betegségek

A gyulladásos betegségek a társadalom széles rétegeit érintő betegségek, melyek jelentős mértékben rontják az érintett betegek életminőségét és számos vezető halálokhhoz is hozzájárulnak. Saját kísérleteinkben az autoimmun eredetű gyulladásos betegségek prototípusának tekintett rheumatoid arthritis állatmodelljében vizsgáltuk különböző jelátvivő molekulák szerepét. A rheumatoid arthritis (17. ábra) a végtagok kisézleteinek

gyulladásával, az ízületi szerkezet felbomlásával, következményes deformációkkal, fájdalommal és funkcióvesztéssel járó súlyos, krónikus megbetegedés.

A rheumatoid arthritis patomechanizmusának első lépése a T-sejtek immunfelismerésének a zavara, melynek következtében a sejtek a saját szöveteket (pl. az ízületet) is idegenként ismerik fel ("immunizáció" fázisa). A betegség későbbi fázisában különböző végrehajtó ("effektor") sejtek, köztük a neutrofilek, makrofágok, oszteoklasztok, hízósejtek, és nem-hemopoetikus eredetű sejtek (pl. szinoviális fibroblasztok) a megtámadott szövet károsodását eredményezik. Az immunizáció során kialakuló autoreaktív T-sejtek számos különböző mechanizmuson keresztül képesek az effektor-sejtek aktiválódását kiváltani (18. ábra). Ennek egyik lehetséges mechanizmusa a B-sejtek aktiválása, melynek hatására autoantitestek keletkeznek, amik Fc-receptorokon keresztül aktiválják az effektor-sejteket. A másik lehetőség, hogy az aktivált T-sejtek antitestek közbeiktatása nélkül, közvetlen citokin-kaszkádon keresztül aktiválják az effektor-sejteket. Ilyen citokin-kaszkádban lehet szerepe a TNF, az IL-1 β és az IL-17 citokineknek.

A rheumatoid arthritis állatmodelljei a betegség patomechanizmusának különböző aspektusait modellezzik. Az ún. aktív modellekben (pl. a kollagén-indukált arthritisben) a betegséget a tolerancia-gát áttörésével és T-sejtes immunválasz kiváltásával érjük el. Ily módon a betegség egészét (az immunizációs és effektor fázisokat együttesen) tudjuk modellezni, de nagyon nehezen tudunk további következtetéseket levonni az egyes lépésekről. A passzív modellekben ezzel szemben a betegség végső fázisát modellezzük a T-sejtek immunizációjának megkerülésével (18. ábra). Az autoantitestek szerepét az autoantitest-indukált modellek (pl. kollagén-antitest-indukált arthritis; K/B $\times$ N szérumtranszfer-arthritis (ld. alább)), a citokin-hálózatok szerepét pedig legjobban a humán TNF transzgénikus expressziója által kiváltott hTNF Tg [101] modell segítségével tudjuk követni. Munkacsoportomban ezek közül több modellt is alkalmazunk, de a dolgozatom alapját képező közleményekben ezek közül csak a K/B $\times$ N szérumtranszfer-arthritist (ld. 91. ábra alább) alkalmaztuk.



4.4. Csontlebontás kóros körülmények között

Az emlős szervezet csontrendszer egészséges körülmények között dinamikus egyensúlyban van, amit az oszteoblasztok általi csontképzés és az oszteoklasztok általi csontlebontás egyensúlya biztosít. Kóros körülmények között ez az egyensúly megbomlik, ami a csontszerkezet jelentős (lokális vagy generalizált) változását és következményes funkciózavarokat (csonttörések, ízületi funkció zavarai, fájdalom) okoznak.

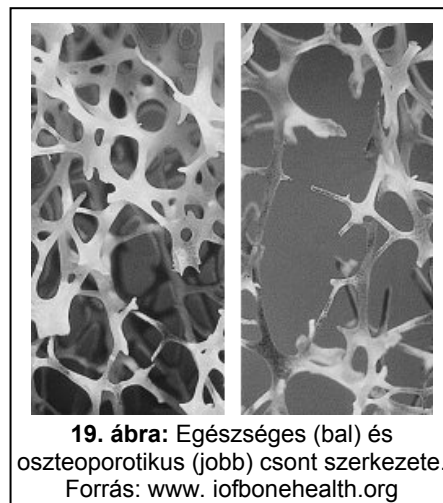
A csontszövet mennyiségének megemelkedésével járó legjellegzetesebb elváltozás az oszteoklasztok általi csontlebontás károsodása miatt kialakuló nagyon ritka öröklött

betegség, az oszteopetrózis (sziklacsontúság) [102]. Az oszteopetrózisban szenvedő betegekben a károsodás súlyosságával arányos mértékben megemelkedik a mineralizálódott csontállomány mennyisége, ami a legsúlyosabb esetekben a csonttüregek beszűkülése miatt vérképzési zavarokhoz, vaksághoz, süketiséghez és egyéb neurológiai eltérésekhez is vezethet. Érdekes módon az oszteopetrotikus betegek csontjai kifejezetten törékenyek ("porcelán-jelenség"), ami miatt fokozottabban hajlamosak a csonttörésekre is. A betegséget az oszteoklasztok fejlődéséhez vagy működéséhez szükséges fehérjék, köztük pl. a RANKL, a V-típusú H^+ -ATPáz vagy a CIC7 Cl^- -csatorna genetikai hiánya okozza [102,103]. Mivel az oszteoklasztok hemopoetikus eredetű sejtek, a betegség csontvelőtranszplantációval részlegesen gyógyítható [102].

A csontanyagcsere speciális öröklött megbetegedése az idegrendszeri tünetekkel és csontcisztákkal járó nagyon ritka Nasu-Hakola betegség (policisztikus lipombranózus oszteodiszplázia szklerotizáló leukoenkefalopátiával; PLOSL). A betegség hátterében a DAP12 vagy az azzal kapcsolódni képes TREM2 fehérje genetikai károsodása áll [104,105]. A tüneteket feltehetően az oszteoklasztok és a mikroglia-sejtek funkciózavara eredményezi, bár a betegség pontos patomechanizmusa mindmáig nem tisztázott.

A csontanyagcsere leggyakoribb károsodása a fokozott oszteoklaszt-aktivitás miatti csontállomány-csökkenés hatására létrejövő oszteoporózis (csonttritkulás; 19. ábra) [106,107]. A betegséget leggyakrabban posztmenopauzális nőkben figyelhetjük meg, aminek az oka az ovariumok ösztrogéntermelésének a csökkenése és ezáltal az oszteoklasztok oszteoblasztokon keresztüli aktiválódásának a fokozódása. Egyre gyakoribb azonban az oszteoporózis időskorú férfiakban is, és jelentős egészségügyi problémát jelent a nagy mennyiségben terápiásan (pl. immunszuppresszív céllal) alkalmazott glükokortikoidok által kiváltott iatrogén oszteoporózis is. Az oszteoporózis jellegzetes következményei a csigolyák összeroppanása miatti testmagasság-csökkenés, illetve a combnyaktörés.

A generalizált csontanyagcsere-betegségek mellett az ízületeket érintő gyulladásos betegségek (pl. rheumatoid arthritis) és a csontátvételt adó daganatok esetén lokálisan is létrejöhet jelentős csontlebontás, ami az ízületi funkció károsodásával, illetve patológias csonttörések kialakulásával jár.



5. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja a különböző hemopoetikus sejtekben lejátszódó jelátviteli folyamatok vizsgálata és ezen folyamatoknak a szervezet egészséges és kóros működésében betöltött szerepének a tanulmányozása volt. Az értekezésben bemutatott kísérletek konkrét célkitűzései az alábbiak voltak:

- 1) Az integrin-jelátvitel vizsgálata hemopoetikus eredetű sejtekben
- 2) Jelátviteli folyamatok vizsgálata a neutrofilek sejtváándorlása során
- 3) Az Fc-receptorok szerepének és jelátvitelének vizsgálata neutrofilekben
- 4) A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitel neutrofilekben és hízósejtekben
- 5) Jelátviteli folyamatok vizsgálata in vivo gyulladásos betegségmodellekben
- 6) Immunreceptor-szerű jelátvitel oszteoklasztokban és a csontanyagcserében
- 7) A PLC γ 2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Az értekezésemben bemutatott eredményeket a fenti célkitűzéseknek megfelelő felosztásban tárgyalom.

6. MÓDSZEREK

Ebben a fejezetben röviden bemutatom az értekezés alapját képező kísérletekben alkalmazott módszereket és megközelítéseket. Bár az egyes kísérletek módszertani részleteit terjedelmi okok miatt nem áll módomban bemutatni, azok az értekezés alapját képező közleményekben megtalálhatók.

6.1. Egerek tenyésztése és genotipizálása

6.1.1. A kísérletekben felhasznált egértörzsek

A dolgozatomban bemutatott kísérletek döntő részében különböző géntörlesztés (knockout) mutációt hordozó egerekkel, illetve sejtekkel dolgoztunk. A dolgozatomban szereplő egértörzseket, a törölt gén és mutáció hivatalos elnevezését és a mutáció első leírását az 1. táblázat mutatja. Az egyes törzsekről további információk a hivatkozott közleményekben és a Mouse Genome Informatics adatbázisban (www.informatics.jax.org) található.

Az érintett fehérje	Az értekezésben használt rövidítés	Az érintett gén hivatalos neve	A mutáns allél hivatalos neve	A mutáció első leírása	A fenntartás módja (ld. aláírás)
CD18	CD18 ^{-/-}	<i>Itgb2</i>	<i>Itgb2</i> ^{tm2Bay}	[35]	Het
DAP12	DAP12 ^{-/-}	<i>Tyrobp</i>	<i>Tyrobp</i> ^{tm1Lil}	[36]	Homo
FcγRIII	FcγR3 ^{-/-}	<i>Fcgr3</i>	<i>Fcgr3</i> ^{tm1Sjv}	[37]	Homo
FcγRI	FcγR1 ^{-/-}	<i>Fcgr1</i>	<i>Fcgr1</i> ^{tm1Sjv}	[38]	Homo
FcγR	FcγR ^{-/-}	<i>Fcer1g</i>	<i>Fcer1g</i> ^{tm1Rav}	[39]	Homo
Fgr	Fgr ^{-/-}	<i>Fgr</i>	<i>Fgr</i> ^{tm1Hev}	[46]	Homo
Hck	Hck ^{-/-}	<i>Hck</i>	<i>Hck</i> ^{tm1Hev}	[46]	Homo
Lyn	Lyn ^{-/-}	<i>Lyn</i>	<i>Lyn</i> ^{tm1Sor}	[47]	Homo
p190RhoGAP	p190RhoGAP ^{-/-}	<i>Grlf1</i>	<i>Grlf1</i> ^{tm2Jset}	[14]	Het
p190RhoGAP	p190RhoGAP ^{hypo/hypo}	<i>Grlf1</i>	<i>Grlf1</i> ^{tm1Jset}	[48]	Het
PI3Kβ	PI3Kβ ^{-/-}	<i>Pik3cb</i>	<i>Pik3cb</i> ^{tm1.1Bvan}	[49]	Het
PI3Kδ	PI3Kδ ^{KD/KD}	<i>Pik3cd</i>	<i>Pik3cd</i> ^{tm1Bvan}	[50]	Het
PLCγ2	PLCγ2 ^{-/-}	<i>Plcg2</i>	<i>Plcg2</i> ^{tm1Jni}	[51]	Het
SLP-76	SLP-76 ^{-/-}	<i>Lcp2</i>	<i>Lcp2</i> ^{tm1Gak}	[52]	Homo
Syk	Syk ^{-/-}	<i>Sykb</i>	<i>Sykb</i> ^{tm1Tyb}	[53]	Het

1. táblázat: Az értekezésben bemutatott kísérletekben alkalmazott mutáns egértörzsek. Hypo: hipomorf allél; KD: "kinase-dead"; Homo: homozigóta fenntartás; Het: heterozigóta fenntartás.

Az 1. táblázatban szereplő egerek mindegyikét a C57BL/6 (B6) genetikai háttérrel tartottuk fent. A kontroll C57BL/6 egerek kereskedelmi forrásból vagy saját állatházunkból származtak.

Csontvelő vagy magzati máj transzplantációjához recipiensként a CD45.1 allélt a C57BL/6 genetikai háttéren hordozó (B6.SJL-*Ptprc^aPep3^b*/BoyJ) egereket használtunk, melyek alapítóit a Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, ME, USA) szereztük be, majd saját állatházunkban tenyésztettük tovább.

A K/B×N szérumtranszfer-arthritishez a KRN transzgént a C57BL/6 genetikai háttéren hordozó egereket [108] Dr. Diane Mathis-től (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) kaptuk. A K/B×N egerek létrehozásához kereskedelmi forgalomban kapható NOD egereket alkalmaztunk.

A kísérletekben felhasznált egerek tenyésztésére és az értekezésben bemutatott kísérletekre a University of California, San Francisco (UCSF) és az SE állatkísérleti és állatvédelmi bizottságaitól megfelelő engedélyekkel rendelkezünk.

6.1.2. Egerek tenyésztése

Az Egyesült Államokban végzett kísérletek során az egereket a UCSF specifikus patogénmentes (SPF) állatházában tenyésztettük. A Magyarországon végzett kísérletek során az egereket korábban az Eötvös Loránt Tudományegyetem (ELTE) Immunológiai Intézetének, később pedig a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Központjának (SE EOK) konvencionális állatházában egyedileg szellőztetett ketrecállványokban tenyésztettük. Az állatok ad libitum jutottak táphoz és alomhoz, a napi ciklus a természetes fényhez igazodott (ELTE) vagy 12 órás világosság-sötétség ciklusban váltakozott (UCSF és SE EOK).

A kísérletekhez szükséges háttérkolóniák egy részét a Magyar Tudományos Akadémia Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézetének SPF állatházában tartottuk fent.

6.1.3. Egerek genotipizálása

Az egyes egértörzseket a mutáció jellegétől függően homozigóta vagy heterozigóta formában tartottuk fent (ld. 1. táblázat). Homozigóta fenntartás esetén az egerek genotípusát szűrőpróbaszerűen ellenőriztük immunoblot módszerrel vagy allél-specifikus PCR-reakcióval.

A heterozigóta formában fenntartott mutációkat rutinszerűen a heterozigóta egyedek vad típusú C57BL/6 egyedekkel való pároztatásával tartottuk fent. Kísérleti célra, illetve magzati máj transzplantációjához a heterozigóta egyedeket egymással pároztattuk.

Az utódokat allél-specifikus PCR-reakció segítségével genomiális DNS-mintából genotipizáltuk. Az ehhez szükséges protokollokat vagy a mutációt létrehozó laboratóriumtól kaptuk, vagy a mutáns szekvencia ismeretében magunk fejlesztettük ki a PCR-reakciót. A reakció-körülményeket minden esetben optimalizáltuk.

A vizsgált mutációk genotipizálásához használt primer-szekvenciákat és a kapott PCR-termékek méretét mutatja a 2. táblázat. Amint a táblázatból látható, az esetek többségében egy vad típusú és egy mutáns allélre specifikus primerrel és egy mindkét allélt felismerni képes primerrel végeztük a genotipizálást. Ez alól kivételt jelentett a *Lyn^{-/-}* mutáció, melynek esetén két teljesen különböző PCR-reakciót használtunk, illetve a *PI3K^{ΔKD/KD}* mutáció, melynek esetén egy PCR-reakciót végeztünk és a két allél között a termék mérete alapján tettünk különbséget.

Értekezésben használt jelölés	Allél	Primer 1 (5'-3')	Primer 2 (5'-3')	Termék mérete (bp)
CD18 ^{-/-}	VT	GCC CAC ACT CAC TGC TGC TTG	CCC GGC AAC TGC TGA CTT TGT	450
	KO	AGG ACA GCA AGG GGG AGG ATT		140
DAP12 ^{-/-}	VT	AGG GCA TCT GGT GCC ATC TTC TGG	TCC TGT GTC CTC AGC TCA TGT TGG G	1100
	KO	TTG CCA TGG ATG CGT ACT AGA GCG G		600
FcγR1 ^{-/-}	VT	GTT TGC TGT GGT TTG AGA CC	TCC TTC TGG AAA ATA CTG ACC	320
	KO	TCG CCG ATA GTG GAA ACC GAC		550
FcγR3 ^{-/-}	VT	CTA CAT CCT CCA TCT CTC TAG	GTG GCT GAA AAG TTG CTG CTG	238
	KO	GCA CGA GAC TAG TGA GAC GTG		550
FcγR ^{-/-}	VT	GCC CTT CCC TTC CCT CTA CAC	CTC ACG GCT GGC TAT AGC TGC C	325
	KO	CTC GTG CTT TAC GGT ATC GCC		280
Fgr ^{-/-}	VT	CAA GGC CGG ACT TCG TCC GTC TTT CC	GAG AGC CTT ACT GGA ATC CCT CTT TAG C	300
	KO	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CTC TCC ACC		550
Hck ^{-/-}	VT	GTT GTT TGG TCC CAG CTT GCT GGA GG	GCT CCA TAG ATC CGT CGT GCC ATT TCC	360
	KO	GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG		420
Lyn ^{-/-}	VT	CAT AGC CTG AGT TAG TTC CCT AGC	TCA CAT ATG AAC ATG TGT GTA CAT GTC	340
	KO	GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG		400
p190RhoGAP ^{-/-}	VT	ACA GCA AAG GAC AAG TAT GAG T	CCA TCA AGT CAA AGG GAA TC	409
	KO	GAG TCG AAT CAA GCT GAT C		247
PI3Kβ ^{-/-}	VT	AGT GAA CGC TAT GCA TCA CAC CAG C	AAC AGT GCT TTC ATC AAA CC	300
	KO	TCT GTG TTC TCA CTT CTG ACC		670
PI3K ^{KD/KD}	VT	GCG TAA CAG AGA GCA AAG TCC C	AGG GAA CCG CCG TAT GAC	250
	KD			400
PLCγ2 ^{-/-}	VT	GCC TCT GCA CAG CAC ACA TAT GG	TTC ACC GCA TCC TCC TTT GAG TCC	340
	KO	CAA GGT GAG ATG ACA GGA GAT CC		700
Syk ^{-/-}	VT	AGA GAA GCC CTG CCC ATG GAC	GTC CAG GTA GAC CTC TTT GGG C	86
	KO	CCT TGG GAA AAG CGC CTC CCC TAC CC		120

2. táblázat: Az egyes egértörzsek genotipizálásának részletei. VT: vad típus; KO: knockout; KD: "kinase-dead"

6.1.4. A p190RhoGAP^{-/-} mutáció jellemzése

Amint azt az Eredmények fejezetben tárgyalom, a p190RhoGAP^{-/-} mutációval kapcsolatban kísérleteink kezdetén gyakorlatilag semmilyen információval nem rendelkezünk. Ezért először a neomicin-rezisztenciát okozó Neo kazetta ismert szekvenciájára terveztünk egy primer-párt, amivel sikerült azonosítanunk a feltételezeten p190RhoGAP^{+/-} egereket. Ennek és a mutáció feltételezett beillesztési pontjának ismeretében megterveztünk, majd optimalizáltunk egy, a p190RhoGAP^{-/-} allélra specifikus PCR-reakciót. Az alkalmazott primereket és a reakciók jellemzőit mutatja a 3. táblázat.

Alkalmazott primerek

Primer neve	Szekvencia (5' – 3')
p190-A ⁺ szenz	ACA GCA AAG GAC AAG TAT GAG T
p190-A ⁻ szenz	GAG TCG AAT CAA GCT GAT C
p190-A közös antiszenz	CCA TCA AGT CAA AGG GAA TC
Neo szenz	GCA GCT GTG CTC GAC GTT GTC
Neo antiszenz	CCA CCA TGA TAT TCG GCA AGC AGG

Alkalmazott PCR-reakciók

PCR neve	1. primer	2. primer	Termék mérete	Reakció, ha a genotípus...		
				p190-A ^{+/+}	p190-A ^{+/-}	p190-A ^{-/-}
p190-A ⁺	p190-A ⁺ szenz	p190-A közös antiszenz	409 bp	✓	✓	–
p190-A ⁻	p190-A ⁻ szenz	p190-A közös antiszenz	247 bp	–	✓	✓
Neo	Neo szenz	Neo antiszenz	364 bp	–	✓	✓

3. táblázat: A p190RhoGAP mutáció azonosításához használt PCR-reakció jellemzői.

A továbbiakban megkíséreltük a teljes mutáns allél szekvenciájának meghatározását. Ehhez lépésenként újabb átfedő PCR-reakciókat terveztünk, melyekkel a mutációt hordozó egyedek genomiális DNS-éből kiterjesztettük az egyes mutáns szakaszokat, és azok bázissorrendjét szekvenálással meghatároztuk. A többlépéses folyamat eredményeként kapott szekvenciát HM365221 azonosító alatt elhelyeztük a Genbank adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

6.2. Csontvelő-kimérák létrehozása és ellenőrzése

6.2.1. Magzati májsejtek és csontvelői sejtek transzplantációja

Kísérleteink egy részében (elsősorban a Syk^{-/-} és a p190RhoGAP^{-/-} sejtek vizsgálatakor) a homozigóta mutáns egerek perinatális letalitása miatt magzati májsejtek transzplantációjával hoztunk létre mutáns hemopoetikus rendszerrel rendelkező kimérákat. Ennek érdekében a heterozigóta szülőket időzítetten párosítottuk, majd a terhesség 15-18. napján (a harmadik trimeszter során) eltávolítottuk a magzatokat. A magzatok genotípusát vagy a Syk^{-/-} mutációra jellemző petechia-szerű megjelenés, vagy (a p190RhoGAP^{-/-} magzatok esetén) az agylyátumból végzett felgyorsított immunoblot segítségével határoztuk meg és esetenként utólag allél-specifikus PCR-reakcióval is megerősítettük. A magzati májat eltávolítottuk, a májsejteket sejt kultúra-médiumban felszuszpendáltuk és a transzplantációig (jellemzően 4-8 órán keresztül) jégen tartottuk.

Recipiensként a C57BL/6 genetikai háttérrel CD45.1 fehérvérsejt-markert hordozó felnőtt egereket alkalmaztunk. A recipienseket a UCSF állatházában, az Országos "Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutatóintézetben (OSSKI) vagy a Központi Fizikai Kutatóintézetben (KFKI) ⁶⁰Co γ-sugárforrás segítségével 11 Gy letális dózissal besugaraztuk. A magzati májsejtek frakcionálás nélküli szuszpenzióját ezután a farokvénán vagy a retroorbitális vénás plexuson keresztül intravénásan beinjektáltuk a recipiens egerekbe. Egy magzati máj sejtjeit átlagosan 6-8 recipiensbe injektáltuk.

Néhány bemutatott kísérletben (a PLCγ2^{-/-} sejtekkel való kísérletek egy részében és a kevert csontvelői kimérák vizsgálata során) felnőtt egerek csontvelői sejtjei segítségével végeztünk transzplantációt, a magzati májsejtek transzplantációjához hasonló

megközelítéssel. Egy felnőtt egér frakcionálatlan csontvelői sejtait 5-10 recipiensbe injektáltuk.

A transzplantáció után az egerek két hétig antibiotikummal (neomicinnel és polymixin B-vel) kezelt vizet kaptak. A transzplantált állatokat a transzplantáció után 4-8 héttel vizsgáltuk tovább.

6.2.2. A csontvelő-kimérák ellenőrzése

A transzplantáció sikerességének az ellenőrzését a donor és recipiens fehérvérsejtek különböző (CD45.2 és CD45.1) sejtfelszíni markereinek áramlási citometriával való kimutatása tette lehetővé. A rutinszerű ellenőrzés során minden egyes kiméra perifériás vérében megvizsgáltuk a Gr1 (RB6-8C5) antitesttel jelölődő granulocita-kompartmenten belül a CD45.2-elleni ("104" klón) antitesttel festődő (tehát donor-eredetű) sejtek arányát. A vizsgálatot minden esetben a donor és recipiens genetikai háttérből származó kontroll sejtek vizsgálatával egészítettük ki. Ezzel a módszerrel a vizsgált kimérákban a keringő granulocitáknak rutinszerűen több mint 99%-a donor-eredetűnek bizonyult.

A transzplantáció hatékonyságát a kimérákon végzett kísérletek során, illetve a kísérlet végén rendszeresen újra ellenőriztük. Erre az adott kísérlet és mutáció függvényében az izolált sejtek (pl. csontvelői neutrofilek) fentihez hasonló módon való áramlási citometriás vizsgálatát, az adott fehérje jelenlétének immunoblot módszerrel való kimutatását vagy a mutáció egyéb ismert következményének (pl. a Syk^{-/-} mutáció esetén a keringő B-sejtek hiányának) a vizsgálatát alkalmaztuk.

6.3. Neutrofilek és makrofágok izolálása és tenyésztése

A sejteket minden esetben steril és endotoxin-mentes reagensek segítségével, a makrofágok esetén steril körülmények között végeztük.

6.3.1. Humán neutrofilek izolálása

A humán neutrofileken végzett kísérletekhez egészséges önkéntesektől heparinnal vagy citráttal alvadésgátolt vért vettünk, melyekből a vörösvértesteket dextrán T-500 (Amersham-Pharmacia) segítségével üleptítettük ki. A fehérvérsejtekben gazdag felülúszóból centrifugálás után Ficoll-Paque PLUS (Amersham-Pharmacia) grádiensen választottuk szét a mononukleáris sejteket és a granulocitákat. A szennyeződésként jelen levő vörösvértesteket hipozmotikus lízissel távolítottuk el. A preparálást szobahőmérsékleten végeztük. Az így nyert sejtszuszpenzióban a sejtek több mint 98%-a polimorfonukleáris morfológiát mutatott és a sejtek életképessége rutinszerűen 98% felett volt. Egy donorból átlagosan 50-80 millió neutrofilet nyertünk.

A humán véren végzett kísérletekhez a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságától megfelelő engedéllyel rendelkezünk.

6.3.2. Egér neutrofilek izolálása

Az egér neutrofileket a tibia és a femur csontvelejéből nyertük. A csontvelői sejteket a vörösvértestek eltávolítása érdekében rövid hipoozmotikus kezelésnek vetettük alá, majd 62.5%-os Percoll-grádiensen centrifugálva választottuk el az érett neutrofileket az egyéb sejtektől. A preparálást szobahőmérsékleten végeztük. Az ily módon nyert sejtszuszpenzió

80-90%-a nagymértékben expresszálta az egér granulocitákra jellemző Gr1 markert. A fennmaradó sejtek főleg éretlen mieloid sejtek és a B-sejtek érésének korai alakjai voltak. Egy felnőtt egerből átlagosan 10-20 millió neutrofil nyertünk.

6.3.3. Egér csontvelői-eredetű makrofágok tenyésztése

A makrofágok tenyésztése érdekében az egerek tibiáit és femurjait steril oldattal átmostuk, majd a kapott csontvelői sejteket felfuszpendáltuk és 24 órán keresztül 10% FCS-t és antibiotikumokat tartalmazó α -MEM (Invitrogen) médiumban 10 ng/ml rekombináns egér M-CSF (Peprotech) jelenlétében szövetkultúra-edényben tenyésztettük. A nem letapadt sejteket összegyűjtöttük és egerenként 1-2 db 10 cm-es bakteriális tenyésztőedényben 10% CMG14-12 sejt-felülúszóval (mint M-CSF-forrással [109]) kondicionált médiumban tenyésztettük tovább 6-8 napig. A sejtek médiumát 3 naponta cseréltük és a sejteket szükség szerint további bakteriális edényekre osztottuk szét. Az így nyert sejtek tisztaságát a makrofágokra jellemző morfológia vizsgálatával és esetenként az F4/80 marker (BD Pharmingen) jelenlétének áramlási citometriás meghatározásával erősítettük meg.

6.4. A neutrofilek funkcionális vizsgálata

6.4.1. Neutrofilek aktiválása

A neutrofilek aktiválását 10 mM HEPES-t (pH 7.4) tartalmazó HBSS oldatban végeztük 37 °C hőmérsékleten.

6.4.1.1. Neutrofilek integrin-függő aktiválása

A neutrofilek integrin-függő aktiválódását rutinszerűen humán fibrinogénnel (Sigma) kezelt sejt-kultúra-edényben vagy 96-lyukú mikrolemezen végeztük. A sejtek aktiválódását leggyakrabban 20 ng/ml humán vagy 50 ng/ml egér TNF- α -val (Peprotech) váltottuk ki. Esetenként vizsgáltuk továbbá 1 μ g/ml Pam₃CSK₄ (EMC Microcollections), 5 μ g/ml ultratiszta LPS (InvivoGen), 10 ng/ml egér GM-CSF (Peprotech) és 100 ng/ml MIP-2 (Peprotech) hatását is. Néhány kísérletben vizsgáltuk a TNF hatását FCS-sel, kollagénnel vagy rekombináns ICAM-1-gyel fedett felszínen is.

A neutrofil-integrinek mesterséges keresztkötése érdekében a sejteket szolubilis ligand hozzáadása nélkül poly-RGD (Sigma) peptiddel fedett felszínre helyeztük.

Az integrinek és az Fc-receptorok együttes aktivációját ELISA-lemezre helyezett monoklonális anti-integrin antitestekkel hoztuk létre. Az ezen kísérletek során alkalmazott monoklonális antitestek leírását és forrását a [2,7] közlemények tartalmazzák. Az antitestek egy részét kereskedelmi forgalomban vásároltuk, más részét FCS-mentes körülmények között tenyésztett hibridóma-sejtek felülúszójából Protein A vagy Protein G oszlopon való affinitás-tisztítás után nyertük. Az IB4 egér anti-humán anti-CD18 antitestből a Pierce F(ab')₂ preparációs kitjével készítettünk F(ab')₂ fragmenseket. Az F(ab')₂ fragmensek vizsgálatánál az antitesteket (a teljes antitestet is) glutáraldehid segítségével kovalens módszerrel kötöttük poli-L-lizin felszínhez. Az anti-integrin antitestek általi neutrofil-aktivációt az integrinek másodlagos ligandkötésének elkerülése érdekében Mg²⁺-mentes oldatban végeztük.

6.4.1.2. Neutrofilek aktiválása Fc-receptorokon keresztül

A neutrofilek Fc-receptorokon keresztüli aktiválódását immobilizált IgG immunkomplexekkel végeztük. Ennek érdekében ELISA-lemezekre antigéneket (humán szérumalbumin, ovalbumin vagy laktoferrin; Sigma) kötöttünk le, majd a felszín FCS-sel való blokkolása után a megfelelő antigén elleni poliklonális nyúl antitestekkel (Sigma) inkubáltuk a lemezeket. A felesleges antitestek elmosása után a neutrofileket további szolubilis stimulus nélkül az immobilizált immunkomplex felszínre helyeztük.

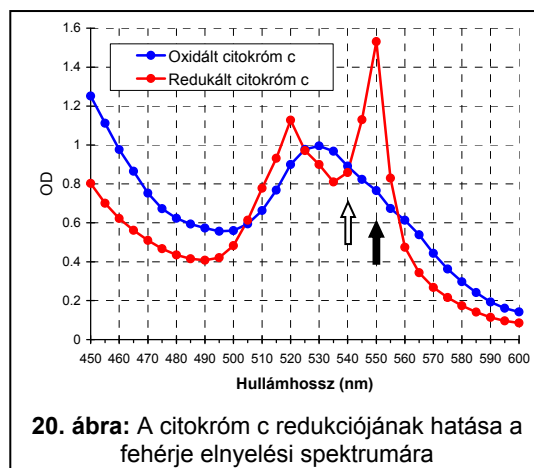
6.4.1.3. Neutrofilek aktiválása szuszpenzióban

A neutrofilek szuszpenzióban való aktiválásához G-fehérjéken ható agonistákat, illetve a fent említett gyulladásos mediátorokat használtuk. A G-fehérje-agonisták közül az fMLP-t (Sigma) a fajbéli különbségek miatt humán neutrofileken 0.1-1 μM , míg egér neutrofilek esetében 1-10 μM koncentrációban alkalmaztuk. Vizsgáltuk továbbá 100 ng/ml MIP-1 α (Peprtech), 100 ng/ml MIP-2 (Peprtech), 15 nM LTB $_4$ (Sigma) és 30 ng/ml C5a (Sigma) hatását is. A szuszpenzióban történő méréseket az integrinek aktiválódásának elkerülése érdekében Mg $^{2+}$ -mentes körülmények között végeztük. Egyes esetekben a sejteket 10 μM citokalazin B-vel (CB; Sigma) kezeltük elő.

6.4.2. Neutrofilek funkcionális válaszainak vizsgálata

6.4.2.1. A szabadgyök-termelés vizsgálata

A neutrofilek szabadgyök-termelését 96-lyukú lemezekon spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk. A mérések üregenként 100 μl térfogatban történtek, humán neutrofilek esetén 1 millió/ml, egér neutrofilek esetén 4 millió/ml sejtszám mellett. A neutrofilekhez 100 μM ferricitokróm c-t (Sigma) adtunk, majd egyenletes időközönként lemértük a minták abszorbanciáját 550 és 540 nm hullámhosszon. A mérés elve arra épül, hogy a neutrofilekből felszabaduló szuperoxid (O_2^-) szabadgyök a ferricitokróm c redukcióját hozza létre, ami jelentősen megemeli a fehérje 550 nm-en mért extinkcióját, de nem befolyásolja az 540 nm-es referencia-hullámhosszon történő elnyelődést (20. ábra). A két hullámhosszon mért elnyelődés változásának és a citokróm c ismert extinkciós koefficiensének segítségével abszolút mértékben is meghatározható a sejtek szuperoxid-termelése.



6.4.2.2. A degranuláció vizsgálata

A primer granulumok ürülését az azokból felszabaduló enzimek aktivitásának a mérésével követtük. A β -glukuronidáz aktivitását a lecentrifugált sejtek felülúszójából a metilumbelliferil- β -D-glukuronidból (Sigma) felszabaduló metilumbelliferil fluoreszcenciájának a vizsgálatával határoztuk meg. A β -glukuronidázzal ellentétben az elasztáz pH-optimuma a fiziológiás tartományban van, ami lehetővé teszi az elasztáz-aktivitásnak a sejtek jelenlétében való valós idejű vizsgálatát. Ennek érdekében a sejteket N-metoxiszukcinil-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-metilkumarin elasztáz-szubsztrát jelenlétében aktiváltuk és követtük a

sejtekből felszabaduló elasztáz hatására megjelenő aminometilkumarin fluoreszcenciáját. A sejten kívüli térben jelen levő elasztáz mennyisége a fluoreszcencia-görbe pillanatnyi meredekségével volt arányos. A primer granulomok ürülését 10 μ M citokalazin B (CB) jelenlétében vizsgáltuk. Az enzimleadást a 0.02% cetiltrimetil-ammonium-bromid (CTAB) ionos detergens jelenlétében mért összes enzimaktivitás százalékában adtuk meg.

A szekunder granulomok ürülését a laktoferrin (Lfr) leadásának ELISA-alapú mérésével követtük a neutrofilek felülúszójából. Humán neutrofilek vizsgálatokor jelöletlen nyúl poliklonális anti-humán Lfr (Sigma) és torna-peroxidázzal konjugált kecske anti-humán laktoferrin (Nordic Immunology) antitestek segítségével kettős-szendvics ELISA módszert alkalmaztunk. Egér neutrofilek esetében a rendelkezésre álló anti-humán Lfr antitest alacsony affinitása miatt a felülúszókat karbonát-oldatban hígítva közvetlenül adtuk az ELISA-lemezekhez, majd jelöletlen nyúl anti-humán Lfr antitesttel és peroxidáz-jelölt anti-nyúl antitesttel végeztük az előhívást.

Humán neutrofilek szekretoros vezikuláinak kiürülését a sejt felülúszók humán szérum-albumin (HSA) koncentrációjának a vizsgálatával követtük. A vizsgálatokat jelöletlen és peroxidáz-jelölt poliklonális anti-HSA antitestek felhasználásával kettős szendvics ELISA módszerrel végeztük.

6.4.2.3. Mikroszkópos vizsgálatok

A neutrofilek szétterülését fáziskontraszt-mikroszkóppal, Leica DMI6000B inverz mikroszkóp segítségével követtük. A szövettani metszeteket ugyanezen mikroszkóppal vizsgáltuk és dokumentáltuk.

A Syk és a CD18 fluorescens festését a sejtek fixálása és permeabilizálása után nyúl poliklonális anti-Syk (Santa Cruz) és patkány monoklonális anti-egér CD18 (C71/16; BD Pharmingen) antitestekkel, majd fluoreszcensen jelölt másodlagos reagensekkel (Molecular Probes) végeztük. Kontrollként az anti-Syk antitest blokkoló peptidjét, illetve az anti-CD18 antitesttel azonos izotípusba tartozó kontroll antitestet alkalmaztunk. A sejtek fluoreszcenciáját Deltavision dekonvolúciós mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

6.4.2.4. A sejtadhézió vizsgálata

A sejtek adhéziójának mérése érdekében az inkubálási fázis végétől elmostuk a szabadon lebegő sejteket, majd az adherens sejteket 0.1% Triton jelenlétében feltártuk és spektrofotometriás enzimaktivitás-vizsgálattal meghatároztuk a mintás savas foszfatáz aktivitását, ami a letapadt sejtek mennyiségével volt arányos. Az értékeket az összes sejt mennyiségének arányában adtuk meg.

6.4.3. A sejt vándorlás vizsgálata

6.4.3.1. In vitro migrációs vizsgálatok

A neutrofilek in vitro migrációját 3 μ m pórusátmérőjű polikarbonát filterrel rendelkező Transwell (Corning) rendszerben vizsgáltuk. A Transwell-betéteket a kísérlet előtt humán fibrinogénnel kezeltük. 24-lyukú lemezek üregeibe a megadott kemoattraktáns-koncentrációkat pipettáztuk, majd ebbe belehelyeztük a vizsgálandó neutrofil-szuszpenziót (mintánként 1 millió sejtet) tartalmazó betéteket. 60 perc inkubáció után a lemezeket lecentrifugáltuk, a Transwell-betéteket eltávolítottuk és a fent említett savas foszfatáz assay

segítségével meghatároztuk a migrált sejtek arányát, melyet a rendszerbe beadott összes sejtek arányában adtunk meg.

Dr. Barbara Walzog-gal (München, Németország) együttműködve in vitro Zigmond kamrában [110] is vizsgáltuk a neutrofilek vándorlását. Ezen kísérletek során a Zigmond-kamra egyik oldalán levő médiumhoz adott 10 μ M fMLP segítségével fMLP-grádienszt hoztunk létre és mikroszkóp alatt videofelvételt készítettünk a sejtek migrációjáról. Az egyes sejtek migrációját off-line vizsgálattal elemeztük és számszerűsítettük.

6.4.3.2. *In vivo migrációs vizsgálatok*

Az in vivo migrációs kísérleteket kevert csontvelői kimerákon kiváltott steril tioglikollát-peritonitis vizsgálatával, a vad típusú és mutáns sejtek közti közvetlen versengés során vizsgáltuk. Ehhez CD45.1-et hordozó vad típusú, illetve CD45.2-t hordozó vad típusú vagy knockout egerek csontvelői sejtjeit különböző (1:3; 1:1; 3:1) arányban összekevertük, és ezeket injektáltuk letálisan besugarazott CD45.1-et expresszáló vad típusú recipiensekbe. A transzplantáció után 4-8 héttel 1 ml 3%-os tioglikollát-oldatot injektáltunk az egerek peritoneumába, majd 4 órával később kimostuk a peritoneális sejteket. A kísérlet elején közepén és végén perifériás vérmintát vettünk. Gr1 és CD45.2 festéssel a peritoneális folyadékban és a vérben is meghatároztuk a CD45.2-pozitív (általában knockout) sejtek arányát. A CD45.2-pozitív neutrofilek arányát a vérben és a peritoneumban az 61. ábrán bemutatott koordinátarendszerben ábrázoltuk, melyben minden pont egy egérnek felelt meg, a vízszintes hibasávok medig a három vérmintából kapott eredmények szórását mutatták. A sejtek relatív migrációját az 61. ábrán bemutatott képletnek megfelelően számoltuk.

6.5. Áramlási citometriás módszerek

A bemutatott kísérletek során rendszeresen végeztünk áramlási citometriás vizsgálatot a sejtek genotípusának, érésének, a sejtfelszíni markerek és receptorok nyugalmi szintjének, az egyes receptorok "upregulációjának" és a sejtek eredetének (donor/recipiens) vizsgálatára. Ezen kísérletek során a mintát 1% FCS-t tartalmazó médiumban jégen inkubáltuk a megfelelő jelölt vagy jelöletlen antitesttel (általában a BD Pharmingen-től), majd mosás után szükség esetén egy második inkubációs lépést is alkalmaztunk jelölt streptavidinnel vagy másodlagos antitesttel (BD Pharmingen). Az egyes konkrét kísérletek során alkalmazott monoklonális antitestek és másodlagos reagensek további adatai az értekezés alapjául szolgáló közleményekben található. Többszöri mosás után a sejteket FACS lízis pufferben vettük fel, és BD FACScan vagy BD FACSCalibur áramlási citométerrel vizsgáltuk. Az adatok kiértékelését BD CellQuest szoftverrel végeztük.

6.6. Oszteoklasztok tenyésztése és funkcionális vizsgálata

Oszteoklasztok tenyésztése céljából az egerek csontvelői sejtjeit a makrofág-tenyészeteknél leírt módon először 10 ng/ml M-CSF-et (Peprotech) tartalmazó médiumban tenyésztettük 24 óráig, majd a nem-adherens sejteket 24-lyukú szövetkultúra-kezelt lemezek (BD Falcon) üregeiben tenyésztettük tovább 3-5 napig 10-100 ng/ml M-CSF és 20-70 ng/ml rekombináns egér RANKL (Peprotech) jelenlétében. A médiumot 2-3 naponta cseréltük. A

sejteket a 3-5. napon TRAP assay kit-tel (Sigma) festettük és megszámláltuk az érett oszteoklasztok (TRAP-pozitív és legalább 3 sejtmaggal rendelkező sejtek) számát.

Az oszteoklasztok in vitro reszorpciós aktivitásának vizsgálata érdekében a sejteket mesterséges hidroxiapatit felszínen (BD Biosciences) vagy bálna dentin-szeleteken (Immunodiagnosics Systems) tenyésztettük 7-10 napig a fentiek szerint. A lebontást a szubsztrát mikroszkópos vizsgálatával és a mikroszkópos képek számítógépes kvantifikációjával számszerűsítettük.

Az oszteoklasztok és oszteoblasztok együtt-tenyésztése során a vizsgálandó vad típusú és mutáns csontvelői sejteket vad típusú egerek csontveleijéből differenciáltatott primer oszteoblasztok jelenlétében tenyésztettük.

6.7. Biokémiai vizsgálatok

6.7.1. Sejtfehérjék vizsgálata teljes-sejt lizátumból

Az intracelluláris fehérjék jelenlétét az azokra specifikus antitestekkel végzett immunoblot módszerrel határoztuk meg. Ehhez a sejteket 1% Triton-X-100-at és esetenként 0.1% Na-dodecil-szulfátot (SDS) és 0.5% Na-deoxikolátot (DOC) tartalmazó, proteáz- és foszfatáz-gátlószerekkel (Sigma) kiegészített lízis-pufferben tártuk fel, majd centrifugálással eltávolítottuk a nem-szolubilis sejtalkotókat. Az így nyert teljes-sejt-lizátumokat mintapufferben megfőztük, SDS-poliakrilamid-gélen megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Blokkolás után a vizsgálandó fehérjére specifikus elsődleges, illetve peroxidáz-jelölt másodlagos antitesttel inkubáltuk a membránokat. Az ehhez használt antitestek adatait az értekezés alapjául szolgáló közlemények tartalmazzák. A nem-foszfo-specifikus antitesteket általában a Santa Cruz, Sigma, BD Transduction Laboratories vagy Cell Signaling, a foszfo-tirozin antitestet az Upstate Biotechnology, a másodlagos antitesteket pedig az Amersham-Pharmacia cégtől vásároltuk. Az immunoblot jelölődést enhanced chemiluminescence (ECL) reagens (Amersham-Pharmacia) segítségével hívtuk elő és röntgen-filmre rögzítettük.

6.7.2. Immunprecipitációs és GST-pulldown módszerek

Egyes fehérjék foszforilációjának vizsgálata érdekében immunprecipitációs módszert alkalmaztunk. Ennek során a teljes-sejt-lizátumokat az adott fehérje elleni antitestekkel inkubáltuk, majd a keletkezett immunkomplexeket gyöngyökhöz kötött Protein A (Zymed) vagy Protein G (Invitrogen) segítségével precipitáltuk ki. Többszöri mosás után a gyöngyöket mintapufferben felvettük, megfőztük és a fentieknek megfelelően anti-foszfortirozin antitestek segítségével immunoblot módszerrel vizsgáltuk. Kontrollként a precipitációhoz használt antitesttel is vizsgáltuk a precipitáció hatékonyságát.

Az ITAM-tartalmú fehérjék foszforilációjának vizsgálata érdekében az egér Syk tandem SH2-doménjeit tartalmazó GST-fúziós fehérjével (GST-Syk(SH2)₂) végeztünk precipitációs ("GST-pulldown") vizsgálatokat. A fúziós fehérjét E. coli sejtekben termeltettük és glutation-tartalmú gyöngyökkel izoláltuk. Célzott mutagenézis kit (Stratagene) segítségével létrehoztuk a GST-Syk(SH2)₂ fúziós fehérje funkcióképtelen mutációját is, melyben az SH2-doméneket az R41A és R194A mutációkkal roncsoltuk el ("SH2-Dead" mutánsok). A teljes-sejt-lizátumokat a GST-fúziós fehérjét tartalmazó gyöngyökkel inkubáltuk, majd többszöri

mosás után a fenti módszerrel vizsgáltuk a precipitátumokban jelenlevő tirozin-foszforilációs jelet, illetve az ITAM-tartalmú fehérjék jelenlétét.

6.7.3. Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának vizsgálata

Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának vizsgálata érdekében az oszteoklaszt-tenyészetekből a megadott időpontokban Trizol (Invitrogen) reagens segítségével mRNS-t izoláltunk, amiből reverz transzkriptáz kit (Applied Biosystems) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. A kapott cDNS-ből megfelelő primer-párok segítségével szemi-kvantitatív PCR-reakciót [6], vagy TaqMan génexpressziós kitek (Applied Biosystems) felhasználásával kvantitatív PCR-vizsgálatot [18] végeztünk (utóbbit Applied Biosystems PRISM 7900 készüléken). A vizsgálatokhoz használt primerek, illetve TaqMan kitek adatait az értekezés alapjául szolgáló közlemények tartalmazzák.

6.8. Hemopoetikus sejtek retrovirális transzdukciója

A hemopoetikus eredetű sejtek retrovirális transzdukcióját a Murine Stem Cell Virus-ra (MSCV) épülő pMIG-W vagy a Moloney Murine Leukemia Virus-ra (MMLV) épülő pMX-pie retrovirális vektorok segítségével végeztük. Mindkét vektor tartalmazta a vektor genomiális DNS-be való beépüléséhez szükséges szekvenciákat, valamint a beépített cDNS-től disztálisan egy belső riboszóma-belépési hely (IRES) után az eGFP génjét. Az egér Syk és a FLAG címkével jelölt DAP12 cDNS-ét standard molekuláris biológiai módszerekkel illesztettük a vektorokba. A Syk C-terminális SH2-doménjét funkcióképtelenné tevő R194A mutációt és a DAP12 ITAM-tirozinjait eltávolító Y65F és Y76F mutációkat célzott mjutagenezis kit (Stratagene) segítségével hoztuk létre. A vektorokat Eugene (Roche) reagens segítségével HEK 293T sejtekbe transzfektáltuk, az így nyert retrovirális felülúszó transzdukciós hatékonyságát (az eGFP-fluoreszcencia megjelenését) pedig NIH 3T3 sejteken ellenőriztük.

A neutrofilek transzdukciója érdekében Syk^{-/-} vagy DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} magzati májsejteket in vitro fertőztünk a retrovirális felülúszóval, majd a transzdukált májsejteket letálisan besugárzott recipiensekbe transzplantáltuk. 4-6 héttel a transzplantáció után a kimérákból neutrofileket izoláltunk és vizsgáltuk azok funkcionális válaszait, a visszajuttatott fehérje expresszióját és az eGFP fluoreszcenciáját.

A makrofágok és az oszteoklasztok vizsgálatához a Syk^{-/-} vagy DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} csontvelői sejteket in vitro fertőztük a megfelelő retrovirális felülúszókkal, majd a korábbiaknak megfelelően in vitro tenyésztettük tovább a sejteket makrofág, illetve oszteoklaszt irányba. A makrofágok jelátvitelét és az oszteoklasztok fejlődését és in vitro reszorpciós működését a fentieknek megfelelően vizsgáltuk, és meghatároztuk a visszajuttatott fehérjék expresszióját és az eGFP fluoreszcenciáját.

6.9. In vivo gyulladásos modellek

6.9.1. K/B×N szérum nyerése

K/B×N szérum nyerése érdekében a KRN transzgént a C57BL/6 genetikai háttéren hordozó egereket NOD egerekkel pároztattunk, majd áramlási citometriás vagy PCR

módszerrel azonosítottuk a KRN transzgén-pozitív (K/B×N) és a transzgén-negatív (B×N) utódokat. Ezekből külön-külön szérumot vettünk, majd az azonos genotípusba tartozó egerek szérumait összegyűjtöttük és fagyasztva tároltuk.

6.9.2. A K/B×N szérumtranszfer-arthritis vizsgálata

A K/B×N szérumtranszfer-arthritist 400 µl (kivételesen 150 µl) K/B×N szérum egyszeri intraperitoneális injekciójával váltottuk ki. A kontroll egerek ugyanannyi nem-arthritogén (B×N) szérumot kaptak. Az arthritis lefolyását a szérum-injekciót követő két hétig naponta történő vizsgálattal követtük. A látható klinikai tünetek megjelenését két vizsgáló személy által adott 0-10 közötti hátsó végtagi klinikai pontszám meghatározásával számszerűsítettük, míg a bokavastagságot rugós mérce (kaliper) segítségével határoztuk meg.

Az arthritis-kiváltotta ízületi funkciókárosodást az egerek rácson való kapaszkodási képességének a vizsgálatával követtük. Ennek érdekében az egereket a ketrecfedélnek megfelelő rácsozattal rendelkező speciális rácsra helyeztük, majd a rács megfordítása után vizsgáltuk, hogy az egerek mennyi ideig képesek kapaszkodni a rácson. Ezt a vizsgálatot minden egéren többször elvégeztük a szérumtranszfert követő 8-12. napokon, és a kapott eredményekből a Kaplan-Meier túlélési görbékhez hasonló "rácson maradási" görbéket képeztünk.

Az arthritis hisztológiai vizsgálatát formalinban fixált és OsteoMoll (Merck Chemicals) oldattal dekalcinált bokaízület hematoxilinnal és eozinnal festett metszeteinek fénymikroszkópos vizsgálatával követtük.

Az arthritis-kiváltotta csonteroziók kialakulását a bokaízület micro-CT vizsgálatával követtük. A vizsgálatot SkyScan 1172 mikro-CT készülékkel végeztük 9 µm voxel-méret mellett. A teljes boka szkennelése után a bokaszöveteket Proteináz K segítségével megemésztettük, a szabaddá vált csontok közül kiválasztottuk az első disztális tarzális csontot, és azt nagyobb felbontással (5 µm voxel-méret) ismét beszkenneltük. Az adatok feldolgozását SkyScan NRecon és CTAnalyzer szoftverekkel végeztük.

6.10. A csontanyagcsere in vivo vizsgálata

6.10.1. A nyugalmi csontszerkezet vizsgálata

A nyugalmi csontszerkezet mikro-CT vizsgálatát a proximális tibia Scanco µCT-20 készülékkel [6], illetve a disztális femur SkyScan 1172 mikro-CT készülékkel [18] való vizsgálatával végeztük. A voxel-méret az előbbi esetben 9 µm, az utóbbi esetben 4.5 µm volt. A mineralizálódott csontállomány térfogatát jellemző relatív csonttérfogat (BV/TV; bone volume/total volume) értéket, valamint a trabekulák számát és vastagságát a trabekuláris állomány nemzetközi standardok [111] szerinti vizsgálatával határoztuk meg.

A hisztomorfometriai vizsgálatokat Georg Schett (Erlangen, Németország) munkacsoportjával együttműködve végeztük. Ehhez az egerek proximális tibiáit fixálás után metilmetakrilátba ágyaztuk és dekalcinálás nélkül metszeteket készítettünk belőlük. von Kossa és Goldner szerinti festést követően OsteoMetrics OsteoMeasure szoftver segítségével kvantifikáltuk a szöveti összetételt és az oszteoblasztok és oszteoklasztok számát.

6.10.2. Az ovariectomia-kiváltotta csontbontás vizsgálata

Az ovariectomia hatására létrejövő csontlebontást sebészileg ovariectomizált vagy áloperált nőstény egereken vizsgáltuk hat héttel az ovariectomia után. A disztális femur mikro-CT analízisét és a proximális tibia hisztomorfometriai vizsgálatát a fentieknek megfelelően végeztük.

6.11. Statisztikai módszerek

Minden kísérletet legalább háromszor elvégeztünk és a bemutatottakhoz hasonló eredményt kaptuk. A szuperoxid-termelés vizsgálatát mintánként 3-4 párhuzamossal végeztük. Amennyiben a kísérleti rendszer lehetővé tette, a további kísérleteket is lehetőleg 2-3 párhuzamossal végeztük. Az értekezésekben szereplő ábrákon feltüntetett hibasávok reprezentatív kísérlet esetén a szórást (SD), több független kísérlet eredményének együttes bemutatása esetén az átlag hibáját (SEM) mutatják. Ezzel kapcsolatban további konkrét információkat az értekezés alapját képező közlemények tartalmaznak. Amennyiben az adatok szükségessé tették, következtetéseinket egy- vagy kétmintás t-próba, illetve ANOVA módszerrel statisztikai analízissel is megerősítettük. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

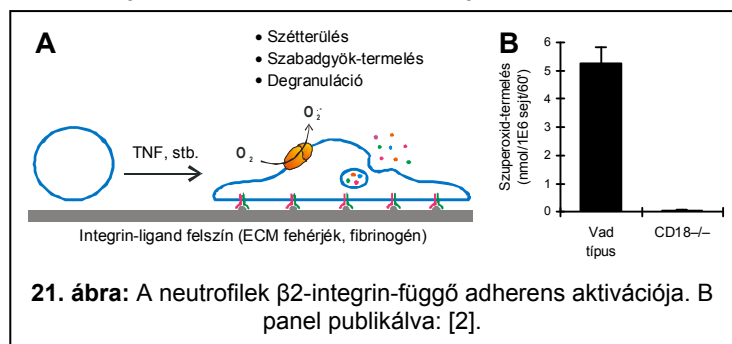
7. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

7.1. Az integrin-jelátvitel vizsgálata hemopoetikus eredetű sejtekben

A gyulladásos sejtek felszínén található β_2 -integrinek (CD11/CD18 heterodimerek) alapvető szerepet játszanak a szervezet antibakteriális védekezésében, amit jól mutat a β_2 integrin-lánc (CD18) genetikai hiányában megfigyelhető, súlyos bakteriális fertőzésekkel járó öröklött betegség, a leukocita adhézis defektus (LAD) I. formája. Kísérleteink kezdetekor viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk a β_2 -integrinek jelátviteli folyamatairól mieloid sejtekben (pl. neutrofilekben és makrofágokban). Korábbi ismereteinkből szeretném kiemelni, hogy gátlószeres megközelítéssel korábban igazolták a tirozin-kinázok szerepét a β_2 -integrinek jelátvitelében neutrofil granulocitákban [112,113], valamint hogy genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy neutrofilek és makrofágok integrin-jelátvitel az Src-típusú tirozin-kinázok részvételével jön létre [33,114-116] (utóbbi eredmények egy része [33] PhD-dolgozatom alapját képezte). A fenti eredményeken túl primer sejtekben és heterológ expressziós rendszerekben kimutatták, hogy különböző hemopoetikus eredetű integrinek képesek aktiválni a Syk tirozin-kinázt [91-95], de a fehérje primer sejtekben betöltött funkcionális szerepéről semmilyen adat nem állt rendelkezésre. Kísérleteinkben először a Syk szerepét szeretnénk volna tisztázni neutrofilek β_2 -integrin-függő aktiválódásában.

7.1.1. A neutrofilek integrin-függő aktiválódása

Mivel jelen elképzeléseink szerint a β_2 -integrinek önmagukban nem, csak gyulladásos mediátorok általi ko-stimuláció jelenlétében aktiválják a neutrofileket, kísérleteinkben egy olyan, az irodalomban elterjedten alkalmazott megközelítést alkalmaztunk, melyben integrin-ligand felszínre helyezett neutrofileket gyulladásos mediátorokkal (TNF, kemokinek, stb.) aktiválunk [117]. Ilyen körülmények között a neutrofilek szétterülnek az integrin-ligand felszínen, szabadgyököket termelnek és kiürítik az intracelluláris granulumait (21. ábra A része). A β_2 -integrineknek (az ábrán püspöklila-zöld dimerként jelölve) a folyamatban való részvételére utal, hogy irodalmi adatok alapján ezen válaszok nem jönnek létre humán neutrofilek β_2 -integrinjeinek antitestek általi blokkolásakor, illetve a β_2 integrin-lánc (CD18) genetikai hiányában emberben [118]. Ezzel egybehangzóan saját eredményeink azt mutatták, hogy CD18^{-/-} egér neutrofilekben sem jön létre a sejtválasz (21. ábra B része).



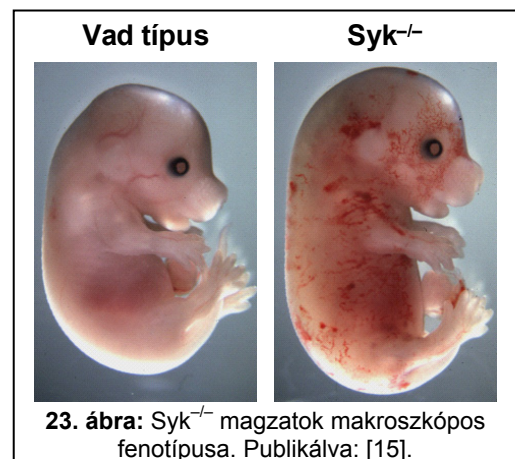
A fenti módon kiváltott neutrofil-aktiváció az egyéb β_2 -integrin-függő válaszoktól (pl. migrációtól) való megkülönböztetés érdekében a továbbiakban a neutrofilek "adherens aktivációja"-ként tárgyalom.

7.1.2. $Syk^{-/-}$ csontvelői kimérák létrehozása

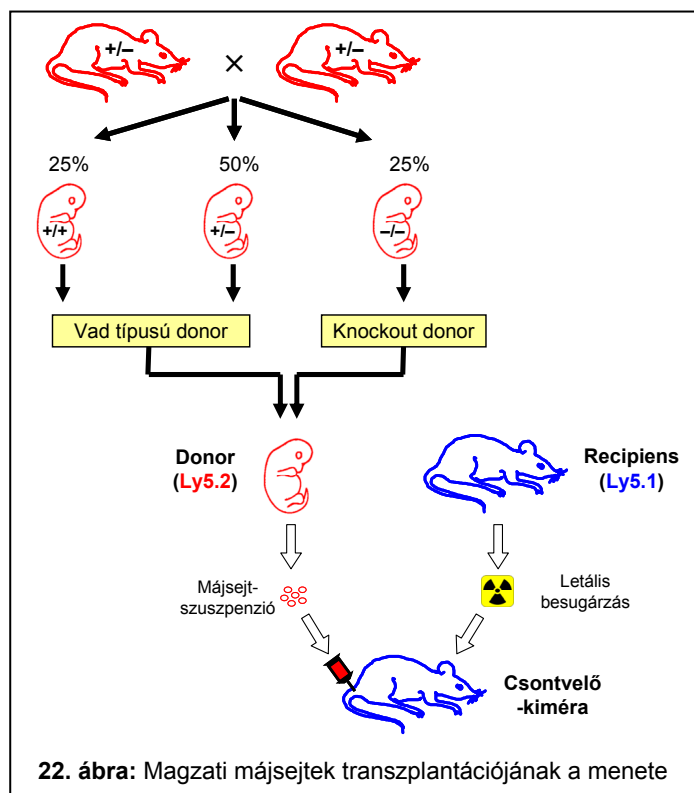
Első kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy a Syk tirozin-kináz szerepet játszik-e neutrofil granulociták β_2 -integrineken keresztüli aktiválódásában. Ezeket a vizsgálatokat egerek csontvelőjéből izolált $Syk^{-/-}$ neutrofileken szerettük volna elvégezni. A kísérleteket azonban nagymértékben megnehezítette az a tény, hogy a $Syk^{-/-}$ egerek (feltehetően egy nyirokér-fejlődési károsodás miatt [21]) súlyos keringési zavarban szenvednek (ez a magzatokon megfigyelhető petechia-szerű vérfelhalmozódásokban (23. ábra) is megnyilvánul) és feltételezhetően emiatt születésük körül elpusztulnak [53,59].

A fenti problémát magzati májsejtek transzplantációjával létrehozott csontvelői kimérák segítségével sikerült áthidalnunk (22. ábra). Ennek érdekében a $Syk^{-/-}$ mutációt heterozigóta ($Syk^{+/-}$) formában tartottunk fent, majd a heterozigóták keresztezéséből származó magzatokat a terhesség harmadik trimeszterében eltávolítottuk, meghatároztuk a genotípusukat és a $Syk^{-/-}$ magzatok májsejtjeit letálisan besugarazott recipiens egerekbe injektáltuk. Kontrollként Syk -et expresszáló ($Syk^{+/+}$ vagy $Syk^{+/-}$) magzatok májsejtjeit injektáltuk hasonlóképpen besugárzott recipiens egerekbe.

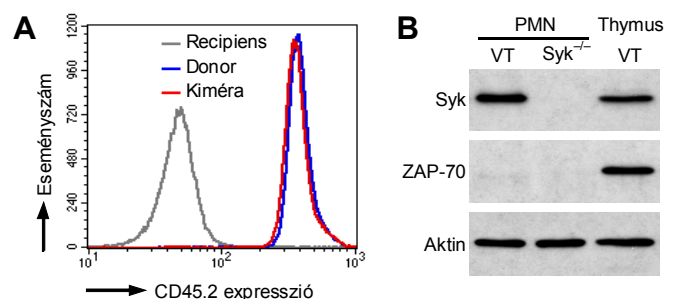
A májsejt-transzplantáció során úgy választottuk a recipiens egereket, hogy azok a donor egerek genetikai hátterének (C57BL/6) megfelelő háttérén az általános leukocita-marker CD45 fehérjének egy, a C57BL/6 egerek alléljától (CD45.2) eltérő allélját (CD45.1) expresszálják (22. ábra). Ily módon áramlási citometriás vizsgálattal lehetővé vált a donor és recipiens sejtek elkülönítése. Amint az a 24. ábrán látható, a magzati májsejtek transzplantációjával létrehozott $Syk^{-/-}$ kimérákból izolált



23. ábra: $Syk^{-/-}$ magzatok makroszkópos fenotípusa. Publikálva: [15].



22. ábra: Magzati májsejtek transzplantációjának a menete

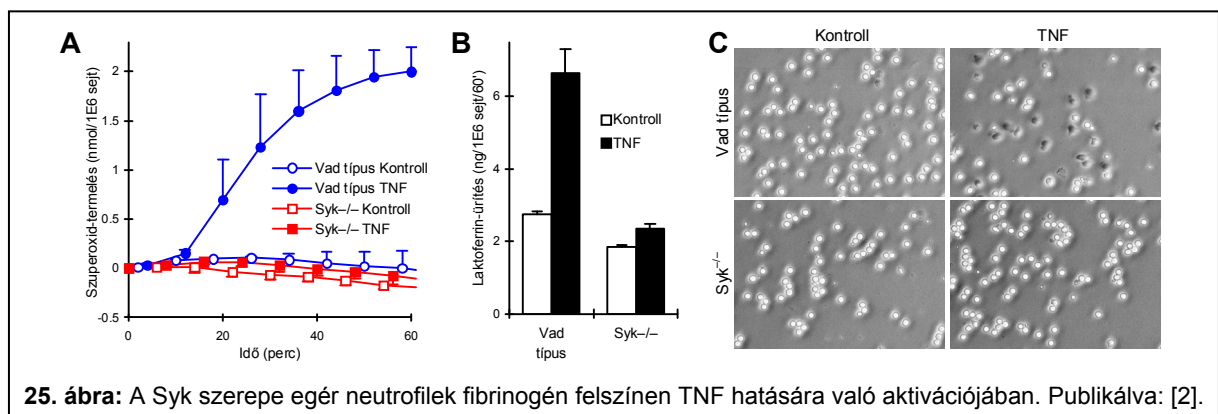


24. ábra: $Syk^{-/-}$ csontvelő-kimérák ellenőrzése. A: $Syk^{-/-}$ csontvelő-kimérából izolált neutrofilek áramlási citometriás vizsgálata CD45.1 (recipiens) és CD45.2 (donor) markert hordozó intakt egerekkel összehasonlítva; B: a Syk fehérje immunoblot vizsgálata vad típusú (VT) és $Syk^{-/-}$ csontvelő-kimérákból származó neutrofilekben (PMN) és timocitákban. Publikálva: [2,4].

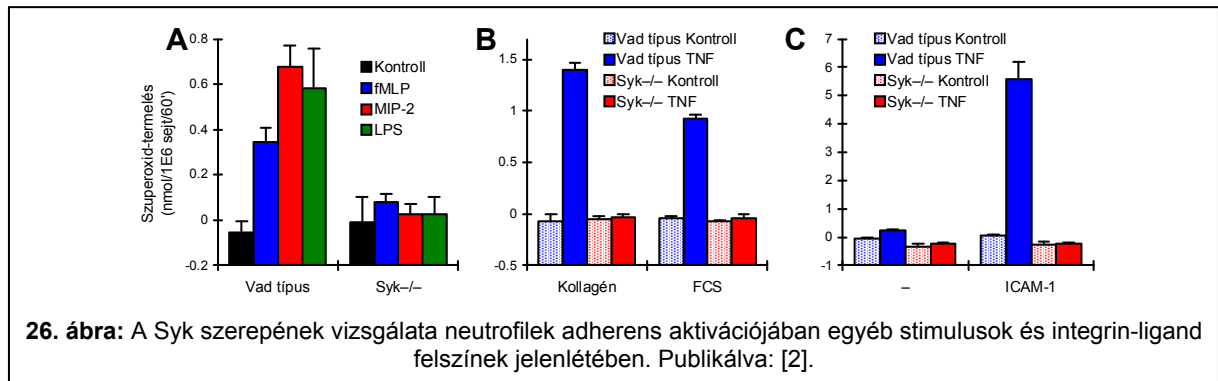
neutrofilek lényegében mindegyike a donor sejtekre jellemző CD45.2 allélt hordozta és a sejtek lizátumában várakozásainknak megfelelően nem volt jelen a Syk fehérje. További kísérletekben kimutattuk, hogy a Syk^{-/-} neutrofilekben nem károsodott a Gr1 érési marker és számos különböző integrin-lánc expressziója [2]. Összességében elmondhatjuk, hogy magzati máj transzplantációja segítségével képesek voltunk letális mutációt hordozó neutrofilek létrehozására.

7.1.3. A Syk szerepének vizsgálata neutrofilek integrin-jelátvitelében

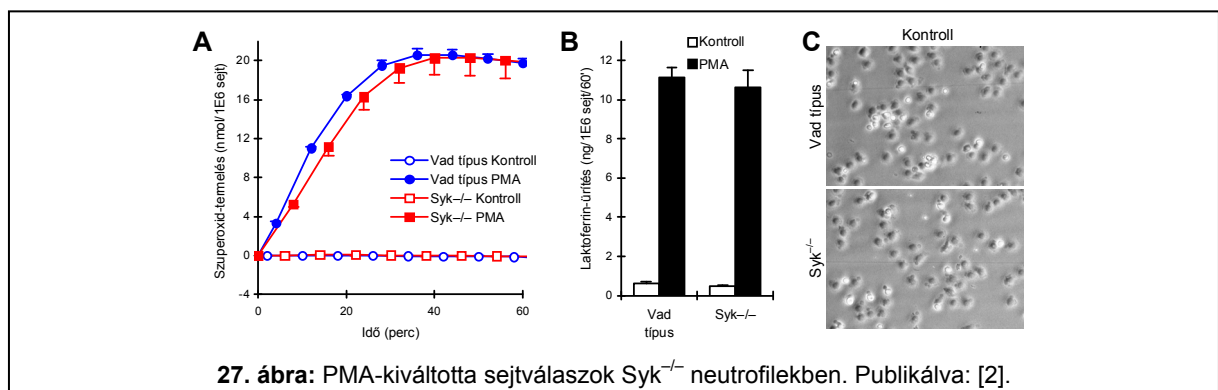
A következőkben megvizsgáltuk a neutrofileknek a 21. ábrán bemutatott módszerrel kiváltott adherens aktivációját Syk^{-/-} csontvelő-kimérákból származó sejteken. Amint azt a 25. ábra mutatja, fibrinogén-felületre helyezett Syk^{-/-} neutrofilekben lényegében teljesen elmaradt a sejtek TNF-indukált szabadgyök-termelése, a szekunder granulum marker laktoferrin ürítése, illetve a sejtek szétterülése. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a Syk fontos szerepet játszik a neutrofilek adherens aktiválódásában.



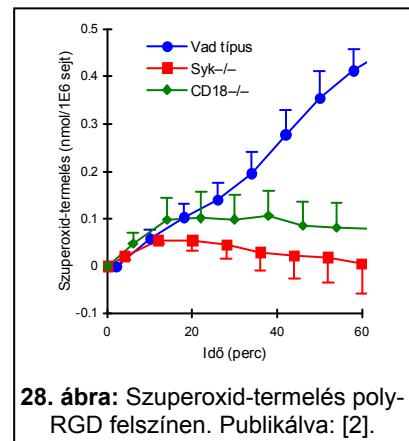
Ezután azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az adherens aktiváció Syk^{-/-} neutrofilekben megfigyelt károsodása specifikus-e az alkalmazott TNF stimulusra, illetve a fibrinogén felszínre. Ennek érdekében megvizsgáltuk a Syk^{-/-} neutrofilek szabadgyök-termelését egyéb szolubilis stimulusok, illetve más integrin-ligand felszínek jelenlétében. Amint az a 26. ábra A részén látható, a fibrinogén-fedett felszínre helyezett Syk^{-/-} neutrofilek a bakteriális tripeptid fMLP, a MIP-2 kemokin (a humán IL-8 rokona), illetve az LPS hatására sem termeltek szuperoxidot. A 26. ábra B-C része pedig azt mutatja, hogy a TNF-indukált szabadgyök-termelés kollagénnel, FCS-sel és rekombináns ICAM-1-gyel fedett felszínen is Syk-függőnek bizonyult. A Syk szerepe a neutrofilek adherens aktivációjában tehát nem korlátozódik a rutinszerűen alkalmazott TNF citokinre és fibrinogén felszínre.



A fenti megfigyelések magyarázatára számos lehetőség adódik. A legegyszerűbb magyarázat az lenne, ha a Syk hiánya a neutrofilek általános fejlődési vagy működési zavarát eredményezné. A fejlődési zavar lehetőségének ellentmond a Syk^{-/-} neutrofilek látszólag normális érése, száma és a sejtfelszíni markerek normális expressziója [2]. A sejtek általános válaszképességét a PKC-aktiváló PMA általi sejtaktiváció során vizsgáltuk. A PMA a neutrofilek nem-fiziológiás aktivációját hozza létre, melynek hatására nagymértékű szabadgyök-termelés és degranuláció jön létre a β_2 -integrinektől független módon [2]. Amint az a 27. ábrán látható, Syk^{-/-} neutrofilekben nem károsodott a PMA-kiváltotta szuperoxid-termelés és degranuláció, és a Syk^{-/-} sejtek képesek voltak szétterülni a fibrinogénnel fedett felszínen. A Syk hiánya tehát nem okozza a neutrofilek válaszképességének általános zavarát. További lehetőség az alkalmazott szolubilis gyulladásos agonisták által kiváltott jelátvitel zavara. Ennek részben ellentmondanak a 25-26. ábrán bemutatott kísérletek, melyek szerint a Syk^{-/-} neutrofilekben számos, teljesen különböző jelátvitelt alkalmazó receptoron (citokin-receptorok, G-fehérje-kapcsolt receptorok, Toll-szerű receptorok) keresztül ható szolubilis agonista alkalmazásakor is az adherens aktiváció teljes károsodása volt megfigyelhető. A kérdés pontosabb vizsgálata érdekében megvizsgáltuk azonban a TNF által adhézió-független módon kiváltódó sejtválaszokat is. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az L-szelektinek TNF-kiváltotta vedlése és a CD18-expresszió TNF hatására létrejövő fokozódása (mindkettő független a sejtek adhéziójától) nem károsodott a Syk^{-/-} sejtekben [2]. A G-fehérje-kapcsolt receptorok (pl. az fMLP és a MIP-2 receptora) jelátvitelének részletes vizsgálata során szintén arra a következtetésre jutottunk, hogy a Syk nem vesz részt ezen receptorok jelátviteli folyamataiban [4] (részletesen ld. a dolgozat későbbi részében). Joggal feltételezhetjük tehát, hogy az adherens aktiváció Syk^{-/-} neutrofilekben megfigyelt zavara nem az alkalmazott szolubilis agonisták által kiváltott jelátvitel zavara miatt jön létre.

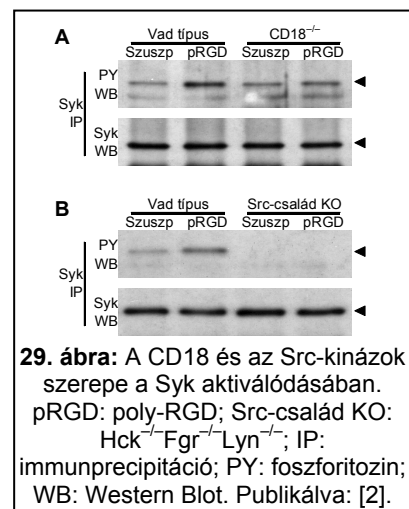


A fentiek alapján a legvalószínűbb magyarázat az adherens aktivációnak a $Syk^{-/-}$ neutrofilekben megfigyelhető károsodására a Syk-nek az integrinek jelátvitelében betöltött szerepe. Ezt egy mesterségesen létrehozott polivalens integrin-ligand, a poly-RGD segítségével közvetlenül is megvizsgáltuk. Amint az a 28. ábrán látható, poly-RGD felszínre helyezve a vad típusú neutrofilek szolubilis stimulus hozzáadása nélkül is jelentős szabadgyök-termeléssel válaszolnak, és ez a válasz jelentősen károsodott a CD18 genetikai hiányában. Ez a kísérleti rendszer tehát szolubilis agonista alkalmazása nélkül is alkalmas a β_2 -integrin-függő neutrofil-válaszok vizsgálatára. Amint a 28. ábráról leolvasható, a $Syk^{-/-}$ neutrofilek poly-RGD felszínen is jelentős funkcionális károsodást mutattak, ami további érvet szolgáltat a Syk-nek az integrinek jelátvitelében betöltött szerepéhez.



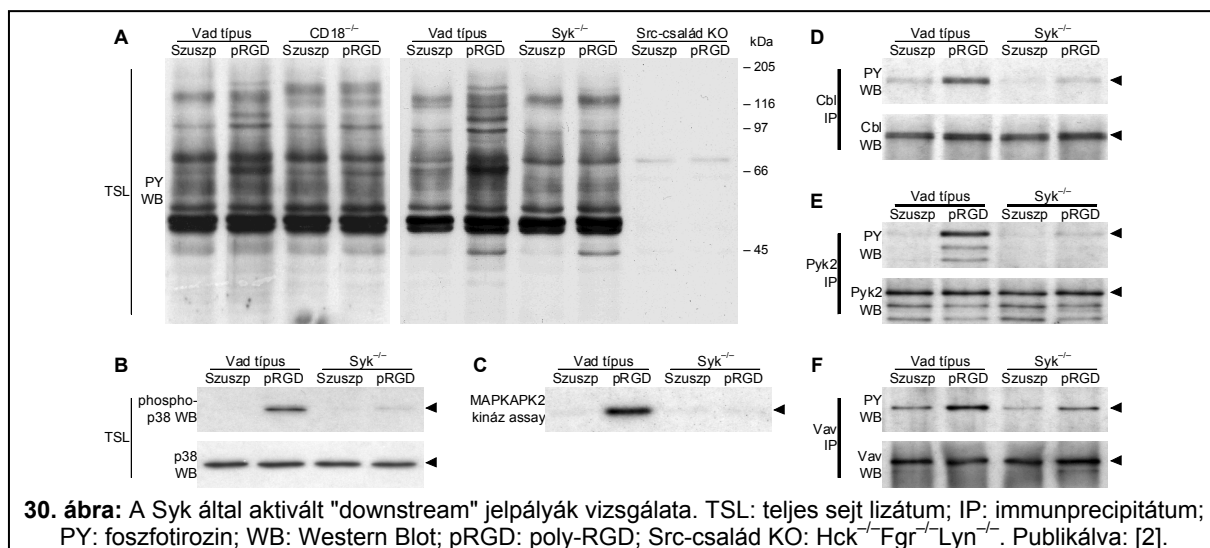
28. ábra: Szuperoxid-termelés poly-RGD felszínen. Publikálva: [2].

A következő kísérletekben biokémiai módszerekkel vizsgáltuk a Syk adhézio-függő aktiválódásának a mechanizmusát neutrofilekben. Amint az a 29. ábra A részén látható, poly-RGD (pRGD) felszínre helyezett vad típusú neutrofilekben létrejön a Syk foszforilációja és ez a foszforiláció csaknem teljesen hiányzik $CD18^{-/-}$ sejtekben. Ez megerősíti a Syk integrin-függő aktiválódását poly-RGD felszínen. A 29. ábra B részén az látható, hogy a poly-RGD felszínen létrejövő Syk-foszforiláció teljesen megszűnt olyan sejtekben, melyekből genetikailag hiányzik a mieloid sejtekre jellemző három Src-típusú tirozin-kináz, a Hck, az Fgr és a Lyn (Src-család KO). A Syk β_2 -integrin-függő aktiválódása tehát feltételezhetően az Src-kinázok közreműködésével valósul meg.



29. ábra: A CD18 és az Src-kinázok szerepe a Syk aktiválódásában. pRGD: poly-RGD; Src-család KO: $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$; IP: immunprecipitáció; PY: foszforitozin; WB: Western Blot. Publikálva: [2].

A következő kísérletek során a Syk által adherens körülmények között aktiválódó ("downstream") jelpályák egyes elemeit próbáltuk azonosítani. Ennek érdekében vad típusú és $Syk^{-/-}$ neutrofileket poly-RGD-vel fedett felszínre helyezve aktiváltuk a sejteket, és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk a különböző jelátvivő fehérjék foszforilációját és aktivitását. Amint az a 30. ábra A részén bemutatott teljes foszfortirozin immunoblottokon látható, poly-RGD hatására vad típusú neutrofilekben számos fehérje foszforilálódik, melyek közül a legmarkánsabb szignál 45, 65, 95-130 és 150 kDa közeli magasságokban található. Ezen fehérjék mindegyikének a foszforilációja jelentős mértékben csökkent $Syk^{-/-}$, $CD18^{-/-}$ és $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ (Src-család KO) sejtekben.



A 45 kDa magasságban található egyik lehetséges fehérje a p38 MAP-kináz. Ezért megvizsgáltuk a p38 MAP-kináz jelpálya aktiválódását $Syk^{-/-}$ neutrofilekben. Amint az a 30. ábra B-C részén látható, vad típusú sejtekben létrejött mind a p38 MAP-kináz foszforilációja, mind az attól disztálisan elhelyezkedő MAPKAPK2 aktiválódása, míg $Syk^{-/-}$ sejtekben egyik válasz sem volt megfigyelhető. A 95-130 kDa tartományban számos lehetséges jelátvivő molekula helyezkedik el. Ezek közül a Cbl, a Pyk2 és a Vav foszforilációját mutatja a 30. ábra D-F része. Ezen kísérletek azt mutatják, hogy vad típusú sejtekben mindhárom fehérje foszforilálódik poly-RGD hatására, míg $Syk^{-/-}$ sejtekben ezen foszforilációs válaszok nagyrészt elmaradnak. A 150 kDa magasságban található csík feltételezésünk szerint a PLC γ 2. Ennek a fehérjének a szerepéről dolgozatom további részében részletesen beszámolok.

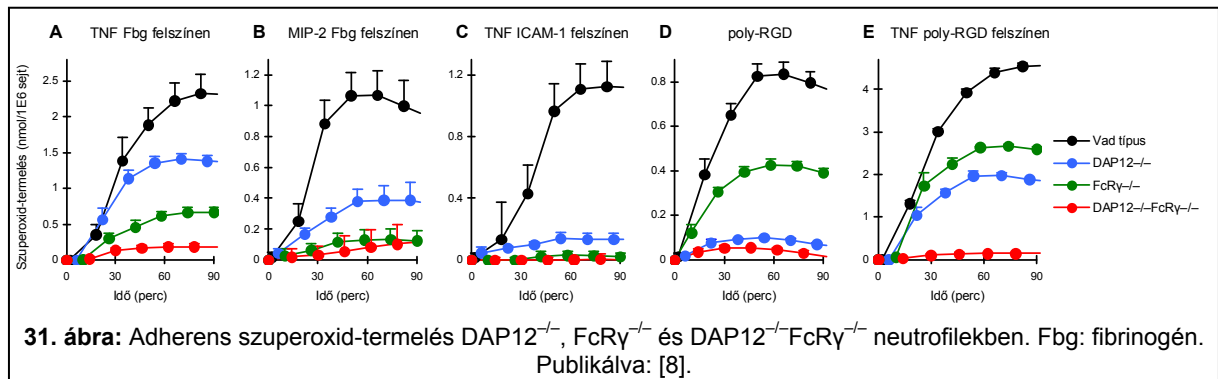
7.1.4. ITAM-tartalmú adapter-fehérjék szerepe a β_2 -integrinek jelátvitelében

Az Src-kinázok szerepe a neutrofilek integrin-függő aktiválódásában [33,114] és a Syk Src-család-függő aktiválódása (29. ábra) és funkcionális szerepe (25., 26. és 28. ábra) az immunreceptorok ITAM-függő jelátviteli folyamataira emlékeztet. Bár korábbi, heterológ expressziós rendszerekben kapott eredmények arra a következtetésre jutottak, hogy a Syk integrineken keresztüli aktiválódása a fehérje SH2-doménjeinek ITAM-függő kihorgonyozódásától függetlenül jön létre [95], szerettük volna ezt a kérdést közvetlenül is megvizsgálni primer immunfagocita (neutrofil és makrofág) sejteken.

Irodalmi adatok alapján neutrofilekben legalább két ITAM-tartalmú transzmembrán adapter-fehérje expresszálódik, a DNAX activating protein 12 (DAP12) és az Fc-receptor γ -lánc (FcR γ). Ezek közül a DAP12 számos NK-sejt-receptornak és újabban leírt mieloid-sejt-receptornak a jelátvivő molekulája, míg az FcR γ elsősorban az aktiváló Fc-receptoroknak (köztük az Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV és Fc ϵ RI fehérjéknek) a jelátvitelért felelős (bár mindkét fehérjének számos további szerepét is leírták) [9]. A következő kísérletekben ezért megvizsgáltuk a DAP12 $^{-/-}$ és FcR γ $^{-/-}$ egyszeres és DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ kettős knockout neutrofilek működését.

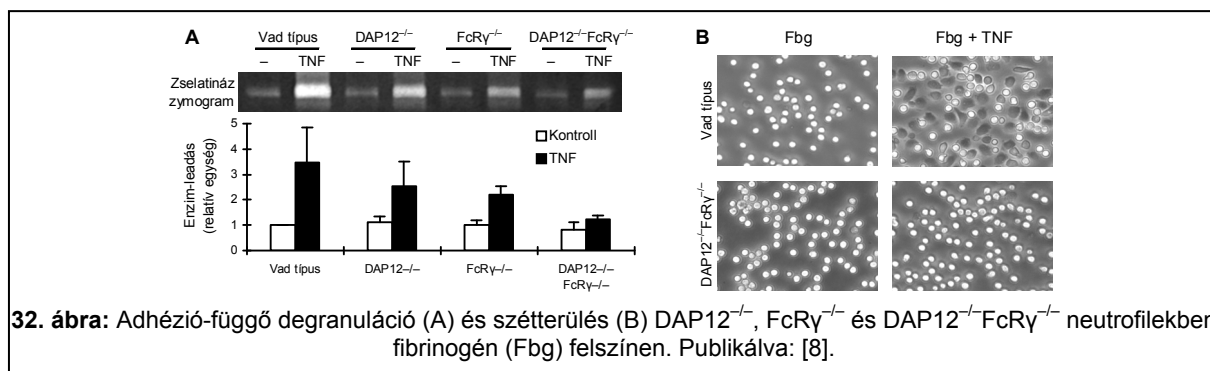
Amint az a 31. ábra A-C részén látható, az integrin-ligand felszínre helyezett és gyulladásos agonistával stimulált neutrofilek szabadgyök-termelése lényegében teljesen megszűnt a DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ kettős mutáció hatására. A károsodás nem volt specifikus egyik

stimulusra (TNF vagy MIP-2) és egyik felszínre (fibrinogén vagy ICAM-1) sem. A szolubilis stimulus nélkül poly-RGD felszínre helyezett DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} sejtek szintén nem termeltek szabadgyököt (31. ábra D része), és teljes károsodás volt megfigyelhető akkor is, amikor a poly-RGD felszínen további TNF-fel stimuláltuk a sejteket (31. ábra E része). Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a DAP12 és az FcRγ együttes hiánya a neutrofilek integrin-függő szabadgyök-termelésének lényegében teljes károsodását eredményezte.

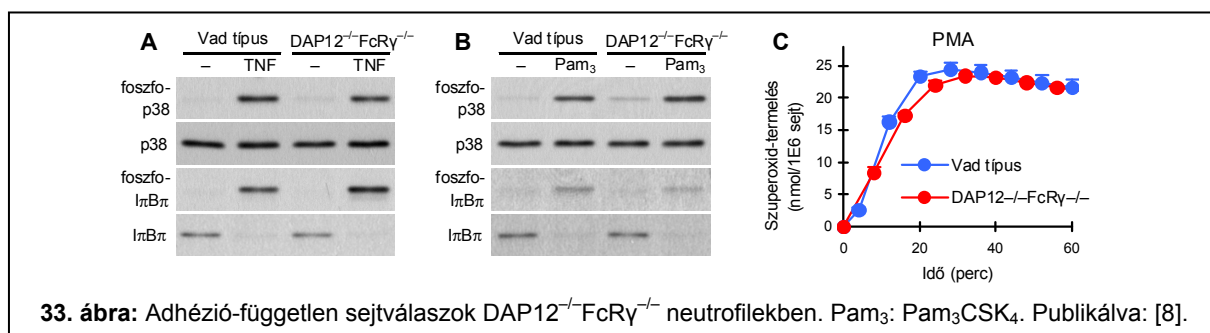


A fenti kísérletek során megvizsgáltuk a DAP12^{-/-} és FcRγ^{-/-} egyszeresen mutáns sejtek viselkedését is. Amint az a 31. ábrán látható, az egyszeres knockout sejtek a konkrét aktiválási körülményektől függően kisebb-nagyobb károsodást mutattak, ami összességében a két fehérje funkciója közti részleges átfedésre utal. A DAP12 és az FcRγ fehérjék különböző kísérleti rendszerekben való részben eltérő szerepének a magyarázatát jelenleg nem ismerjük.

A következőkben arra kerestük a választ, hogy az adhézió-függő szuperoxid-termelés károsodása kiterjed-e a neutrofilek degranulációjára és az adherens felszínen való szétterülésre is. Amint az a 32. ábra A részén látható, a TNF hatására fibrinogén-felszínen létrejövő zselatináz-ürítés (a zselatináz-granulumok degranulációja) nagymértékben károsodott a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} kettős mutáns sejtekben, az egyszeres mutáns sejtekben pedig a 31. ábra A részén megfigyelthez hasonló károsodási mintázatot tapasztaltunk. A 32. ábra B része pedig azt mutatja, hogy az adott körülmények között a sejtek szétterülése is nagymértékben károsodott a DAP12 és az FcRγ együttes hiányában. A fentiekben túl biokémiai módszerekkel kimutattuk, hogy DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} neutrofilekben károsodott a poly-RGD hatására létrejövő általános tirozin-foszforiláció, valamint a Vav, Pyk2, ERK és p38 MAP-kináz foszforilációja [8]. Mindezek arra utalnak, hogy a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} mutáció hatása nem korlátozódik az adherens szuperoxid-termelésre, hanem minden vizsgált adhézió-függő sejtválaszban megfigyelhető.

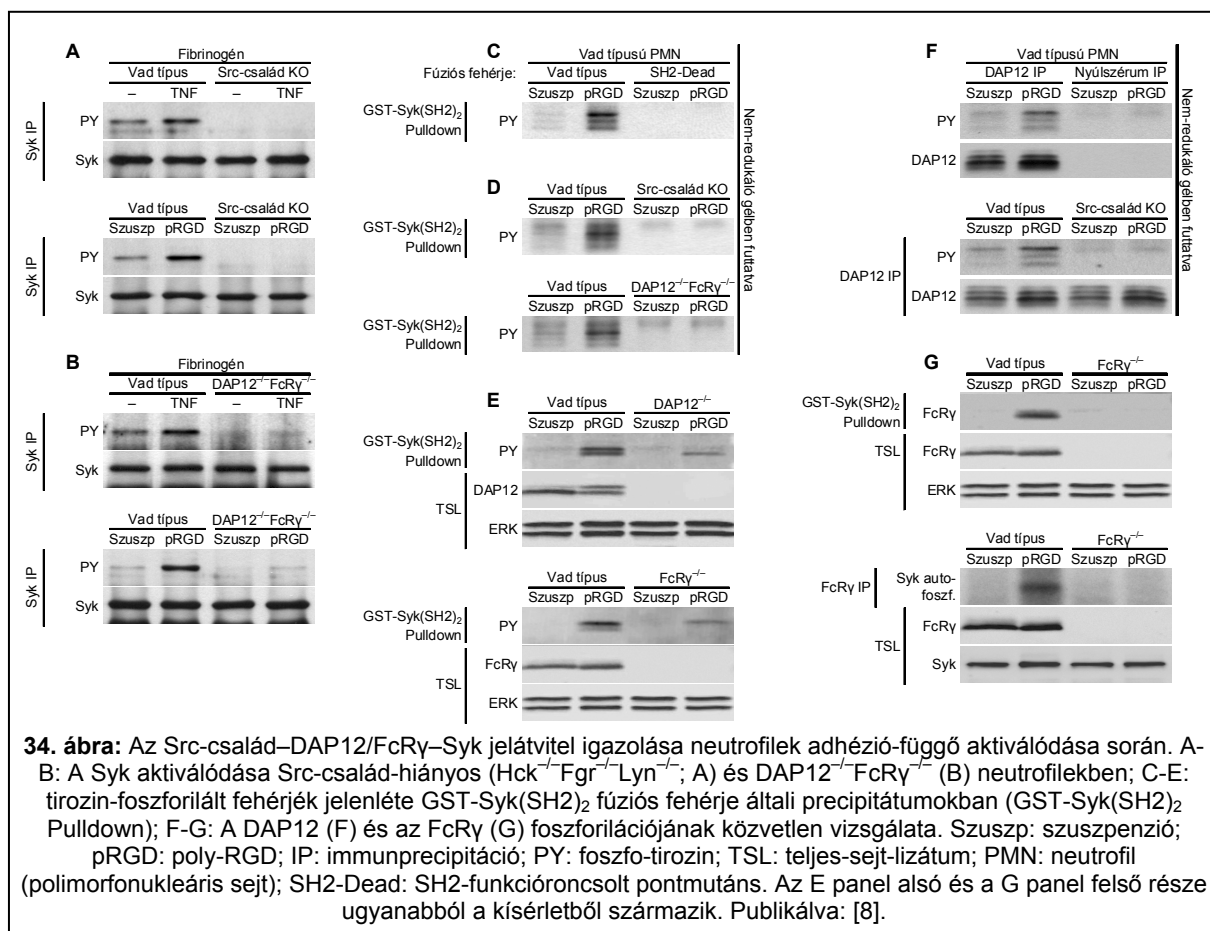


Ezután azt szerettük volna megvizsgálni, hogy hogyan változnak az adhéziótól független sejtválaszok DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} neutrofilekben. Amint az a 33. ábra A részén látható, a szuszpenzióban adott TNF hatására DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} sejtekben is létrejött a p38 MAP-kináz foszforilációja. Az NF-κB jelpálya aktiválódását gátló IκBα foszforilációja és következményes degradációja (vagyis az NF-κB aktivációja) sem károsodott a DAP12 és az FcRγ hiányában. Hasonló eredményeket kaptunk egy másik szolubilis agonista, a TLR2-t aktiváló Pam₃CSK₄ esetében is (33. ábra B része). A β₂-integrinek expressziójának TNF-kiváltotta fokozódása szintén megfigyelhető volt a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} sejtekben [8]. Amint azt a későbbiekben részletesen is bemutatom, a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} mutáció nem gátolta a neutrofilek G-fehérje-kapcsolt receptorok keresztüli (fMLP és MIP-2 általi) aktiválódását sem [8]. A neutrofileket nem-fiziológiás módon, a PKC aktiválódása által serkentő PMA hatására létrejövő szabadgyök-termelés szintén normális lefutást mutatott a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} sejtekben (33. ábra C része). Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} mutáció nem befolyásolta a neutrofilek adhézió- (és FcR-) független sejtválaszait.



Az ITAM-tartalmú adapter-molekulák szerepe a neutrofilek integrin-jelátvitelében arra utalt, hogy folyamathoz (az immunreceptorok jelátviteléhez hasonlóan) valószínűleg elengedhetetlen az ITAM-tirozinok Src-kinázok általi foszforilációja és a Syk SH2-doméneken keresztüli következményes kihorgonyozódása és aktivációja. A következőkben ezen folyamatok létrejöttét vizsgáltuk lépésről lépésre biokémiai módszerekkel.

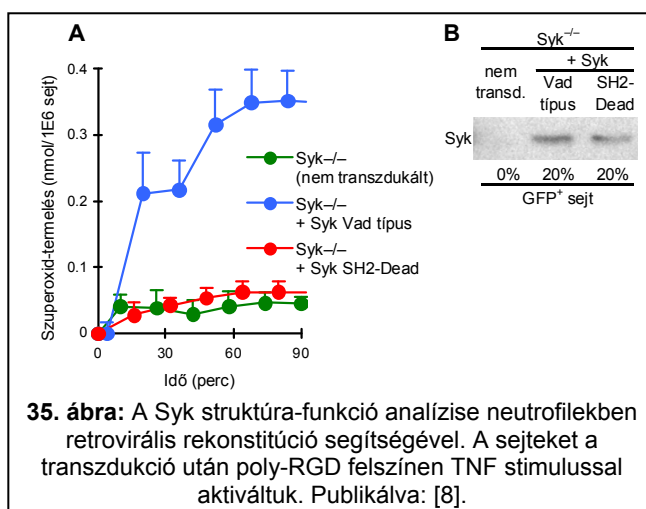
Amint az a 34. ábra A részén látható, a Syk adhézió-függő aktiválódása fibrinogén-felszínen TNF-fel stimulált és poly-RGD felszínre helyezett neutrofilekben sem jött létre a mieloid sejtekre jellemző Src-kinázok (Hck, Fgr és Lyn) együttes hiányában (ez megfelelt a 29. ábra alapján várt eredménynek). Érdekes módon a Syk foszforilációja a DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} sejtekben sem jött létre (34. ábra B része), ami az ITAM-tartalmú fehérjéknek a Syk-tól proximálisan való elhelyezkedésére utalt.



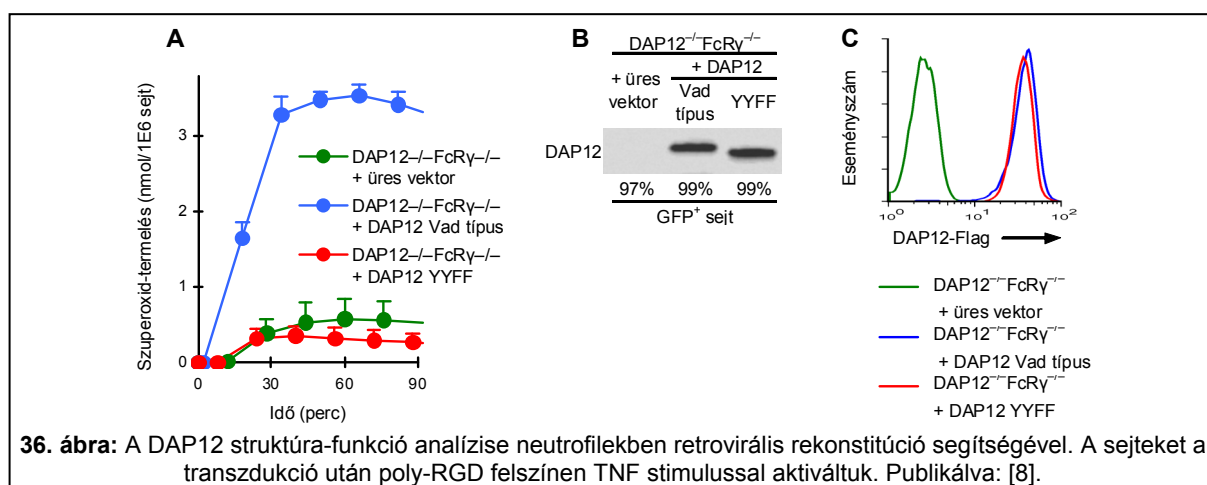
A következőkben a DAP12 és az FcR γ adhézió-függő foszforilációját vizsgáltuk. Ehhez először egy olyan fúziós fehérjét használtunk, melyben a Syk tandem SH2-doménjeit a glutation S-transzferázhoz (GST) kötöttük (GST-Syk(SH2) $_2$ fúziós fehérje). Ennek a fehérjének elkészítettük egy olyan verzióját is, amelyben a két SH2-domént egy-egy pontmutációval funkcióképtelenné tettük (R41,194A mutáció; SH2-Dead). A két fehérjét ezután glutation-gyöngyökhöz kötöttük és nem-redukáló SDS-PAGE-t követő immunoblott módszerrel vizsgáltuk a gyöngyökkel precipitálható ("lehúzható") fehérjéket (GST-pulldown assay). Amint az a 34. ábra C részén látható, poly-RGD-re helyezett neutrofilek lizátumából GST-Syk(SH2) $_2$ fúziós fehérjével történő precipitációval sikerült kimutatnunk számos tirozin-foszforilált csíkot, melyek magassága megfelelt a foszforilált DAP12 és FcR γ molekulatömegének. Ezek a fehérjék nem jelentek meg az SH2-Dead fúziós fehérjével történő precipitáció során, ami a szignál specificitását mutatta. A GST-Syk(SH2) $_2$ fúziós fehérjével kiprecipitált tirozin-foszforilált csíkok nem jelentek meg sem a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$, sem a $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ sejtek lizátumában (34. ábra D panel). A kérdéskört kissé módosított körülmények között (redukáló gélben futtatva) tovább vizsgáltuk $DAP12^{-/-}$ és $FcR\gamma^{-/-}$ sejtekben is. Amint az a 34. ábra E részén látható, ilyen körülmények között vad típusú sejtekben két csík jelent meg, melyek közül a felső a $DAP12^{-/-}$, az alsó pedig az $FcR\gamma^{-/-}$ sejtekben eltűnt. További fluoreszcens immunoblot módszerrel közvetlenül is kimutattuk, hogy az alsó csík az FcR γ -val egy magasságban található [8]. Mindez arra utalt, hogy a GST-Syk(SH2) $_2$ fúziós fehérjével precipitált tirozin-foszforilált csíkok megfelelnek az Src-kinázok által foszforilált DAP12 és FcR γ fehérjéknek.

Ezután megpróbáltuk még közvetlenebb módon kimutatni a DAP12 és az FcR γ foszforilációját. Amint azt a 34. ábra F panelje mutatja, DAP12 antitesttel sikerült kiprecipitálnunk a DAP12-t és kimutatni, hogy a fehérje foszforilációja megemelkedik poly-RGD-re helyezett neutrofilekben. Az Src-kinázok hiányában (Hck $^{-/-}$ Fgr $^{-/-}$ Lyn $^{-/-}$ sejtekben) a DAP12 foszforilációja nem jött létre, ami a fehérje Src-kinázok általi foszforilációjára utalt. A DAP12-vel szemben az FcR γ foszforilációját technikai okok (a fehérje megasságában megjelenő nem-specifikus jelek) miatt nem tudtuk kimutatni közvetlen immunprecipitációt követő foszforotirozin immunoblottal. Ezért a jelenséget indirekt módon próbáltuk igazolni. Amint az a 34. ábra F részén látható, poly-RGD-re helyezett neutrofilek lizátumából GST-Syk(SH2) $_2$ fúziós fehérjével sikerült kiprecipitálnunk az FcR γ -t, ami jelen ismereteink szerint csak foszforilált állapotban képes asszociálódni a Syk SH2-doménjeivel. Kimutattuk továbbá, hogy az FcR γ -ellenes antitestekkel kapott immunprecipitátumban a Syk magasságában megjelent egy autofoszforilációs szignál, ami az FcR γ -Syk asszociáció létrejöttét és annak feltételeként az FcR γ foszforilációját valószínűsítette. Ezen kísérleteinket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a neutrofilek integrineken keresztüli adherens aktiválódása a DAP12 és az FcR γ ITAM-motívumainak Src-kinázok általi foszforilációját és a Syk SH2-doméneken keresztüli következményes kihorgonyzódását és aktiválódását hozza létre. Ezek a folyamatok határozottan emlékeztetnek a klasszikus immunreceptorok jelátvitelénél során létrejövő lépésekre.

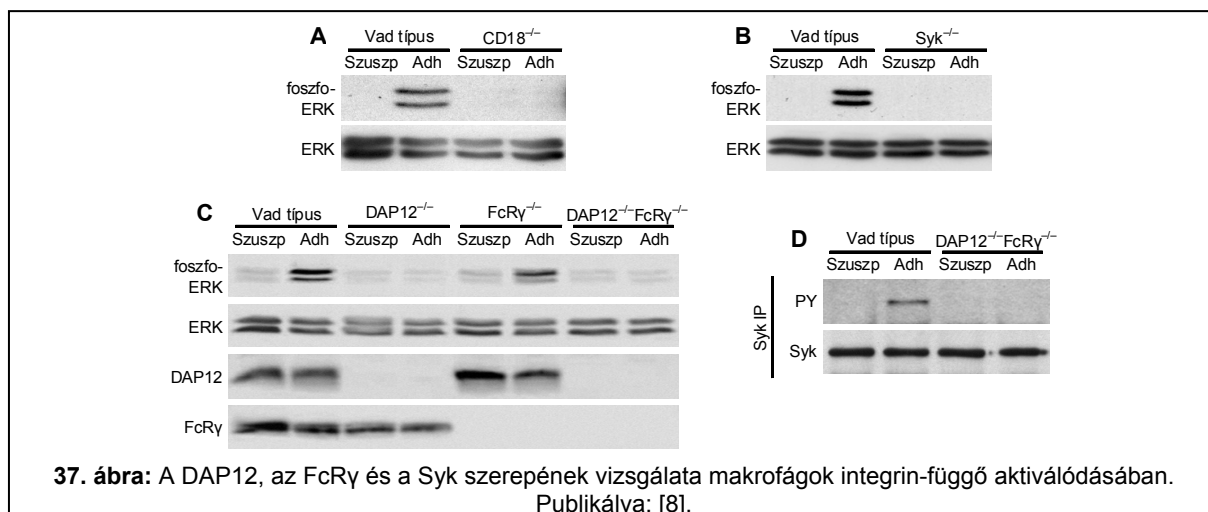
Bár a fenti eredmények egy immunreceptor-szerű jelátviteli folyamat szerepére utaltak a neutrofilek integrin-függő aktiválódása során, szeretnénk volna azt is megvizsgálni, hogy van-e ennek a folyamatnak funkcionális jelentősége a neutrofilek sejtválaszainak létrejöttében. Ezért struktúra-funkció analízis segítségével megvizsgáltuk, hogy szükségesek-e a Syk SH2-doménjei és a DAP12 ITAM-tirozinjai a neutrofilek adhízió-függő aktiválódásában. Mivel az érett neutrofilek terminálisan differenciálódtak, nem osztódó és transzkripcionálisan kevésbé aktív sejtek, az exogén génekkel való transzdukciót csontvelői sejteken (hemopoetikus őssejteken) végeztük, majd a transzdukált sejteket letálisan besugarazott recipiensekbe transzplantálva tettük lehetővé a transzdukált neutrofilek in vivo kifejlődését. A transzdukcióhoz használt retrovirális vektor a célgén cDNS-e mellett egy belső riboszomális belépési helyről (IRES) az eGFP fehérjét is expresszáta, amivel a sikeresen transzdukált sejtek számát lehetett követni. Először Syk $^{-/-}$ sejteket vad típusú és a C-terminális SH2-domént roncsoló mutációt hordozó Syk-et kódoló vektorral transzdukáltunk. Amint az a 35. ábrán látható, vad típusú Syk visszajuttatása a Syk $^{-/-}$ neutrofilekbe a Syk és az eGFP-fluoreszcencia megjelenését és a poly-RGD felszínen TNF-fel kiváltott szabadgyök-termelés megemelkedését eredményezte. A C-terminális SH2-domént roncsoló R194A mutációt hordozó (SH2-Dead) fehérje visszajuttatása ezzel szemben a Syk és az eGFP-fluoreszcencia megjelenése ellenére nem volt képes az adhízió-függő szabadgyök-termelés érdemi fokozására.



A következő kísérletben DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} háttéren vad típusú és az ITAM-motívum tirozinjainak mutációjával funkcióképtelenné tett, extracelluláris FLAG címkével ellátott DAP12 expressziójának a hatását vizsgáltuk. Amint az a 36. ábrán látható, a vad típusú DAP12 re-expressziója a DAP12 fehérje és az eGFP-fluoreszcencia megjelenéséhez és a poly-RGD felszínen TNF hatására létrejövő szuperoxid-termelés megemelkedéséhez vezetett. A DAP12 ITAM-tirozinjainak (Y65 és Y76) fenilalaninra cserélése (Y65,76F; YYFF) ugyanakkor a DAP12 fehérje és az eGFP-fluoreszcencia megjelenése ellenére nem volt képes az adhézió-függő szabadgyök-termelés fokozására. Mivel a DAP12 működéséhez feltételezhetően a fehérje sejtfelszíni megjelenése szükséges, ezekben a kísérletekben áramlási citometriával külön vizsgáltuk az exogén DAP12-re helyezett FLAG címke expresszióját. Amint az a 36. ábra C részén látható, a vad típusú és az YYFF DAP12-vel transzdukált sejtekben nem különbözött a FLAG címke sejtfelszíni expressziója, tehát a két fehérje hatása közti különbséget nem az YYFF mutáns sejtben belüli megkezdése okozta. Összességében elmondhatjuk, hogy a neutrofilek adhézió-függő sejtválaszaihoz a Syk funkcióképes SH2-doménjei és a DAP12 ITAM-tirozinjai is szükségesek.

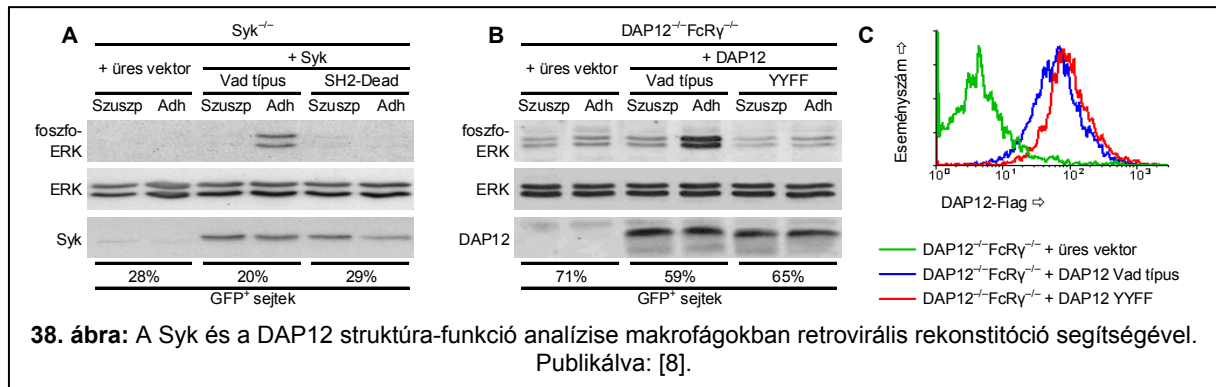


A fenti eredmények arra utalnak, hogy neutrofil granulocitákban a β_2 -integrinek jelátvitel a klasszikus immunreceptorok jelátviteléhez hasonlóan, ITAM-tartalmú fehérjék foszforilációján és a Syk következményes kihorgonyzódásán keresztül jön létre. A következő kísérletekben arra kerestünk választ, hogy hasonló folyamatok szerepet játszanak-e makrofágok integrin-függő aktiválódásában. A kísérletekhez különböző knockout egerek csontvelői sejtjeiből in vitro differenciált makrofágokat használtunk.



Amint az a 37. ábra A-B részén látható, vad típusú makrofágok műanyag-felületre (bakteriális Petri-csészébe) helyezése hatására létrejött az ERK fehérje foszforilációja, és ez a sejtválasz mind CD18 $^{-/-}$, mind Syk $^{-/-}$ sejtekben elmaradt. A 37. ábra C panelje azt mutatja, hogy az adhézió-függő ERK-foszforiláció nem jön létre DAP12 $^{-/-}$ és DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ sejtekben sem. A 37. ábra D része alapján elmondhatjuk, hogy vad típusú makrofágok adhézió-függő aktivációja során létrejön a Syk aktiválódása, és ez a válasz a DAP12 és az FcR γ együttes hiányában elmarad. Összességében tehát a makrofágok β_2 -integrineken keresztüli adhéziója a Syk és az ERK jelpálya aktiválódását hozza létre és mindkét folyamathoz feltételezhetően szükségesek ITAM-tartalmú adapter-fehérjék (elsősorban a DAP12).

A következő kísérletekben azt szerettük volna vizsgálni, hogy szükségesek-e a Syk SH2-doménjei és a DAP12 ITAM-tirozinjai a makrofágok adhézió-kiváltotta ERK-aktiválódáshoz. Ennek érdekében a 35. ábrán bemutatotthoz hasonló módon retrovirális transzdukciót és struktúra-funkció vizsgálatot végeztünk (azzal a különbséggel, hogy a makrofágok transzdukcióját és az azt követő tenyésztést teljes egészében in vitro körülmények között végeztük). Amint az a 38. ábra A részén látható, a vad típusú Syk re-expresszója Syk $^{-/-}$ makrofágokban helyreállította az ERK adhézió-függő foszforilációját. A Syk C-terminális SH2-doménjét roncsoló R194A (SH2-Dead) mutációt hordozó Syk re-expresszója ugyanakkor nem volt képes helyreállítani az ERK-foszforilációt, annak ellenére, hogy a mutáns fehérjét expresszáló sejtekben a Syk expressziója és az eGFP-fluoreszcencia megjelenése a vad típusú Syk-et expresszáló sejtekéhez volt hasonló. A 38. ábra B-C része ezen túlmenően azt mutatja, hogy a vad típusú DAP12 re-expresszója DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ sejtekben az adhézió-függő ERK-foszforiláció normalizálódását eredményezte, míg a DAP12 ITAM-tirozinjainak fenilalaninra való cseréje (Y65,76F mutáció; YYFF) ezt a hatást megszüntette, annak ellenére, hogy az YYFF DAP12-mutáns fehérjeszintű expressziója, az eGFP fluoreszcenciája és a DAP12-höz kötött FLAG címke sejt felszíni festődése a vad típusú DAP12-t re-expresszáló sejtekéhez volt hasonló. Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a makrofágokban β_2 -integrinen keresztül létrejövő ERK-aktiválódáshoz elengedhetetlenek a Syk funkcionális SH2-doménjei és a DAP12 ITAM-tirozinjai.



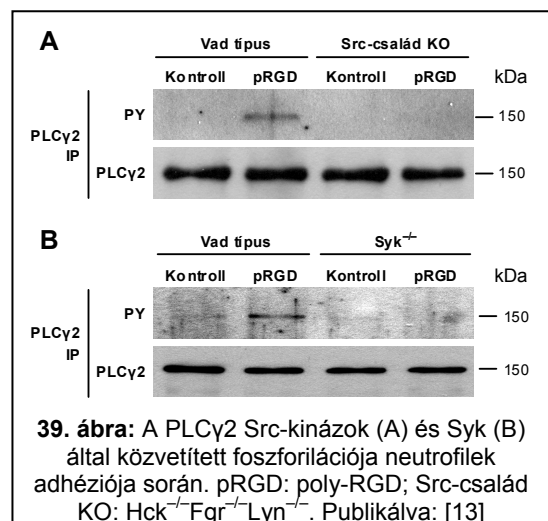
Az ebben az alfejezetben bemutatott kísérletekben összességében kimutattuk, hogy neutrofilek és makrofágok β_2 -integrinjének a jelátviteléhez egy, a klasszikus immunreceptorok jelátviteléhez hasonló folyamat szükséges. Ennek során ITAM-tartalmú transzmembrán adapter-fehérjék Src-kinázok általi foszforilációja a Syk SH2-doménen keresztüli kihorgonyzódásához és következményes aktivációjához vezet. Ez a jelátviteli folyamat elengedhetetlen a neutrofilek adherens aktiválódásához és makrofágok ERK-jelpályájának az aktiválódásához.

7.1.5. A PLC γ 2 szerepe neutrofilek integrin-függő aktiválódásában

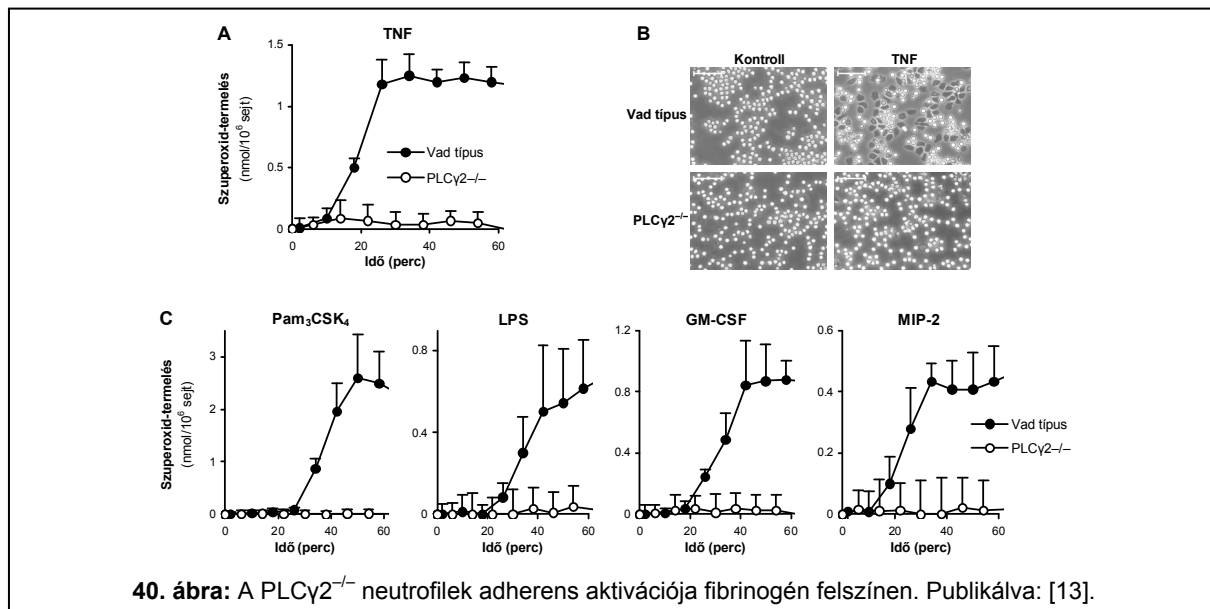
Az integrinek és immunreceptorok jelátvitel közötti hasonlóság és egyéb irodalmi adatok alapján felmerült bennünk, hogy a neutrofilek integrin-jelátvitelében fontos szerepe lehet a foszfolipáz C γ (PLC γ) enzimcsaládnak. Ezt a lehetőséget támasztotta alá azon nem publikált további eredményünk is, mely szerint a neutrofilek intracelluláris Ca²⁺-raktárainak a depletálása az adherens aktiváció hatására létrejövő sejtválaszok megszűnését eredményezte. Mivel a neutrofilekben ezen enzimek közül előzetes eredményeink szerint elsősorban a PLC γ 2 volt jelen [13], a következőkben megvizsgáltuk a PLC γ 2 aktiválódását és szerepét neutrofilek integrin-függő aktiválódása során. Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a PLC γ 2 hiánya nem befolyásolta a neutrofilek érését és a különböző sejtfelszíni markerek és receptorok megjelenését [13].

Amint az a 39. ábrán látható, a neutrofilek poly-RGD felszínre helyezése a PLC γ 2 foszforilációját eredményezte. Ez a foszforiláció lényegében megszűnt Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} egerekből, illetve Syk^{-/-} csontvelői kimerákból származó neutrofilekben (39. ábra). A neutrofilek integrinek általi aktiválódása tehát az Src-kinázok és a Syk részvételével a PLC γ 2 foszforilációjához vezet.

A PLC γ 2 funkcionális jelentőségét a neutrofilek integrin-függő aktiválódásában PLC γ 2^{-/-} neutrofilek sejtválaszainak a vizsgálatával határoztuk meg. Amint az a 40. ábra A-B részén látható, fibrinogén-felszínre helyezett PLC γ 2^{-/-} neutrofilekben lényegében teljesen megszűnt a TNF-kiváltotta szuperoxid-termelés és a sejtek szétterülése. Hasonló eredményeket kaptunk a degranuláció

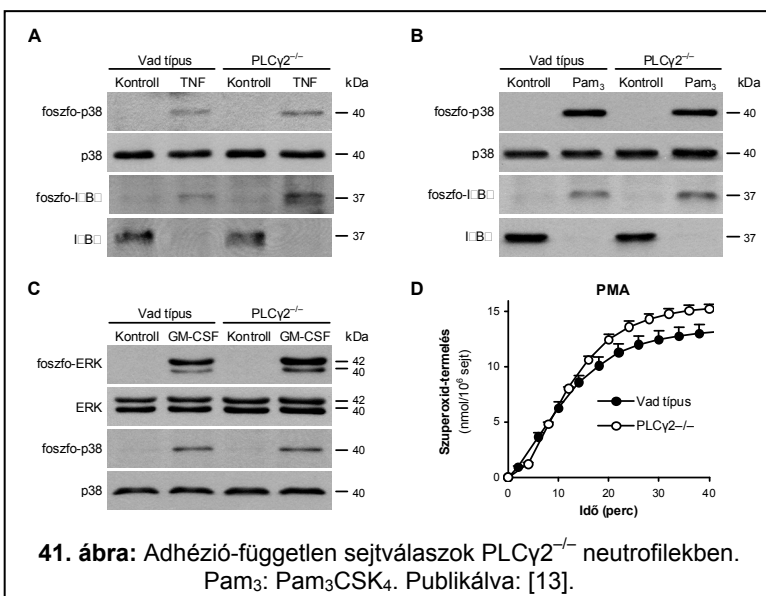
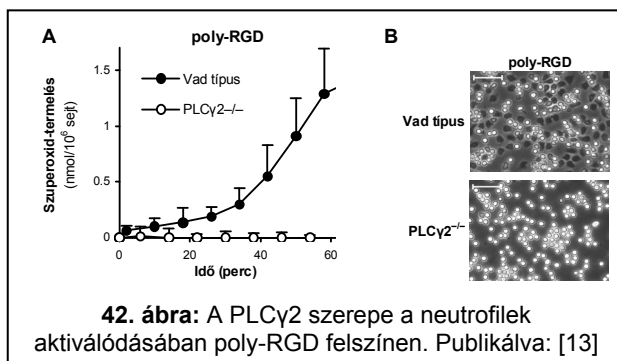


vizsgálatakor is [13]. A károsodás nem volt specifikus az alkalmazott TNF stimulusra, mert hasonló defektust figyeltünk meg fibrinogén-felületre helyezett PLC γ 2^{-/-} neutrofilek Pam₃CSK₄ (TLR2 ligand), LPS (TLR4 ligand), GM-CSF, és MIP-2 kemokin általi aktiválásakor is (40. ábra C panel).



A fenti kísérletekben a neutrofileket egy szolubilis gyulladásos mediátor és egy integrin-ligand felszín együttes alkalmazásával aktiváltuk. A következőkben megvizsgáltuk a sejt felszíni integrinek mesterséges liganddal, szolubilis agonista nélkül való aktiválásának a hatását. Amint az a 42. ábrán látható, a PLC γ 2 genetikai hiánya teljesen megszüntette a poly-RGD felszínre helyezett neutrofilek szabadgyök-termelését és a sejtek szétterülését. A szolubilis agonisták hiánya miatt feltételezhető, hogy ebben a kísérleti rendszerben a PLC γ 2 az adhéziónak receptorok (integrinek) jelátvitelében vesz részt.

A következőkben megvizsgáltuk az egyes szolubilis agonisták által sejtadhézió nélkül kiváltott sejtválaszokat. Amint az a 41.

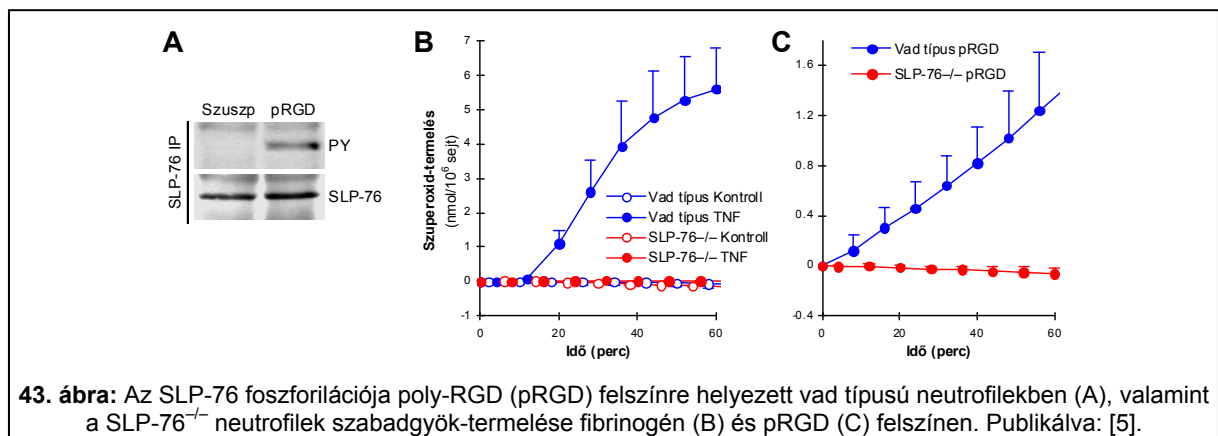


ábra A-B részén látható, a PLC γ 2 hiánya nem befolyásolta a p38 MAP-kináz TNF és Pam₃CSK₄ hatására létrejövő foszforilációját, sem az NF- κ B jelpálya ugyanilyen körülmények között létrejövő aktivációját (az I κ B α foszforilációját és következményes degradációját). A PLC γ 2^{-/-} neutrofilekben normális mértékben jött létre a β ₂-integrinek TNF által kiváltott sejt felszíni expresszió-fokozódása is [13]. A PLC γ 2^{-/-} mutáció nem befolyásolta a p38 MAP-kináz és az ERK GM-CSF hatására létrejövő foszforilációját sem (41. ábra C panel). További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PLC γ 2 nem szükséges a G-fehérje-kapcsolt receptorokon ható fMLP és MIP-2 által szuszpenzióban kiváltott sejt válaszokhoz sem [13] (ld. alább). Végül megvizsgáltuk a nem-fiziológiás mechanizmusokon keresztül, adhézio-független módon ható PMA által kiváltott szuperoxid-termelést, ami szintén normálisnak bizonyult a PLC γ 2^{-/-} neutrofilekben (41. ábra D panel). Összességében tehát elmondhatjuk, hogy egyik vizsgált, adhézio-független (és Fc-receptor-független) sejt válasz sem igényelte a PLC γ 2 jelenlétét a neutrofilekben.

A fenti eredmények összességében arra utalnak, hogy a Syk-hez és az ITAM-tartalmú adapter-fehérjékhez hasonlóan a PLC γ 2 is elengedhetetlen szerepet játszik neutrofilekben a β ₂-integrin-függő adherens sejtaktivációhoz. A PLC γ 2 feltételezhetően az adhézio receptorok (integrinek), nem pedig a szolubilis gyulladásos agonisták jelátvitelében vagy a végső sejt válaszok kiváltásáért felelős disztális folyamatokban vesz részt.

7.1.6. Az SLP-76 szerepe a neutrofil-integrinek jelátvitelében

T-sejtekben az immunreceptor-jelátvitel egyik központi molekulája az SLP-76 adapter-fehérje [52,70]. Az immunreceptorok és az integrinek jelátvitel közti hasonlóságok, illetve az SLP-76 neutrofilekben való jelenléte miatt Dr. Gary Koretzky (University of Pennsylvania, PA, USA) munkacsoportjával együttműködve megvizsgáltuk az SLP-76 szerepét a neutrofilek integrin-függő aktiválásában. Amint az a 43. ábra A részén látható, poly-RGD felszínre helyezett vad típusú neutrofilekben az SLP-76 markáns foszforilációja volt megfigyelhető, ami az SLP-76 integrinek általi aktiválására utalt. Ezután megvizsgáltuk az adhézio-függő szabadgyök-termelést SLP-76-hiányos neutrofilekben. Amint az a 43. ábra B-C részén látható, a SLP-76^{-/-} neutrofilekben sem TNF által fibrinogén felszínen történő stimuláció, sem a sejtek poly-RGD felszínre helyezése során nem jött létre szabadgyök-termelés. Itt be nem mutatott kísérleteinkben azt találtuk, hogy a SLP-76 hiánya a sejtek szétterülését is meggátolta, de nem befolyásolta a neutrofilek PMA hatására létrejövő aktiválódását, valamint a TNF és fMLP által szuszpenzióban kiváltott válaszokat [5]. Ezek az eredmények az SLP-76 neutrofilek integrin-jelátvitelében betöltött fontos szerepére utaltak.



7.1.7. A p190RhoGAP-hiányos egerek létrehozása és általános jellemzése

Korábbi irodalmi adatok a p190RhoGAP fehérje esetleges szerepét vetették fel mind nem-hemopoetikus eredetű sejtek (fibroblasztok, neuronok) [87-90], mind neutrofilek [119] integrin-jelátvitelében. Ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy hogyan alakul a neutrofilek integrineken keresztüli jelátvittele a p190RhoGAP genetikai hiányában. Dr. Jeffrey Settleman (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) munkacsoportja korábban létrehozott egy p190RhoGAP-mutáns egértörzset, melyben a p190RhoGAP-ot kódoló gén első exonjának 5' részét cserélték le egy fordított orientációban beillesztett neomicin-rezisztencia (Neo) kazettával (p190RhoGAP^{hypo} mutáció; ld. 44. ábra A része). Bár ezzel eltávolították a p190RhoGAP normál transzlációjának megindításáért felelős ATG kodont, utólag kiderült, hogy a Neo kazettától disztálisan elhelyezkedő rejtett "in-frame" ATG kodonról a mutáns egerekben is elindul a transzláció, és abból a normál p190RhoGAP-pal összevethető mennyiségben keletkezik egy N-terminálisan csonkolt fehérje. Ez a mutáció tehát hipomorf mutációnak bizonyult. A rejtett ATG használatát az ezáltal lehetővé, hogy az mRNS-en ettől 5' irányban nem volt jelen más, a riboszóma által felismerhető és fehérjére fordítható szekvencia.

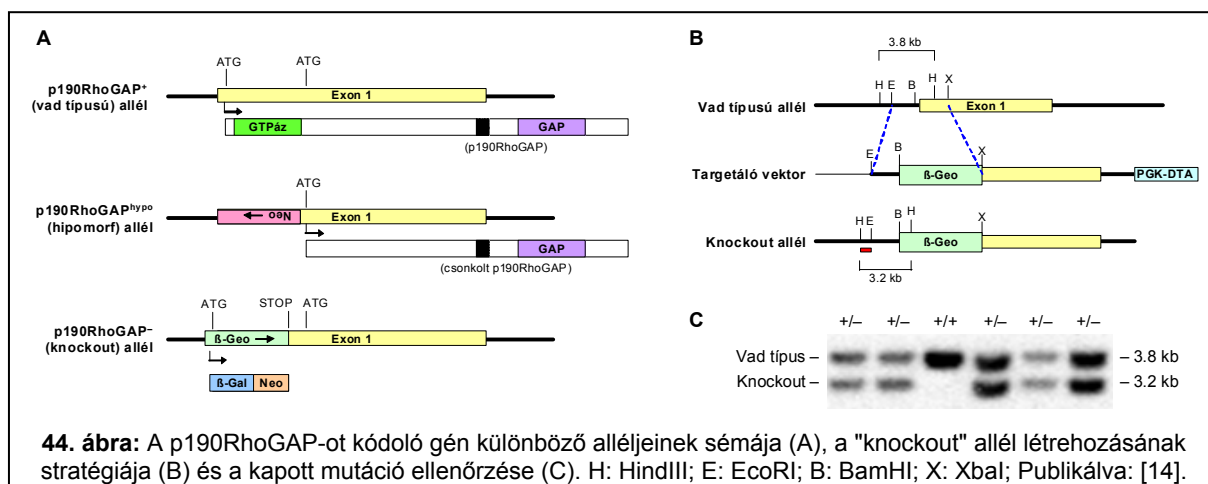
A fentiek tükrében Dr. Jeffrey Settleman munkacsoportja egy újabb stratégiával létrehozott egy második, teljes fehérjehiányt eredményező p190RhoGAP-mutációt is (p190RhoGAP⁻ mutáció). A munkacsoport időközbeni profilváltása miatt azonban a mutációt nem jellemezték és nem közölték, a létrehozásával kapcsolatos adatok jelentős része elveszett és a mutációt hordozó egértörzs a kihalás szélére került. Az egértörzset ebben a fázisban kaptuk meg Dr. Settleman munkacsoportjától, és a Semmelweis Egyetemen elkezdtük a p190RhoGAP⁻ mutációt hordozó egérkolónia megalapítását és a mutáció genetikai és fenotípusos jellemzését.

Alább bemutatandó kísérleteink kezdetén még a p190RhoGAP⁻ mutáció létrehozásának részletei sem álltak a rendelkezésünkre, és a kapott genotipizálási protokoll nem működött és nem volt értelmezhető. Mindössze annyit tudtunk, hogy a mutáns allélnek hordoznia kell a Neo kazettát és hogy a p190RhoGAP^{-/-} egerek feltételezhetően nem életképesek. A továbbiakban először a Neo kazetta ismert szekvenciája alapján tervezett primerpárral sikerült azonosítanunk a p190RhoGAP⁻ mutációt feltételezhetően hordozó egereket, majd ennek az információnak a segítségével megterveztünk és beállítottunk egy, a p190RhoGAP⁻ mutációra specifikus allél-specifikus PCR-reakciót [14] (a Neo belső szekvenciája alapján tervezett PCR minden Neo-t tartalmazó mutációt felismert, tehát nem volt specifikus a p190RhoGAP⁻ mutációra). A továbbiakban a teljes mutációt hordozó genomikus DNS-szakasz többlépéses átfedő PCR-felerősítésével és szekvenálásával utólagosan meghatároztuk a mutáns allél nukleotidsorrendjét és a Settleman doktortól kapott részleges információkkal összevetve rekonstruáltuk a mutáció létrehozásának stratégiáját és menetét. Az így kapott eredményeket mutatja a 44. ábra.

Amint az a 44. ábra A részén látható, a p190RhoGAP⁻ mutáció létrehozása során az a β -galaktozidáz és a neomicin-rezisztenciáért felelős aminoglikozid-foszfotranszferáz aktivitásával egyaránt rendelkező β -Geo (β -Gal-Neo) fúziós fehérjét kódoló kazettát a p190RhoGAP-ot kódoló génnek megfelelő ("szenz") orientációban illesztettek be az első exon 5' végén genomba. Ennek eredményeképpen a Neo aktivitás lehetővé tette a mutánsok azonosítását (pozitív szelekció), a β -Gal aktivitás követésével vizsgálni lehetett a p190RhoGAP-ot kódoló gén kifejeződését, és a keletkezett mRNS-ben a korábban említett

rejtett ATG-től 5' irányban elhelyezkedő teljes olvasási keret ("open reading frame") jelenléte miatt a rejtett ATG-től kiindulva már nem jött létre másodlagos csonkolt p190RhoGAP fehérje.

A 44. ábra B része részletesen mutatja a felhasznált targetáló vektort. A korábbiakban említett β -Geo kazetta mellett a vektor tartalmazott egy további (negatív) szelekciós kazettát is, mely a foszfoglicerát-kináz (PGK) konstitutív promotere által hajtva expresszálta a diftériatoxin citotoxikus A komponensét (DTA). Ez a knockout állatok létrehozásakor rutinszerűen alkalmazott módszer biztosította, hogy a vektornak a genomba való esetleges véletlen integrációja az adott sejt DTA általi elpusztításához vezessen, és így módon csak azok a mutáns klónok maradjanak fent, melyekben a vektor beépülése a β -Geo és a PGK-DTA közti szakaszon kilakuló homolog rekombináció révén jöttek létre.

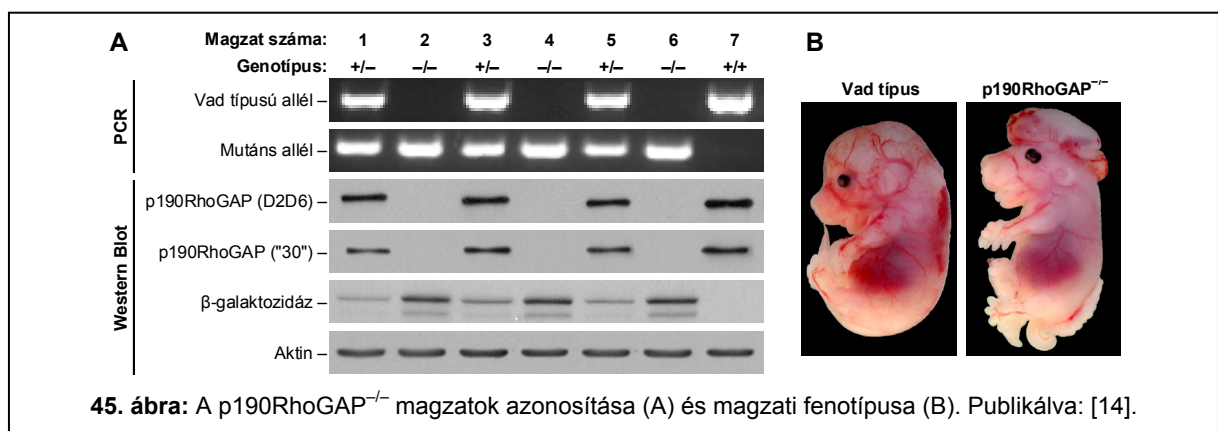


A keletkezett neomicin-rezisztens embrionális őssejt (ES sejt) klónok közül a genomális DNS HindIII restrikciós enzimmel való hasítása után a 44. ábra B részén piros téglalappal jelölt szakaszra felfekvő próbával végzett Southern Blot vizsgálattal tudták kiválasztani a tervezettnek megfelelő mutációt hordozó klónokat. Egy ilyen vizsgálat eredményét mutatja a 44. ábra C része, melyen a 3.2 kb magasságban megjelenő szignál a tervezettnek megfelelő mutáció jelenlétét jelzi. További, a p190RhoGAP^{hypo/hypo} mutációval való közvetlen összehasonlítás során kimutattuk, hogy a p190RhoGAP⁻ mutációt hordozó ES sejtek nem expresszálják a p190RhoGAP^{hypo} allél által kódolthoz hasonló csonkolt p190RhoGAP fehérjét [14].

A p190RhoGAP⁻ mutációt a továbbiakban heterozigóta (p190RhoGAP^{+/-}) formában tartottuk fent. A mutáns vonal stabilizálódása után heterozigóták időzített keresztezésével megpróbáltunk homozigóta knockout (p190RhoGAP^{-/-}) magzatokat nyerni. A kapott magzatokat egyrészt genomális DNS-ből végzett allél-specifikus PCR-reakció, másrészt a magzatok agyvizátumán végzett immunoblot módszer segítségével vizsgáltuk. Egy ilyen vizsgálat eredményét mutatja a 45. ábra A része, melyen jól látható, hogy a PCR-alapú genotipizálás eredményével egybehangzóan a homozigóta knockout (p190RhoGAP^{-/-}) magzatok nagy mennyiségben expresszálták a β -galaktozidázt, de két különböző p190RhoGAP-ellenes antitesttel (melyek közül az egyik a fehérje középső szakaszát ismeri fel) sem tudtuk bennük kimutatni a p190RhoGAP fehérjét. A homozigóta vad típusú (p190RhoGAP^{+/+}) magzatok ezzel szemben expresszálták a p190RhoGAP-ot, de nem fejezték ki a β -galaktozidázt. Várakozásainknak megfelelően a p190RhoGAP^{+/-} heterozigóta

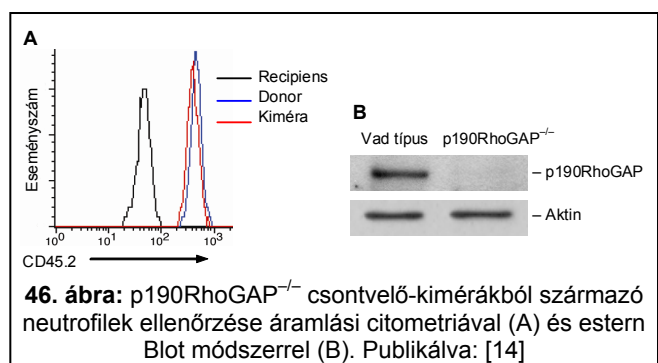
állatok mind a p190RhoGAP, mind (bár a p190RhoGAP^{-/-} magzatoknál alacsonyabb szinten) a β -galaktozidáz fehérjét is expresszálták.

A p190RhoGAP^{+/-} × p190RhoGAP^{+/-} keresztezésből származó magzatok genotípusának nagyobb mintán való vizsgálata kimutatta, hogy a harmadik trimeszterben a magzatoknak a várt 25%-nál valamivel kevesebb, mintegy 18%-a volt p190RhoGAP^{-/-} genotípusú [14]. Az ugyanilyen keresztezésből származó, megszületett és 2-3 hetes korban genotipizált egerek között pedig egyáltalán nem találtunk p190RhoGAP^{-/-} genotípusúakat [14]. A p190RhoGAP^{-/-} magzatok részletes vizsgálata során ezen túl számos esetben a velőűr záródásának károsodására utaló jeleket figyeltünk meg (egy jellegzetes esetet mutat a 45. ábra B része, melyen a p190RhoGAP^{-/-} magzat koponyájának és a kaudális gerincvelőnek a záródási zavara látható). Makroszkópos velőűr-záródási zavar a p190RhoGAP^{-/-} magzatok kb. 30%-ában volt megfigyelhető [14].



A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy a p190RhoGAP^{-/-} mutáció az embrionális korban kisebb mértékű elhalálozást, a születés körül viszont teljes életképtelenséget eredményez. A p190RhoGAP hiánya ezen túl a magzatok egy részében velőűr-záródási rendellenességgel jár. Ezek a megfigyelések nagyon hasonlóak p190RhoGAP^{hypo/hypo} mutánsokban megfigyeltékhez, ami arra utal, hogy a p190RhoGAP^{hypo/hypo} mutáció a teljes génhiányhoz hasonló tüneteket eredményez.

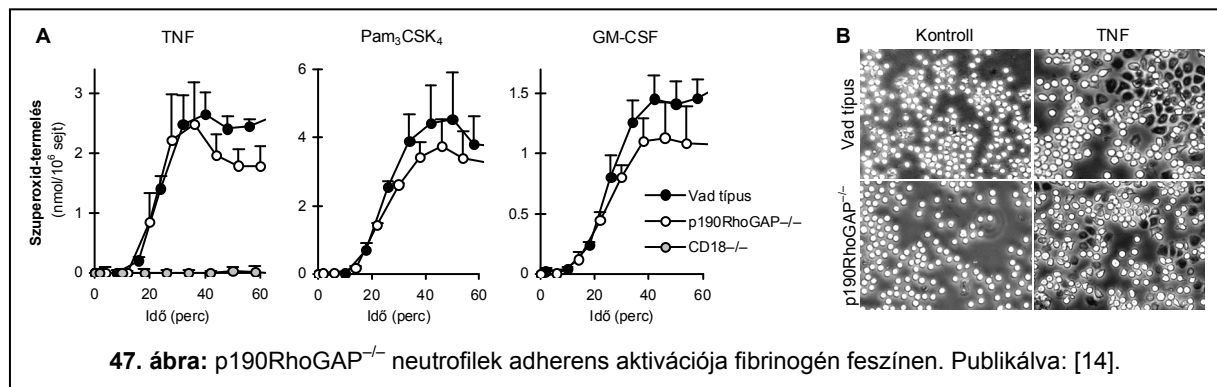
Mivel minket elsősorban a p190RhoGAP-nak a neutrofilekben betöltött szerepe érdekelt, a továbbiakban az 22. ábrán bemutatott módszernek megfelelően időzített terhességből származó p190RhoGAP^{-/-} és vad típusú kontroll (p190RhoGAP^{+/+} vagy p190RhoGAP^{+/-}) magzatok májsejtjeit letálisan besugárzott CD45.1-et hordozó recipiensekbe transzplantáltuk. A transzplantáció során a p190RhoGAP^{-/-} magzatokat az agylizátumokból, felgyorsított immunoblot módszerrel azonosítottuk (ez az allél-specifikus PCR-nál megbízhatóbb módszernek bizonyult). A transzplantáció sikerességét a vérben keringő neutrofilek CD45.2 expressziójának (a donor sejtekre jellemző markernek) az áramlási citometriás vizsgálatával ellenőriztük (46. ábra A része). Kimutattuk továbbá, hogy a p190RhoGAP^{-/-} kimérákból izolált



neutrofilekben ténylegesen hiányzik a p190RhoGAP fehérje (46. ábra B része). A p190RhoGAP hiánya nem befolyásolta sem a Gr1 granulocita-érési marker, sem a vizsgált integrin-láncok és Fc-receptorok sejtfelszíni expresszióját [14]. A továbbiakban az ily módon létrehozott és ellenőrzött p190RhoGAP^{-/-} és kontroll csontvelői kimerákból izolált neutrofileket vizsgáltuk.

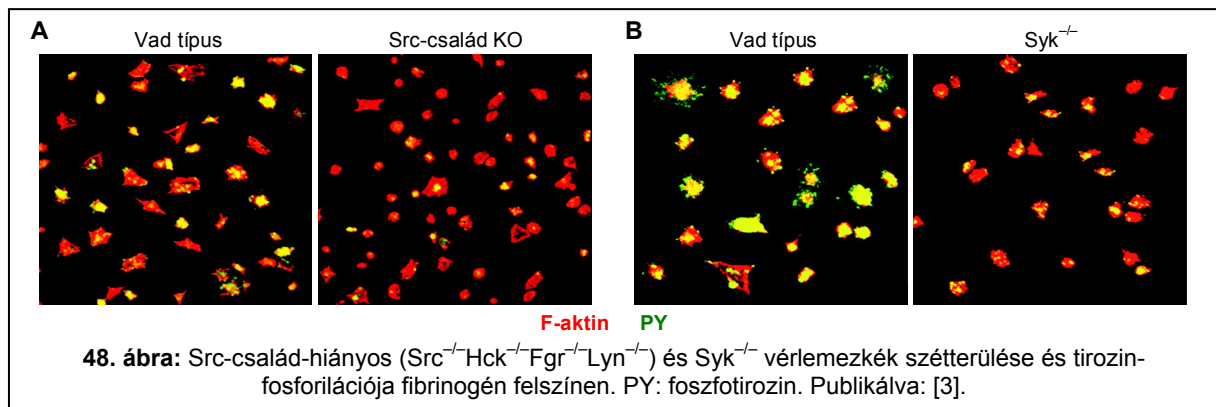
7.1.8. A p190RhoGAP vizsgálata neutrofilek integrin-függő aktiválódásában

A p190RhoGAP fibroblasztok integrin-jelátvitelében betöltött szerepe [87-90] és a neutrofilek integrin-jelátvitelénél történő feltételezett aktiválódása [119] alapján felmerült a fehérje szerepe a neutrofilek β_2 integrin-függő sejtválaszaiban. Amint azonban azt a 47. ábra A része mutatja, a p190RhoGAP^{-/-} neutrofilek fibrinogén felszínén TNF, Pam₃CSK₄ és GM-CSF stimulus hatására is a vad típusú sejtekhez hasonló mértékben termeltek szuperoxidot, miközben a CD18^{-/-} sejtekben teljesen károsodtak ezek a sejtválaszok (ld. még [13]). A p190RhoGAP^{-/-} neutrofileknek az adherens felszínen való szétterülése szintén hasonló volt a vad típusú sejtekéhez (47. ábra B panel). A p190RhoGAP tehát feltételezhetően nem játszik megkerülhetetlen szerepet a neutrofilek integrin-függő sejtaktivációjában.

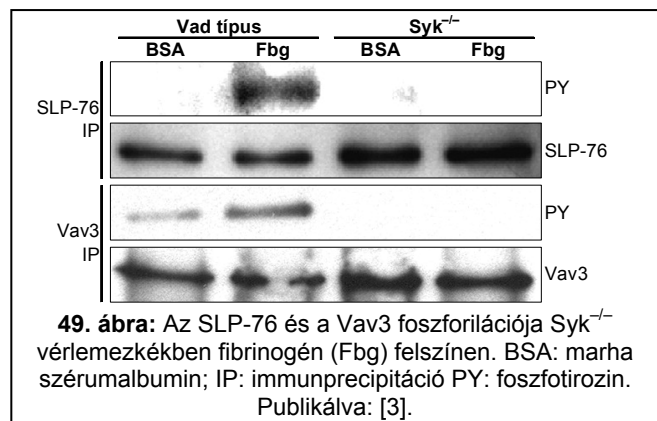


7.1.9. Az Src-kinázok és a Syk szerepe vérlemezkék integrin-függő adhéziójában

A neutrofil granulociták integrin-jelátvitelének vizsgálatával párhuzamosan Dr. Sandy Shattil munkacsoportjával együttműködve közös kísérleteket végeztünk a vérlemezkék $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrinjein (GpIIb/IIIa glikoprotein) keresztüli jelátviteli folyamatok vizsgálatára is. Ezen kísérletek során a különböző egerekből (főleg csontvelő-kimerákból) izolált vérlemezkéket az $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin ligandjával, a fibrinogénnel fedett felszínre helyeztük és vizsgáltuk a vérlemezkék szétterülését és az intracelluláris fehérjék foszforilációját. Amint az a 48. ábra A részén látható, az Src-kinázok hiánya (Src^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} mutáció) a vérlemezkék szétterülésének a károsodását és az intracelluláris tirozin-foszforiláció csökkenését eredményezte. Hasonló eredményt kaptunk Syk^{-/-} csontvelő-kimerákból izolált vérlemezkékben is (48. ábra B panel).



A következőkben megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a Syk genetikai hiánya a fibrinogén-felszínre kerülő vérlemezkék intracelluláris jelátviteli folyamatait. Amint az a 49. ábrán látható, vad típusú vérlemezkékben a fibrinogénnel fedett felszínnel való kapcsolat a vérlemezkék SLP-76 és Vav3 fehérjéinek a foszforilációját hozza létre, míg Syk^{-/-} vérlemezkékben ugyanez a hatás nem jött létre.



Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy vérlemezkék $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrinjei a neutrofilek β_2 -integrinjeihez hasonlóan az Src-kinázok és a Syk együttműködésével, feltételezhetően az SLP-76 és a Vav fehérjecsalád tagjainak részvételével szignalizálnak.

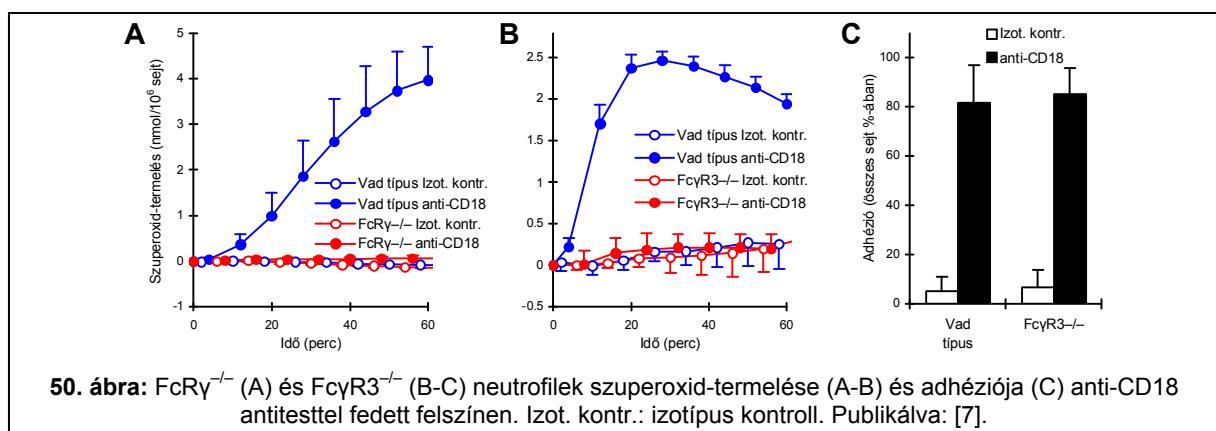
7.1.10. Az Fc-receptorok szerepe az anti-integrin antitestek aktiváló hatásában

Az integrinek általi sejtaktiváció tárgyalásának végén egy módszertani jellegű kísérletsorozat eredményeit szeretném bemutatni, mivel ezen eredmények nagymértékben befolyásolták saját és mások kísérleti eredményeinek az interpretálását.

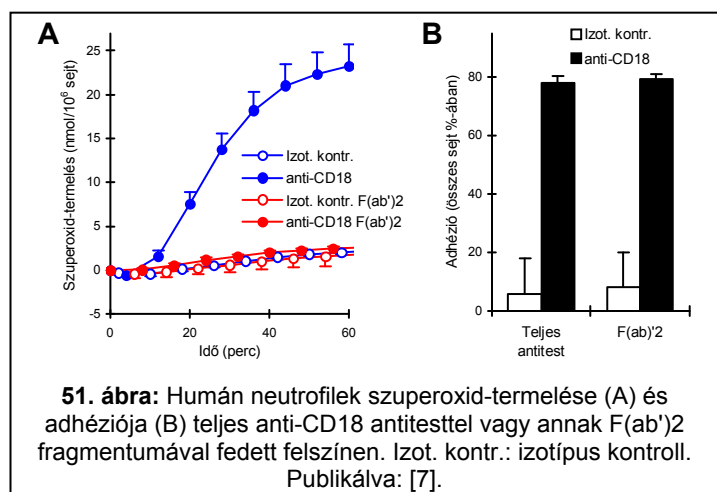
Régóta ismert volt, hogy a neutrofilek integrin-függő aktiválódásához elengedhetetlen valamilyen szolubilis gyulladásos mediátor (pl. TNF) alkalmazása [117,118]. Berton és munkatársai [120] kimutatták azonban, hogy a neutrofilek teljes aktiválódását lehet kiváltani műanyag-felszínre kötött β_2 -integrin-ellenes monoklonális ellenanyagokkal (vagyis a β_2 -integrinek keresztkötésével) is. Ezen eredmények egyrészt egy olyan kísérleti rendszert mutattak be, melyben nem volt szükség szolubilis gyulladásos agonisták alkalmazására (ami jelentősen leegyszerűsítette az eredmények interpretálását), másrészt arra utalt, hogy mivel az integrinek önmagukban is képesek a neutrofilek teljes aktiválódását kiváltani, a szolubilis agonisták szerepe feltételezhetően csak annyi, hogy inside-out szignál révén elősegítsék az integrinek ligandkötését, és a további jelátvitelt már az integrinek önmagukban végzik. Ezt a kísérleti rendszert széles körben alkalmazták a β_2 -integrinek szolubilis agonistától független vizsgálatára. Többek között mi is kimutattuk, hogy a β_2 -integrinek (és hasonlóképpen a β_1 - és β_3 -integrinek) elleni monoklonális antitestek általi neutrofil-aktiválódáshoz elengedhetetlen a Syk [2] és az SLP-76 [5] fehérje.

A β_2 -integrinek elleni anti-CD18 antitestekkel végzett további kísérleteink során arra lettünk figyelmesek, hogy a sejtek válaszképessége teljesen megszűnik a számos Fc-

receptor jelátvitelében szerepet játszó Fc γ R hiányában (50. ábra A része). A kérdést tovább vizsgálva kimutattuk, hogy ugyanezek a sejtválaszok teljes mértékben gátlódnak Fc γ RIII-hiányos sejtekben (50. ábra B része). A jelenség háttérében nem az anti-CD18 antitestek sejtekhez való kötődésének a zavara állt, mivel az Fc γ R3^{-/-} sejtek a vad típusú neutrofilekhez hasonló mértékben tapadtak le az immobilizált anti-CD18 antitestekkel fedett felszínre (50. ábra C része). Hasonló eredményeket kaptunk a CD49d (α_4 -integrin) és a CD61 (β_3 -integrin) ellenes antitestek alkalmazásakor is [7]. Kimutattuk továbbá, hogy az immobilizált anti-CD18 antitesttel kiváltott sejtválaszokat jelentős mértékben gátolja egy, az Fc γ RII-t és Fc γ RIII-t együttesen gátló monoklonális antitest [7]. A fibrinogén vagy ICAM-1 felszínen TNF hozzáadásával kiváltott szabadgyök-termelést ezzel szemben sem az Fc γ R3^{-/-} mutáció, sem az Fc γ RII/II-blokkoló antitest nem gátolta [7]. Ezen eredményeink arra utaltak, hogy az Fc γ RIII elengedhetetlen szerepet tölt be az egér neutrofilek immobilizált anti-CD18 antitestekkel történő aktiválása során.



Ezután humán CD18-ellenes antitestből F(ab')₂ fragmentumot preparáltunk és megvizsgáltuk, hogy az Fc-résztől megfosztott antitest képes-e aktiválni a humán neutrofileket. Amint az a 51. ábra A részén látható, az anti-CD18 F(ab')₂ fragmense egyáltalán nem volt képes aktiválni a humán neutrofileket. Ennek a jelenségnek sem az állt a háttérében, hogy az F(ab')₂ fragmentum nem tudott volna kötődni a neutrofilekhez, mert a sejtek hasonló mértékben tapadtak le a teljes anti-CD18 antitesttel és annak F(ab')₂ fragmentumával fedett felszínre (51. ábra B része). A továbbiakban kimutattuk, hogy humán neutrofilek immobilizált anti-CD18 antitesttel való aktiválódását mind a humán Fc γ RIII, mind az Fc γ RIIA elleni antitest nagymértékben gátolta, miközben az utóbbi antitest nem befolyásolta a sejtek TNF hatására fibrinogén felszínen való aktiválódását [7].



A fenti eredmények összességében arra utaltak, hogy az anti-integrin antitestek általi sejtaktiválódáshoz elengedhetetlen az alkalmazott antitestek Fc-részének a neutrofilek

alacsony affinitású Fc γ -receptorokhoz (egér Fc γ RIII, humán Fc γ RIIA és Fc γ RIIIB) való kötődése. Ezen eredményeink egyrészt óvatosságra intenek az anti-integrin antitestekkel kapott eredmények interpretálásával kapcsolatban, másrészt kétségessé teszik, hogy az integrinek keresztükötése önmagában képes-e kiváltani a sejtek teljes mértékű aktiválódását.

7.1.11. Megbeszélés

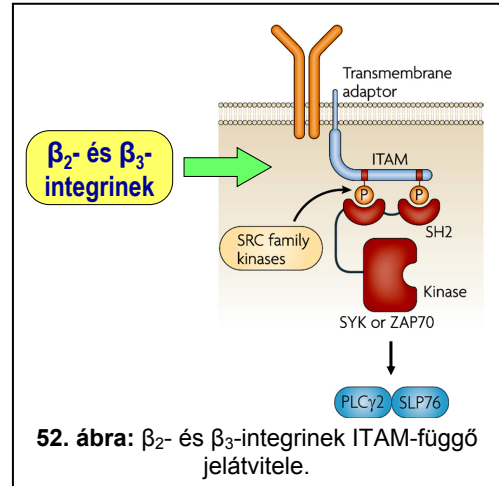
Az integrinek jelátvitelével kapcsolatos kísérleteink legfontosabb következtetése a DAP12/FcR γ –Syk komplexen keresztül létrejövő immunreceptor-szerű jelátviteli folyamat szerepének azonosítása volt. Kísérleteink kezdetén az integrinokat és a klasszikus immunreceptorokat két élesen elkülönülő receptor-családnak tekintették, melyek teljesen különböző, egymással alig átfedő jelátviteli mechanizmussal szignalizálnak. Ezt az elképzelést leginkább Sanford Shattil munkacsoportjának azon eredményei támasztották alá, melyek szerint a heterológ expressziós rendszerben (CHO sejtekben) kifejezett $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin egy ITAM-független mechanizmuson keresztül aktiválja a Syk-et [95]. Bár az ebben a közleményben bemutatott eredmények megfelelő módszerekkel és kontrollokkal voltak alátámasztva, a heterológ expressziós rendszer alkalmazása kérdésessé tette, hogy a kísérleti megközelítés mennyire tükrözi a tényleges élettani folyamatokat.

Saját kísérleteink során egerek csontvelőjéből frissen izolált primer neutrofileken, a csontvelői sejtekből tenyésztett primer makrofágokon, illetve a perifériás vérből frissen izolált vérlemezkéken vizsgáltuk az integrinek jelátvitelét [2,3,8]. Eredményeink megerősítették a sejtvonalakon korábban végzett kísérletek azon következtetését, mely szerint a Syk szerepet játszik az integrinek (esetünkben a β_2 -integrinek és az $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin) jelátvitelében (25-26., 28., 30., 37. és 48-49. ábrák) [2,3,8]. További kísérleteink ugyanakkor arra utaltak, hogy a Syk aktiválódása az általunk vizsgált integrin-jelátvitel során egy ITAM-függő mechanizmuson keresztül jön létre. Utóbbi következtetésünket arra alapoztuk, hogy 1) sikerült kimutatnunk két ITAM-tartalmú adapter-fehérje, a DAP12 és az FcR γ Src-család-függő foszforilációját az integrin-jelátvitel során (34. ábra); 2) kimutattuk, hogy a DAP12 és az FcR γ mind a Syk aktiválódásához (34. és 37. ábra), mind az integrin-függő sejtválaszokhoz (31-32. és 37. ábra) elengedhetetlen; valamint 3) a szerkezet-hatás összefüggés retrovirális rekonstitúció segítségével történő vizsgálatával igazoltuk, hogy az integrinek jelátviteléhez mind a Syk SH2-doménjei, mind a DAP12 ITAM-tirozinjai szükségesek (35-36. és 38. ábra) [8]. Következtetésünket tőlünk függetlenül mások is megerősítették neutrofileken [121], vérlemezkéken [121,122], oszteoklasztokban [123], dendritikus sejteken [124], mikroglia-sejteken [125] és NK-sejteken [126]. A fentiek közül külön említést érdemel a Sanford Shattil közreműködésével készült [121] sz. közlemény, melyben a szerzők közvetlenül is összehasonlították az $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrinek működését frissen izolált primer vérlemezkékben és heterológ expressziós rendszerben (CHO sejtek), és kimutatták, hogy az $\alpha_{IIb}\beta_3$ jelátvitel az előbbiben ITAM-szerű, míg az utóbbiban ITAM-független folyamatokon keresztül jön létre. A saját eredményeink [8] és Sanford Shattil korábbi eredményei [95] közti látszólagos különbséget tehát feltehetőleg a CHO-sejtekben létrejött műtermék okozhatta.

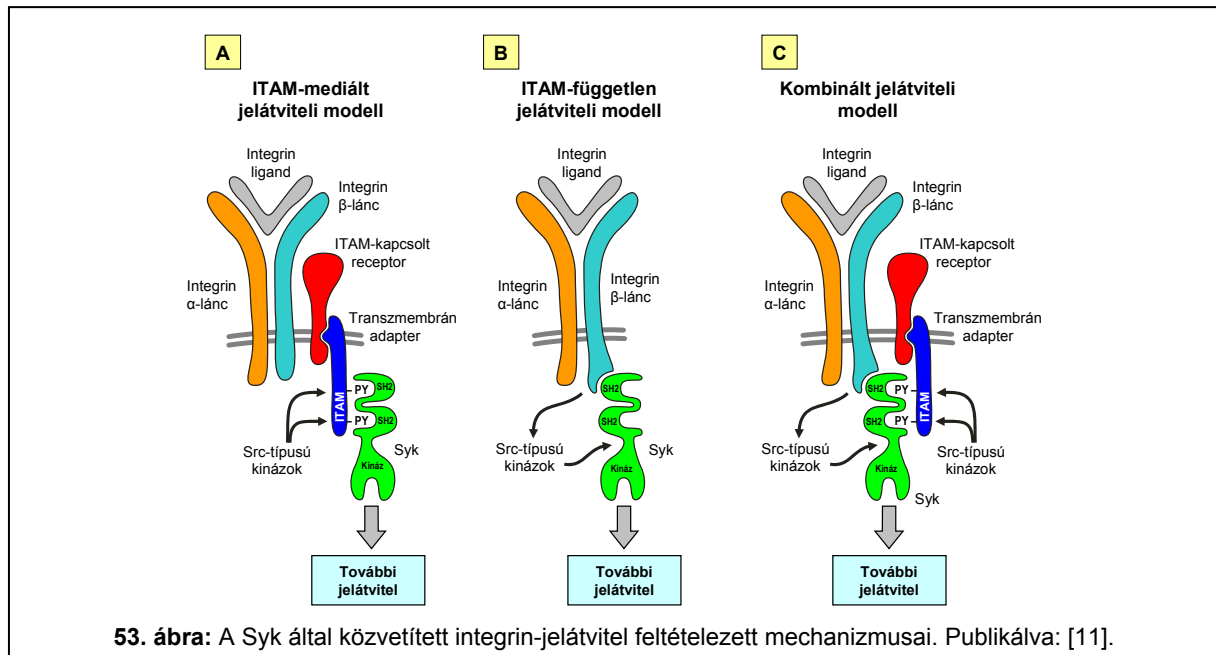
Az ITAM-függő folyamatok szerepén túl további kísérleteinkben kimutattuk, hogy a neutrofilek β_2 -függő aktiválódásához két további, a klasszikus immunreceptorok jelátvitelében is szerepet játszó fehérje, a PLC γ 2 (40-42. ábra) [13] és az SLP-76 (43. ábra) [5] is szükséges. Utóbbi eredményeink szintén egybecsengnek más munkacsoportok hasonló témában közölt eredményeivel [127-129]. Irodalmi adatok [119] alapján előzetesen

feltételeztük továbbá, hogy a p190RhoGAP is fontos szerepet tölt be a neutrofilek β_2 -integrinjeinek jelátvitelében. Ezt a feltételezést azonban saját kísérleteinkben nem sikerült igazolnunk (47. ábra) [14].

A fenti eredményeket foglalja össze a 52. ábra. Összességében elmondhatjuk, hogy a β_2 - és β_3 -integrinek számos különböző hemopoetikus eredetű sejttypusban is az immunreceptorokhoz hasonló, a Syk (illetve NK-sejtek esetében a ZAP-70 [126]) ITAM-függő aktivációját igénylő folyamatokon keresztül szignalizálnak. Az integrinek jelátvitelének további lépéseiben fontos szerepet játszik a PLC γ 2 és az SLP-76 fehérje. Bár jelenleg nem ismert, hogy a β_2 - és β_3 -integrinek pontosan milyen mechanizmuson keresztül aktiválják az ITAM-tartalmú adapter-fehérjéket, feltételezzük, hogy ez a folyamat egy vagy több, a klasszikus immunreceptorokkal rokon transzmembrán fehérje közbeiktatásával jön létre. Utóbbi lehetőségre utal az ITAM-tartalmú Fc γ RIIA receptor részvétele a humán vérlemezkék $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrinen keresztüli aktiválódásában [122].



Bár a fenti eredmények alapján széles körben elfogadottá vált, hogy a β_2 - és β_3 -integrinek általi jelátvitelhez elengedhetetlen a Syk ITAM-függő aktiválódása (ld. fent, illetve a 53. ábra A részén) számos eredmény utal a Syk ITAM-független aktiválódásának a lehetőségére is [95-97,123]. Utóbbi közlemények elsősorban heterológ expressziós rendszerek és biokémiai módszerek alkalmazásával kimutatták, hogy a Syk N-terminális SH2-doménje közvetlenül is képes kapcsolódni különböző integrinek β -láncához és ez a kapcsolódás nem igényli a Syk SH2-doménjeinek foszforilálódott ITAM-hoz való kihorgonyzódását (53. ábra B része). Hangsúlyoznunk kell, hogy a két különböző (ITAM-mediált és ITAM-független) jelátviteli modell nem zárja ki egymást, azok a Syk aktivációja során párhuzamosan is haladhatnak. Egy ilyen lehetséges "kombinált" modellt mutat a 53. ábra C része, melyben az integrinek általi Syk-aktivációhoz egyaránt szükséges a kináz N-terminális SH2-doménjének ITAM-független módon való kapcsolódása az integrin β -láncához, valamint a Syk SH2-doménjeinek a foszforilálódott ITAM-tirozinokhoz való kapcsolódása.



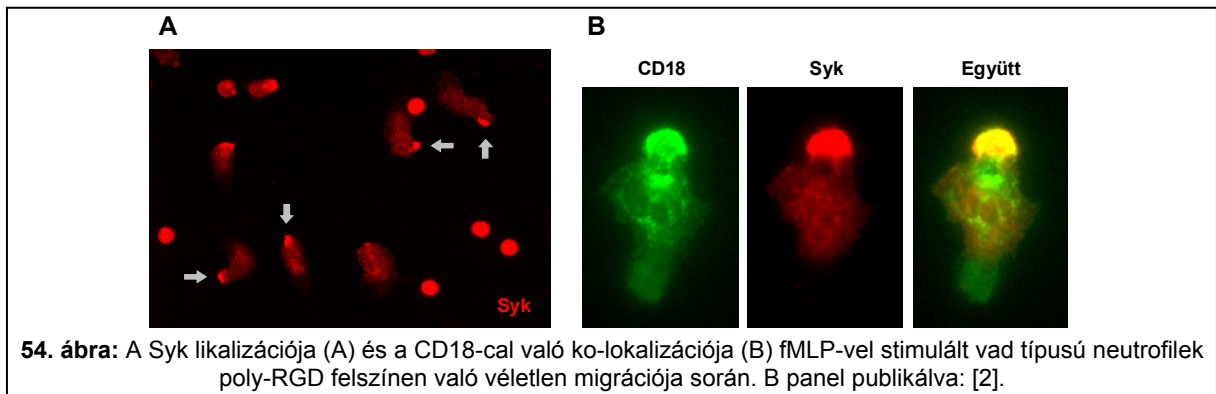
Bár a bevezetésben említést tettem az integrinek kétirányú (outside-in és inside-out) jelátviteléről, a fenti eredményeink bemutatása során nem tárgyaltam a kétféle jelátvitel közti különbséget. A jelenleg legáltalánosabban elfogadott paradigmák szerint az általunk alkalmazott módszerek az integrinek outside-in jelátvitelét vizsgálják, vagyis azt, hogy milyen sejten belüli jelátviteli folyamatok alakulnak ki az integrinek ligandkötésének hatására. Kísérleteinket ilyen nézőpontból vizsgálva feltételezhetjük, hogy az ITAM-függő Syk-aktiváció az integrinek outside-in jelátvitelének a részét képezi. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy a neutrofilek (és más hemopoetikus sejtek) integrineken keresztüli aktiválódása (pl. szétterülése) feltételezhetően számos öngerősítő folyamatot igényel, melyekben váltakozva jön létre az outside-in és az inside-out jelátvitel (pl. egy ligandját kötött integrin outside-in jelátvitelére inside-out mechanizmusokon keresztül növelheti a szomszédos integrinek affinitását vagy aviditását). Utóbbi esetben a pozitív visszacsatolási hurok bárhol történő megszakítása a teljes folyamat leállítását eredményezné. Emiatt az outside-in és az inside-out jelátvitel között csak korlátozott mértékben tudunk különbséget tenni és csak bizonyos fenntartásokkal állíthatjuk, hogy az általunk azonosított jelpálya az integrinek outside-in jelátvitelének a részét képezi.

7.2. Jelátviteli folyamatok vizsgálata a neutrofilek sejt-vándorlása során

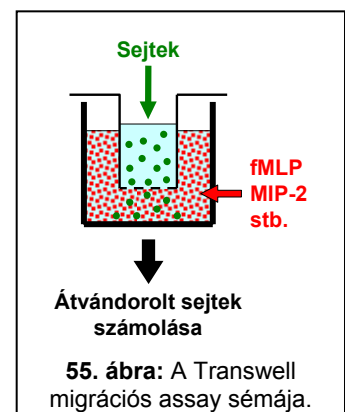
7.2.1. A Syk szerepének vizsgálata neutrofilek migrációja során

Mivel a β_2 -integrinek alapvető szerepet töltenek be a fehérvérsejteknek a gyulladás helyére vándorlásában, felmerült bennünk a lehetőség, hogy a fentiekben vizsgált jelpálya a neutrofilek β_2 -integrin-függő migrációs folyamataiban is részt vesz. Először megvizsgáltuk a CD18 és a Syk lokalizációját poly-RGD felszínen fMLP-val stimulált egér neutrofilekben. Amint az az 54. ábrán látható, A Syk nagy mennyiségben halmozódott fel a véletlenszerű migrációt végző neutrofilek frontális területén (A panel) és itt ko-lokalizációt mutatott a CD18-

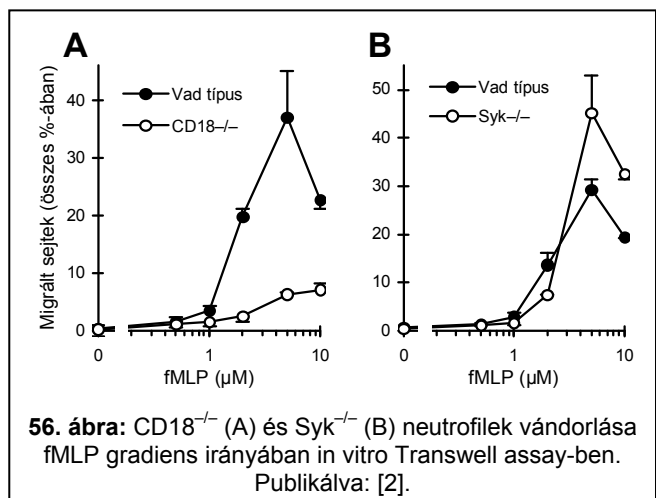
cal (B panel). Ez a megfigyelés megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a Syk szerepet játszhat a sejtek migrációs folyamataiban.



A Syk neutrofilek migrációjában betöltött szerepét először in vitro Transwell kísérleti rendszerben vizsgáltuk (55. ábra), ami a Boyden-féle migrációs kamra továbbfejlesztett verziójának tekinthető. Ebben a rendszerben a sejtek szuszpenzióját egy alul lyukacsos membránnal lezárt edénykébe (Transwell-betétbe) helyezük, melyet 24-lyukú lemez kemoattraktáns tartalmozó médiummal töltött üregébe illesztünk. A sejtek a kemoattraktáns gradiensének megfelelően a pórusokon keresztül az alsó térbe vándorolnak, ahol az átvándorolt sejtek megszámlálhatók vagy számuk biokémiai módszerekkel meghatározható. A porózus membránnal lezárt edényke (insert) a kereskedelmi forgalomban különböző pórusméretekkel kapható, és felszínét tetszőleges fehérjével lehet fedni. A következő kísérletekben rutinszerűen fibrinogénnel fedett 3 μm pórusméretű polikarbonát membránnal dolgoztunk.

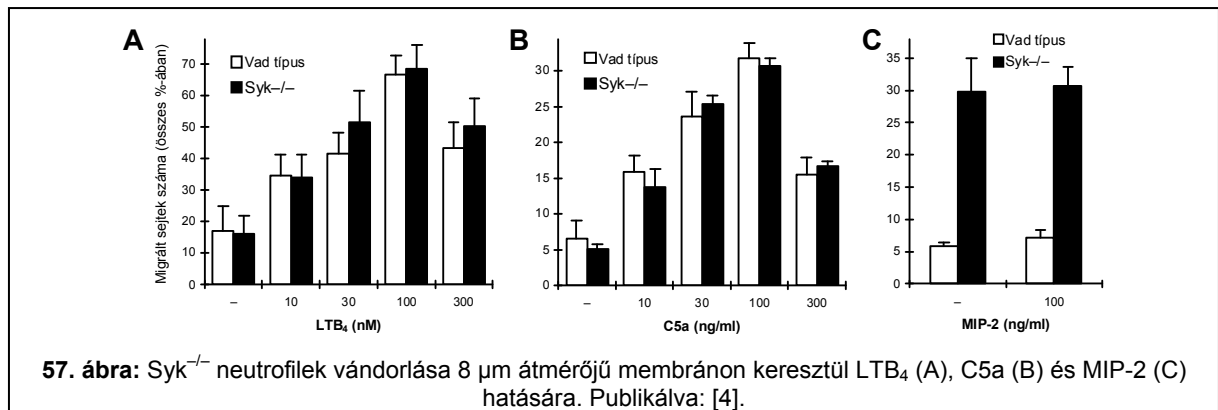


Amint az a 56. ábrán látható, különböző koncentrációjú fMLP kemoattraktáns alkalmazásakor a vad típusú neutrofilek nagyszámban vándoroltak a kemoattraktáns gradiens irányába. A koncentráció-függés görbéje a G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli válaszok esetén általánosan megfigyelhető haranggöre-szerű lefutást mutatta. Az ábra A részén látható továbbá, hogy a neutrofilek vándorlása nagymértékben károsodott $\text{CD18}^{-/-}$ sejtekben, ami a módszer integrin-függését igazolta. A $\text{Syk}^{-/-}$ neutrofilek vizsgálatakor ugyanakkor meglepetésünkre azt találtuk, hogy a sejtek migrációja nem mutatott lényeges károsodást a vad típusú sejtekéhez képest (56. ábra B része). Bár alacsonyabb fMLP-koncentrációk mellett a migráció részlegesen csökkent, magasabb koncentrációk mellett a $\text{Syk}^{-/-}$ sejtek meg a vad típusúaknál nagyobb arányban is vándoroltak át a porózus membránon. Előzetes feltételezésünkkel

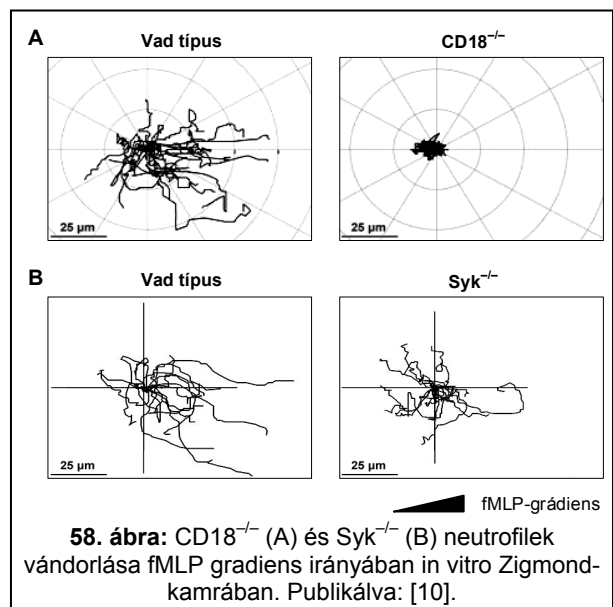


és a CD18 szerepével szemben tehát a Syk ebben a kísérleti rendszerben nem vesz jelentős mértékben részt a neutrofilek migrációjában.

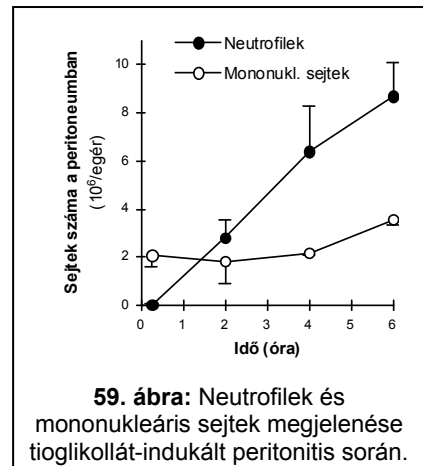
A következőkben a fentitől kismértékben eltérő (8 μm átmérőjű membránnal rendelkező) kísérleti rendszerben vizsgáltuk a Syk^{-/-} neutrofilek különböző kemoattraktánsok irányába való vándorlását. Az fMLP-kiváltotta sejt vándorlás ilyen körülmények között is a fentiekhez hasonló lefutást mutatott mind vad típusú, mind Syk^{-/-} sejtekben [4]. Amint az a 57. ábrán látható, a Syk hiánya nem befolyásolta az LTB₄ és C5a kemoattraktánsok, illetve a MIP-2 kemokin irányába történő sejt vándorlást, ami megerősíti, hogy a Syk nem játszik fontos szerepet a neutrofilek irányított vándorlásában.



Dr. Barbara Walzog (Ludwig-Maximilians Universität, München, Németország) munkacsoportjával együttműködve egy további in vitro rendszerben, az ún. Zigmond-kamrában is vizsgáltuk a neutrofilek in vitro vándorlását. Ebben a kísérleti rendszerben valós időben vizsgálható a két üveglap közötti keskeny térben felépített kemoattraktáns (fMLP) gradiens hatására létrejövő irányított neutrofil-migráció. A módszer előnye, hogy egyértelműen különbséget tesz a véletlenszerű és random migráció között és kizárható a sejtek károsodott adhézója miatti esetleges "elveszése" a rendszerből. Amint az az 58. ábra A részén látható, ez a migrációs rendszer is nagymértékben függ a CD18 jelenlététől, hiszen a CD18^{-/-} neutrofilek lényegében nem mutatnak irányított vándorlást (kemotaxis). A 58. ábra B része szerint a Syk^{-/-} neutrofilek ebben a kísérleti rendszerben kismértékű károsodást mutattak (elsősorban a migrációnak a gradiens felé való irányítottságában), de ez a károsodás nem volt összemérhető a CD18^{-/-} neutrofilekben megfigyelhető lényegében teljes károsodással, tehát a Syk^{-/-} neutrofilek ebben a kísérleti felállásban is képesek voltak a CD18-függő sejt vándorlásra fMLP-gradiens jelenlétében.

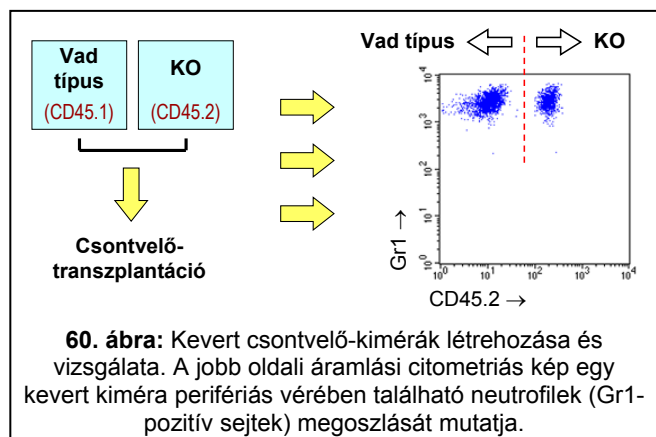


Bár a fenti eredmények egyöntetűen arra utaltak, hogy a Syk-nek nincs megkerülhetetlen szerepe a neutrofilek integrin-függő in vitro sejt-vándorlásában, szerettük volna a kérdést in vivo körülmények között is megvizsgálni. Ehhez a neutrofilek in vivo migrációjának egyik legelterjedtebb modell-rendszerét, a tioglikollát-indukált peritonitis-modellt használtuk fel. A módszer során tioglikollát intraperitoneális injekciójával steril peritonitist hozunk létre, melynek hatására órákon belül nagyszámú neutrofil vándorol a peritoneumba (59. ábra), míg a mononukleáris sejtek (pl. makrofágok) felszaporodása ekkor (az első 4 órában) még nem jellemző (utóbbi sejtek felszaporodása 4 óra után kezdődik és 24 óra után maximális).

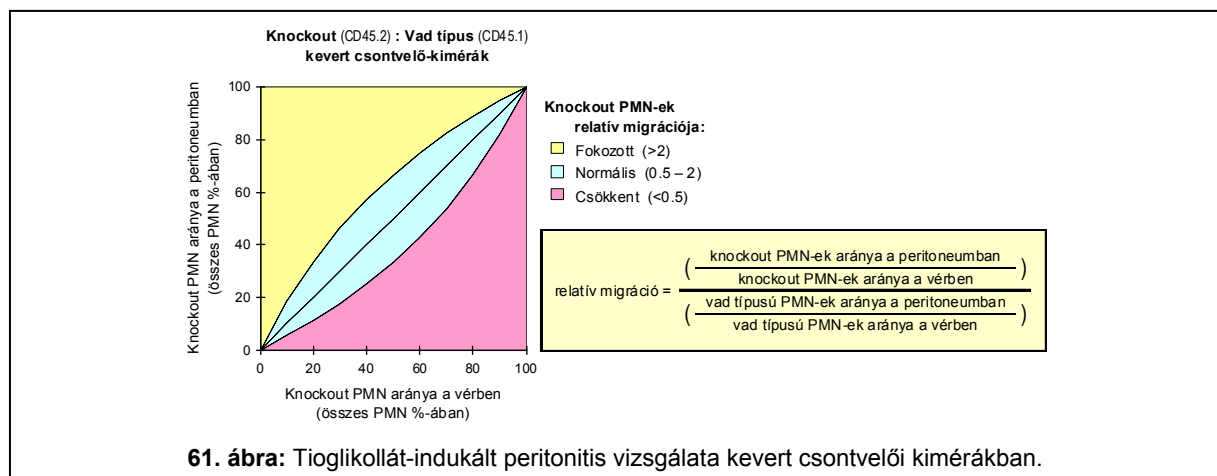


59. ábra: Neutrofilek és mononukleáris sejtek megjelenése tioglikollát-indukált peritonitis során.

Az in vivo kísérletek során fontosnak tartottuk, hogy kizárjuk a különböző knockout egerek eltérő immunológiai és egyéb státuszából eredő másodlagos hatásokat, ezért beállítottunk egy olyan kísérleti rendszert, melyben a vad típusú és mutáns sejteket egy egyedben belül, azonos körülmények között hasonlíthatjuk össze. Ennek érdekében CD45.1 markert hordozó vad típusú és CD45.2 markert hordozó knockout hemopoetikus (magzati máj vagy csontvelői) sejteket összekevertünk, és ezzel a kevert donor-populációval végeztünk transzplantációt CD45.1-et hordozó vad típusú recipiensekbe (60. ábra). Az így létrehozott kevert csontvelői kimérák perifériás vérében (vagy bármely más testfolyadékában) áramlási citometriával egyértelműen el tudtuk különíteni a vad típusú (CD45.2-negatív) és a knockout (CD45.2-pozitív) sejteket (60. ábra).



60. ábra: Kevert csontvelő-kimérák létrehozása és vizsgálata. A jobb oldali áramlási citometriás kép egy kevert kiméra perifériás vérében található neutrofilek (Gr1-pozitív sejtek) megoszlását mutatja.

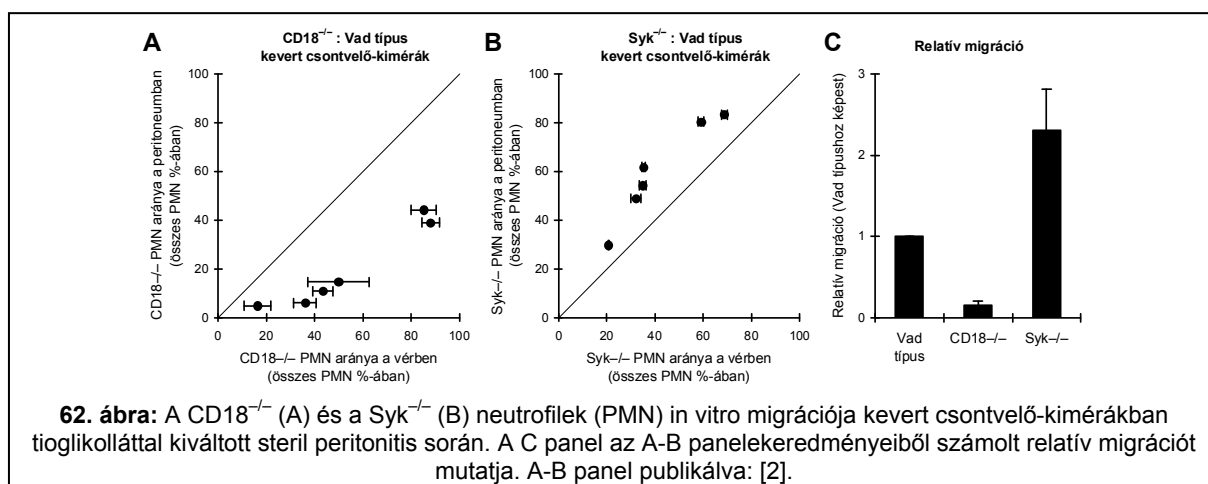


61. ábra: Tioglikollát-indukált peritonitis vizsgálata kevert csontvelői kimérákban.

A fenti módon létrehozott kevert csontvelői kimérákban tioglikolláttal peritonitist váltottunk ki és megvizsgáltuk a vad típusú és a mutáns neutrofilek megoszlását a perifériás vérben, illetve a peritoneális folyadékban. A kapott értékeket a 61. ábrán bemutatottnak

megfelelő koordináta-rendszerben ábrázoltuk. Amennyiben az adott mutáció nem befolyásolta volna a sejtek vándorlási képességét, akkor a vérben és a peritoneumban hasonló arányban vártuk volna a mutáns neutrofilek arányát. Amennyiben a mutáció gátolta volna a migrációt, a peritoneumban a mutáns neutrofilek kisebb arányban lettek volna jelen, mint a vérben. Amennyiben pedig a mutáció fokozta volna a migrációt, a peritoneumban a vérnél nagyobb arányban vártunk volna mutáns neutrofileket. Ezeket a lehetőségeket a 61. ábrán különböző színekkel jelöltem. A kapott eredményekből a 61. ábrán bemutatott képlet alapján számszerűsítettük is a mutáns neutrofilek relatív migrációs képességét a referenciaként használt CD45.1-et expresszáló vad típusú sejtekhez képest.

A fenti in vivo rendszer segítségével először megvizsgáltuk a CD18 szerepét a neutrofilek sejt-vándorlásában tioglikollát-indukált peritonitis során. Amint az a 62. ábra A paneljén látható, a CD18^{-/-} neutrofilek aránya mindegyik vizsgált kevert kímérában lényegesen alacsonyabb volt a peritoneális folyadékban, mint a vérben, ami arra utalt, hogy CD18 hiányában a neutrofilek lényegesen rosszabb hatásfokkal tudtak a peritoneumba vándorolni. Ennek megfelelően a CD18^{-/-} neutrofilek relatív migrációs kapacitása lényegesen alacsonyabb volt, mint a vad típusú sejteké (62. ábra C része). Ezen kísérletek megerősítették az alkalmazott kísérleti rendszer integrinektől való függését.

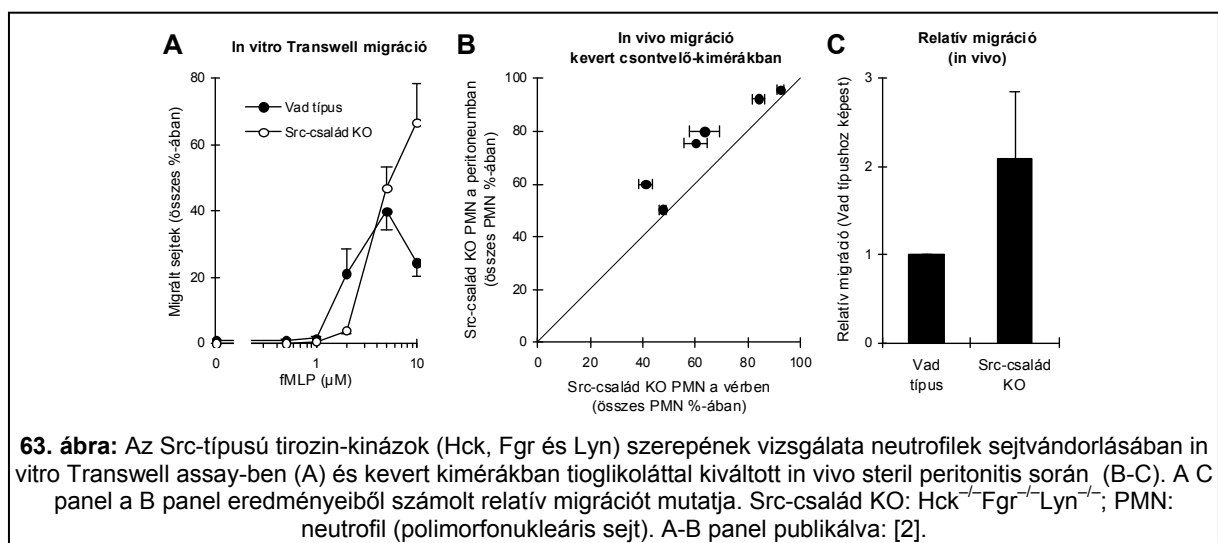


A kísérleti rendszer beállítása és általános jellemzése után megvizsgáltuk a Syk szerepét is a neutrofilek in vivo vándorlásában. Ezen kísérleteink azt mutatták, hogy a Syk^{-/-} neutrofilek aránya a peritoneumban minden vizsgált kevert kímérában összevethető, sőt kissé magasabb is volt, mint ugyanezen sejtek aránya a vérben (62. ábra B része). Ennek megfelelően a Syk^{-/-} neutrofilek relatív migrációs kapacitása a vad típusú sejtek kb. kétszeresének adódott (62. ábra C része). A Syk tehát in vivo sem szükséges a neutrofilek integrin-függő migrációjához, sőt a Syk hiánya kismértékben fokozza is a neutrofileknek a gyulladás helyére történő vándorlását.

7.2.2. Az Src-típusú kinázok szerepének vizsgálata

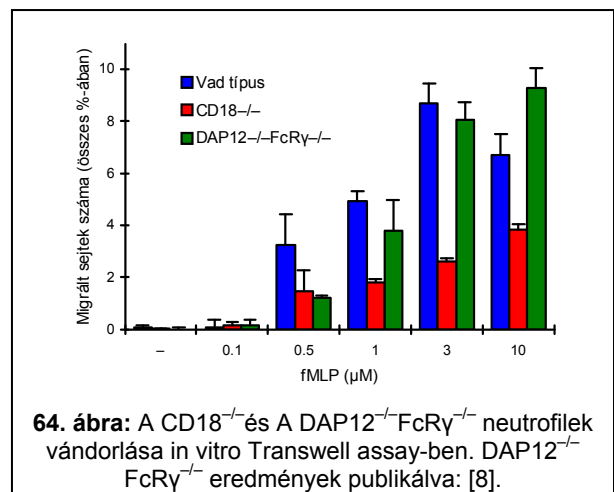
Amint korábban említettem, saját és mások itt nem tárgyalt eredményei arra utaltak, hogy a neutrofilek β_2 integrin-függő adherens aktivációjában elengedhetetlen szerepe van az Src-típusú tirozin-kinázoknak is [33,114]. Ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a neutrofilekben megtalálható három Src-típusú tirozin-kináz (a Hck, az Fgr és a Lyn) együttes hiánya a neutrofilek integrin-függő in vitro és in vivo sejt-vándorlását. Amint az a 63. ábra A

részén látható, in vitro Transwell rendszerben az Src-család-hiányos ($Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$) neutrofilek összességében a vad típusú sejtekkel összevethető mértékben voltak képesek az fMLP irányában való migrációra, bár alacsonyabb fMLP-koncentráció mellett részleges károsodás, magasabb fMLP-koncentráció mellett pedig a migráció fokozódása volt megfigyelhető. A kevert csontvelői kimerákban végzett in vivo peritonitis-vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy az Src-család-hiányos ($Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$) neutrofilek aránya a peritoneális folyadékban hasonló, sőt valamivel magasabb volt, mint ugyanezen sejtek aránya a perifériás vérben (63. ábra B panel). Ennek megfelelően az Src-család-hiányos sejtek relatív migrációs képessége a vad típusú sejtekénél kb. kétszer magasabbnak bizonyult. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy (a Syk-hez hasonlóan) az Src-típusú tirozin-kinázok sem töltnek be elengedhetetlenül fontos funkciót a neutrofilek integrineken keresztüli sejt-vándorlásában.



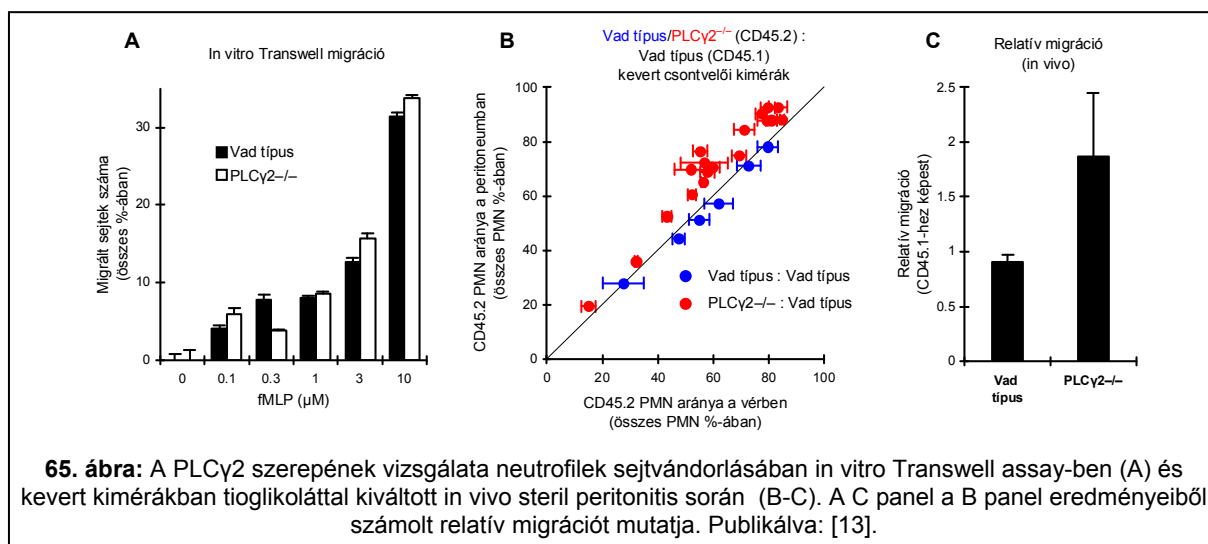
7.2.3. A $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ neutrofilek vándorlása

A következőkben megvizsgáltuk a $DAP12$ és az $FcR\gamma$ esetleges szerepét a neutrofilek migrációjában. Amint az a 64. ábrán látható, míg a $CD18^{-/-}$ sejtekben az in vitro Transwell-migráció jelentős károsodása volt megfigyelhető, a $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ neutrofilek összességében a vad típusú sejtekhez hasonló mértékben voltak képesek az fMLP-grádiens irányában migrálni (bár alacsony fMLP-koncentráció mellett a migráció gátlása, magas koncentráció mellett pedig annak kismértékű fokozódása volt megfigyelhető). Itt nem bemutatott kísérleteinkben azt találtuk, hogy a $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ mutáció nem befolyásolta jelentős mértékben a neutrofilek MIP-2 hatására létrejövő in vitro és a tioglikollát peritonitis során való in vivo migrációját sem [8]. Összességében tehát az ITAM-tartalmú adapter-fehérjék valószínűleg nem játszanak érdemi szerepet a neutrofilek sejt-vándorlásában.



7.2.4. A PLC γ 2 részvételének vizsgálata neutrofilek sejtváándorlásában

A következő kísérletekben a PLC γ 2 szerepét vizsgáltuk a neutrofilek vándorlásában a fentiekhez hasonló in vitro és in vivo megközelítésekkel. Amint az a 65. ábra A részén látható, a PLC γ 2 hiánya in vitro Transwell rendszerben nem okozott jelentős változást a neutrofilek fMLP irányában való vándorlásában, bár az alacsonyabb fMLP-koncentrációk melletti részleges károsodás és a magasabb fMLP-koncentrációk melletti kismértékű fokozódás a PLC γ 2^{-/-} sejtek esetében is megfigyelhető volt. A PLC γ 2 szerepét kevert csontvelői kimérákban elvégzett tioglikollát peritonitis módszerrel is vizsgáltuk. Ebben a kísérletsorozatban további kontrollként végeztünk olyan kísérleteket is, melyekben a CD45.1-et expresszáló vad típusú csontvelői sejtek mellett CD45.2-t expresszáló vad típusú sejtek voltak jelen (tehát a vad típusú sejtek egymással való "versengését" vizsgáltuk). Amint az a 65. ábra B részén látható, várakozásaink szerint ezek a sejtek egymáshoz hasonló mértékben voltak képesek felszaporodni a gyulladt peritoneális térben. A PLC γ 2^{-/-} sejtek hasonló módon való vizsgálata kimutatta, hogy a PLC γ 2 hiánya nem csökkentette, sőt kismértékben fokozta is a neutrofilek bejutását a peritoneumba. Az eredmények számszerűsítése során a PLC γ 2^{-/-} neutrofilek relatív migrációs kapacitása a vad típusú sejtek közel kétszeresének adódott (65. ábra C panel).

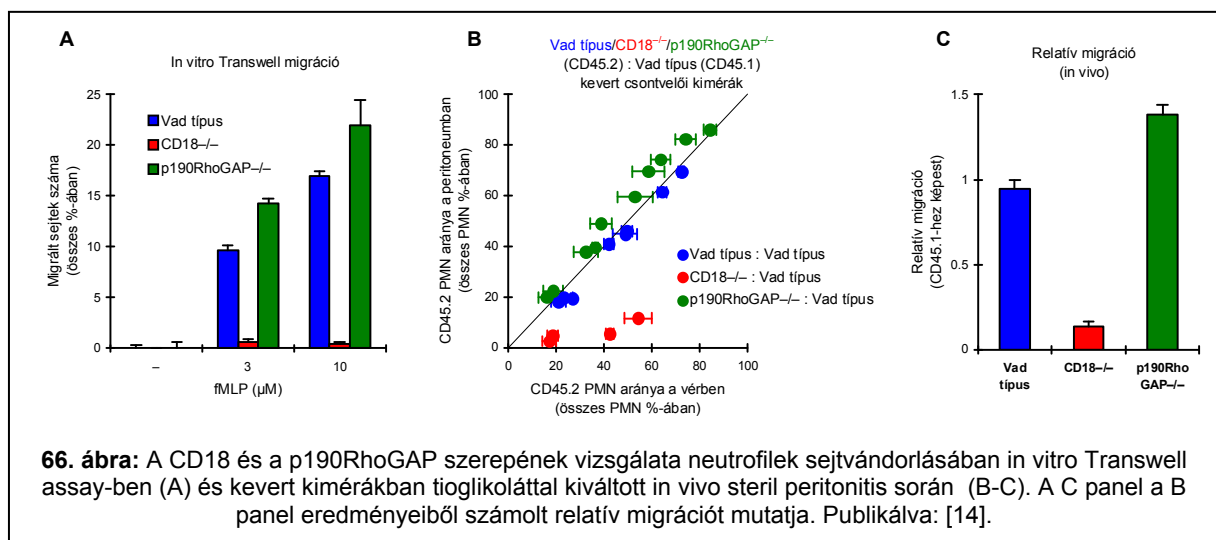


Dr. Markus Sperandio (Ludwig-Maximilians Universität, München, Németország) munkacsoportjával együttműködve további intravitalis mikroszkópos és hisztológiai vizsgálatokat végeztünk a PLC γ 2 leukociták in vivo vándorlásában betöltött szerepének vizsgálatára kívülről adott fMLP-vel kezelt cremaster izom venuláiban. Itt be nem mutatott kísérleteinkben azt találtuk, hogy bár a leukociták éren belüli adhéziója és szétterülése jelentős mértékben károsodott a PLC γ 2 hiányában, ez nem befolyásolta a PLC γ 2^{-/-} leukocitáknak az érfalon való átjutását [13].

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy –a Syk-hez, az Src-kinázokhoz és az ITAM-tartalmú adapter-fehérjékhez hasonlóan– a PLC γ 2 sem játszik elengedhetetlen szerepet a neutrofilek integrin-függő migrációjában.

7.2.5. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata a sejt vándorlásban

A következő kísérletekben a p190RhoGAP szerepét vizsgáltuk neutrofilek in vitro és in vivo migrációja során. A p190RhoGAP-nak a korábbi irodalmi adatok alapján az integrinek jelátvitelében betöltött feltételezett szerepe miatt a kísérleteket párhuzamosan elvégeztük CD18^{-/-} neutrofileken is. Amint az a 66. ábra A részén látható, a p190RhoGAP hiánya az alkalmazott fMLP-koncentrációk mellett nem csökkentette (sőt kismértékben fokozta) a neutrofilek vándorlását in vitro Transwell rendszerben, míg ugyanezen körülmények között a CD18^{-/-} sejtek vándorlása lényegében teljesen megszűnt. A kevert csontvelő-kimérákon végzett in vivo peritonitis-kísérletek során (66. ábra B része) korábbi eredményeinknek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a CD45.1-et expresszáló vad típusú sejtekhez képest a CD45.2-t expresszáló vad típusú sejtek hasonló, a CD18^{-/-} sejtek pedig jelentősen csökkent migrációt mutattak. A p190RhoGAP^{-/-} sejtek ebben a kísérlet-sorozatban a vad típusú sejtekhez hasonlóan viselkedtek, bár kismértékben azoknál nagyobb hatékonysággal is akkumulálódtak a gyulladt peritoneumban. Ezt az összképet az eredményekből számolt relatív migrációs értékek is megerősítették (66. ábra C része).



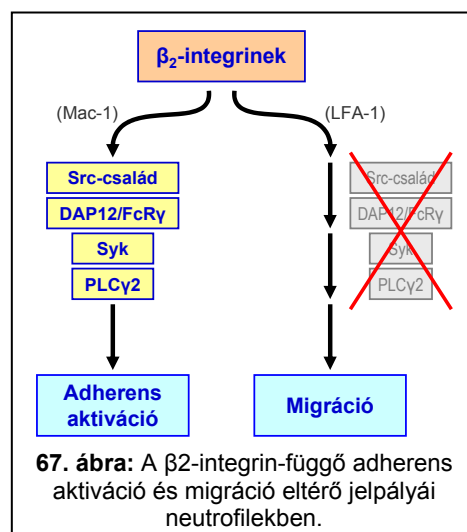
A fentiekén túl Barbara Walzog munkacsoportjával együttműködve in vitro Zigmond-kamrában is vizsgáltuk a p190RhoGAP^{-/-} neutrofilek irányított vándorlását. Itt be nem mutatott kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a p190RhoGAP hiánya egyik vizsgált paraméter szempontjából sem befolyásolta a neutrofilek fMLP-grádiens irányában való vándorlását [14].

Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy a p190RhoGAP sem in vitro, sem in vivo körülmények között nem játszik megkerülhetetlen szerepet a neutrofilek integrin-függő sejt vándorlásában.

7.2.6. Megbeszélés

A neutrofilek sejt vándorlásának fent bemutatott vizsgálata során azt szerettük volna tanulmányozni, hogy a β₂-integrinek jelátvitelében adherens aktiváció során fontos szerepet játszó jelátviteli fehérjék (Syk, DAP12/FcRγ, Src-család és PLCγ2) részt vesznek-e a neutrofilek β₂-integrin-függő migrációs aktivitásában is. Meglepődve tapasztaltuk, hogy a Syk és az Src-típusú kinázok adherens aktivációban betöltött szerepe (25-26. és 28-30. ábra)

[2,33,114] ellenére sem in vitro, sem in vivo körülmények között nem sikerült kimutatnunk a fehérjéknek a sejtmigrációban való elengedhetetlen szerepét (56-58. és 62-63. ábra) [2,10]. További kísérleteinkben hasonló különbséget tapasztaltunk az adherens aktiváció és a sejt vándorlás között a DAP12 és FcR γ (vö. 31-32. és 64. ábrákat) [8], illetve a PLC γ 2 (vö. 40-42. és 65. ábrákat) [13] esetében. Mindezek alapján összességében elmondhatjuk, hogy a neutrofilek β_2 -integrin-függő adherens aktiválódásához és β_2 -integrin-függő sejt vándorlásához különböző jelátviteli folyamatok szükségesek (67. ábra). Míg előbbihez az immunreceptorok jelátviteléhez hasonlóan feltételezhetően elengedhetetlen az Src-család–DAP12/FcR γ –Syk–PLC γ 2 jelátviteli tengely, addig az utóbbihoz ezen fehérjék egyike sem szükséges.



Az β_2 -integrin-függő adherens aktiváció és migráció közti jelátviteli különbség komoly meglepetést váltott ki és eleinte sokan kételkedve fogadták az eredményeinket. Részben ez volt az oka annak, hogy több különböző kísérleti rendszerben és számos kontroll kísérlet közbeiktatásával végeztük a kísérleteinket. Az Src-család–DAP12/FcR γ –Syk–PLC γ 2 jelpálya döntő szerepe ellen négy különböző, közülük két in vitro (Transwell és Zigmond kamra) és két in vivo (tioglikollát peritonitis és a cremaster-izom venuláinak intravitális vizsgálata) migrációs rendszerben kapott eredményeink szólnak. Ezek közül az első három rendszerben saját magunk is megerősítettük a CD18 elengedhetetlen szerepét. Az alkalmazott kísérleti megközelítések (köztük a kevert kimerákon elvégzett önkontrollos peritonitis-kísérletek, illetve a sejtek közvetlen megfigyelése a Zigmond-kamrákban) minimális lehetőséget hagynak az eredmények esetleges félreértelmezésére. Összességében tehát az itt bemutatott nagy mennyiségű kísérleti eredmény együttesen nagyon erős érvet szolgáltat a CD18-on keresztüli kétféle sejtválasz különbözőségére.

A β_2 -integrin-függő adherens aktiváció és migráció jelátviteli folyamatai közti különbség oka mindmáig nem tisztázott. Elképzelhető, hogy a két folyamat során a β_2 -integrinek jelpályája már nagyon korán kettéválik és elkülönül egymástól. Elképzelhető az is, hogy a sejt vándorlás során a β_2 -integrinek csak mint passzív adhézións receptorokra van szükség, de ezek a receptorok nem indítanak el a sejt vándorlás szempontjából fontos jelátviteli folyamatokat. Az is elképzelhető, hogy az Src-család–DAP12/FcR γ –Syk–PLC γ 2 jelpálya olyan speciális (pl. citoskeletális) folyamatok kiváltásában játszik szerepet, melyek szükségesek az adherens aktivációhoz (szétterülés, szuperoxid-termelés, degranuláció) de nem vesznek részt a sejtmigráció létrejöttében. Végül nem szabad elfeledkeznünk arról sem, hogy a CD18 genetikai hiánya nem csak egyetlen molekulapár, hanem a β_2 -integrinek családjába tartozó több különböző homodimer expresszióját csökkenti. Elképzelhető, sőt egyes irodalmi adatok és saját nem publikált eredményeink utalnak is rá, hogy ezek közül az adherens aktivációban elsősorban a Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$; CD11b/CD18), míg a migrációban az LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18) vesz részt. Ebben az esetben elképzelhető, hogy az Src-család–DAP12/FcR γ –Syk–PLC γ 2 jelpálya specifikusan a Mac-1 jelátvitelében szerepel (pl. az α_M lánc jelátviteli folyamatain keresztül), így szükséges a Mac-1-függő adherens aktivációhoz, de nem vesz részt az LFA-1-függő migrációs folyamatokban (67. ábra)

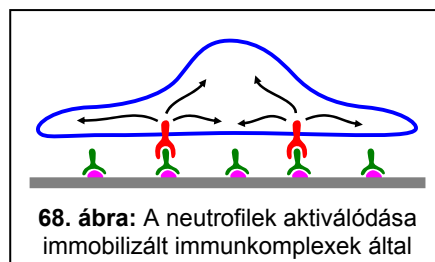
Összességében elmondhatjuk, hogy a fent bemutatott migrációs kísérletek által sikerült tisztáznunk a β_2 -függő sejtváándorlás jelátvitelének fontos aspektusait, melyek új megvilágításba helyezték a neutrofilek vándorlásának mechanizmusáról alkotott elképzeléseinket.

7.3. Az Fc-receptorok szerepének és jelátvitelének vizsgálata neutrofilekben

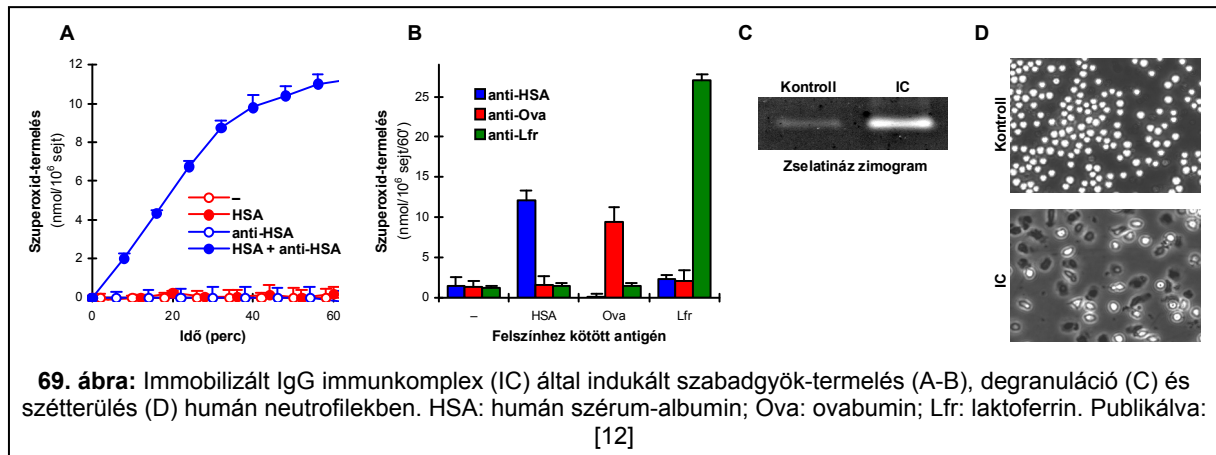
Az immunkomplexek általi neutrofil-aktiváció fontos pathogenetikai szerepet játszik számos betegség, köztük az autoimmun vasculitisek, egyes glomerulonephritis-formák és a reumatoid arthritis patomechanizmusa egyes aspektusainak létrejöttében. Mivel ezen esetekben a neutrofilek aktivációja elsősorban felülethez kötött IgG immunkomplexeken keresztül jön létre, munkacsoportunkban beállítottuk és vizsgáltuk a neutrofilek immobilizált immunkomplexek általi aktivációját.

7.3.1. Neutrofilek aktiválódása immobilizált immunkomplexek által

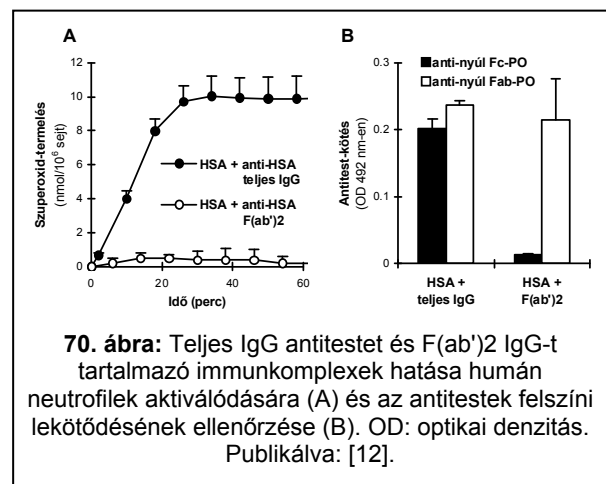
A neutrofilek immunkomplexek általi aktiválódását a sejtek immobilizált immunkomplex-felszínre helyezésével értük el további szolúbilis stimulus alkalmazása nélkül (68. ábra). Ezen kísérletek során ELISA-lemezek üregeit először antigén-oldattal, majd (a szabad kötőhelyek blokkolása után) az adott antigén elleni antitest oldatával inkubáltuk. Az így kezelt felszínre helyeztük a neutrofileket, majd vizsgáltuk azok funkcionális válaszkészségét.



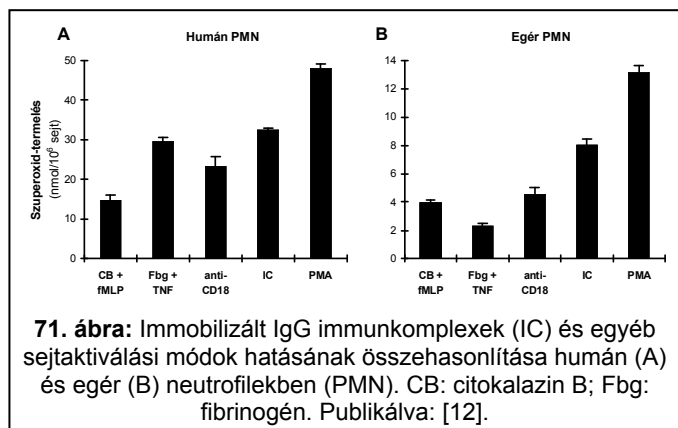
Kísérleteink első részében humán neutrofileken vizsgáltuk az immobilizált immunkomplexek által kiváltott sejtválaszokat. Amint az a 69. ábra A részén látható, humán szérumalbumin (HSA) és nyúl poliklonális anti-HSA antitestek által képzett immobilizált immunkomplexek a humán neutrofilek nagymértékű szabadgyök-termelését váltották ki, míg bármelyik komponens elhagyása esetén a válasz nem jött létre. HSA–anti-HSA immunkomplexeken kívül jól mérhető választ kaptunk az ovalbumin (Ova) és anti-Ova, illetve a laktoferrin (Lfr) és anti-Lfr immunkomplexekkel is, míg a nem azonos specificitású antigén-antitest párok nem váltottak ki sejtaktiválódást (69. ábra B része). Az immobilizált immunkomplexek a szuperoxid-termelés mellett a zselatináz-granulumok ürülését és a sejtek szétterülését is kiváltották (49. ábra C-D része).



Annak igazolására, hogy a fenti sejtválaszokat az alkalmazott immunglobulinok Fc része váltja ki, pepszines hasítás révén a poliklonális anti-HSA antitestből $F(ab')_2$ fragmenseket készítettünk, és ezekkel is megkíséreltük a humán neutrofilek aktiválását. Amint a 70. ábra A részén látható, az anti-HSA antitest $F(ab')_2$ fragmense nem volt képes a neutrofilek aktiválására. Annak ellenőrzésére, hogy a sejtválasz hiánya nem az $F(ab')_2$ fragmensek leköötődésének a zavara miatt jön-e létre, az antitestek Fab és Fc részeire specifikus másodlagos antitestekkel megvizsgáltuk a különböző anti-HSA antitest-preparátumok leköötődését az immobilizált HSA-hoz. Várakozásainknak megfelelően a nyúl IgG Fc-része ellen termeltetett másodlagos antitest csak a teljes anti-HSA leköötésekor adott jelet, míg a nyúl IgG Fab-részét felismerő másodlagos antisszel a leköötött teljes anti-HSA antitestek és anti-HSA $F(ab')_2$ fragmensek egyaránt jelölődtek. Az $F(ab')_2$ fragmenseket tehát sikerült hatékonyan lekötnünk az immobilizált HSA antigénekhez, de az $F(ab')_2$ -t tartalmazó immunkomplexek az Fc-rész hiánya miatt nem voltak képesek a neutrofilek aktiválására.



A következőkben összehasonlítottuk a neutrofilek immobilizált immunkomplexek általi aktiválásának a mértékét a sejtek más módon való aktiválásával. Amint az a 71. ábrán látható, az immunkomplex-kiváltotta szabadgyök-termelés mind humán, mind egér neutrofilek esetében meghaladta az egyéb alkalmazott fiziológiás stimulusok, köztük a citokalazin-B-előkezelés után alkalmazott fMLP, a fibrinogén-felszínen adott TNF vagy az immobilizált anti-CD18 antitestek által kiváltott sejtválaszokat és megközelítette a sejtek legerősebb

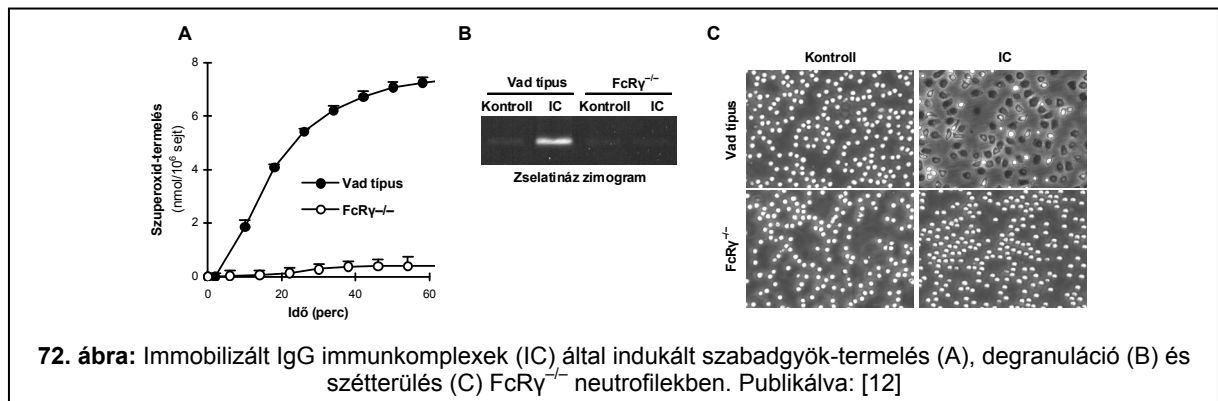


ismert aktivátorának, a nem-fiziológiás mechanizmusokon keresztül ható PMA-nak a hatását.

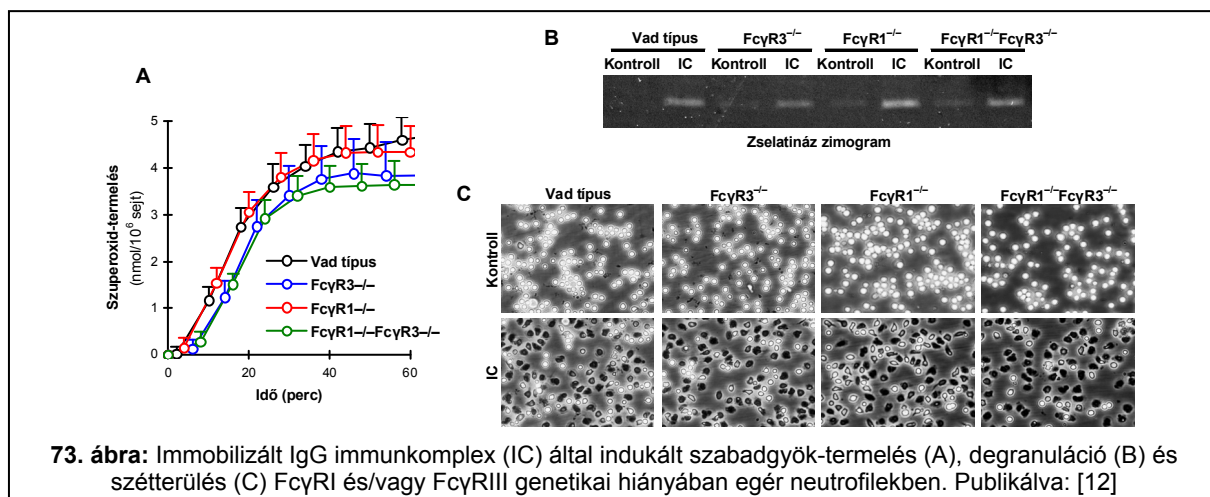
7.3.2. Fc-receptorok azonosítása neutrofilek immunkomplex-általi aktivációjában

Bár az immunkomplex-mediált neutrofil aktiváció által kiváltott kórfolyamatokat leggyakrabban kísérleti egereken modellezik, kísérleteink kezdetén egyáltalán nem volt ismert, hogy mely Fc-receptorok vesznek részt az egér neutrofilek immunkomplex-indukált aktiválódásában. Ennek egyik lehetséges magyarázata az volt, hogy az egér neutrofilek felszínén nagy mennyiségben jelen levő FcγRIV fehérjét csak kísérleteink előtt néhány évvel azonosították [130]. A következőkben ezért megpróbáltuk azonosítani az egér neutrofilek immunkomplex-kiváltotta aktiválódásában szerepet játszó Fc-receptorokat.

Amint azt az 72. ábra mutatja, FcRγ^{-/-} neutrofilekben teljesen megszűnt az immunkomplex-indukált szabadgyök-termelés, degranuláció és szétterülés. Ez arra utalt, hogy az immunkomplexek FcRγ-hoz kapcsolódó Fc-receptorokon keresztül aktiválják az egér neutrofileket.

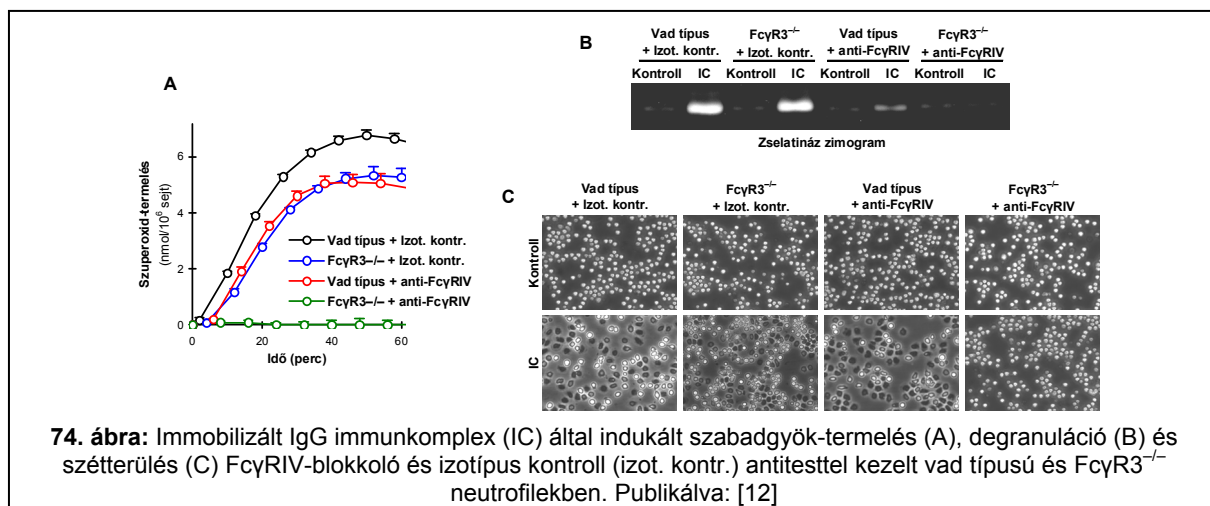


Az egér mieloid sejtek felszínén jelen levő FcRγ-asszociált receptorok közül legismertebbek az FcγRIII és az FcγRI, melyek közül az előbbi nagy mennyiségben van jelen egér neutrofilek felszínén, de az utóbbi is megjelenhet a sejtek aktivációja során [131]. Amint azt az 74. ábra mutatja, önmagában sem az FcγRIII, sem az FcγRI törlése, de még a két receptor együttes hiánya sem okozta a neutrofilek immunkomplex-indukált válaszképességének a jelentős károsodását (bár az FcγRIII hiánya a sejtválaszok enyhe csökkenését hozta létre). Feltételezhető volt tehát, hogy egy további FcRγ-asszociált receptor ilyen körülmények között is képes létrehozni a neutrofilek aktiválódását.



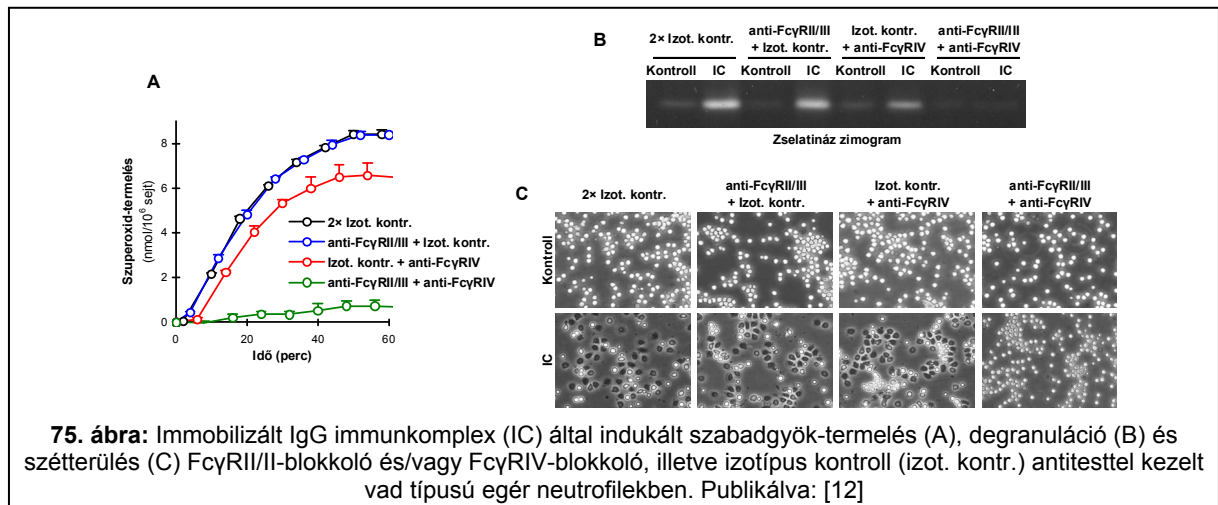
A jelen kísérletsorozatot pár évvel megelőzően Nimmerjahn és munkatársai [130] azonosítottak egy új Fcγ-asszociált Fcγ-receptort, az FcγRIV-et, mely nagy mennyiségben expresszáldott egér neutrofilek felszínén. Bár az FcγRIV autoimmun betegségmodellekben betöltött szerepét többen is vizsgálták, nem volt tiszta, hogy mely sejt típusokon és milyen sejt válaszokban vesz részt a fehérje. A következőkben megvizsgáltuk az FcγRIV blokkolásának a hatását vad típusú és FcγR3^{-/-} neutrofilek immunkomplex-indukált aktiválódásában.

Amint a 74. ábra A részén látható, mind az FcγR3^{-/-} mutáció, mind az FcγRIV blokkolása kismértékben csökkentette a neutrofilek válaszkészségét, de egyik sem okozta az immunkomplex-indukált szabadgyök-termelés jelentős csökkenését. A két beavatkozás kombinációja (tehát az FcγRIV blokkolása FcγR3^{-/-} sejteken) azonban a szuperoxid-termelés teljes gátlását eredményezte. Ezzel összevethető képet mutatott a degranuláció és a szétterülés vizsgálata, melyeket szintén teljes mértékben gátolt az FcγRIII és az FcγRIV együttes inaktiválása (74. ábra B-C része).



A fenti eredményeket ezután megpróbáltuk megismételni oly módon, hogy antitestekkel blokkoltuk az FcγRIII-t és/vagy az FcγRIV-et. Az FcγRIII esetében ehhez az egér FcγRIII-t és a gátló hatású FcγRIIB-t együttesen gátló FcγRII/III-blokkoló antitesteket alkalmaztunk. Amint az a 75. ábrán látható, a két blokkoló antitest együttes alkalmazása

lényegében megszüntette a neutrofilek szabadgyök-termelését, degranulációját és szétterülését, míg külön-külön egyik antitestnek sem volt jelentős hatása.

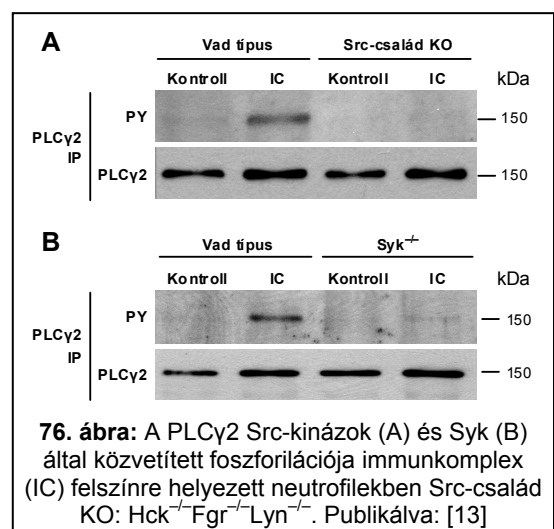


Fenti kísérleteinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy egér neutrofilek immobilizált immunkomplexek általi aktiválódásában elengedhetetlen szerepe van az FcγRIII és FcγRIV fehérjéknek, de a két fehérje jelentősen átfedő funkcióval rendelkezik és nagyrészt képesek a másik hiányának vagy inaktíválásának a hatását kompenzálni.

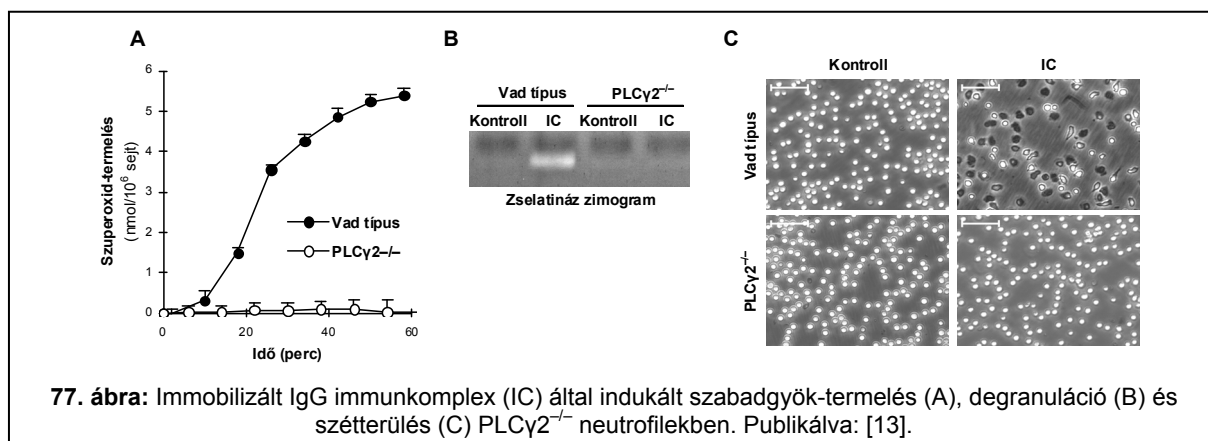
További, itt nem bemutatott kísérleteinkben megvizsgáltuk humán neutrofilek hasonló körülmények között létrejövő aktiválódásának a mechanizmusát, különösen mivel a humán neutrofilek az egér neutrofilektől jelentősen eltérő Fc-receptorokat expresszálnak (nincs rajtuk jelen FcγRIV, de expresszálnak két speciális másik Fcγ-receptort, a receptor ligand-kötő láncában ITAM-et hordozó FcγRIIA-t és a GPI-horgonnyal a plazmamembránhoz kötődő FcγRIIIB-t). Blokkoló antitestek alkalmazásával az irodalmi adatokkal egybecsengően azt találtuk, hogy a humán neutrofilek immunkomplexek általi aktiválódásához az FcγRIIA és az FcγRIIIB egyaránt szükséges (tehát az egyik blokkolása esetén a másik lényegében nem képes a funkcionális kompenzációra) [12].

7.3.3. A PLCγ2 szerepe neutrofilek immunkomplex-indukált aktivációjában

A következő kísérletekben a PLCγ2 aktiválódását és esetleges szerepét vizsgáltuk neutrofilek immunkomplex-indukált aktiválódása során. Amint az a 76. ábrán látható, az immunkomplex-felszínre helyezett neutrofilekben a PLCγ2 foszforilációja volt megfigyelhető, és ehhez a foszforilációhoz szükséges volt az Src-kinázok (Hck, Fgr és Lyn), illetve a Syk jelenléte. További nem-publikált eredményeink szerint a neutrofilek intracelluláris Ca²⁺-raktárainak a depletálása az immunkomplex-kiváltotta sejtválaszok megszűnését eredményezte. Mindezek a Ca²⁺-szignált létrehozni képes PLCγ2 lehetséges szerepére utaltak.

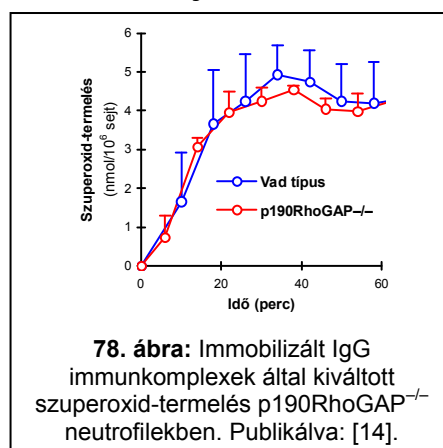


Ezután megvizsgáltuk, hogy hogyan változnak az immunkomplex-kiváltotta sejtválaszok PLCy2^{-/-} neutrofilekben. Amint az a 77. ábra A részén látható, a PLCy2 hiánya lényegében megszüntette a neutrofilek immunkomplex-felszínen kialakuló szuperoxid-termelését. Hasonló gátlás volt megfigyelhető a zselatináz-granulumok ürülése és a sejtek szétterülése esetén is. A PLCy2 tehát fontos funkcionális szerepet tölt be a neutrofilek Fc-receptorokon keresztüli aktiválódásában.



7.3.4. A p190RhoGAP vizsgálata az immunkomplex-indukált sejtaktivációban

Utoljára megvizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e a p190RhoGAP a neutrofilek immunkomplex-kiváltotta sejtválaszaiban. Amint azt a 78. ábra mutatja, az immunkomplex-felszínre helyezett p190RhoGAP^{-/-} neutrofilek a vad típusú sejtekhez hasonló mértékben termeltek szuperoxid szabadgyököket. A p190RhoGAP teát feltételezhetően nem játszik elengedhetetlen szerepet a neutrofilek Fc-receptorokon keresztüli aktiválódásában.



7.3.5. Megbeszélés

Ebben a fejezetben az egér neutrofilek immobilizált IgG immunkomplexeken keresztüli aktiválódásának mechanizmusát vizsgáltuk. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az immunkomplexek által kiváltott sejtválaszokhoz elengedhetetlen két FcRγ-asszociált aktiváló hatású Fcγ-receptor, az FcγRIII és az FcγRIV (72. és 74-75. ábra) [12]. Ezen kísérleteinkben elsőként sikerült egy IgG-függő celluláris hatást rendelnünk az újonnan leírt FcγRIV-hez. További kísérleteinkben igazoltuk, hogy az ily módon kiváltott sejtválaszok a PLCy2 közreműködésével jönnek létre (77. ábra) [13]. Egyelőre nem publikált előzetes eredményeink szerint az immunkomplex-indukált sejtválaszokhoz szükségesek az Src-kinázok (Hck, Fgr és Lyn) és a Syk is. Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az egér neutrofilek immunkomplex-indukált aktivációja során feltételezhetően fontos szerepet játszik az FcγRIII és FcγRIV receptorokból kiinduló Src-család–FcRγ–Syk–PLCy2 jelpálya.

7.4. A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitel neutrofilekben és hízósejtekben

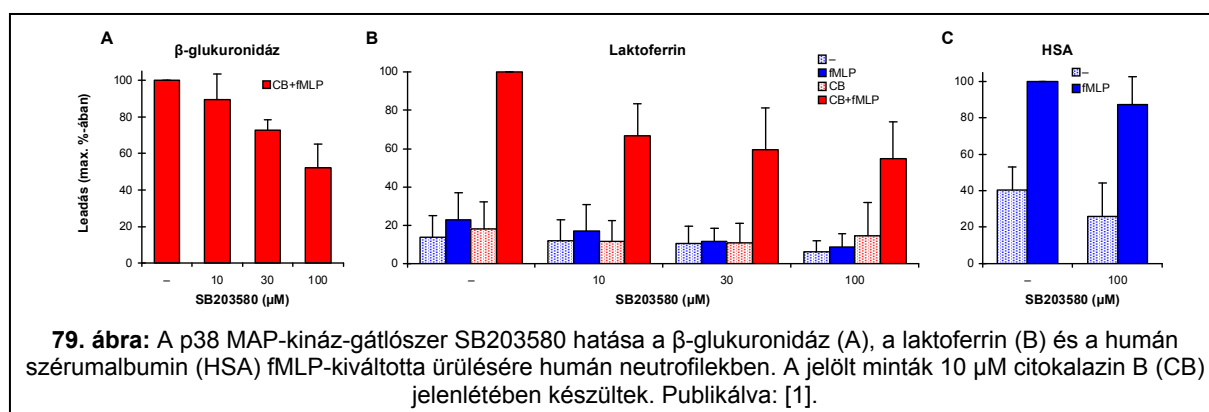
A neutrofilek aktiválódásának számos aspektusát G-fehérje-kapcsolt receptorok közvetítik. Ezek közé tartozik a behatoló baktériumokból és a szövetkárosodás során a sérült mitokondriumokból felszabaduló fehérjék formil-peptid-receptorok általi felismerése; a különböző gyulladásos mediátorok (C5a, LTB₄, PAF, stb.) érzékelése vagy az elsősorban a sejtek migrációját szabályozó kemokinek felismerése. A következőkben bemutatott kísérleteinkben a neutrofilek G-fehérjéken keresztüli jelátvitelének különböző aspektusait vizsgáltuk.

7.4.1. Src-kinázok és a p38 MAP-kináz szerepe az fMLP-kiváltotta degranulációban

PhD-tevékenységem kezdetén kimutattuk, hogy a neutrofilek fMLP által kiváltott válaszai jelentős mértékben gátlhatók általános tirozin-kináz-gátlószerekkel [31]. Kimutattuk továbbá, hogy bár a tirozin-kináz-gátlószerek gátolják az ERK fMLP-kiváltotta foszforilációját, az ERK gátlása nem okoz a tirozin-kináz-gátlószerekhez hasonló funkcionális károsodást [31]. További, itt be nem mutatott kísérleteinkben kiterjesztettük ezen eredményeinket más granulum-populációkra is, és kimutattuk, hogy az fMLP a p38 MAP-kináz aktivációját is kiváltja és hogy ez a folyamat szintén gátlható tirozin-kináz-gátlószerekkel [1], ami felvetette annak a lehetőségét, hogy a neutrofilek fMLP-kiváltotta degranulációs aktivitását a tirozin-kinázok részvételével aktiválódó p38 MAP-kináz közvetíti.

A következő kísérletekben megvizsgáltuk a p38 MAP-kináz gátló SB203580 hatását humán neutrofilek degranulációs aktivitására. A különböző granulum-populációk közül a primer-granulum-marker β -glukuronidáz ürítését az irodalomban elfogadott módon citokalazin B (CB) jelenlétében, a szekunder granulumokból ürített laktoferrin leadását CB jelenlétében és CB nélkül is, míg a szekretoros vezikulákban található humán szérumalbumin (HSA) leadását csak CB nélkül vizsgáltuk.

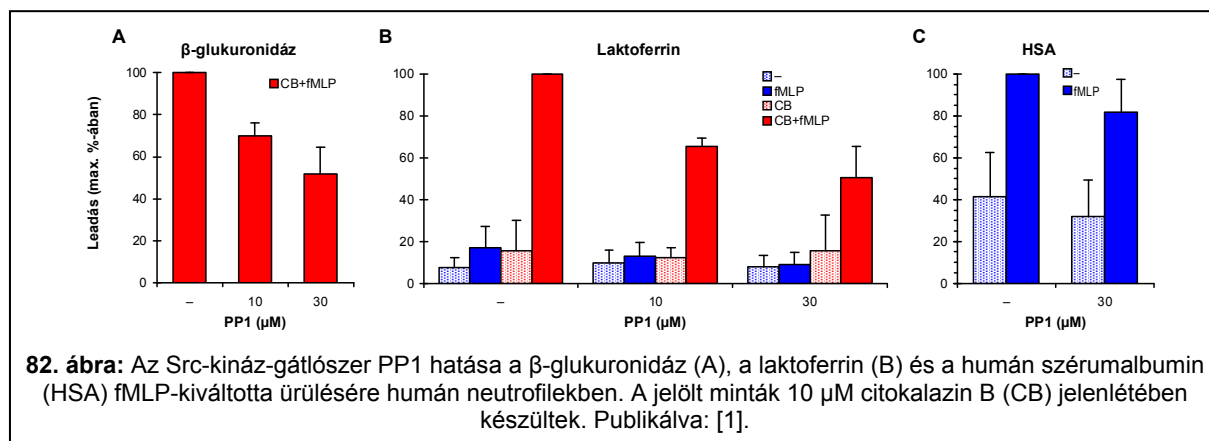
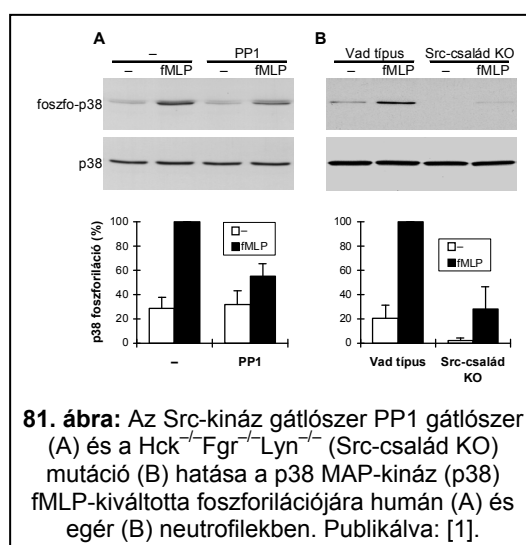
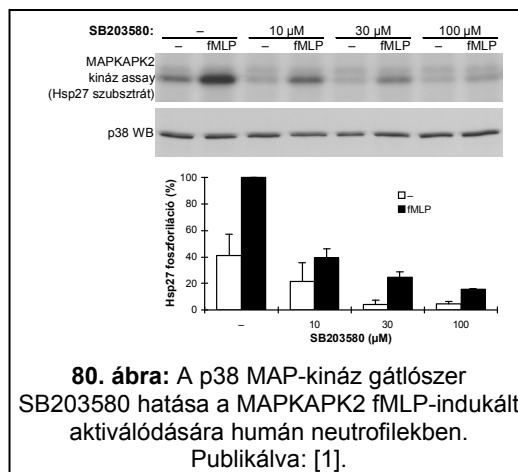
Amint az a 79. ábrán látható, az SB203580 koncentráció-függő módon részben gátolta mind a β -glukuronidáz, mind a laktoferrin ürítését (utóbbit CB jelenlétében és hiányában egyaránt). A HSA leadására ezzel szemben az SB203580-nak még a legmagasabb alkalmazott koncentrációban sem volt érdemi hatása.



Az SB203580 általi gátlás értékelhetősége érdekében megvizsgáltuk a vegyület hatását a p38 MAP-kináz szubsztrátjának, a MAPKAP-kináz 2-nek (MAPKAPK2) az aktiválódására. Amint az a 80. ábrán látható, az SB203580 az alkalmazott 10-100 μM koncentrációban koncentráció-függő módon gátolta a MAPKAPK2 aktiválódását és az alkalmazott legnagyobb koncentrációban kb. 85%-os gátlást eredményezett.

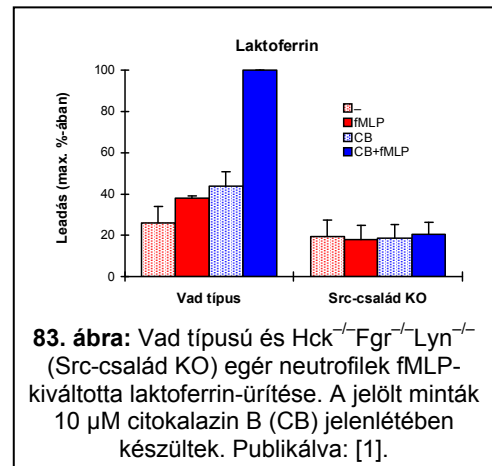
A következő kísérletekben a p38 MAP-kináz aktiválásában szerepet játszó tirozin-kinázokat próbáltuk azonosítani. PhD-munkám során végzett előzetes kísérleteink alapján felmerült az Src-típusú kinázok szerepe a neutrofilek G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli aktiválódásában [33]. Ezért a következőkben farmakológiai vagy genetikai megközelítésekkel vizsgáltuk az Src-kinázok szerepét a p38 MAP-kináz fMLP-kiváltotta aktiválódásában. Amint az a 81. ábrán látható, a p38 MAP-kináz fMLP hatására létrejövő foszforilációját mind az Src-család PP1 gátlószere (A panel), mind a neutrofilekben jelen levő Src-kinázok genetikai hiánya ($\text{Hck}^{-/-}\text{Fgr}^{-/-}\text{Lyn}^{-/-}$ mutáció) jelentős mértékben gátolta. Az Src-típusú kinázok tehát feltételezhetően a p38 MAP-kináztól proximálisan helyezkednek el az fMLP-receptorok jelpályájában.

Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van a PP1-nek humán neutrofilek fMLP-kiváltotta degranulációs aktivitására. Amint az a 82. ábra A-B részén látható, a PP1 koncentráció-függő módon gátolta a primer-granulum-marker β -glukuronidáz és a szekunder-granulum-marker laktoferrin ürítését (utóbbit CB jelenlétében és hiányában egyaránt). A PP1 azonban a legmagasabb (30 μM) koncentrációban sem befolyásolta érdemben a szekretoros vezikulákban található HSA kiürülését.



Az Src-kinázoknak az fMLP-kiváltotta degranulációban való szerepét a szekunder granulumok esetében genetikai megközelítéssel is vizsgáltuk. Amint az a 83. ábrán látható, a Hck, Fgr és Lyn együttes genetikai hiánya mind CB jelenlétében, mind annak hiányában lényegében teljesen megszüntette a laktoferrin fMLP-kiváltotta ürülését. Ezek a genetikai vizsgálatok megerősítették az Src-típusú tirozin-kinázok szerepét a neutrofilek G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli aktiválódásában.

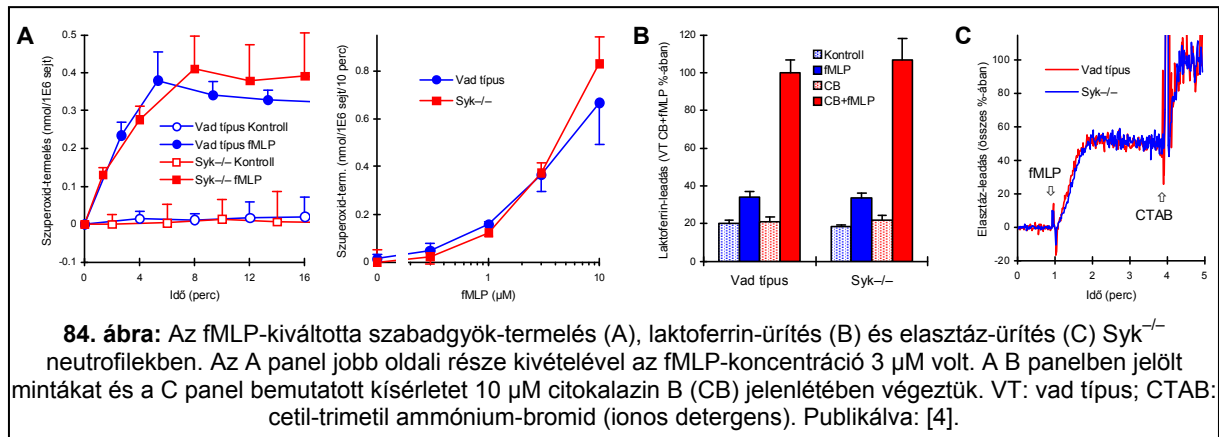
Összességében elmondhatjuk, hogy az itt bemutatott kísérletsorozat az Src-kinázok közreműködésével aktiválódó p38 MAP-kináz szerepét igazolta a neutrofilek primer és szekunder granulumainak formil-peptidek által kiváltott kiürülésében. Ez a jelpálya ugyanakkor valószínűleg nem vesz részt a szekretoros vezikulák fMLP-kiváltotta exocitózisában.



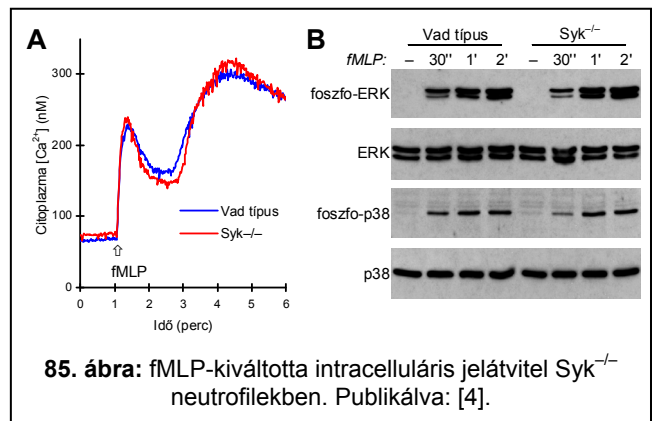
7.4.2. A Syk szerepének vizsgálata G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében

Korábbi irodalmi adatok arra utaltak, hogy a Syk fontos szerepet játszhat a G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében ([132-137]). Ezen eredmények döntő többsége azonban vagy korlátozott specificitással rendelkező gátlószerek (pl. piceatannol) alkalmazására vagy heterológ expressziós rendszereken készült kísérletekre (melyekben a Syk szerepét idegen sejt környezetben, nem-természetes agonistákon és receptorokon keresztül vizsgálták) épült. Az Src-kinázok és a p38 MAP-kináz szerepével kapcsolatos fenti kísérletsorozattal párhuzamosan farmakológiai és biokémiai módszerekkel magunk is vizsgáltuk a Syk szerepét a neutrofilek fMLP-kiváltotta degranulációja során [1]. Bár a Syk-et gátló piceatannol gátolta a neutrofilek fMLP hatására létrejövő degranulációját és a p38 MAP-kináz aktiválódását, a Syk foszforilációját nem sikerült kimutatnunk. Mindezek együttesen komoly bizonytalanságot jelentettek a Syk-nek a G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli jelátvitelben betöltött szerepével kapcsolatban. A kérdés tisztázása érdekében a következőkben bemutatott kísérletsorozatban genetikai megközelítéssel, primer sejtek endogén receptorokon keresztüli aktiválásával és fiziológiás sejtválaszok mérésével részletesen megvizsgáltuk a Syk szerepét a neutrofilek és a hízósejtek G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli jelátviteli folyamataiban.

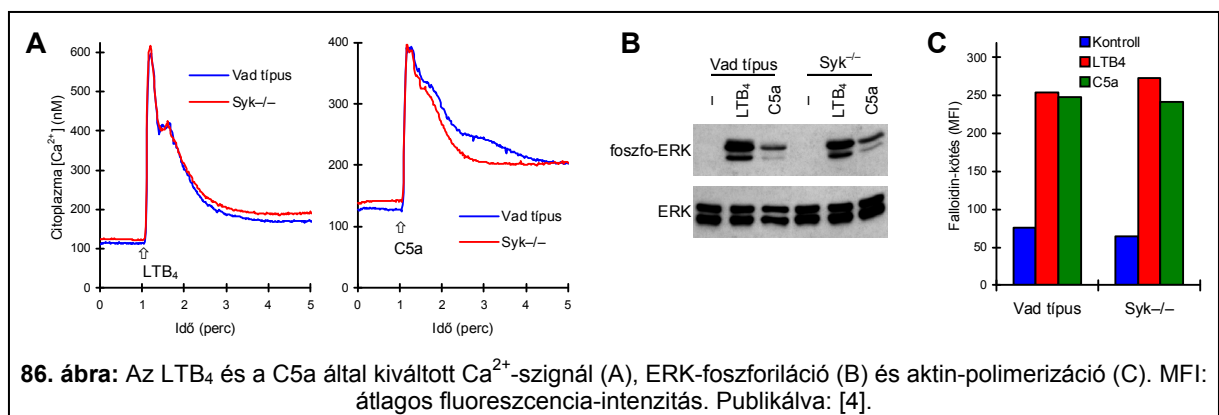
Először a neutrofilek fMLP által, Gi-fehérjéhez kapcsolt formil-peptid-receptorokon keresztüli aktivációját vizsgáltuk. A Syk genetikai hiánya nem befolyásolta sem az fMLP hatására létrejövő szabadgyök-termelés kinetikáját, sem annak az fMLP-koncentrációtól való függését (84. ábra A panel). Hasonló eredményeket kaptunk CB-vel előkezelt sejteken is [4]. A Syk^{-/-} mutáció sem CB jelenlétében, sem annak hiányában nem befolyásolta a neutrofilek fMLP hatására létrejövő laktoferrin-ürítését sem (84. ábra B panel). A primer granulumokban található elasztáz CB jelenlétében fMLP hatására kiváltott ürülése szintén hasonló volt a vad típusú és Syk^{-/-} neutrofilekben (84. ábra C panel).



A következőkben egyes fMLP-kiváltotta intracelluláris jelpályák aktiválódását vizsgáltuk. A $Syk^{-/-}$ mutáció nem befolyásolta az fMLP hatására létrejövő Ca^{2+} -szignál lefutását sem normál extracelluláris médiumban (85. ábra A panel) sem amikor a külső Ca^{2+} -koncentrációt kelátorok alkalmazásával olyannyira lecsökkentettük, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -szignált kizárólag a sejtek Ca^{2+} -raktárainak az ürülése hozta létre [4]. A Syk hiánya nem befolyásolta érdemben az ERK és a p38 MAP-kináz fMLP-kiváltotta foszforilációját (85. ábra B panel) és az aktin polimerizációját [4] sem.

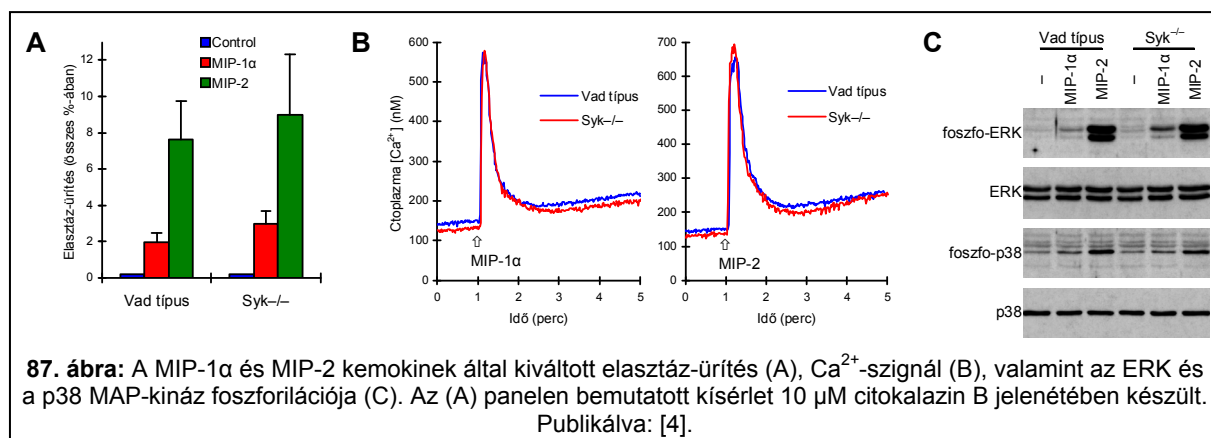


Ezután két másik Gi-fehérjéhez kapcsolt neutrofil aktivátor, az LTB₄ leukotrién és a C5a komplement-fragmentum hatására létrejövő jelátviteli folyamatokat vizsgáltuk. Amint az a 86. ábra A részén látható, a Syk hiánya nem befolyásolta sem az LTB₄, sem a C5a hatására létrejövő Ca^{2+} -jelet. A $Syk^{-/-}$ neutrofilekben mind az LTB₄, mind a C5a normális ERK-foszforilációt (86. ábra B panel) és aktin-polimerizációt (86. ábra C panel) váltott ki.

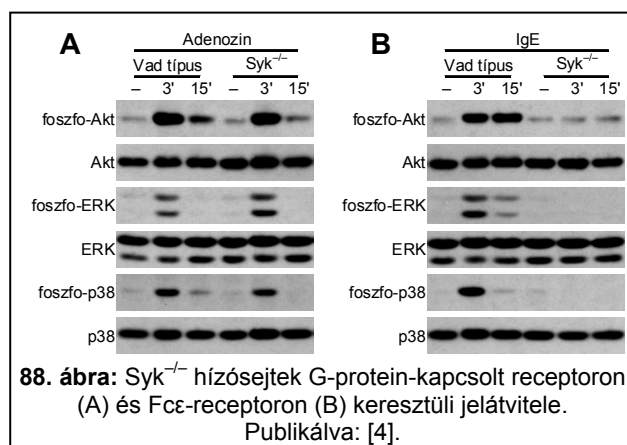


Végül két kemokin, a MIP-1 α és a MIP-2 neutrofilekre kifejtett hatását vizsgáltuk (mindkettő Gi-kapcsolt receptorokon keresztül aktiválja a neutrofileket). Amint azt a 87. ábra A része mutatja, a Syk hiánya CB-előkezelt neutrofilekben nem befolyásolta a MIP-1 α és a

MIP-2 által kiváltott elasztáz-ürítést. A két kemokin által kiváltott Ca^{2+} -szignál (87. ábra B panel), az ERK és a p38 MAP-kináz foszforilációja (87. ábra C panel), valamint az aktin-polimerizáció [4] szintén a vad típusú sejtekhez hasonlónak bizonyult.



Utoljára azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a Syk szerepet játszik-e egyéb sejtek G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli aktiválódásában. Ezért Toshiaki Kawakami (La Jolla Institute of Allergy and Immunology, La Jolla, CA, USA) munkacsoportjával együttműködve megvizsgáltuk a csontvelői sejtekből in vitro differenciáltatott hízósejtek adozin hatására, Gi-fehérjéhez kapcsolt receptorokon [138] keresztüli aktiválódását. Kontrollként megvizsgáltuk

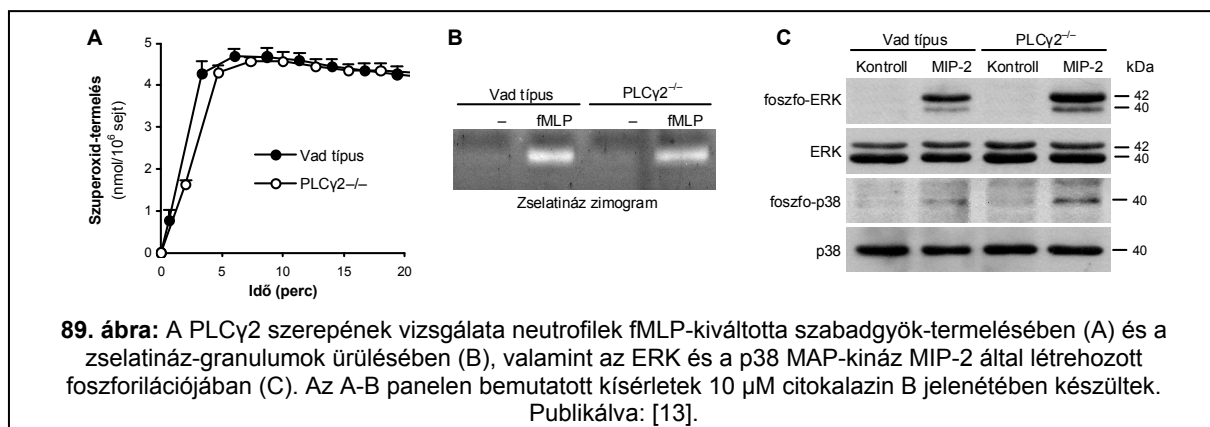


ugyanezen sejtek IgE keresztükötés hatására Fcε-receptorokon keresztül létrejövő (feltételezetten ITAM- és Syk-mediált) aktiválódását is. Amint azt a 88. ábra A része mutatja, a Syk hiánya nem befolyásolta az Akt, az ERK és a p38 MAP-kináz adozin hatására létrejövő foszforilációját, míg ugyanezen fehérjék IgE-kesztükötés hatására létrejövő foszforilációja teljesen megszűnt a Syk^{-/-} hízósejtekben (88. ábra B panel).

Mindezek az eredmények összességében arra utaltak, hogy a Syk sem neutrofilekben, sem hízósejtekben nem szükséges a G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátviteléhez.

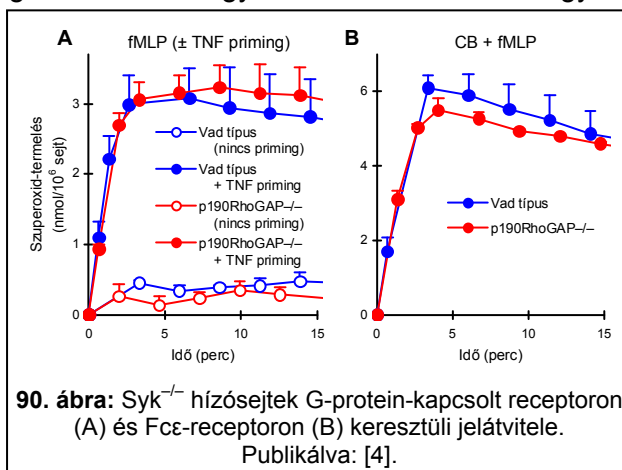
7.4.3. A PLCγ2 szerepének vizsgálata G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében

A PLCγ2 neutrofilekben betöltött szerepének vizsgálata során szintén vizsgáltuk a G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelét. Amint az a 89. ábrán látható, a PLCγ2 hiánya nem befolyásolta a CB-vel előkezelt sejtek fMLP-kiváltotta szuperoxid-termelését (A panel) és zselatináz-ürítését (B panel), és nem volt érdemi hatással az ERK és a p38 MAP-kináz MIP-2 által létrehozott foszforilációjára sem. A PLCγ2 tehát feltételezhetően nem játszik lényeges szerepet a neutrofilek Gi-fehérjéken keresztüli aktiválódásában.



7.4.4. A p190RhoGAP vizsgálata G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében

A p190RhoGAP szerepének vizsgálata során röviden megvizsgáltuk a fehérje esetleges részvételét a neutrofilek fMLP által kiváltott szabadgyök-termelésére is. Amint azt a 90. ábra A része mutatja, fMLP önmagában csak nagyon kismértékű szabadgyök-termelést mutatott, ami összehasonlítható mértékű volt vad típusú és p190RhoGAP^{-/-} sejtekben. A p190RhoGAP hiánya nem befolyásolta a TNF-előkezeléssel ("priming") érzékenyített vagy CB-vel előkezelt sejtek fMLP-kiváltotta szabadgyök-termelését sem (90. ábra A-B panel). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a p190RhoGAP nem tölt be általános és elengedhetetlen szerepet a neutrofilek G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztüli aktiválódásában.



7.4.5. Megbeszélés

A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelével kapcsolatos kísérleteink első részében kimutattuk, hogy az Src-típusú tirozin-kinázok közvetítésével aktiválódó p38 MAP-kináz fontos szerepet játszik a neutrofilek primer és szekunder granulomok fMLP hatására létrejövő degranulációjában, de nem vesz részt a szekretoros vezikulák ürítésében (79-83. ábra) [1]. Ezáltal egyrészt sikerült azonosítanunk egy, az fMLP-kiváltotta degranulációban fontos szerepet játszó jelpályát, másrészt igazoltuk, hogy a valódi granulomok és a szekretoros vezikulák exocitózisa különböző folyamatokon keresztül történik.

A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelével foglalkozó kísérleteink második részében a Syk szerepét vizsgáltuk neutrofilek és hízósejtek Gi-fehérjéken keresztüli aktiválódásában. Ezt a kísérletsorozatot azon korábbi közlemények ihlették, melyek meglehetősen bizonytalan módszertani megközelítések (az ismerten kevésbé specifikus piceatannol gátlószer és heterológ expressziós rendszerek) alkalmazásával korábban arra a következtetésre jutottak, hogy a Syk fontos szerepet játszik a G-fehérje-kapcsolt receptorok működésében [132-137]. További bizonytalanságot okoztak saját korábbi eredményeink, melyek során kimutattuk, hogy bár a piceatannol gátolja a neutrofilek egyes fMLP-kiváltotta exocitotikus és jelátviteli folyamatait, a Syk aktiválódását ezen körülmények között nem sikerült kimutatnunk [1]. Ezek

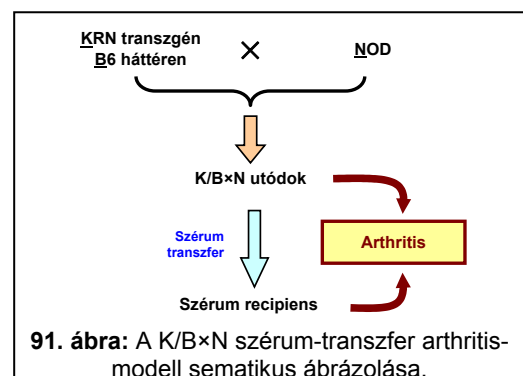
együttesen arra sarkalltak bennünket, hogy a Syk esetleges szerepét a fentieknél megbízhatóbb körülmények között vizsgáljuk meg. Kísérleti megközelítésünk lényeges vonásai a következők voltak: 1) genetikai megközelítés a Syk gén teljes törlésével; 2) primer sejtek alkalmazása; 3) endogén receptorokon keresztüli aktiváció; 4) fiziológias sejtválaszok és jelátviteli folyamatok vizsgálata; 5) többféle rendszer (több sejtípus, több ligand és több sejtválasz) párhuzamos vizsgálata. Az ezen szempontok figyelembevételével elvégzett kísérletsorozatban semmilyen érdemi károsodást nem sikerült kimutatnunk a Syk^{-/-} neutrofilek és hízósejtek válaszképességében (84-88. ábra) [4]. Ugyanerre a következtetésre jutottunk a Syk^{-/-} neutrofilek különböző kemoattraktánsok és kemokinek koncentrációgrádiensének mentén történő normális in vitro migrációja (56-58. ábra) [2,4,10], illetve a Syk^{-/-} neutrofileknek a kemokin-függő [139] tioglikollát-peritonitisben való normális in vivo migrációja (62. ábra) [2] alapján. Mivel sem vad típusú, sem Syk^{-/-} neutrofilekben nem tudtuk kimutatni a ZAP-70 jelenlétét (24. ábra) [4], nem valószínű, hogy a G-fehérje-kapcsolt receptorok normális működéséért a ZAP-70 általi kompenzáció tehető felelőssé. Mindezek együttesen arra utaltak, hogy a Syk az irodalmi adatokkal ellentétben sem neutrofilekben, sem hízósejtekben nem vesz részt a G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében.

7.5. Jelátviteli folyamatok vizsgálata in vivo gyulladásos betegségmodellekben

A különböző gyulladásos sejtek (neutrofilek, makrofágok és hízósejtek) és a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó receptorok (integrinek, Fc-receptorok, G-fehérje-kapcsolt receptorok) in vitro vizsgálatával kapott fenti eredmények alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon az eddig vizsgált jelátviteli mechanizmusok szerepet játszanak-e az in vivo gyulladásos folyamatokban is. Ezt a továbbiakban a rheumatoid arthritis egyik transzgénikus állatmodelljének, az ún. K/B×N szérumtranszfer-arthritisnek a segítségével vizsgáltuk.

7.5.1. Az autoantitest-indukált K/B×N szérum-transzfer arthritis modell

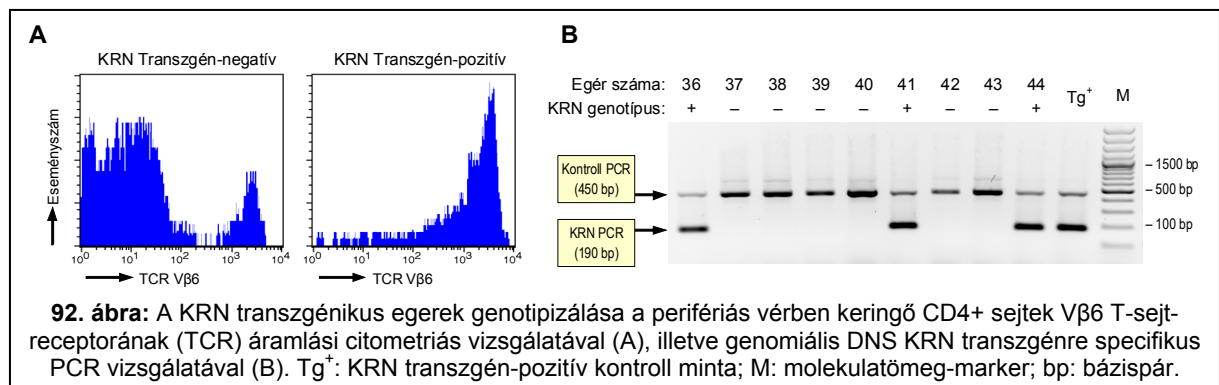
A K/B×N szérumtranszfer-arthritis alapja egy véletlen megfigyelés volt, melynek során egy más célból létrehozott, az ún. KRN transzgénikus T-sejt-receptort hordozó egértörzset az autoimmunitásra hajlamosító NOD egértörzsszel való keresztezésből kapott utódokat vizsgáltak [108]. Ezeket az egereket a szülők eredete és a KRN transzgént hordozó törzs C57BL/6 (röviden B6) genetikai háttere alapján KRN/B6×NOD, rövidítve K/B×N egereknek nevezzük el (91. ábra). A K/B×N egereken súlyos ízületi gyulladást figyeltek meg, amely klinikai tüneteiben és szövettani képében (pl. a jellegzetes pannus megjelenésében) is nagyon hasonlított a humán rheumatoid arthritishez [108]. A modell további vizsgálata során kiderült, hogy a betegség



genetikailag normális egyedekre is átvihető a K/B×N állatok szérumával vagy tisztított immunglobulinjaival (91. ábra) [140]. Az ily módon kiváltott betegségmodell a K/B×N szérumtranszfer-arthritis.

A K/B×N szérumtranszfer arthritis modell a saját kísérleteink szempontjából számos előnnyel rendelkezik. Egyrészt ez a modell a nemzetközi szakirodalomban általánosan használt és elismert modell, ami megkönnyítette eredményeink másokéival való összehasonlítását és szélesebb körű megismertetését. A modell kifejezetten robusztus, és (ellentétben pl. a kollagén-indukált vagy kollagén-antitest-indukált arthritisszel) minden eddig vizsgált egértörzsben, köztük a saját egereink háttérét adó C57BL/6 egerekben is működik. A modell lehetőséget teremt az autoimmun arthritis késői (szövetkárosodási) fázisának a limfociták által közvetített korai (immunizációs) fázistól független vizsgálatára. Korábbi irodalmi adatok ezeken túlmenően igazolták, hogy a K/B×N szérumtranszfer-arthritis létrejöttében fontos szerepet játszanak a neutrofilek [141], a makrofágok [142] és a hízósejtek [143], valamint a β_2 -integrinek [144] és az Fc γ -receptorok [145-147], vagyis a korábbi kísérleteink tárgyát képező sejtek és receptorok.

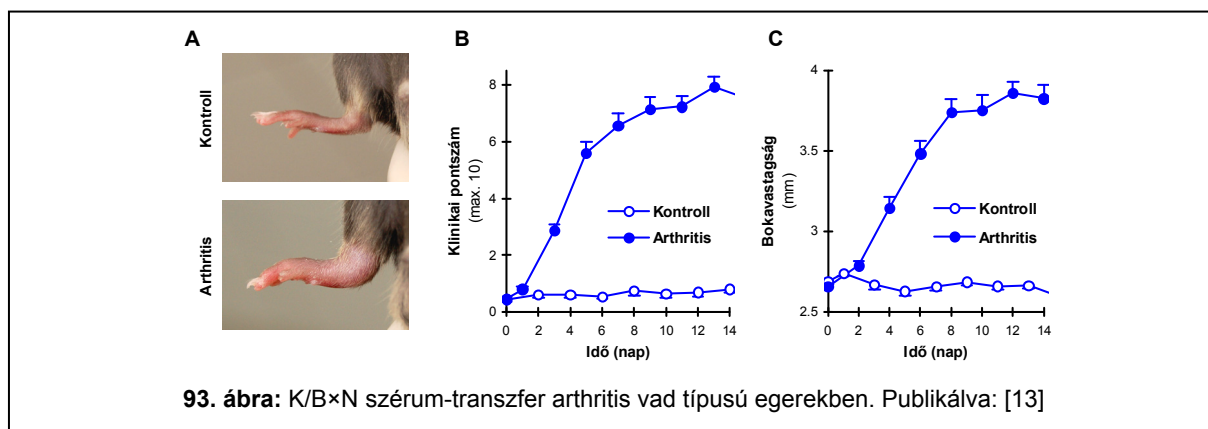
A K/B×N szérumtranszfer-arthritis beállításához először meg kellett alapítanunk egy, a KRN transzgént a C57BL/6 genetikai háttéren hordozó egértörzset. Mivel a KRN transzgén-pozitív és a transzgén-negatív egyedek között külsőleg semmilyen különbség nincs (a NOD egerekkel való keresztezés nélkül nem jön létre arthritis), a KRN transzgén-pozitív egereket egyedi genotipizálás alapján kellett azonosítanunk. Ehhez kezdetben a KRN T-sejt-receptor-transzgén részét képező V β 6 régió áramlási citometriával való kimutatását (92. ábra A panel), a későbbiekben pedig a transzgén PCR-alapú kimutatását (92. ábra B panel) alkalmaztuk.



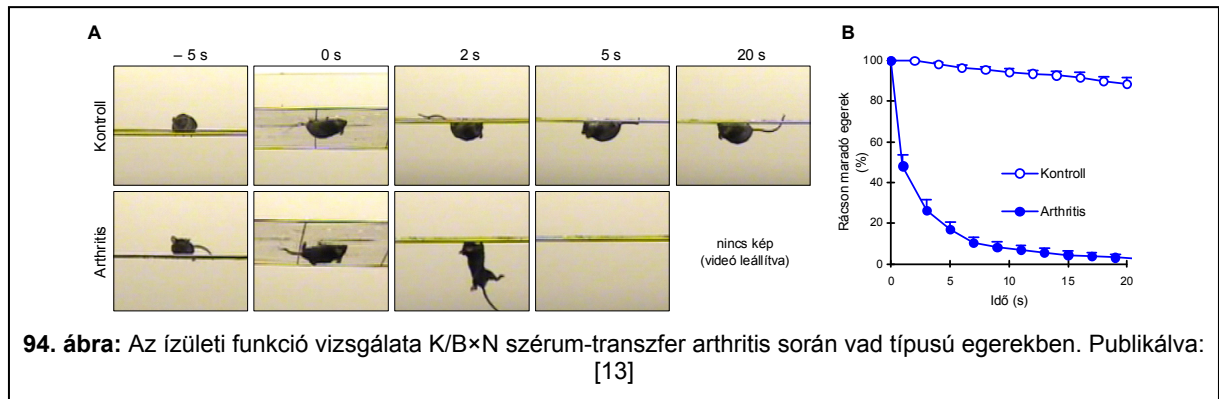
A KRN transzgén-pozitív egyedek NOD egerekkel való keresztezéséből származó utódok közül a 92. ábra szerinti genotipizálás és a látható arthritis alapján választottuk külön a transzgén-pozitív (K/B×N; arthritises) és a transzgén-negatív (B×N; egészséges) egereket. A kétféle egerek szérumát külön-külön összegyűjtöttük. A K/B×N egerek szérumát használtuk a szérumtranszfer-arthritis kiváltására, míg a kontroll egerek az egészséges (B×N) egerekből származó szérumot kaptak.

A K/B×N szérumtranszfer-arthritist rutinszerűen egyszeri 400 μ l K/B×N szérum intraperitoneális injekciójával váltottuk ki. A kontroll egerek azonos mennyiségű normál (B×N) szérumot kaptak. A K/B×N szérum hatására létrejövő ízületi gyulladást mutatja a 93. ábra A része, melyen jól látható a bokatájék és a lábujjak duzzanata, a szövetek vöröses színezete és a végtag deformációja. A betegséget a K/B×N szérum adását követő két héten keresztül

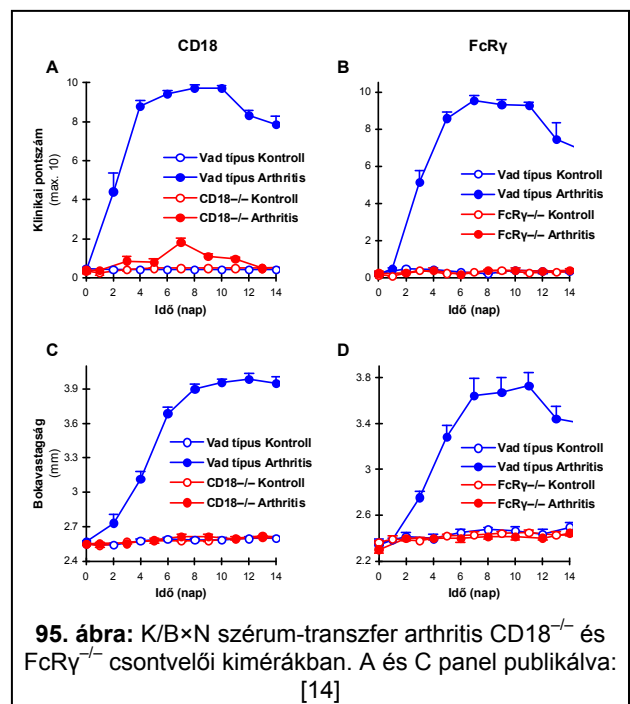
minden nap számszerűsítettük is a látható tünetek 0-10 közötti hátsó végtagi klinikai pontszám-skálán való értékelésével (93. ábra B panel) és rugós tolómérő segítségével minden nap lemertük az egerek bokavastagságát is (93. ábra C panel). Az így kapott kinetikai görbéken jól látszik, hogy az arthritis a K/B×N szérum injekcióját követő 2-3 nap múlva kezd megjelenni és a 8-10. napon éri el a maximumát (93. ábra B-C panel). Itt nem bemutatott továbbkövetéses kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a K/B×N szérum injekcióját követő 3. héten a betegség már kezd lecsengeni, ami feltételezhetően az arthritogén antitesteknek a szervezetből való kiürülésével magyarázható.



Mivel a humán rheumatoid arthritis egyik legsúlyosabb következménye az ízületi funkció (fogás, írás, stb.) elvesztése, beállítottunk egy kísérleti rendszert az egerek ízületi funkciójának a vizsgálatára is. Ennek során az egereket egy, a ketrecfedélhez hasonló rácsozattal rendelkező, speciálisan erre a célra készített fémrácsra helyeztük, majd a rácsot megfordítva szimuláltuk azt az állapotot, amikor az egerek a ketrecdobozukban alulról kapaszkodnak az azt fedő rácsra. Ezután megmértük, hogy az egerek hány másodpercig képesek kapaszkodni a rács aljához. A vizsgálat eredményét a 94. ábra A részén bemutatott képkockák és a mért időtartamokból a Kaplan-Meier túlélési görbéhez hasonlóan képzett és a 94. ábra B részén bemutatott "rácson-maradási görbék" szemléltetik (utóbbiak azt mutatják, hogy adott idő elteltével az egerek hány százaléka kapaszkodik még mindig a rácson). Az ábráról leolvasható, hogy míg a kontroll (B×N) szérummal kezelt egerek kb. 90%-a 20 másodpercnél tovább volt képes kapaszkodni a rácson, addig az arthritist kiváltó (K/B×N) szérummal való kezelést követően az állatok fele az első másodpercekben leesett a rácsról és elhanyagolható részük volt képes a teljes 20 másodperces mérési időszakban a rácson maradni.

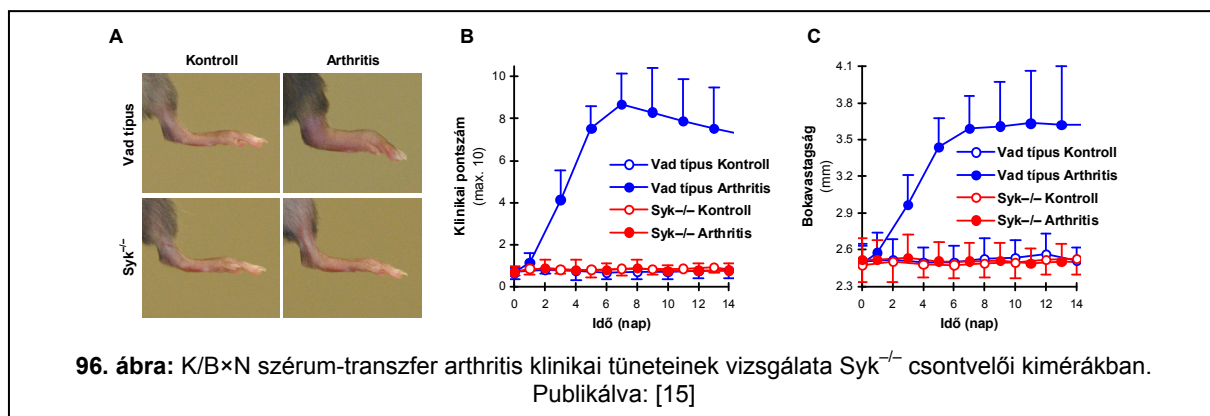


Amint azt a fentiekben említettem, a K/B×N szérumtranszfer-arthritis iránti érdeklődésünk egyik oka az volt, hogy korábbi irodalmi adatok szerint a betegség kialakulásához elengedhetetlenek a β_2 -integrinek és az Fc γ -receptorok [144,145]. Ezeket a következtetéseket megpróbáltuk a saját kísérleti rendszerünkben magunk is megerősíteni. Amint azt a 95. ábra A és C része mutatja, a K/B×N szérumtranszfer-arthritis makroszkóposan látható klinikai tünetei és a bokavastagság emelkedése egyaránt majdnem teljesen elmaradt a CD18^{-/-} csontvelői kimérákban. Hasonlóképpen a betegség klinikai tünetei és a bokavastagság emelkedése teljesen megszűnt az aktiváló Fc γ -receptorok működéséhez szükséges Fc γ adapterfehérje hiányában (95. ábra B és D panel).



7.5.2. A Syk szerepe autoantitest-indukált arthritisben

A következő kísérletsorozatban a Syk szerepét vizsgáltuk a K/B×N szérumtranszfer-arthritis létrejöttében Syk^{-/-} csontvelői kimérák segítségével. Amint az a 96. ábra A részén látható, a vad típusú csontvelő-kimérákkal szemben a Syk^{-/-} kimérákban nem sikerült kiváltani a K/B×N szérumtranszfer-arthritis klinikai tüneteit. Az arthritis számszerűsítésére használt hátsó végtagi klinikai pontszám (96. ábra B része) és bokavastagság (96. ábra C része) kinetikai vizsgálata azt mutatta, hogy a Syk^{-/-} kimérákban egyáltalán nem jött létre arthritis. Hasonló eredményeket kaptunk a mellső végtag vizsgálata során [15]. A Syk tehát fontos szerepet játszik az in vivo arthritis kialakulásában az autoantitest-indukált K/B×N szérumtranszfer modellben.

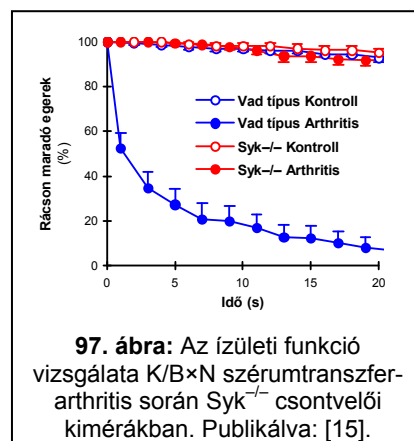


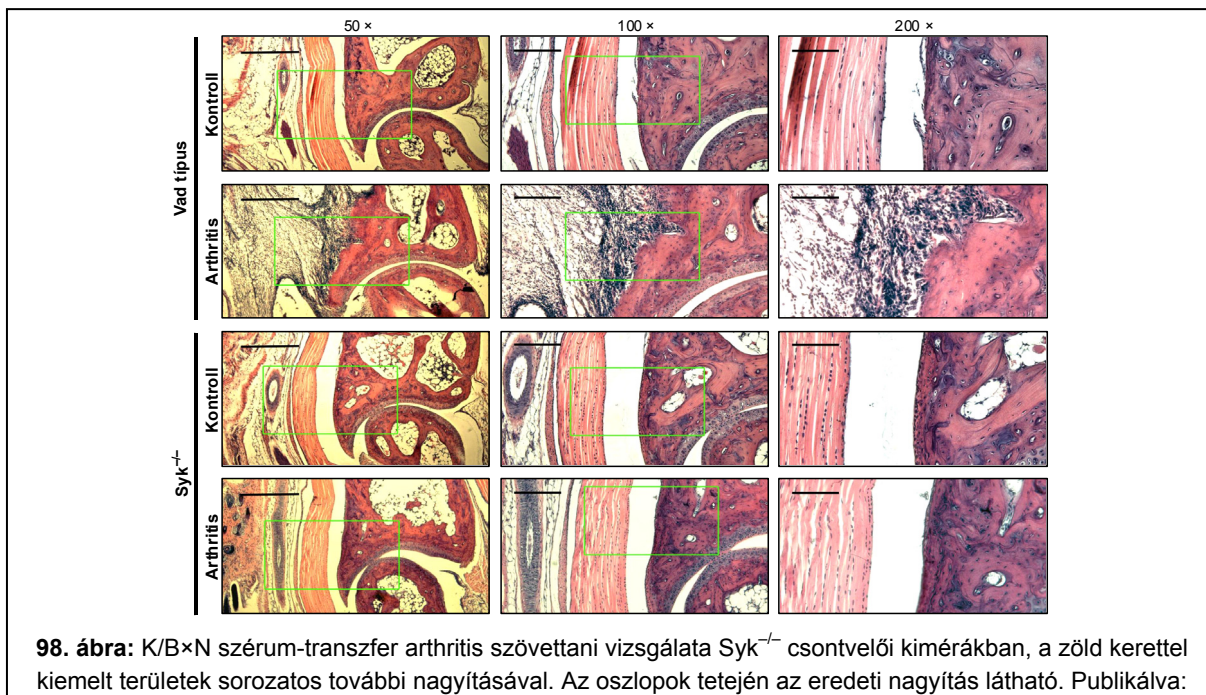
Itt be nem mutatott további kísérleteinkben $Syk^{+/-}$ heterozigóta egerekben is megvizsgáltuk a K/B×N szérumsztransfer-arthritisz lefutását. A homozigóta $Syk^{+/+}$ alomtestvér-kontrollokkal összehasonlítva a $Syk^{+/-}$ heterozigótákban lényegében teljesen normális volt a betegség makroszkópos lefolyása [15], ami arra utal, hogy a Syk expressziójának feltételezetten kb. 50%-os csökkenése még nem eredményezi a kórfolyamat károsodását. Ez arra utal, hogy a K/B×N szérumsztransfer-arthritishoz hasonló patomechanizmusú humán betegségekben esetleg alkalmazandó Syk -gátlószereknek 50%-nál nagyobb mértékben kell gátolniuk a Syk aktivitását a várt terápiás hatás elérése érdekében.

Mivel a humán rheumatoid arthritis egyik legfontosabb tünete az ízületi funkció károsodása, a 94. ábrán bemutatott megközelítéssel megvizsgáltuk az arthritogén szérummal kezelt $Syk^{-/-}$ kimérák rácson való kapaszkodásának a képességét. Amint az a 97. ábrán látható, a Syk genetikai hiánya teljesen megszüntette a K/B×N szérumsztransfer-arthritisz hatására létrejövő ízületi funkciókárosodást.

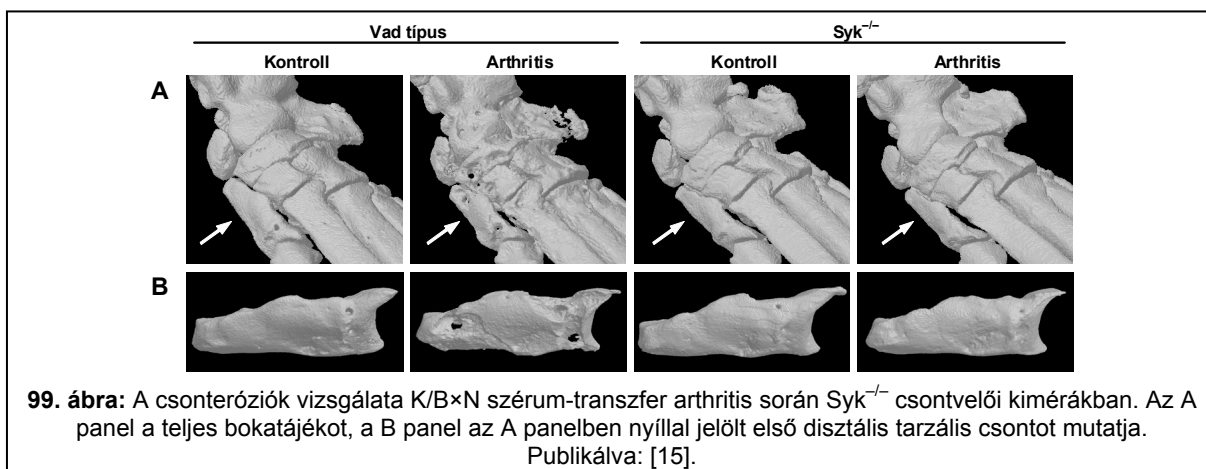
Az eddigi makroszkópos és klinikai jellegű vizsgálatok után szövettani metszeteken is megvizsgáltuk a arthritis megjelenését a $Syk^{-/-}$ csontvelői kimérákban.

Amint az a 98. ábrán látható, a vad típusú kimérák bokatájékán a bokaízületet környező synoviumban jelentős fehérvérsejtes infiltráció alakult ki, amely az ízületet alkotó csontokba is behatolt. $Syk^{-/-}$ csontvelői kimérákban ezzel szemben sem a leukocita-infiltráció, sem a csonthatár sérülése nem volt megfigyelhető, ezeknek az egereknek a szövettani képe a K/B×N szérum injekciója ellenére a kontroll szérummal kezelt állatokéhoz volt hasonló.





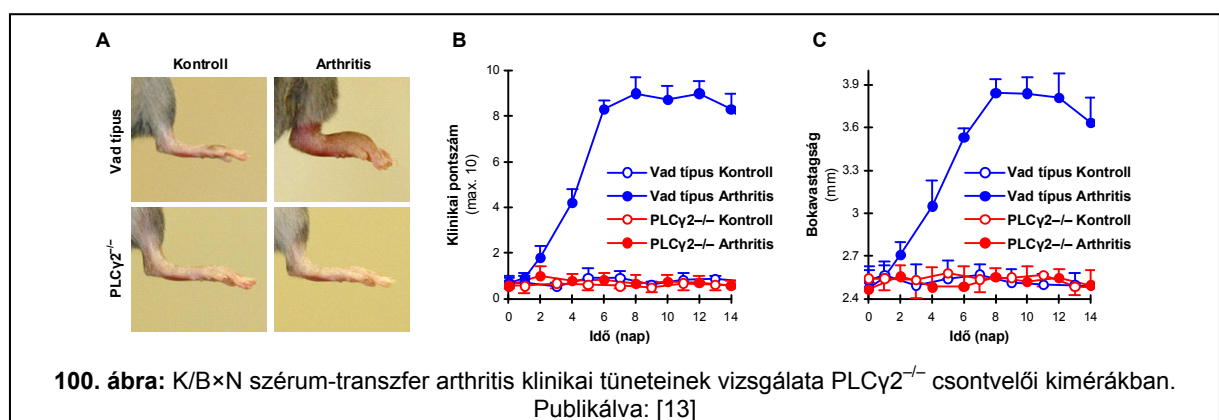
A humán rheumatoid arthritis progressióját meghatározó egyik legfontosabb tényező az ízületet alkotó csontok eróziójának a megjelenése. Mivel a 98. ábra a csontszövet károsodására utalt a vad típusú (de nem a $Syk^{-/-}$) csontvelői kimérákban, a következőkben mikro-CT segítségével megvizsgáltuk a bokatáji csontok szerkezetét a különböző eredetű és különböző kezelésen átesett egerekben. Amint azt a 99. ábra A része mutatja, az arthritist kiváltó K/B×N szérum injekciója vad típusú kimérákban a bokatáji csontok felszínének kirágódását (erózióját) eredményezte, míg $Syk^{-/-}$ kimérákban ugyanez a károsodás nem volt megfigyelhető. A jelenséget még jobban szemlélteti az A panelen nyíllal jelölt első disztális tarsális csont utólagos, nagyobb nagyítással való szkennelésének az eredménye (99. ábra B része). Vad típusú kimérákban az arthritist kiváltó K/B×N szérum ezen csont felszínének masszív erózióját, két helyen pedig a csont teljes átlukadását eredményezte, míg a hasonló kezelésen átesett $Syk^{-/-}$ kimérákban semmilyen csonterózióra utaló jelet nem találtunk.



A fenti eredmények összességében arra utalnak, hogy a Syk jelenléte elengedhetetlen a K/B×N szérumsztransfer-arthritisz makroszkópos és mikroszkópos tüneteinek, az arthritisz kiváltotta ízületi funkciókárosodásnak és az arthritist követő csontporozióknak a létrejöttéhez.

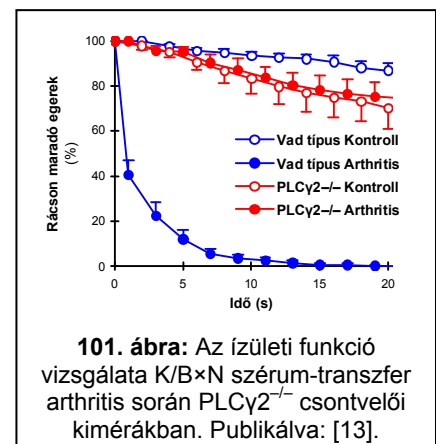
7.5.3. A PLCy2 szerepe autoantitest-indukált arthritiszben

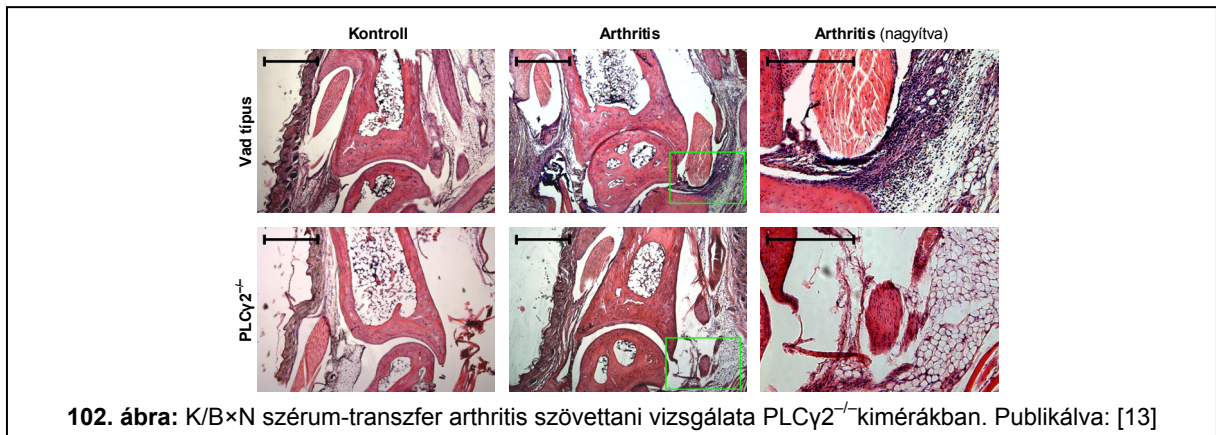
A következő kísérletsorozatban a PLCy2 szerepét vizsgáltuk a K/B×N szérumsztransfer-arthritisz kialakulásában. Amint az a 100. ábra A részén látható, a vad típusú csontvelő-kimérákkal szemben a PLCy2^{-/-} kimérákban nem alakult ki a jellegzetes ízületi gyulladás, duzzadás és deformáció. Az arthritist számszerűsítő klinikai pontszám (100. ábra B panel) és bokavastagság (100. ábra C panel) kinetikus vizsgálata kimutatta, hogy PLCy2^{-/-} kimérákban egyáltalán nem jöttek létre az arthritisz makroszkópos jelei. Hasonló eredményeket kaptunk intakt PLCy2^{-/-} egerek vizsgálata során is [13].



Ezután megvizsgáltuk az arthritisz hatására létrejövő ízületi funkciókárosodást a PLCy2^{-/-} kimérákban. Amint azt a 101. ábra mutatja, míg vad típusú kimérákban az arthritist kiváltó szérums hatására az egerek elvesztették a rácson való lógási képességüket, a PLCy2^{-/-} kimérákban nem volt különbség a kontroll (B×N) és az arthritogén (K/B×N) szérumszal kezelt egerek ízületi funkciója között.

Utoljára megvizsgáltuk a bokaízület mikroszkópos képét is. Amint azt a 102. ábra mutatja, vad típusú egerek arthritist indukáló szérumszal való kezelése a jelentős gyulladásos infiltrációt eredményezett a bokaízületet körülvevő synovialis térben. A PLCy2^{-/-} kimérákban ezzel szemben egyáltalán nem volt megfigyelhető a gyulladásos sejtek infiltrációja az arthritogén K/B×N szérums adása után.

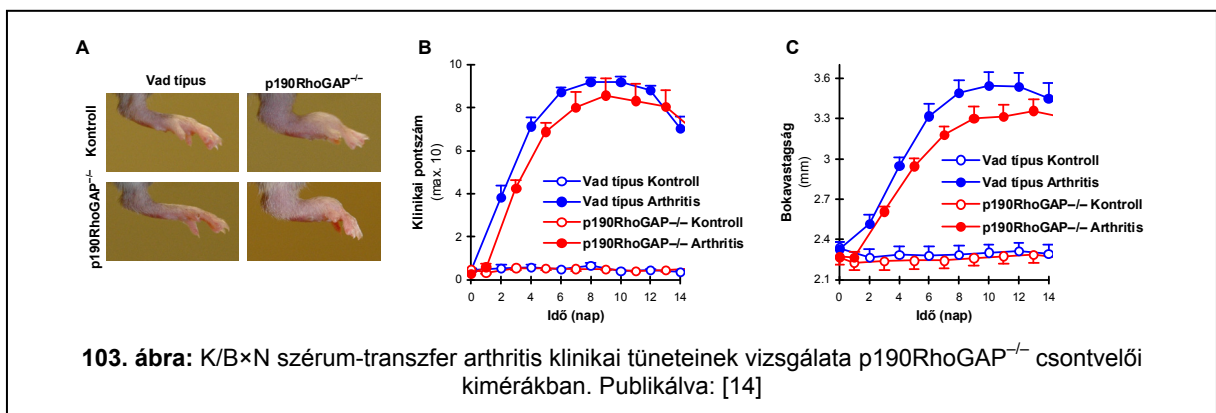




Mindezen eredményeink együttesen arra utalnak, hogy a PLCγ2 megkerülhetetlen szerepet játszik az autoantitest-indukált arthritis makroszkópos tüneteinek, mikroszkópos képének és az arthritist követő ízületi funkciókárosodásnak a kialakulásában.

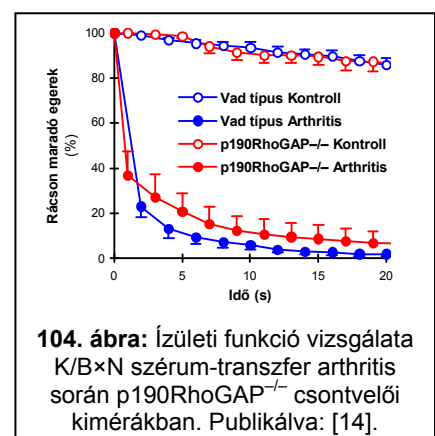
7.5.4. A p190RhoGAP szerepének vizsgálata arthritisben

A p190RhoGAP integrinek és egyéb receptorok jelátvitelében betöltött szerepének vizsgálatával párhuzamosan megvizsgáltuk a fehérje részvételét a K/B×N szérumtranszfer-arthritis létrejöttében is. Amint az a 103. ábrán látható, sem az arthritis makroszkópos klinikai jeleinek mértékében, sem azok időbeli lefutásában nem találtunk különbséget vad típusú és p190RhoGAP^{-/-} kimerák között.



Amint az a 104. ábrán látható, az arthritis-kiváltotta ízületi funkciókárosodás vizsgálata során szintén nem találtunk különbséget az arthritist kiváltó (K/B×N) szérummal kezelt vad típusú és p190RhoGAP^{-/-} csontvelői kimerák rácson való kapaszkodási képessége között.

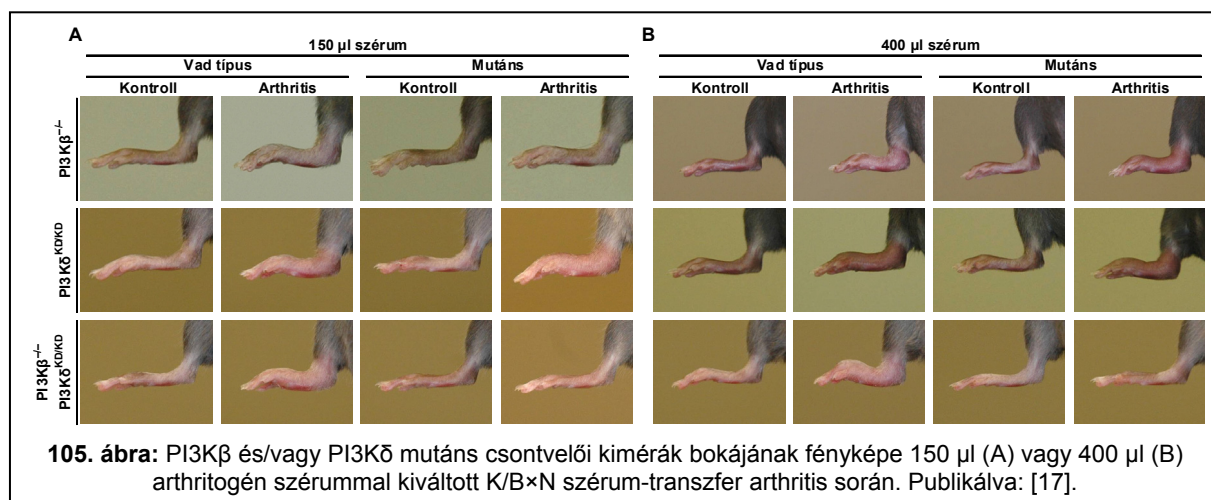
Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az in vitro kísérletekhez hasonlóan a p190RhoGAP in vivo sem tölt be elengedhetetlen szerepet a β₂-integrinek által közvetített autoimmun gyulladásos folyamatok létrejöttében.



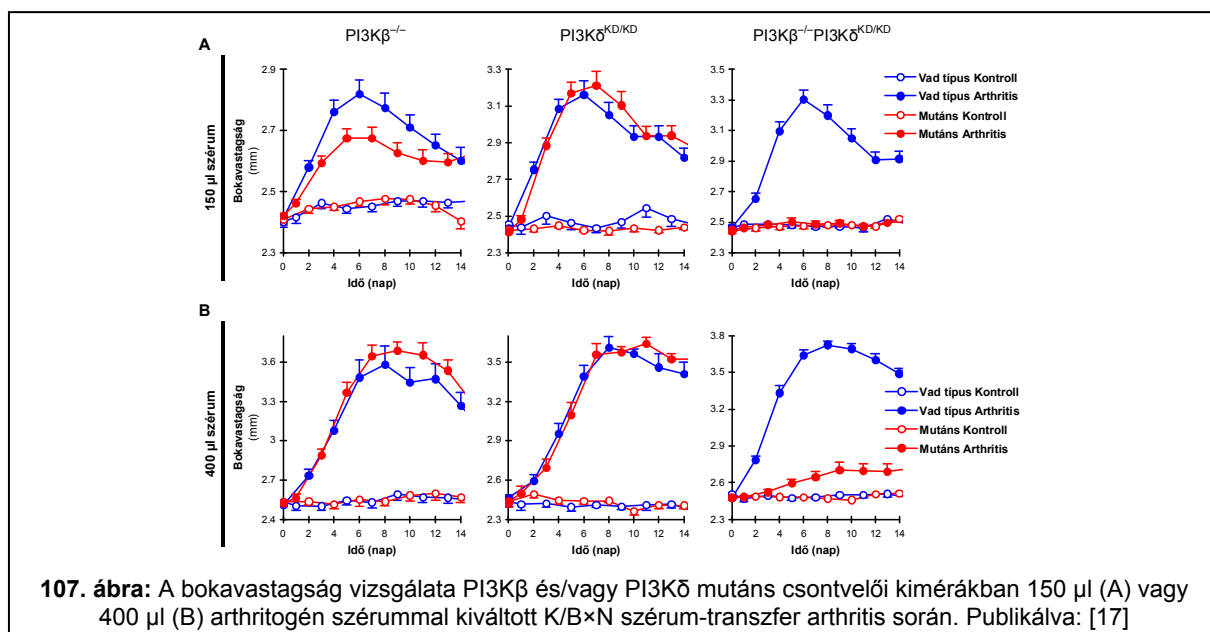
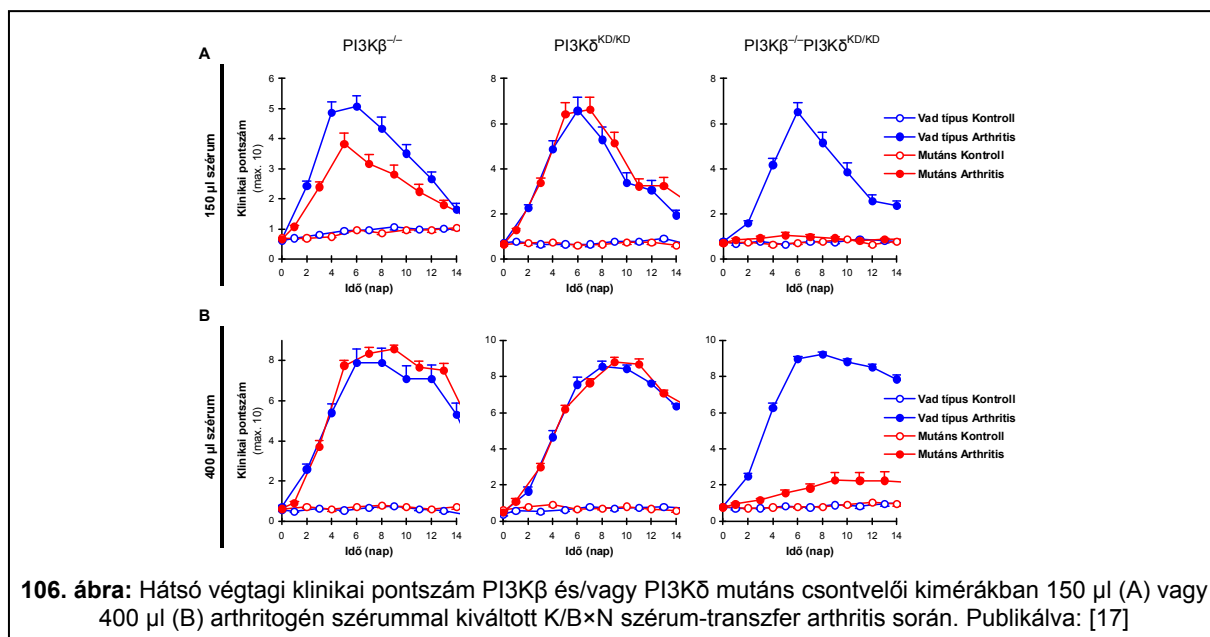
7.5.5. PI3-kináz-izoformák szerepe autoantitest-indukált arthritisben

A következőkben a különböző PI3-kináz (PI3K) izoformák autoantitest-indukált arthritisben való szerepét vizsgáltuk. Ezen kísérletek előzményét az adta, hogy Phillip Hawkins (Babraham Institute, Cambridge UK) munkacsoportja kimutatta, hogy a PI3K β és kisebb mértékben a PI3K δ fontos szerepet játszik a neutrofilek immunkomplex-indukált sejtválaszainak létrejöttében [17]. Emiatt Phillip Hawkins munkacsoportjával együttműködve megvizsgáltuk a PI3K β és a PI3K δ K/B $\times$ N szérumsztransfer-arthritisben betöltött szerepét. A kísérletekhez a PI3K β géntörléses mutációját (PI3K $\beta^{-/-}$), a PI3K δ kináz-aktivitását megszüntető ("kinase dead") pontmutációt (PI3K $\delta^{KD/KD}$), illetve a kétféle mutációt együttesen hordozó (PI3K $\beta^{-/-}$ PI3K $\delta^{KD/KD}$) egerek csontvelői sejtjei segítségével létrehozott csontvelői kimérákon végeztük. Mivel az in vitro kísérletek során elsősorban szubmaximális stimuláció során lehetett funkcionális károsodást tapasztalni az egyes mutáns sejtekben, az in vivo kísérleteket mind a szokásos maximális (400 μ l), mind szubmaximális (150 μ l) szérumsztransfer injekciója mellett elvégeztük.

Amint az a 105. ábrán látható, vad típusú kimérákban 150 μ l arthritogén szérumsztransfer adásakor kisebb, 400 μ l szérumsztransfer esetén kifejezettebb arthritis alakult ki. A PI3K $\beta^{-/-}$ PI3K $\delta^{KD/KD}$ kettős mutáció mindkét szérumsztransfer-dózis mellett jelentős mértékben gátolta az arthritis kialakulását. Az egyszeres mutációk közül a PI3K $\delta^{KD/KD}$ mutáció önmagában nem befolyásolta az arthritis létrejöttét, míg a PI3K $\beta^{-/-}$ mutáció a 150 μ l szérumsztransfer mellett kismértékben, 400 μ l szérumsztransfer esetén viszont egyáltalán nem gátolta a betegség lefolyását.



A fenti eredményeket még jobban szemléltetik a hátsó-végtagi klinikai pontszám (106. ábra) és a bokavastagság (107. ábra) számszerűsített átlagértékei. Mindkét ábrán jól látható, hogy 150 μ l szérumsztransfer alkalmazásakor kisebb mértékű és gyorsabban lecsengő arthritis jön létre. A PI3K $\beta^{-/-}$ PI3K $\delta^{KD/KD}$ kettős mutáció 150 μ l szérumsztransfer mellett gyakorlatilag teljesen, míg 400 μ l szérumsztransfer-dózisnál nagymértékben, de nem teljesen gátolta az arthritis kialakulását. Az egyszeres mutációk közül a PI3K $\delta^{KD/KD}$ mutációnak önmagában semmilyen hatása nem volt, míg a PI3K β hiánya a 150 μ l szérumsztransfer mellett részlegesen csökkentette a betegség súlyosságát, 400 μ l szérumsztransfer esetén viszont egyáltalán nem volt hatással a tünetek lefolyására.



A fenti eredmények összességében arra utalnak, hogy a PI3K β és a PI3K δ fontos, bár (a Syk-kel és a PLC γ 2-vel ellentétben) nem teljesen megkerülhetetlen szerepet játszik az autoantitest-kiváltotta arthritis létrejöttében. A két fehérje szerepe szubmaximális autoantitest-dózissal való kezelés során a legkifejezettebb. A két PI3K-izoforma funkciója között részleges átfedés tapasztalható: bár a PI3K β -nak jelentősebb szerepe az arthritis kialakulásában, a PI3K β hiányában a PI3K δ is képes létrehozni az arthritisre jellemző klinikai elváltozásokat.

7.5.6. Megbeszélés

Az ebben a fejezetben bemutatott kísérletek célja különböző jelátvivő fehérjék, köztük elsősorban kinázok és kináz-szubsztrátok szerepének vizsgálata volt a humán reumatoid

arthritis patomechanizmusának egyes komponenseit modellező autoantitest-indukált K/B×N szérumtranszfer-arthritis modell segítségével.

Kísérleteink első részében kimutattuk, hogy Syk^{-/-} csontvelői kimérákban teljes mértékben károsodott a K/B×N szérumtranszfer-arthritis kialakulása. A Syk hiánya az arthritis makroszkópos tüneteit (96. ábra), ízületi funkcióra kifejtett hatását (97. ábra), mikroszkópos jellegzetességeit (98. ábra) és az arthritist követő csontlebontást (99. ábra) egyaránt megakadályozta.

A fenti kísérleteink kezdetekor már ismert volt, hogy egy kismolekulájú kináz-gátlószer, az R406 kísérleti egerekben részlegesen gátolja az autoantitest-indukált arthritis (köztük a K/B×N szérum-transzfer arthritis) kialakulását [148]. Az is ismert volt, hogy az R406 orálisan adható előalakja, az R788 (generikus nevén fostamatinib) patkányokban gátolta a kollagén-indukált arthritis kialakulását [149] és hogy korai II. fázisú klinikai vizsgálatokban a fostamatinib egyes betegekben szignifikánsan javította a rheumatoid arthritis klinikai tüneteit [150]. Ezeket az előzetes eredményeket egy, a saját közleményünk [15] megjelenése után publikált közleményben nagyobb betegpopuláción végzett késői II. fázisú klinikai vizsgálatok is megerősítették [151]. A fostamatinib rheumatoid arthritisben való klinikai kipróbálása jelenleg a III. fázisban tart.

A fostamatinib, illetve az abból képződő R406 elsődleges támadáspontjának a Syk tirozin-kinázt tartják [148] és a fostamatinibet mindmáig mint orálisan szedhető Syk tirozin-gátlószer tárgyalja az irodalom. Meg kell azonban említeni, hogy a fostamatinib/R406 a Syk mellett számos más fehérjét, többek között a dendritikus sejtek működésében szerepet játszó Flt3 kinázt, valamint a c-Kit, Lck, JAK és Ret kinázokat és az A3 adenosin-receptort is gátolja [148,152]. A fostamatinib/R406 tehát nem tekinthető specifikus Syk gátlószernek.

A fentiekből látható, hogy a Syk rheumatoid arthritisben betöltött szerepének lehetősége több évvel a saját eredményeink publikálása [15] előtt felmerült. Az összes korábbi eredmény azonban kizárólag farmakológiai megközelítésre, és egyetlen inhibitor, a fostamatinib/R406 alkalmazására épült. A gátlószer kérdéses specificitása miatt a korábbi eredmények nem biztosítottak megfelelő bizonyítékot a Syk arthritisben betöltött szerepére. A fostamatinib/R406 ráadásul csak részlegesen gátolta az autoantitest-indukált arthritis kialakulását. Miután a gátlószeres kísérletek során nem lehet pontosan megmondani, hogy milyen mértékben sikerült gátolni a hatóanyag célmolekuláját (ebben az esetben feltételezetten a Syk-et), nem volt tisztázott, hogy a részleges hatásért a Syk részleges gátlása vagy esetleges Syk-től független folyamatok jelenléte a felelős. A farmakológiai megközelítés miatt az sem volt tisztázható, hogy a fostamatinib/R406 milyen sejtípuson hat, különös tekintettel arra, hogy a vegyület hemopoetikus eredetű sejteken vagy (ahogy az egyes korábbi közleményekben felmerült [153,154]) esetleg nem-hemopoetikus sejteken (pl. szinoviális fibroblasztokon) hat-e.

A K/B×N szérumtranszfer-arthritis Syk^{-/-} csontvelői kimérákban való károsodását bemutató munkánk [15] elsőként próbálta a kérdéskört genetikai megközelítéssel vizsgálni. A Syk genetikai hiánya által okozott károsodás megfelelően specifikus módon igazolta, hogy a Syk tényleg szükséges az autoantitest-indukált arthritis kialakulásához. A Syk^{-/-} kimérákban megfigyelt teljes károsodás azt is igazolta, hogy (legalábbis az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben) nem létezik az arthritist Syk-től független módon akár részlegesen kiváltani képes mechanizmus. Továbbá, mivel Syk^{-/-} csontvelői kiméráinkban a Syk csak a hemopoetikus sejtekből hiányzott, kijelenthetjük, hogy a hemopoetikus sejteken jelen lévő Syk elengedhetetlen az autoantitest-indukált arthritis kialakulásához (bár nem zárja ki a Syk

párhuzamos hatását nem-hemopoetikus sejtekben, pl. fibroblasztokban). Általánosságban pedig elmondhatjuk, hogy az általunk elsőként publikált genetikai eredmények a Syk autoimmun arthritisben való szerepének megértéséhez szükséges számos további (sejtvonal-specifikus, struktúra-funkció, stb.) vizsgálat előtt nyitották meg az utat.

Az *in vivo* arthritis-kísérletek második részében kimutattuk, hogy a PLC γ 2 elengedhetetlen szerepet játszik a K/B $\times$ N szérumsztransfer-arthritis kialakulásában. A PLC γ 2 hiánya az arthritis makroszkópos tüneteinek (100. ábra), az ízületi funkcióra kifejtett hatásának (101. ábra) és mikroszkópos jellegzetességeinek (102. ábra) a kialakulását is megakadályozta [13]. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a PLC γ 2 lehetséges farmakológiai célpont lehet autoantitest-függő autoimmun betegségek terápiájában.

A PLC γ 2 K/B $\times$ N szérumsztransfer-arthritisben betöltött szerepét tőlünk függetlenül egy amerikai munkacsoport is publikálta [155]. Bár a két közlemény [13,155] az arthritis szempontjából hasonló eredményeket közölt, Cremasco és munkatársai [155] a kapott eredményeket kizárólag a PLC γ 2 integrin-jelátvitelben betöltött szerepével [129] magyarázták, míg saját elképzeléseink szerint a jelenségért inkább a PLC γ 2-nek az Fc-receptorok jelátvitelében betöltött szerepe felelős [13].

Kísérleteink során Phillip Hawkins munkacsoportjával együttműködve megvizsgáltuk különböző PI3K-izoformák szerepét is a K/B $\times$ N szérumsztransfer-arthritis kialakulásában. A kérdésnek komoly farmakológiai terápiás jelentősége van, mivel számos gyógyszergyár fejleszt izoforma-specifikus PI3K-gátlószereket terápiás (elsősorban daganatellenes) célra. Eredményeink szerint a PI3K β és a PI3K δ egymással átfedő módon (bár a PI3K β túlsúlyával) vesznek részt az autoantitest-indukált arthritis kialakulásában (105-107. ábra) [17]. Ugyanezen projekt részeként kollaborációs partnereink tőlünk függetlenül kimutatták, hogy a PI3K β hiánya az autoantitest-kiváltotta autoimmun hólyagos bőrgyulladástól (epidermolysis bullosa acquisita) is megvédi az állatokat [17]. Bár a PI3K-izoformák autoimmun gyulladásos betegségeken való szerepe már korábban is felmerült, a korábbi kísérletek elsősorban a G-fehérjék által aktivált PI3K γ szerepére vonatkoztak [156,157]. A PI3K β (és kisebb mértékben a PI3K δ) szerepének kimutatása arra utal, hogy ezek a molekulák a jövőben az autoantitest-mediált autoimmun betegségek terápiás célpontjai lehetnek.

7.6. Immunreceptor-szerű jelátvitel oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

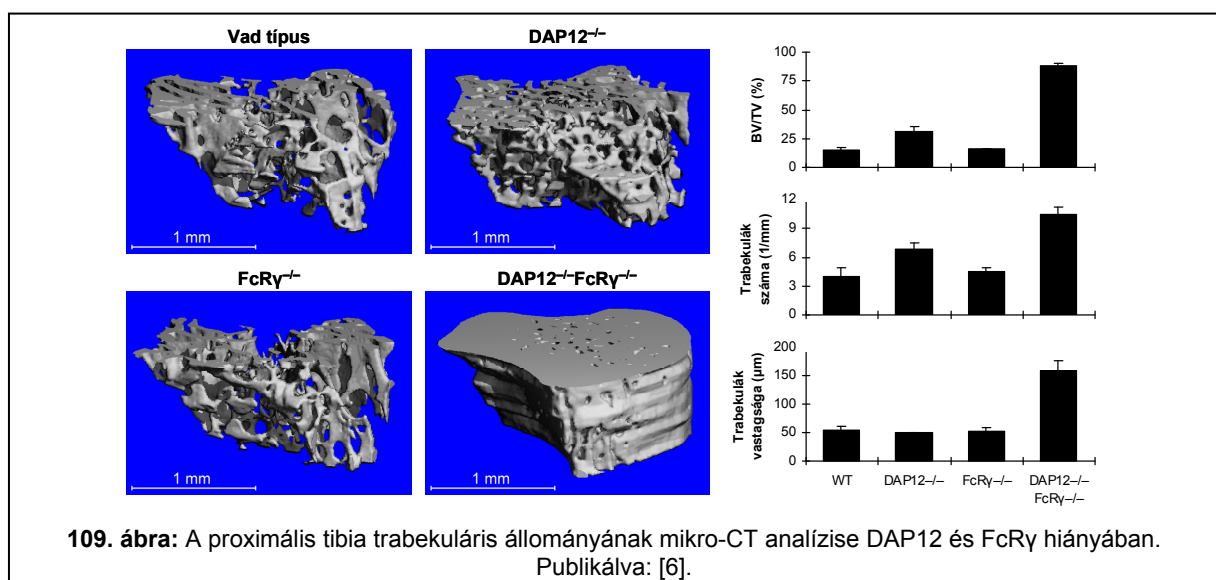
Ebben a fejezetben egy új, immunreceptor-szerű jelpálya azonosításával és ennek a jelpályának a nyugalmi csontanyagcserében betöltött szerepével kapcsolatos eredményeinket mutatom be. Ezt a kutatási irányt egy, az alábbiakban ismertetett véletlen megfigyelés alapozta meg.

7.6.1. A DAP12 és az FcR γ szerepe az *in vivo* csontanyagcserében

Az integrinek jelátvitelével kapcsolatos, fentebb bemutatott kísérleteink során rendszeresen használtunk DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ kettős génhányos egereket, melyekből csontvelői sejteket próbáltunk nyerni neutrofilek izolálása és makrofágok tenyésztése céljából. Ezen kísérletek közben arra lettünk figyelmesek, hogy a DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ egerek más genotípusú testvéreiknél lényegesen kisebbek (108. ábra), arcuk lekerekedett és

csontjaik megrövidültek. A legdrámaibb különbség ugyanakkor abban mutatkozott meg, hogy a $DAP12^{-/-}$ $FcR\gamma^{-/-}$ egerek csontjaiban mintha jelentősen megnövekedett volna a szivacsos csontállomány mennyisége és emiatt szinte alig volt velőűr a csontokban. Mindezek arra utaltak, hogy a $DAP12^{-/-}$ $FcR\gamma^{-/-}$ egereknek csontanyagcsere-rendellenességei lehetnek.

A fentiek nyomán mikro-CT segítségével megvizsgáltuk a $DAP12$ - és/vagy $FcR\gamma$ -hiányos egerek csontszerkezetét. Amint az a 109. ábra bal oldalán bemutatott háromdimenziós rekonstrukciós képeken látható, a $DAP12^{-/-}$ egyszeres knockout egerekben kismértékben, míg a $DAP12^{-/-}$ $FcR\gamma^{-/-}$ kettős knockout egerekben drámaian megnőtt a trabekuláris csontállomány mennyisége, miközben az $FcR\gamma^{-/-}$ egerek csontállománya lényegében nem változott. Ezt a mikro-CT adatoknak a 109. ábra jobb oldalán bemutatott kvantitatív elemzése is megerősítette. Utóbbi eredményei szerint a proximális tibia trabekuláris állományában a ténylegesen kalcifikálódott csontállomány részaránya (bone volume/total volume; BV/TV) a vad típusú egerekben megfigyelt 15%-ról $DAP12^{-/-}$ egerekben 31, $DAP12^{-/-}$ $FcR\gamma^{-/-}$ egerekben pedig 88%-ra emelkedett ($FcR\gamma^{-/-}$ egerekben a BV/TV értéke 16% volt, tehát lényegében nem változott). Az emelkedést $DAP12^{-/-}$ egerekben kizárólag a trabekulák számának, $DAP12^{-/-}$ $FcR\gamma^{-/-}$ egerekben pedig mind a trabekulák számának, mind a trabekulák vastagságának az emelkedése okozta (109. ábra). A mineralizált csontállomány megnövekedését szövettani vizsgálattal is megerősítettük [6].



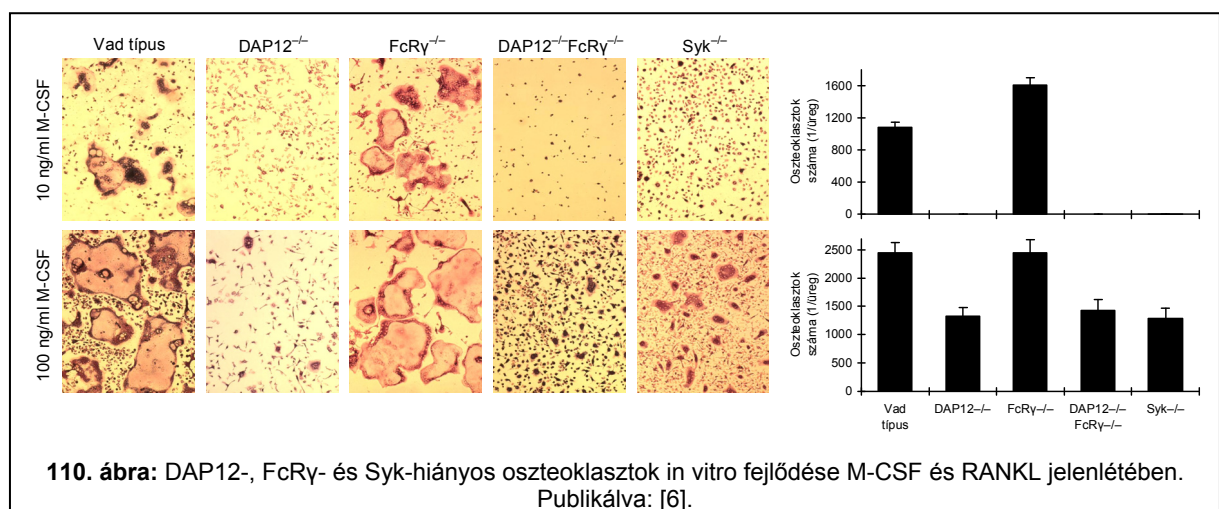
Fenti eredményeink összességében arra utaltak, hogy a $DAP12^{-/-}$ egerekben kismértékben, a $DAP12^{-/-}$ $FcR\gamma^{-/-}$ egerekben viszont igen kifejezett csontállomány-növekedés jött létre, ami az ITAM-tartalmú molekuláknak a csontanyagcsereiben betöltött fontos

szerepére utalt. A DAP12 és az FcR γ viszonyát vizsgálva megállapíthattuk, hogy a csontanyagcserében elsősorban a DAP12 vesz részt, de a DAP12 hiányában az FcR γ részben átveszi annak szerepét. A DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ egerek fenotípusa leginkább a csontbontás károsodásának következtében létrejövő oszteopetrozís megjelenéséhez volt hasonló. Bár a DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ egerekben súlyos csontanyagcsere-zavart sikerült kimutatnunk, az egereknek kifejlődtek a fogai, tehát a fenotípus nem volt annyira súlyos, mint a legsúlyosabb oszteopetrozisos egereknél (pl. Src $^{-/-}$, RANK $^{-/-}$, RANKL $^{-/-}$ [158-160]), melyekben a fogerupcióhoz szükséges minimális csontbontás sem jön létre.

Meg kell említenünk még, hogy bár szerettük volna megvizsgálni a Syk $^{-/-}$ egerek trabekuláris állományát is, ezen egerek perinatális letalitása nem tette lehetővé az ez irányú vizsgálatokat.

7.6.2. Az oszteoklaszt-tenyészetek jellemzése DAP12, FcR γ és Syk hiányában

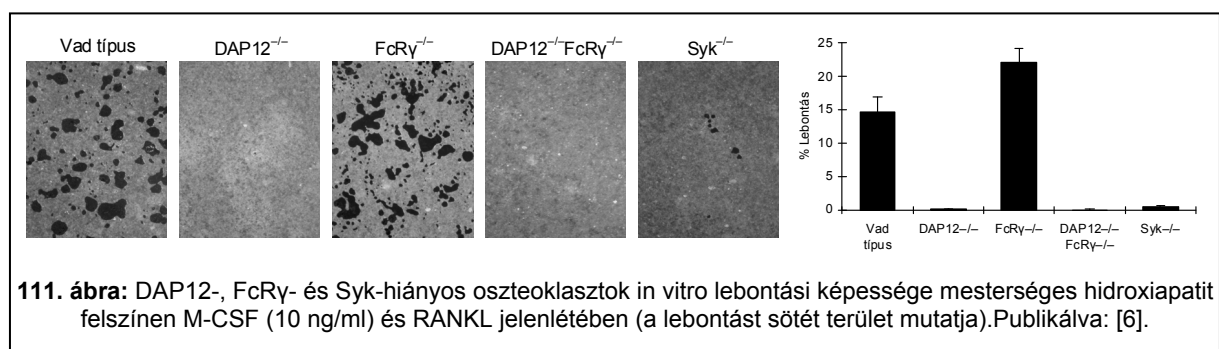
A DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ egerekben megfigyelhető csontmennyiség-növekedés legkézenfekvőbb oka az oszteoklasztok fejlődésének vagy működésének a zavara lehet. Ezt a lehetőséget csontvelői sejtek M-CSF és RANKL jelenlétében való in vitro tenyésztésével vizsgáltuk meg. A sejteket a 70 ng/ml RANKL és 10 vagy 100 ng/ml M-CSF jelenlétében tenyésztettük. Amint az az 110. ábrán látható, 10 ng/ml M-CSF jelenlétében sem DAP12 $^{-/-}$, sem DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ csontvelői sejtekből nem alakultak ki érett sokmagvú oszteoklasztok, míg az FcR γ $^{-/-}$ mutáció nem gátolta az oszteoklasztok fejlődését. 100 ng/ml M-CSF jelenlétében a vad típusú tenyészetekben lényegesen megnőtt mind az oszteoklasztok száma, mind azok mérete. Ilyen körülmények között a DAP12 $^{-/-}$ és a DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ kultúrákban is megfigyeltünk oszteoklasztokat, de azok mind számban, mind méretben jelentősen elmaradtak a vad típusú tenyészetekben megfigyeltéktől (110. ábra). Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az oszteoklasztok M-CSF és RANKL jelenlétében történő in vitro kialakulásában fontos szerepet játszik a DAP12 fehérje, és ezt nagy dóziszú M-CSF is csak kismértékben tudja kompenzálni. Az FcR γ ezzel szemben nem szükséges az oszteoklasztok kialakulásához és (ellentétben az in vivo mikro-CT eredményekkel) az itt tárgyalt kísérleti körülmények között az FcR γ nem képes részben sem kompenzálni a DAP12 genetikai hiányát.



Mivel a klasszikus immunreceptorok jelátvittele során a DAP12-höz és FcR γ -hoz hasonló ITAM-tartalmú adapter-fehérjék a Syk aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat, a következőkben megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az oszteoklasztok fejlődése a Syk genetikai hiányában. Amint az a 110. ábrán látható, 10 ng/ml M-CSF jelenlétében lényegében nem alakultak ki oszteoklasztok a Syk $^{-/-}$ tenyészetekben, és az oszteoklasztok száma és mérete 100 ng/ml M-CSF jelenlétében is lényegesen elmaradt a vad típusú tenyészetekétől. Várakozásainknak megfelelően tehát a Syk $^{-/-}$ csontvelői sejtekben a DAP12 $^{-/-}$ és a DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ sejtekhez hasonló oszteoklaszt-fejlődési zavart találtunk.

A következőkben RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk egyes oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját. Szemi-kvantitatív eredményeink szerint a fentiekben vizsgált egyik mutáció sem befolyásolta a kalcitonin receptor, a katepszin K, a β_3 integrin-lánc, az OSCAR és a RANK expresszióját [6]. A DAP12/FcR γ és a Syk genetikai hiánya tehát feltételezhetően nem gátolja az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját és ezáltal az oszteoklasztok biokémiai érését.

A következőkben megvizsgáltuk az oszteoklaszt-tenyészetek in vitro lebontó képességét. Ennek érdekében a különböző csontvelői sejteket először mesterséges hidroxiapatit-felületen tenyésztettük. Amint az a 111. ábrán látható, 10 ng/ml M-CSF és 70 ng/ml RANKL jelenlétében vad típusú és FcR γ $^{-/-}$ csontvelői sejtek tenyészetében jelentős reszorpciós aktivitást tapasztaltunk, míg DAP12 $^{-/-}$, DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ és Syk $^{-/-}$ tenyészetekben lényegében nem történt lebontás. Hasonló eredményeket kaptunk mesterséges hidroxiapatit-felületen 100 ng/ml M-CSF-koncentráció mellett és bálna dentin-szeleteken is [6]. Összességében tehát megállapíthatjuk, hogy az ITAM-tartalmú adapter-molekulák és a Syk elengedhetetlen az M-CSF és RANKL jelenlétében in vitro tenyésztett oszteoklasztok általi reszorpciós folyamatokhoz, aminek feltételezhetően legalább részben az ezen molekulák hiányában létrejövő oszteoklaszt-fejlődési zavar a magyarázata. Fontos kiemelni továbbá, hogy a DAP12 $^{-/-}$ tenyészetekben megfigyelt teljes károsodás arra utal, hogy (ellentétben az in vivo csontanyagcserével) az általunk alkalmazott in vitro körülmények között az FcR γ nem képes kompenzálni a DAP12 genetikai hiányát.

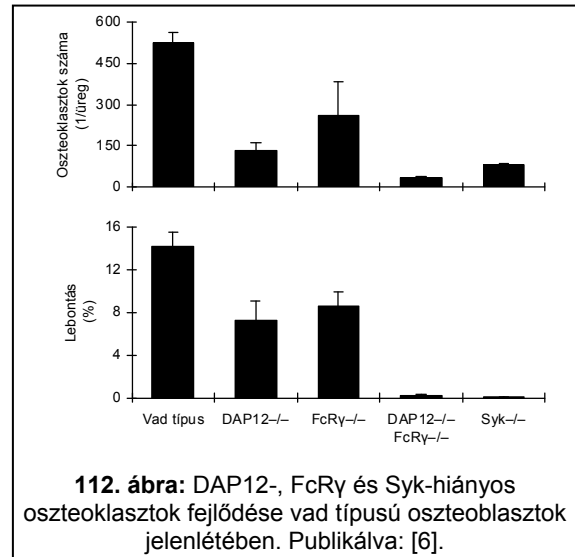


A DAP12 és az FcR γ csontanyagcserében betöltött szerepével kapcsolatos eddigi kísérleteinkben egy látszólagos ellentmondásra derült fény. Bár a DAP12 és az FcR γ együttes hiánya (DAP12 $^{-/-}$ FcR γ $^{-/-}$ mutáció) esetén mind az in vivo csontszerkezetben, mind az in vitro oszteoklaszt-fejlődésben jelentős károsodást tapasztaltunk, az egyszeres knockout mutációk esetében az in vivo és az in vivo vizsgálatok különböző eredményekre vezettek. A DAP12 hiánya ugyanis in vivo körülmények között a BV/TV értéknek csak kismértékű emelkedését hozta létre, míg ugyanez a mutáció in vitro körülmények között (M-

CSF és RANKL jelenlétében) az oszteoklaszt-fejlődés teljes gátlását eredményezte. Úgy tűnt tehát, hogy in vivo körülmények között az FcR γ képes részben kompenzálni a DAP12 hiányát, míg ugyanezen kompenzációra az M-CSF és RANKL hatására létrejövő oszteoklaszt-fejlődés során nincs lehetőség. Mindez egy olyan, FcR γ által közvetített in vivo kompenzációs mechanizmusra utal, amely a fent alkalmazott in vitro körülmények között nem tud létrejönni.

Az in vitro oszteoklaszt-fejlődés és a rekombináns M-CSF és RANKL által kiváltott in vitro oszteoklaszt-differenciációs rendszer közötti egyik lényeges eltérés az in vivo oszteoklaszt-fejlődéshez elengedhetetlen oszteoblasztok hiánya a fenti in vitro kísérleti rendszerben. Ezért a következő kísérletekben megvizsgáltuk a különböző genotípusú oszteoklaszt-előalakok oszteoklasztokká való differenciációját vad típusú egerek csöves csontjaiból in vitro kitenyésztett oszteoblasztokkal való együtt-tenyésztés során is. Mivel ilyen körülmények között az oszteoklasztok fejlődéséhez szükséges citokineket az oszteoblasztok biztosítják, a

tenyészetekhez nem adtunk rekombináns citokineket. Amint az a 112. ábrán látható, a DAP12 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ és a Syk $^{-/-}$ oszteoklaszt-előalakokból vad típusú oszteoblasztok jelenlétében is alig alakultak ki oszteoklasztok és a tenyészetek in vitro reszorpciós képessége is szinte teljesen megszűnt. Az FcR $\gamma^{-/-}$ oszteoklaszt-előalakok esetén mind az oszteoklasztok fejlődése, mint a reszorpciós aktivitásuk vizsgálata részleges károsodást mutatott ki. A legfontosabb megfigyelés ugyanakkor az volt, hogy a DAP12 $^{-/-}$ oszteoklaszt-előalakok vad típusú oszteoblasztok jelenlétében részben képesek voltak oszteoklasztokká differenciálódni és ezen tenyészetek jelentős in vitro reszorpciós képességgel is rendelkeztek. Az in vivo eredményekhez hasonlóan tehát vad típusú oszteoblasztok jelenlétében az FcR γ képes volt részben kompenzálni a DAP12 genetikai hiányát. Ez egyrészt arra utal, hogy az oszteoblasztok a RANKL (és M-CSF) mellett egy további, az oszteoklasztok FcR γ -fehérjéjén keresztüli további jelet közvetítenek az oszteoklasztok felé, másrészt feloldják az in vitro és in vivo eredmények közti látszólagos ellentmondást is.



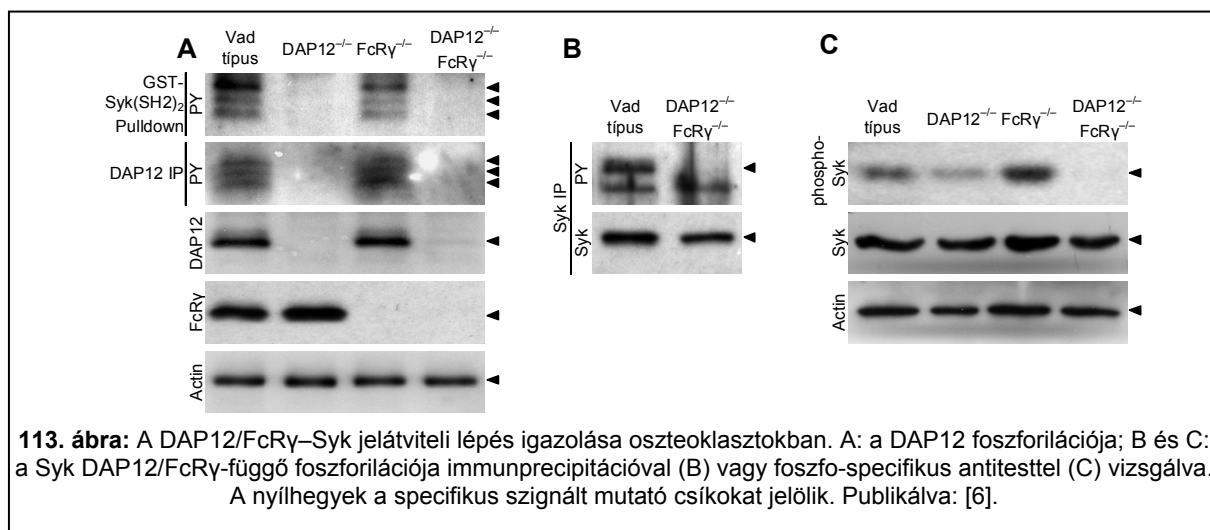
112. ábra: DAP12 $^{-/-}$, FcR $\gamma^{-/-}$ és Syk $^{-/-}$ oszteoklasztok fejlődése vad típusú oszteoblasztok jelenlétében. Publikálva: [6].

7.6.3. Immunreceptor-szerű jelátvitel oszteoklasztokban

A fenti eredmények arra utaltak, hogy két ITAM-tartalmú adapter-fehérje (a DAP12 és az FcR γ) és a Syk elengedhetetlen az oszteoklasztok fejlődéséhez. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a klasszikus immunreceptorok jelátviteléhez hasonlóan az oszteoklasztok fejlődéséhez is ITAM-motívumok foszforilációja és a Syk SH2-doménjeinek a foszforilált ITAM-tirozinokhoz való következményes kihorgonyzódása szükséges. A továbbiakban ezen jelátviteli lépések meglétét vizsgáltuk oszteoklasztokban.

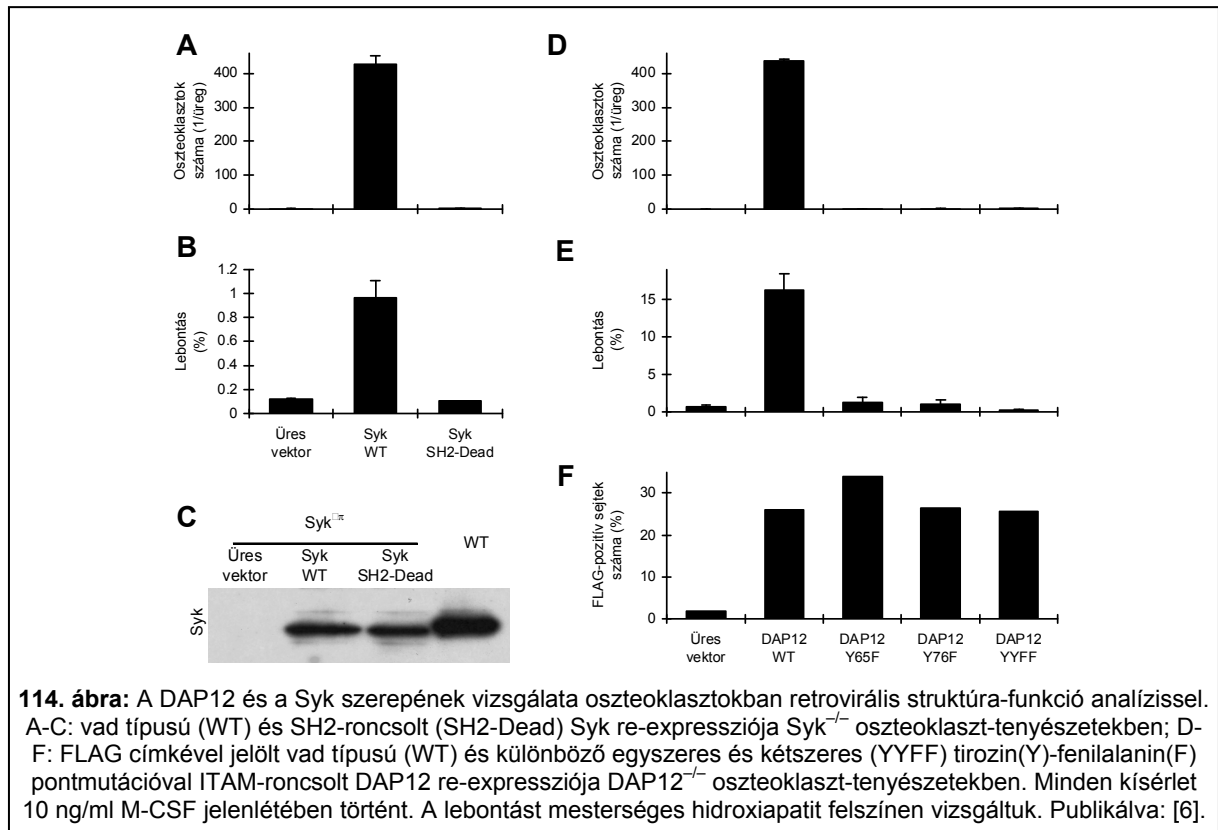
Először szeretnénk volna kimutatni, hogy a DAP12 és/vagy az FcR γ tényleg foszforilálódik az oszteoklasztok fejlődése során. Ennek érdekében oszteoklaszt-tenyészetek lizátumaiból a Syk tandem SH2-csoportjának GST-fúziós fehérjéjével (GST-Syk(SH2) $_2$) "lehúztuk" az ahhoz kötődni képes molekulákat, illetve DAP12-ellenes antitesttel

kiprecipitáltuk a DAP12-t, majd vizsgáltuk ezen mintákban a tirozin-foszforiláció jelenlétét. Amint az a 113. ábra A részén látható, vad típusú oszteoklasztok lizátumaiban mind a GST-Syk(SH2)₂ fúziós fehérjével mind a DAP12 immunprecipitáció során sikerült több tirozin-foszforilációs csíkot kimutatnunk, melyek molekulatömege megfelelt a DAP12 homodimer különböző foszforilált állapotainak várható magasságával. Ezek a csíkok DAP12^{-/-} és DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} tenyészetekben nem voltak megfigyelhetők, míg FcRγ^{-/-} tenyészetekben jelen voltak. Mindez arra utalt, hogy oszteoklasztok tenyészetében a DAP12 foszforilált állapotban van és ez a foszforiláció a DAP12 ITAM-tirozinjain jön létre.



Ezután azt vizsgáltuk meg, hogy a Syk foszforilálódik-e oszteoklasztokban, és ha igen, szükséges-e a DAP12 és/vagy az FcRγ a foszforilációhoz. Ezt a kérdést egyrészt immunprecipitációt követő foszfortirozin immunoblot módszerrel (113. ábra B panel) és foszforiláció-specifikus anti-Syk antitest alkalmazásával (113. ábra C panel) vizsgáltuk. Vad típusú oszteoklasztokban mindkét módszerrel sikerült kimutatni a Syk foszforilációját, és ez a foszforiláció DAP12^{-/-} sejtekben részlegesen csökkent, DAP12^{-/-}FcRγ^{-/-} sejtekben pedig teljes mértékben elmaradt (az FcRγ^{-/-} tenyészetekben nem csökkent a Syk foszforilációja). Összességében tehát a Syk aktiválódásához (az immunreceptorokhoz hasonlóan) ITAM-tartalmú adapter-fehérjék jelenléte szükséges.

A következő kísérletekben struktúra-funkció analízis segítségével próbáltuk igazolni, hogy az oszteoklasztok fejlődéséhez és működéséhez elengedhetetlen a Syk SH2-doménjeinek a működése és a DAP12 ITAM-tirozinjai. Ennek érdekében Syk^{-/-} és DAP12^{-/-} csontvelői sejteket retrovirális módszerrel transzdukáltunk a Syk, illetve a DAP12 vad típusú és pontmutáns verzióival és követtük a transzdukált sejtek oszteoklaszt-irányú differenciációját és reszorpciós képességét. Amint az a 114. ábra A-C részén látható, a vad típusú (WT) Syk re-expressziója Syk^{-/-} csontvelői sejtekben a fehérje megjelenését, és ezzel párhuzamosan érett oszteoklasztok kifejlődését és a mesterséges hidroxipatit-felszín lebontásának fokozódását eredményezte. A Syk C-terminális SH2-doménjét roncsoló R194A (SH2-Dead) mutációt hordozó Syk re-expressziója ezzel szemben a fehérje megjelenése ellenére nem volt képes helyreállítani az oszteoklasztok fejlődését és reszorpciós aktivitását. A Syk SH2-doménjei tehát elengedhetetlenek az oszteoklasztok fejlődéséhez.



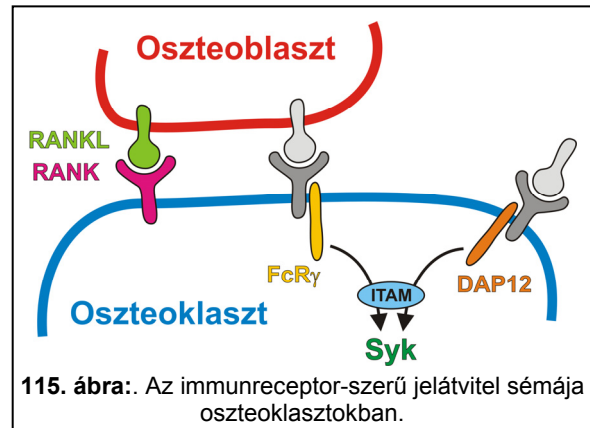
A DAP12 esetén a retrovirális rekonstitúciót FLAG címkével jelölt DAP12-vel végeztük. Amint az a 114. ábra D-F részén látható, a vad típusú (WT) DAP12 re-expressziója $DAP12^{-/-}$ sejtekben a FLAG címke megjelenése mellett helyreállította az oszteoklasztok fejlődését és reszorpciós aktivitását. A DAP12 ITAM motívumának két foszforilálható tirozinja közül bármelyiket (Y65F vagy Y76F) vagy mindkettőt (YYFF) fenilalaninra cserélve ugyanakkor a FLAG címke megjelenése (tehát a DAP12 expressziója) ellenére sem jött létre érdemi oszteoklaszt-fejlődés és oszteoklaszt-mediált reszorpció. A DAP12 ITAM-motívumának tirozinjai tehát szintén elengedhetetlenek az oszteoklasztok fejlődéséhez.

7.6.4. Megbeszélés

Az ebben a fejezetben bemutatott kísérletsorozat alapján egy új, immunreceptor-szerű jelpálya elengedhetetlen szerepét azonosítottuk oszteoklasztok fejlődésében és a nyugalmi csontanyagcserében [6]. A jelpálya része két ITAM-tartalmú adapter-fehérje, a DAP12 és az FcR γ , illetve a Syk tirozin-kináz, melyek fontos szerepet játszanak az oszteoklasztok jelátvitelében. Ez a jelpálya mind az oszteoklasztok in vitro fejlődéséhez és reszorpciós képességéhez (110-112. ábra), mind a normális csontanyagcsere létrejöttéhez szükséges. Utóbbi következtetésünket arra alapoztuk, hogy a DAP12 és az FcR γ együttes hiánya a trabekuláris csontállomány mineralizációjának drámai mértékű megemelését eredményezi (109. ábra). További biokémiai vizsgálataink kimutatták, hogy oszteoklasztokban létrejön a DAP12 foszforilációja, valamint hogy a DAP12 és az FcR γ elengedhetetlen a Syk aktivációjához (113. ábra). Retrovirális rekonstitúció segítségével végzett szerkezet-funkció vizsgálataink kimutatták továbbá, hogy az oszteoklasztok fejlődéséhez és működéséhez elengedhetetlenek a Syk SH2-doménjei és a DAP12 ITAM-tirozinjai (114. ábra). Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az oszteoklasztok

fejlődéséhez és működéséhez egy immunreceptor-szerű jelátvivő folyamat szükséges, melynek során a DAP12 és az FcR γ ITAM-függő módon aktiválja a Syk tirozin-kinázt (115. ábra).

A DAP12^{-/-} és FcR γ ^{-/-} egyszeresen mutáns egerek és az azokból származó csontvelői sejtenyészetek vizsgálata során tapasztalt látszólagos ellentmondás (vö. 109-111. ábrákat) lehetséges magyarázatának tanulmányozása során arra a következtetésre



jutottunk, hogy a két ITAM-tartalmú fehérje közül a DAP12 egy oszteoblasztoktól független, míg az FcR γ egy oszteoblaszt-függő (feltételezeten az oszteoblasztok felszínén jelen levő ligand felismerésével kapcsolatos) jeltovábbítási lépésben vesz részt és a két jelpálya in vitro körülmények között részben átfedő funkcióval bír (115. ábra). Eredményeink tehát arra is utalnak, hogy az oszteoblasztok nem csak a RANKL expressziója által, hanem egy további, FcR γ -Syk-függő folyamaton keresztül is szabályozzák az oszteoklasztok fejlődését.

A fenti kísérleteinket egy japán munkacsoporttal [161] párhuzamosan végeztük. A két közlemény [6,161] lényegében egyszerre jelent meg 2004. áprilisában és egymáshoz nagyon hasonló következtetésre jutott. Mindkét munkacsoport kimutatta, hogy 1) a DAP12^{-/-} FcR γ ^{-/-} egerekben az oszteoklasztok fejlődésének és működésének zavara miatt súlyos oszteopetózis alakul ki; 2) az oszteoklasztok jelátviteléhez szükségesek az ITAM tirozin-oldalláncai; illetve 3) hogy az FcR γ egy oszteoblaszt-függő, míg a DAP12 egy oszteoblaszt-független folyamatban vesz részt. A saját közleményünk [6] ezen túlmenően igazolta a DAP12/FcR γ -Syk interakció és a Syk tirozin-kináz jelentőségét, míg Koga és munkatársai [161] részletesen vizsgálták a DAP12 és az FcR γ lehetséges együttműködő partnereit és a két adapter-fehérje szerepét a RANK aktiválódását követő Ca²⁺-jel kialakulásában és az NFATc1 transzkripciós faktor aktiválódásában. Az egyetlen érdemi különbség a két közlemény között, hogy míg Koga és munkatársai az ITAM-függő jelpályát a RANK jelátviteli folyamatába illesztették be, addig a saját eredményeink ugyanennek a jelpályának a β_3 -integrinek szignalizációjában való részvételét valószínűsítették. Összességében a két közlemény egymáshoz nagyon hasonló következtetésekre jutott és egymást kiegészítő irányokba terjesztette ki az ITAM-függő jelátvitel szerepének vizsgálatát oszteoklasztokban.

A fentiekben nem foglalkoztam részletesen azzal, hogy milyen molekuláris mechanizmusok biztosítják a DAP12 és az FcR γ aktiválódását. Jelenlegi elképzeléseink szerint ez mindmáig nem egyértelműen azonosított DAP12- és FcR γ -asszociált receptorok közreműködésével jön létre. A DAP12 esetében a legvalószínűbb partner a TREM-2 fehérje, melynek genetikai hiánya a DAP12 hiányához hasonló tüneteket és in vitro károsodásokat eredményez [105,162-165]. Az FcR γ legvalószínűbb asszociációs partnere az OSCAR fehérje, melyről nemrég mutatták ki, hogy az oszteoblasztok és strómasejtek felszínén jelen levő kollagén felismerésében vesz részt [166-169]. A TREM-2 és az OSCAR szerepével kapcsolatos szakirodalom részletesebb elemzése ugyanakkor arra utal, hogy ezeken kívül feltételezhetően további DAP12- és FcR γ -asszociált receptorok is részt vesznek az oszteoklasztok jelátvitelében [161,165,168,169].

A fentiekben nem említettem a Syk szerepének esetleges vizsgálatát az in vivo csontanyagcserében. Ennek az oka az, hogy a Syk genetikai hiánya esetén kialakuló,

korábban már említett perinatális letalitás [53,59] nem teszi lehetővé a felnőtt $Syk^{-/-}$ egerek csontszerkezetének a vizsgálatát. Egy későbbi közleményben azonban Zou és munkatársai [123] megvizsgálták a $Syk^{-/-}$ magzatok csontszerkezetét és arra a következtetésre jutottak, hogy a csontszövet mennyisége már ebben a korban is jelentősen megemelkedik a Syk genetikai hiányában. A Syk tehát feltételezhetően az élő szervezetben is fontos szerepet játszik az oszteoklasztok általi csontlebonthatás létrejöttében.

Az ebben a fejezetben bemutatott eredményeknek számos további, klinikailag is releváns aspektusa van, mivel az általunk és Koga és munkatársai által azonosított jelpálya a kóros csontlebonthatás elleni küzdelem terápiás célpontja lehet. Különösen igaz ez a Syk esetében, mivel a Syk ellen már létezik klinikai kipróbálás alatt levő kismolekulájú kináz-gátló gyógyszerjelölt-vegyület (a fostamatinib; ld. fent és [151]). Az egyik lehetséges terápiás indikáció a posztmenopauzális oszteoporózis lehetne. A PLC γ 2-vel kapcsolatos alábbi eredményeink (121-122. ábra) és kollaborációs partnereink későbbi, tőlünk független publikációja [170] ugyanakkor arra utal, hogy a nyugalmi és az ovariumok működésének leállítását követő csontlebonthatási folyamatok nem szükségszerűen történnek ugyanazon jelátviteli folyamatok részvételével. Ez a következtetés és az a tény, hogy hosszan tartó de önmagában kevésbé súlyos megbetegedés (mint pl. a posztmenopauzális oszteoporózis) esetén kiemelt figyelmet kell szentelnünk az alkalmazott terápiák esetleges mellékhatásainak, óvatosságra int azzal kapcsolatban, hogy a DAP12/Fc γ R– Syk jelpálya megfelelő terápiás célpontnak bizonyul-e posztmenopauzális oszteoporózisban.

Lényegesen biztatóbb a helyzet rheumatoid arthritis esetén. Ezt a betegséget szintén jelentős kóros csontlebonthatás kíséri, melyhez szintén elengedhetetlen az oszteoklasztok működése [171-177]. Jelenleg nem ismert, hogy az oszteoklasztokon belüli DAP12/Fc γ R– Syk jelpálya szerepet játszik-e a rheumatoid arthritis során létrejövő csontlebonthatásban és sem $Syk^{-/-}$ kimérákon ezzel kapcsolatban kapott saját eredményeink (99. ábra) [15], sem a fostamatinib-bel mások által kollagén-indukált arthritisben kapott eredmények [149] nem teszik lehetővé annak vizsgálatát, hogy az oszteoklasztokon belüli Syk részt vesz-e az arthritis-kiváltotta csontlebonthatásban (ezt a Syk oszteoklaszt-specifikus törlésével lehetne vizsgálni). Amennyiben azonban kiderül, hogy az oszteoklasztokon belüli DAP12/Fc γ R– Syk jelpálya fontos szerepet játszik az arthritis-kiváltotta csontlebonthatás létrejöttében, ez a jelpálya a rheumatoid arthritis kezelésének újabb fontos terápiás célpontjává válhat, és arra utalhat, hogy a fostamatinib-től az egyéb, kizárólag a gyulladásos sejteken ható vegyületeknél hatékonyabb "csontvédő" hatás várható.

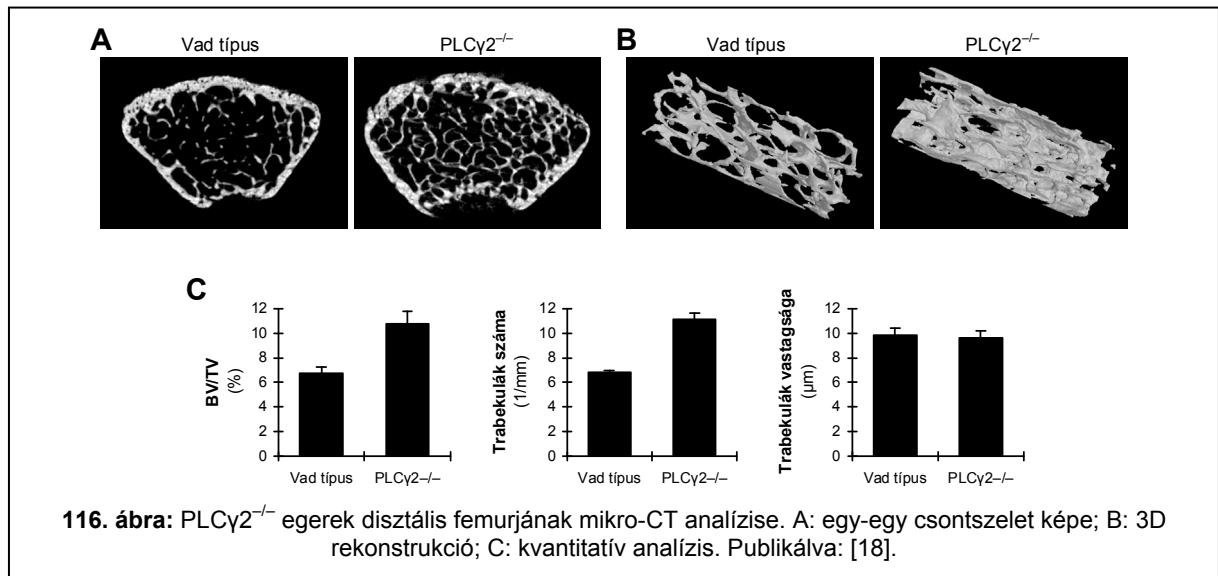
7.7. A PLC γ 2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Ebben a fejezetben a PLC γ 2-nek az oszteoklasztok jelátvitelében, valamint a nyugalmi és az ovariektómiát követő csontanyagcserében betöltött szerepével kapcsolatos kísérleteinket mutatom be.

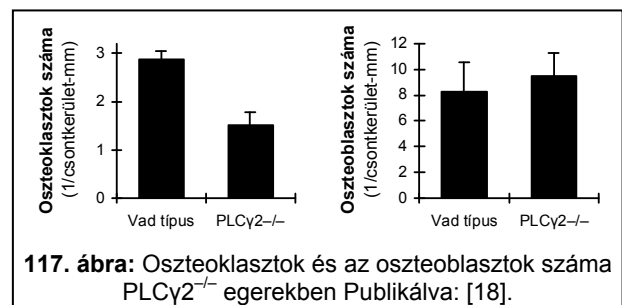
7.7.1. A PLC γ 2 szerepe az in vivo csontlebonthatásban

A PLC γ izoformák immunreceptorok jelátvitelében betöltött szerepe és a PLC γ 2 $^{-/-}$ neutrofilekben megfigyelt funkcionális zavarok alapján felmerült bennünk a PLC γ 2 esetleges szerepe a csontanyagcserében. Ennek vizsgálatára vad típusú és PLC γ 2 $^{-/-}$ egerek

femurjának disztális metafízisét mikro-CT analízisnek vetettük alá. Amint azt az 116. ábrán látható csontszelet és háromdimenziós rekonstrukciók kép mutatja, a $PLC\gamma 2^{-/-}$ egerekben jelentősen megnövekedett a mineralizálódott trabekuláris csontállomány mennyisége. Ezt megerősítette az adatok kvantitatív vizsgálata (116. ábra C része), ami a relatív csonttömeg (BV/TV) szignifikáns növekedését mutatta a $PLC\gamma 2^{-/-}$ egerekben. Ezen növekedésért elsősorban a trabekulák számának, nem pedig a trabekulák vastagságának a változása volt felelőssé tehető. Itt be nem mutatott kísérleteinkben hasonló eredményeket kaptunk a proximális tibia hisztomorfometriai vizsgálata során is [18].



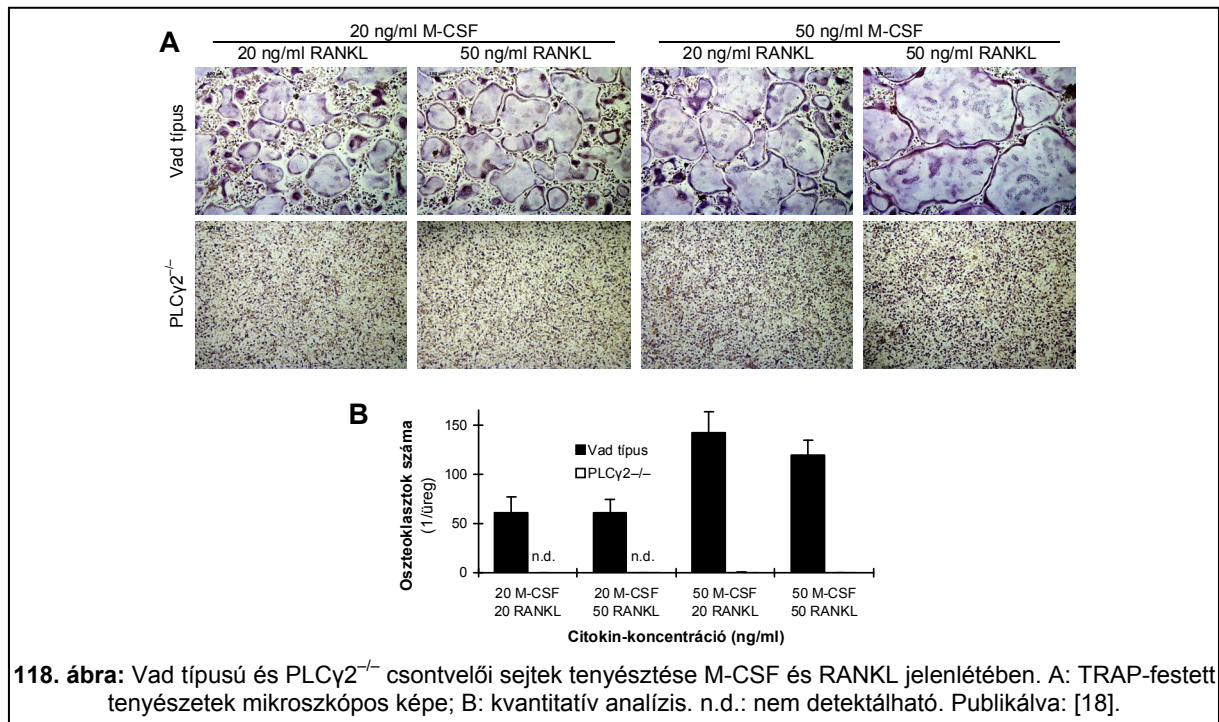
A trabekuláris csontállomány mennyiségének megnövekedését vagy az oszteoklasztok általi csontlebontás gátlása, vagy az oszteoblasztok általi csontfelépítés fokozódása okozhatja. Ennek a kérdésnek a vizsgálatára az egerek proximális tibiáiban hisztomorfometriai módszerrel meghatároztuk az egységnyi csontkerületre eső oszteoklasztok és oszteoblasztok számát. Amint azt a 117. ábra mutatja, a $PLC\gamma 2^{-/-}$ egerekben jelentős mértékben csökkent az egységnyi csontkerületre jutó oszteoklasztok száma, míg az oszteoblasztok száma nem különbözött a vad típusú sejtekben kapott értéktől. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a $PLC\gamma 2$ hiányában az oszteoklasztok fejlődési zavara jön létre.



7.7.2. A $PLC\gamma 2$ szerepe oszteoklasztokban

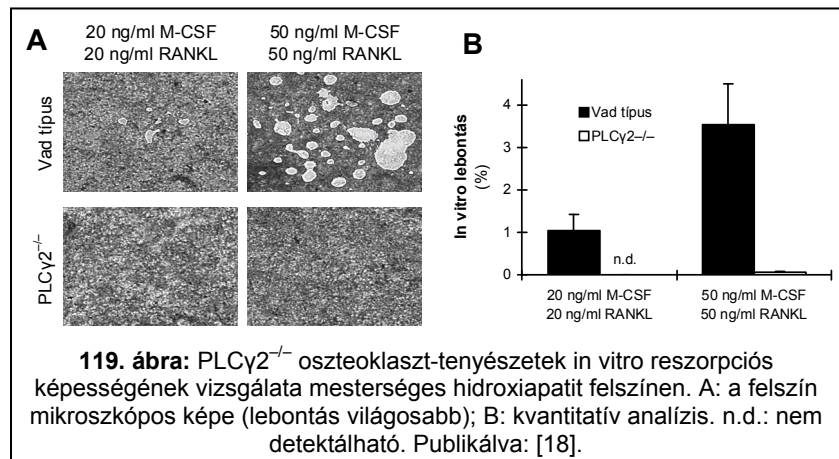
A fentiek alapján felmerült, hogy a $PLC\gamma 2$ szerepet játszik az oszteoklasztok fejlődésében. Ezt a lehetőséget $PLC\gamma 2^{-/-}$ csontvelői sejtek M-CSF és RANKL jelenlétében való in vitro tenyésztésével vizsgáltuk. Amint az a 118. ábrán látható, vad típusú csontvelői sejtekből 20 ng/ml M-CSF és 20 ng/ml RANKL jelenlétében nagyszámú sokmagvú TRAP-pozitív óriássejt (oszteoklaszt) jött létre, míg a $PLC\gamma 2^{-/-}$ tenyészetekben ilyen sejteket egyáltalán nem találtunk. A két genotípus közti különbség az M-CSF és/vagy a RANKL

koncentrációjának megemelése után is megmaradt. A PLCy2 tehát fontos szerepet játszik az oszteoklasztok in vitro kialakulásában M-CSF és RANKL hatására.



A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a PLCy2^{-/-} tenyészetek képesek-e lebontani a mesterséges hidroxipatit felszínt. Amint az a 119. ábrán látható, míg vad típusú tenyészetekben

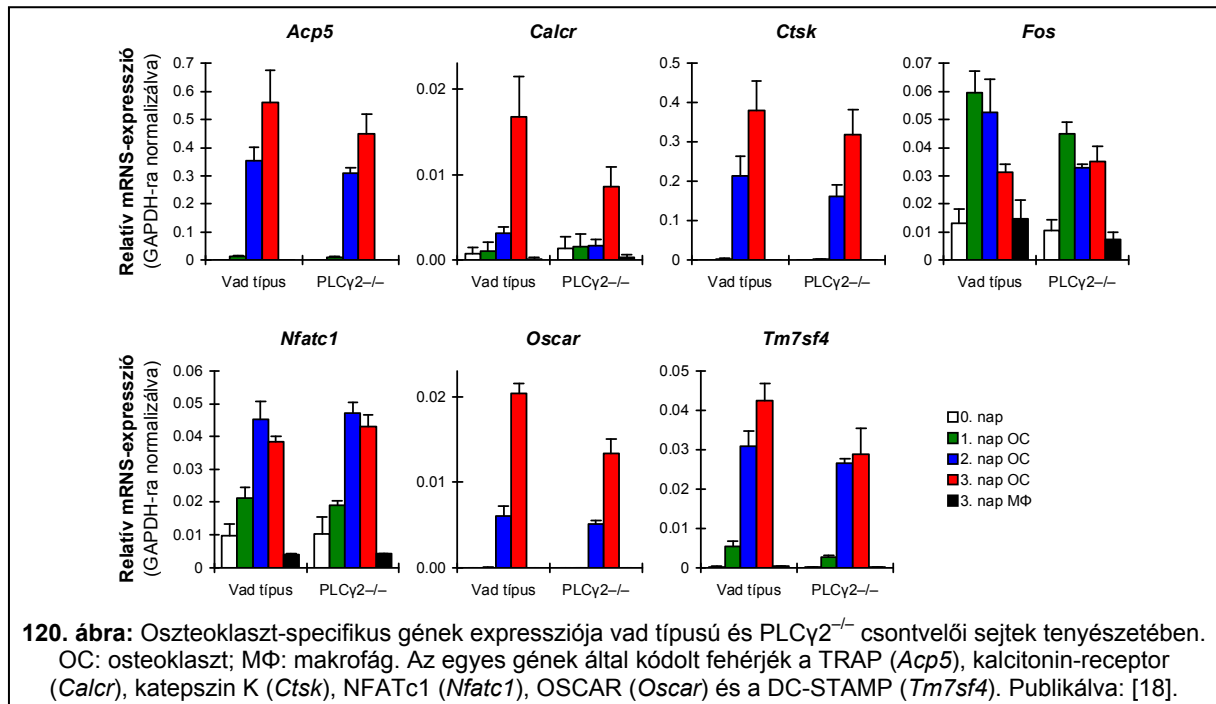
egyértelmű lebontásra utaló jeleket láttunk ami magas citokin-koncentrációk mellett még kifejezettebb volt, PLCy2^{-/-} tenyészetekben gyakorlatilag nem találtunk lebontásra utaló jelet sem alacsony, sem magas citokin-koncentráció mellett.



Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a PLCy2 genetikai hiánya hogyan befolyásolja az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját. A fenti 118. ábrán bemutatott mikroszkópos képek azt mutatták, hogy bár a PLCy2^{-/-} tenyészetekben nem jöttek létre sokmagvú óriássejtek, a TRAP expressziója a PLCy2 hiányában is megemelkedett (ld. még [18]), a PLCy2 hiánya tehát feltételezhetően nem befolyásolta a RANKL hatására létrejövő oszteoklaszt-specifikus TRAP-expresszió kialakulását.

Ezután kvantitatív RT-PCR segítségével részletesen is megvizsgáltuk az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját vad típusú és PLCy2^{-/-} csontvelői sejtek tenyészetében. A kísérletek során az oszteoklaszt-makrofág előalakokat 1-3 napig M-CSF és RANKL jelenlétében (oszteoklaszt minták) vagy 3 napig csak M-CSF jelenlétében (makrofág minták)

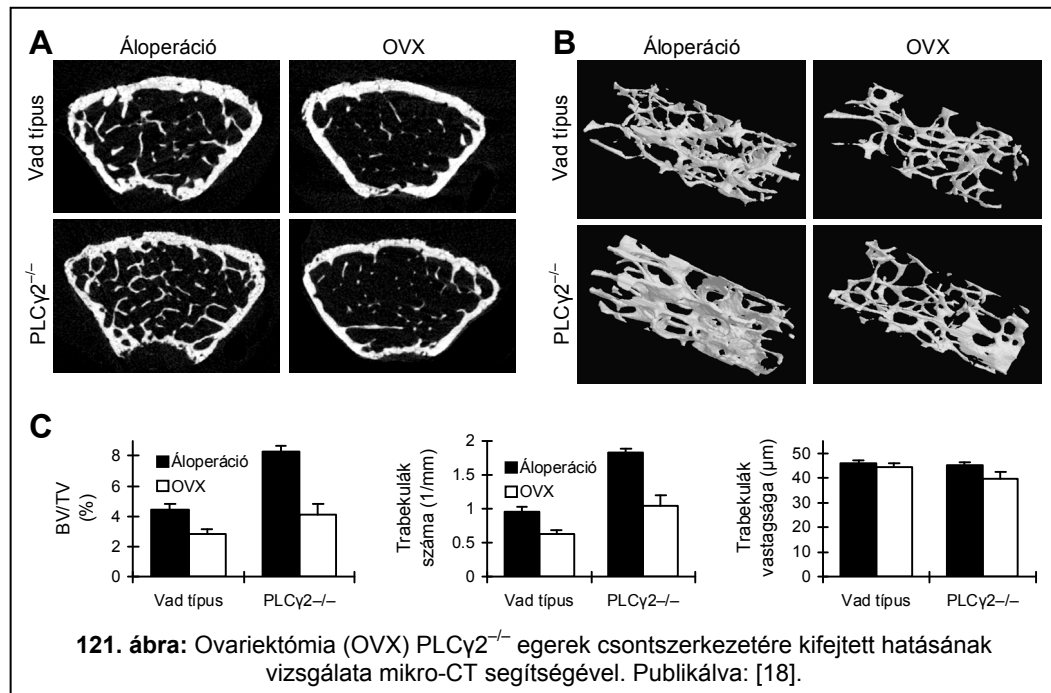
tenyésztettük. Amint az a 120. ábrán látható, a TRAP (*Acp5*), kalcitonin-receptor (*Calcr*), katepszin K (*Ctsk*), NFATc1 (*Nfatc1*), OSCAR (*Oscar*) és DC-STAMP (*Tm7sf4*) molekulákat kódoló gének expressziója jelentősen megemelkedett az oszteoklasztok fejlődése során (de nem változott a makrofágok differenciációja során), és a PLCy2 genetikai hiánya nem okozta ezen génexpressziós mintázat lényegi változását. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a PLCy2^{-/-} sejtekben megfigyelhető oszteoklaszt-fejlődési zavart feltételezhetően nem az oszteoklaszt-specifikus génexpresszió gátlása okozza.



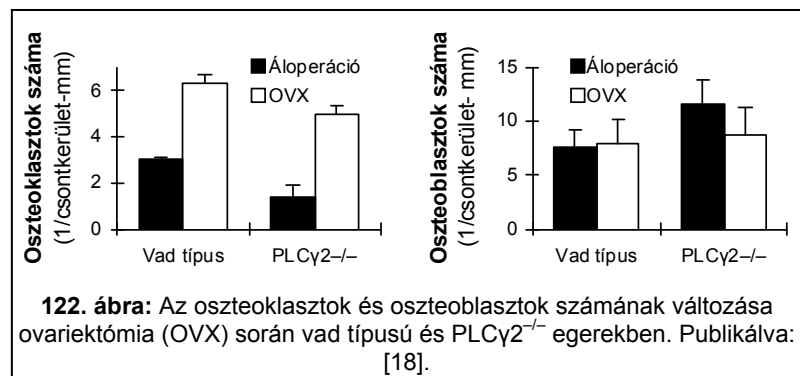
7.7.3. Ovariektómia hatásának vizsgálata PLCy2 hiányában

A PLCy2-nek az oszteoklasztok fejlődésére és a nyugalmi csontállományra kifejtett hatásai felvetették annak a lehetőségét, hogy a PLCy2 fontos szerepet játszik a kóros csontlebontás, azon belül is a posztmenopauzális osteoporosis kialakulásában. Ennek a vizsgálatára vad típusú és PLCy2^{-/-} nőstény egerek petefészkét sebészi úton eltávolítottuk (ovariektómia) és megvizsgáltuk a beavatkozásnak a csontszerkezetre kifejtett hatását. A vizsgálatokat a műtéti beavatkozást követő 6. héten végeztük, a kontroll egereken áloperációt végeztünk. Amint az a 121. ábrán látható, az ovariektomizált vad típusú nőstényekben csökkent a mineralizálódott trabekuláris csontállomány mennyisége, ami elsősorban a csontgerendák számának, nem pedig azok vastagságának a csökkenéséből adódott. Várakozásainkkal ellentétben a PLCy2^{-/-} egerekben is létrejött a csontállomány csökkenése, ami mind abszolút értékben (a BV/TV abszolút értékének csökkenésében), mind a kiindulási BV/TV érték százalékában kifejezve nagyobb volt, mint a vad típusú egerekben megfigyelhető csontbontás. A jelenséget legjobban az szemlélteti, hogy míg az áloperált egerekben lényeges különbség volt a vad típusú és a PLCy2^{-/-} egerek között, addig az ovariektomián átesett egerek esetében nem volt érdemi különbség a két genotípus között, tehát a PLCy2^{-/-} egerekben a magasabb kiindulási értékről is ugyanarra a szintre csökkent a relatív csonttömeg értéke, mint a vad típusú állatokban. Hasonló eredményeket adott a proximális tibia hisztomorfometriai vizsgálata is [18]. Összességében tehát elmondhatjuk,

hogy bár a PLC γ 2 fontos szerepet játszik a nyugalmi csontanyagcserében, a fehérvérnek nincs jelentős szerepe a posztmenopauzális osteoporosis kialakulásában.



A PLC γ 2^{-/-} egerekben ovariectomia hatására megfigyelt kifejezett csontbontás miatt hisztomorfometriai módszerrel megvizsgáltuk az oszteoklasztok és az oszteoblasztok számának az alakulását az ovariectomia után. Amint az a 122. ábrán látható, vad típusú egerekben az ovariectomia hatására jelentősen megemelkedett az oszteoklasztok száma, míg az oszteoblasztok száma nem változott. Érdekes módon, bár a korábbiaknak megfelelően a PLC γ 2^{-/-} egerekben a nyugalmi oszteoklaszt-szám lényegesen alacsonyabb volt, az ovariectomia hatására ezekben az egerekben is megemelkedett az oszteoklasztok száma és megközelítette a vad típusú egerekben megfigyelt értéket. Az oszteoblasztok száma a PLC γ 2^{-/-} egerekben sem változott szignifikáns mértékben.

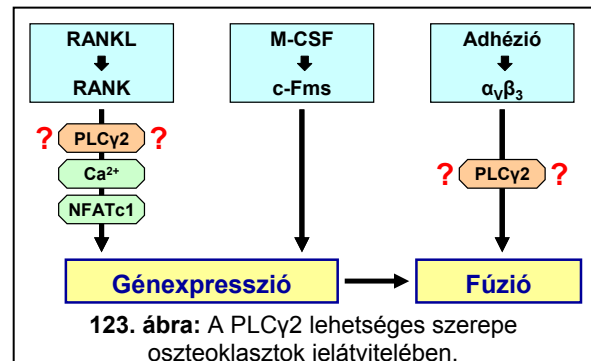


7.7.4. Megbeszélés

Koga és munkatársai [161] korábban felvetették, hogy a DAP12 és az Fc γ R elsődleges szerepe valamely PLC γ izoforma RANK általi aktiválódása lenne, melynek következtében intracelluláris Ca²⁺-oszcillációk jönnek létre, ami aktiválja az oszteoklaszt-képződés egyik központi szabályozó-fehérjét, az NFATc1 transzkripciós faktort. Részben ezen feltételezés hatására vizsgáltuk meg a PLC γ 2 szerepét oszteoklasztok fejlődésében és működésében. Eredményeink arra utaltak, hogy a PLC γ 2 fontos szerepet játszik az oszteoklasztok in vitro

fejlődésében és működésében (118-119. ábra), valamint az in vivo oszteoklaszt-fejlődésben és a nyugalmi csontbontásban (116-117. ábra) [18]. Ezzel összevethető eredményeket tőlünk függetlenül korábban két másik munkacsoport is közölt [178,179], a PLC γ 2 szerepe az oszteoklasztok jelátvitelében tehát megfelelően alá van támasztva.

Bár mindhárom munkacsoport [18,178,179] egyetértett abban, hogy a PLC γ 2 fontos szerepet tölt be az oszteoklasztok jelátvitelében, a jelenség magyarázata kevésbé tűnik egyértelműnek. Mao és munkatársai [178] és Chen és munkatársai [179] azt a következtetést vonták le, hogy a PLC γ 2 (Koga és munkatársai [161] eredeti feltételezésének megfelelően) a RANK jelátvitelében vesz részt azért, hogy aktiválja



a Ca²⁺-függő NFATc1 transzkripciós faktort (123. ábra). Erre a következtetésre az oszteoklaszt-specifikus génexpresszió látszólagos zavarából következtettek. Saját, a másik két munkacsoportnál lényegesen részletesebb génexpressziós vizsgálataink ezzel szemben nem mutattak lényeges károsodást az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójában, az NFATc1 expressziójának a lefutása pedig teljesen megegyezett a vad típusú és a PLC γ 2^{-/-} tenyészetekben (120. ábra) [18]. Biokémiai vizsgálatainkban ráadásul nem sikerült kimutatnunk a PLC γ 2 RANKL hatására való aktiválódását, míg a sejtek adhéziója jelentős mértékben fokozta a PLC γ 2 foszforilációját [18]. Mivel a β_3 -integrineken keresztüli sejtadhézió fontos szerepet játszik az oszteoklasztok fúziójában, eredményeink arra utalnak, hogy a PLC γ 2 (legalábbis részben) a β_3 -integrineken keresztüli jelátvitel közvetítésével az oszteoklasztok fúziójához szükséges (123. ábra). Ez egybecsengene a PLC γ 2-nek más sejtek integrin-jelátvitelében betöltött szerepével is (40-42. ábra) [13,128,129].

A nyugalmi csontszerkezet vizsgálata mellett az ovariektómia hatására létrejövő csontbontás mértékét is megvizsgáltuk a PLC γ 2^{-/-} egerekben. Várakozásainkkal ellentétben azt tapasztaltuk, hogy a PLC γ 2 hiánya nem csökkenti, hanem inkább fokozza az ovariektómiát követő csontvesztést (121. ábra). A jelenség háttérében feltételezhetően az áll, hogy ovariektómiát követően a PLC γ 2^{-/-} egerekben is jelentősen megemelkedik az oszteoklasztok száma a csontszövetben (122. ábra). Bár ennek a megfigyelésnek a magyarázatát nem ismerjük, eredményeink arra utalnak, hogy a nyugalmi és az ovariektómia-kiváltotta csontbontás különböző mechanizmusok közvetítésével jön létre. Bár eredeti reményeink szerint a PLC γ 2 akár terápiás célpontként is szóba jöhetett volna a posztmenopauzális oszteoporózis kezelésében, a 121-122. ábrán bemutatott eredmények alapján ez az elképzelés nem bizonyult helytállónak.

8. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID TÁRGYALÁSA

A következőkben röviden összefoglalom az értekezés eredményeit, és röviden tárgyalom az eredmények egyes távolabbi összefüggéseit.

8.1. Az értekezésben bemutatott legfontosabb eredmények

Az értekezésben bemutatott kísérletek fontosabb új eredményei az egyes célkitűzések szerinti csoportosításban az alábbiakban:

1) Az integrin-jelátvitel vizsgálata hemopoetikus eredetű sejtekben

Kimutattuk, hogy a β_2 - és β_3 -integrinek jelátviteléhez különböző hemopoetikus sejtekben elengedhetetlen a Syk tirozin-kináz DAP12 és FcR γ általi, az immunreceptorok jelátvitelére emlékeztető módon létrejövő aktivációja. Kimutattuk továbbá, hogy a β_2 -integrinek jelátvitelében fontos szerepet játszik az SLP-76 és a PLC γ 2, de nem szükséges hozzá a p190RhoGAP fehérje.

2) Jelátviteli folyamatok vizsgálata a neutrofilek sejtváándorlása során

Kimutattuk, hogy a fenti jelpálya nem szükséges a neutrofilek β_2 -integrin-függő in vitro és in vivo migrációjához, ami az adherens aktiváció és migráció jelátviteli folyamatai közti különbségre utal.

3) Az Fc-receptorok szerepének és jelátvitelének vizsgálata neutrofilekben

Kimutattuk, hogy egér neutrofilek immobilizált immunkomplexek általi aktiválódása az Fc γ RIII és az Fc γ RIV együttműködésével valósul meg és szükséges hozzá a PLC γ 2 fehérje.

4) A G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátviteli szerepe neutrofilekben és hízósejtekben

Kimutattuk, hogy neutrofilek primer és szekunder granulumainak fMLP-kiváltotta ürülésében fontos szerepet játszik az Src-kinázokon keresztül aktiválódó p38 MAP-kináz, míg a szekretoros vezikulák ürüléséhez ugyanez a mechanizmus nem szükséges. Kimutattuk továbbá, hogy a Syk nem vesz részt a G-fehérje-kapcsolt receptorok jelátvitelében neutrofilekben és hízósejtekben.

5) Jelátviteli folyamatok vizsgálata in vivo gyulladásos betegségmodellekben

Kimutattuk, hogy a Syk és a PLC γ 2 elengedhetetlen szerepet játszik az autoantitestek által kiváltott kísérletes arthritis létrejöttében.

6) Immunreceptor-szerű jelátvitel oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Azonosítottunk egy új oszteoklaszt-jelpályát, melyben a DAP12 és az FcR γ ITAM-függő módon aktiválja a Syk-et. Az FcR γ egy oszteoblaszt-függő, míg a DAP12 egy oszteoblaszt-független jeltovábbításban vesz részt. Ez a jelpálya fontos szerepet játszik az oszteoklasztok fejlődésében és a nyugalmi csontlebonthatásban.

7) A PLC γ 2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Kimutattuk, hogy a PLC γ 2 fontos szerepet játszik az oszteoklasztok in vitro és in vivo fejlődésében és a nyugalmi csontanyagcserében, de nem szükséges az ovariektómiát követő fokozott csontlebontáshoz.

8.2. Immunreceptor-szerű jelátvitel az adaptív immunrendszeren túl

Kísérleteink egyik legfontosabb megállapítása, hogy a klasszikus immunreceptorokra (pl. a limfociták antigén-receptoraira) jellemző és sokáig arra specifikusnak tartott ITAM-függő jelátvitel számos további biológiai folyamatban is központi szerepet játszik. Ezek közül saját eredményeink arra utalnak, hogy a hemopoetikus sejtek β_2 - és β_3 -integrinjeinek jelátvitelére a Syk tirozin-kináznak a DAP12 és az FcR γ általi ITAM-függő aktiválódásán keresztül jön létre [2,8]. Hasonlóképpen az oszteoklasztok fejlődéséhez szintén elengedhetetlen a Syk DAP12 és FcR γ általi, ITAM-mediált aktiválódása [6]. A klasszikus immunreceptorok jelátviteléhez való további hasonlóságra utal a PLC γ 2-nek és az SLP-76-nak az integrinek jelátvitelében [5,13], illetve a PLC γ 2-nek az oszteoklasztok fejlődésében [18] betöltött szerepe. Saját kísérleteinkkel párhuzamosan más munkacsoportok (részben a mi részvételünkkel) kimutatták, hogy a Syk ITAM-függő aktiválódásához hasonló folyamatok szerepet játszanak a nyirokerek fejlődésében [21,180], valamint a kórokozók [27,28,181-184] és a szöveti károsodás [185,186] C-típusú lektinek általi felismerésében. Egy hasonló mechanizmust mutattak ki ecdymuslicák glia-sejtjeiben is [187], miközben ezeknek az állatoknak egyáltalán nincs adaptív immunrendszerük. Ezen eredmények összességében arra utalnak, hogy a Syk ITAM-függő aktiválódása egy ősi jelátviteli mechanizmus, mely feltételezhetően az evolúció során később vált az adaptív immunrendszer központi jelátvivő mechanizmusává [9,11,16].

8.3. Oszteoimmunológia: Az immun- és csontrendszer közti párhuzamosságok

A csontanyagcserével kapcsolatos kísérleteink során meglepő hasonlóságot fedeztünk fel az oszteoklasztok fejlődésében és az adaptív immunrendszer működésében szerepet játszó jelátviteli folyamatok között, amennyiben mindkettőhöz elengedhetetlen a Syk tirozin-kináz ITAM-tartalmú adapter-fehérjéken keresztüli aktiválódása és a PLC γ izoformák részvétele [6,13,18]. Velünk párhuzamosan számos más munkacsoport is jelentős hasonlóságokat fedezett fel az immun- és csontrendszer működésében szerepet játszó citokinek [188-190], transzkripciós faktorok [188,191,192] és jelátvivő fehérjék között [161,193-198]. Mindezek együttesen egy új tudományterület, az oszteoimmunológia megalapozását eredményezték, melynek célja az immunrendszer és a csontrendszer összefüggéseinek, hasonlóságainak és kölcsönhatásainak a tanulmányozása [188].

8.4. Klinikai vonatkozások

Az értekezésemben bemutatott számos eredménynek jelentős klinikai és farmakológiai vonatkozása is van. A betegségek patomechanizmusában szerepet játszó molekuláris szintű

folyamatok azonosítása ugyanis egyrészt a betegségek jobb megértéséhez, másrészt új diagnosztikai és terápiás eljárások kidolgozásához vezethet. A kísérleteinkben azonosított új jelpályák az autoimmun gyulladásos betegségek és a kóros csontlebontás gyógyszeres terápiájának új célpontjai lehetnek. Ez különösen igaz a Syk fehérjére, amely feltételezéseink szerint több ponton is (az immunizációs és az effektor fázisban, illetve a csontteróziók létrejöttében) fontos szerepet játszik az autoimmun arthritis kialakulásában. Ezt megerősítik a Syk ellen korábban készült fostamatinib gátlószerekkel humán rheumatoid arthritisben kapott igen pozitív eredmények [151], melyek alapján jelenleg a fostamatinib a rheumatoid arthritis egyik legígéretesebb szájon át szedhető kismolekulájú gyógyszerjelölt-vegyülete. A Syk oszteoklasztokban és a rheumatoid arthritis in vivo állatmodelljében való szerepének igazolásával [6,15] nagymértékben járultunk hozzá a Syk terápiás célmolekulává való kijelöléséhez. Eredményeink alapján a PLC γ 2 hasonló terápiás célpont lehet, és a PLC γ 2^{-/-} egerek kevésbé súlyos általános fenotípusa miatt elképzelhető, hogy a PLC γ 2 gátlásával a fostamatinibénél kevésbé súlyos mellékhatások lépnének fel. A kísérleteink alapján felmerülő egyik legérdekesebb kérdés pedig az, hogy az általunk azonosított célmolekulák a gyulladás elősegítésén túl milyen mértékben járulnak hozzá a rheumatoid arthritis és a malignus csonttáttétek során létrejövő kóros csontlebontáshoz. Miközben a fostamatinib III. fázisú klinikai vizsgálata reményeink szerint választ ad a vegyület csontszerkezetre kifejtett hatására, a Syk és a PLC γ 2 oszteoklaszt-specifikus törlésével kapcsolatos folyamatban lévő kísérleteink remélhetőleg nemsokára genetikai megközelítéssel is tisztázni fogják a két fehérje hozzájárulását a kóros csontlebontás létrejöttéhez.

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1. Összesített tudományometriai adatok

	Impakt faktor	Független hiv.
Az értekezés alapját képező közlemények	212,480	810
A PhD-dolgozatban nem szereplő további közlemények	148,280	443
A PhD-dolgozatban szereplő közlemények	15,922	161
Összesen	376,682	1414

Összes hivatkozások száma: 1828

Hirsch index (összes / független hivatkozások alapján): 21 / 21

9.2. Az értekezés alapját képező közlemények

	Impakt faktor	Függlen hiv.
[1] Mócsai A , Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA and Ligeti E: <i>Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases.</i> <i>J Immunol</i> 2000, 164 : 4321-4331.	6,834	127
[2] Mócsai A , Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL and Lowell CA: <i>Syk Is Required for Integrin Signaling in Neutrophils.</i> <i>Immunity</i> 2002, 16 : 547-558.	17,468	116
[3] Obergfell A, Eto K, Mócsai A , Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA and Shattil SJ: <i>Coordinate Interactions of Csk, Src and Syk Kinases with $\alpha_{IIb}\beta_3$ Initiate Integrin Signaling to the Cytoskeleton.</i> <i>J Cell Biol</i> 2002, 157 : 265-275.	12,522	168
[4] Mócsai A , Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T and Lowell CA: <i>G-Protein-Coupled Receptor Signaling in Syk-Deficient Neutrophils and Mast Cells.</i> <i>Blood</i> 2003, 101 : 4155-4163.	10,120	25
[5] Newbrough SA, Mócsai A , Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, Lowell CA and Koretzky GA: <i>SLP-76 Regulates Fcγ Receptor and Integrin Signaling in Neutrophils.</i> <i>Immunity</i> 2003, 19 : 759-769.	16,016	21
[6] Mócsai A* , Humphrey MB*, Van Ziffle JAG, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA and Nakamura MC: <i>The Immunomodulatory Adapter Proteins DAP12 and Fc-receptor γ-chain (FcRγ) Regulate Development of Functional Osteoclasts Through the Syk Tyrosine Kinase.</i> <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2004, 101 : 6158-6163. *: megosztott első szerzők	10,452	132

	Impakt faktor	Függlen hiv.
[7] Jakus Z, Berton G, Ligeti E, Lowell CA and Mócsai A : <i>Responses of Neutrophils to Anti-Integrin Antibodies Depends on Costimulation through Low-Affinity FcγRs: Full Activation Requires Both Integrin and Nonintegrin Signals.</i> <i>J Immunol</i> 2004, 173 : 2068-2077.	6,486	14
[8] Mócsai A* , Abram CL*, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA: <i>Integrin Signaling in Neutrophils and Macrophages Uses Adaptors Containing Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs.</i> <i>Nat Immunol</i> 2006, 7 : 1326-1333. *: megosztott első szerzők	27,596	79
[9] Fodor S, Jakus Z and Mócsai A : <i>ITAM-Based Signaling Beyond the Adaptive Immune Response.</i> <i>Immunol Lett</i> 2006, 104 : 29-37.	2,352	34
[10] Schymeinsky J, Sindrilaru A, Frommhold D, Sperandio M, Gerstl R, Then C, Mócsai A , Scharffetter-Kochanek K and Walzog B: <i>The Vav Binding Site of the Non-Receptor Tyrosine Kinase Syk at Tyr 348 Is Critical for β₂ Integrin (CD11/CD18)-Mediated Neutrophil Migration.</i> <i>Blood</i> 2006, 108 : 3919-3927.	10,370	24
[11] Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA and Mócsai A : <i>Immunoreceptor-Like Signaling by β₂ and β₃ Integrins.</i> <i>Trends Cell Biol</i> 2007, 17 : 493-501.	13,527	25
[12] Jakus Z, Németh T, Verbeek JS and Mócsai A : <i>Critical But Overlapping Role of FcγRIII and FcγRIV in Activation of Murine Neutrophils by Immobilized Immune Complexes.</i> <i>J Immunol</i> 2008, 180 : 618-629.	6,000	6
[13] Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M and Mócsai A : <i>Critical Role of Phospholipase Cγ2 in Integrin and Fc Receptor-Mediated Neutrophil Functions and the Effector Phase of Autoimmune Arthritis.</i> <i>J Exp Med</i> 2009, 206 : 577-593.	14,505	11
[14] Németh T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Z, Walzog B, Settleman J and Mócsai A : <i>Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: Generation and analysis of a novel null mutation in mice.</i> <i>J Immunol</i> 2010, 185 : 3064-3075.	5,745	0
[15] Jakus Z, Simon E, Balázs B and Mócsai A : <i>Genetic Deficiency of Syk Protects Mice from Autoantibody-Induced Arthritis.</i> <i>Arthritis Rheum</i> 2010, 62 : 1899-1910.	8,435	1
[16] Mócsai A , Ruland J and Tybulewicz VLJ: <i>The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions.</i> <i>Nat Rev Immunol</i> 2010, 10 : 387-402.	35,196	26
[17] 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 and Hawkins PT: <i>PI3Kβ plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes.</i> <i>Science Signal</i> 2011, 4 : ra23.	6,120	1

	Impakt faktor	Függlen hiv.
[18] Kertész Z, Györi D, Körmendi S, Fekete T, Kis-Tóth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavölgyi E, Dobó-Nagy C and Mócsai A : <i>Phospholipase Cy2 Is Required for Basal but not Oestrogen Deficiency-Induced Bone Resorption.</i> <i>Eur J Clin Invest</i> 2011 (in press; doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02556.x.).	2,736	0
Összesen	212,48	810

9.3. A PhD-dolgozatban nem szereplő további közlemények

	Impakt faktor	Függlen hiv.
[19] Pereira S, Zhou M, Mócsai A and Lowell CA: <i>Resting Murine Neutrophils Express Functional α_4 Integrins that Signal through Src Family Kinases.</i> <i>J Immunol</i> 2001, 166 : 4115-4123.	7,065	23
[20] Káldi K, Szeberényi J, Rada BK, Kovács P, Geiszt M, Mócsai A and Ligeti E: <i>Contribution of Phospholipase D and a Brefeldin A Sensitive ARF to Chemoattractant-Induced Superoxide Production and Secretion of Human Neutrophils.</i> <i>J Leukocyte Biol</i> 2002, 71 : 695-700.	4,132	12
[21] Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mócsai A , Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA and Kahn ML: <i>Regulation of Blood and Lymphatic Vascular Separation by Signaling Proteins SLP-76 and Syk.</i> <i>Science</i> 2003, 299 : 247-251.	29,162	115
[22] Kitaura J, Song J, Tsai M, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Mócsai A , Kawakami Y, Liu FT, Lowell CA, Barisas BG, Galli SJ, Kawakami T: <i>Evidence that IgE Molecules Mediate a Spectrum of Effects on Mast Cell Survival and Activation via Aggregation of the FcεRI.</i> <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2003, 100 : 12911-12916.	10,272	78
[23] Chen H, Mócsai A , Zhang H, Ding RX, Morisaki JH, White M, Rothfork JM, Heiser P, Colucci-Guyon E, Lowell CA, Gresham HD, Allen PM and Brown EJ: <i>Role for Plastin in Host Defense Distinguishes Integrin Signaling from Cell Adhesion and Spreading.</i> <i>Immunity</i> 2003, 19 : 95-104.	16,016	27
[24] Berton G, Mócsai A and Lowell CA: <i>Src and Syk Kinases: Key Regulators of Phagocytic Cell Activation.</i> <i>Trends Immunol</i> 2005, 26 : 208-214.	10,174	63
[25] Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, Mócsai A , Poeschl J, Walzog B and Sperandio M: <i>Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo.</i> <i>BMC Immunol</i> 2007, 8 : 31.	2,673	6
[26] Schymeinsky J, Mócsai A and Walzog B: <i>Neutrophil Activation via β_2 Integrins (CD11/CD18): Molecular Mechanisms and Clinical Implications.</i> <i>Thromb Haemostasis</i> 2007, 98 : 262-273.	3,501	14

	Impakt faktor	Függlen hiv.
[27] Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mócsai A , Tschopp J and Ruland J: <i>Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence.</i> <i>Nature</i> 2009, 459 : 433-436.	34,480	77
[28] Werninghaus K, Babiak A, Groß O, Hölscher C, Dietrich H, Agger EM, Mages J, Mócsai A , Schoenen H, Finger K, Nimmerjahn F, Brown GD, Kirschning C, Heit A, Andersen P, Wagner H, Ruland J and Lang R: <i>Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRγ-Syk-Card9-dependent innate immune activation.</i> <i>J Exp Med</i> 2009, 206 : 89-97.	14,505	26
[29] Schymeinsky J, Gerstl R, Mannigel I, Niedung K, Frommhold D, Panthel K, Heesemann J, Sixt M, Quast T, Kolanus W, Mócsai A , Wienands J, Sperandio M and Walzog B: <i>A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on β_2 integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo.</i> <i>Blood</i> 2009, 114 : 4209-4220.	10,555	1
[30] Boyle KB, Györi D, Sindrilari A, Scharffetter-Kochanek K, Taylor PR, Mócsai A , Stephens LR and Hawkins PT: <i>Class IA phosphoinositide 3-kinase β and δ regulate neutrophil oxidase activation in response to Aspergillus fumigatus hyphae.</i> <i>J Immunol</i> 2011, 186 : 2978-2989.	5,745	1
Összesen	148,28	443

9.4. A PhD-dolgozatban szereplő közlemények

	Impakt faktor	Függlen hiv.
[31] Mócsai A , Bánfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L, Faragó A and Ligeti E: <i>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.</i> <i>Biochem Pharmacol</i> 1997, 54 : 781-789.	2,443	24
[32] Suszták K, Mócsai A , Ligeti E and Kapus A: <i>Electrogenic H^+ Pathway Contributes to Stimulus-Induced Changes of Internal pH and Membrane Potential in Intact Neutrophils: Role of Cytoplasmic Phospholipase A_2.</i> <i>Biochem J</i> 1997, 325 : 501-510.	3,579	22
[33] Mócsai A , Ligeti E, Lowell CA and Berton G: <i>Adhesion-Dependent Degranulation of Neutrophils Requires the Src Family Kinases Fgr and Hck.</i> <i>J Immunol</i> 1999, 162 : 1120-1126.	7,145	98
[34] Ligeti E and Mócsai A : <i>Exocytosis of Neutrophil Granulocytes.</i> <i>Biochem Pharmacol</i> 1999, 57 : 1209-1214.	2,755	17
Összesen	15,922	161

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először két tudományos témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Ligeti Erzsébetnek és Dr. Clifford Lowellnek szeretnék köszönetet mondani támogatásukért, szakmai útmutatásaikért, szeretetükért és barátságukért. Ligeti Erzsébet PhD-témavezetőmként egy szigorú szakmai alapokra épülő tudományos környezetet teremtett meg, ami mindmáig meghatározza tudományos gondolkodásomat, Clifford Lowell pedig megismertetett a nemzetközi tudományos világ és gondolkodásmód szépségeivel és távlataival. Köszönöm nekik, hogy engedték a tőlük való elszakadást, de fél szemmel még mindig aggódva figyelik karrieremet.

Köszönöm Dr. Fonyó Attilának, Dr. Spät Andrásnak és Dr. Hunyady Lászlónak, hogy a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetének igazgatóiként megteremtettek és fenntartottak Magyarországon egy szakmailag és emberileg is kimagasló tudományos műhelyt.

Köszönöm munkacsoportom kutató tagjainak, Dr. Jakus Zoltánnak, Kertész Zsuzsannának, Dr. Németh Tamásnak, Dr. Győri Dávidnak, Futosi Krisztinának és Dr. Kovács Miklósnak az inspiráló beszélgetéseket, a sok lelkesedést, hitet és kitartást. Hálás vagyok Simon Edinának, Makara Krisztinának és Tóth Annának azért a kimagasló színvonalú háttérmunkáért, amely nélkül az értekezésben bemutatott kísérletek nem lettek volna megvalósíthatóak. Köszönöm Mary Beth Humphrey-nak és Clare Abram-nak a megosztott elsőszereplőséggel publikált közleményeinkben bemutatott kísérletekben való részvételüket és segítségüket.

Nagyon hálás vagyok annak a sok-sok hazai és külföldi kollaborációs partnernek, akikkel együtt próbáltuk megfejteni a hemopoetikus sejtek jelátvitelének rejtelmét és akik megismertették velem a közös tudományos felfedezések szépségeit és örömeit.

Végtelenül hálás vagyok feleségemnek, Szabinának, és gyermekeimnek, Annának és Marcinak a sok-sok szeretetért, hitért és támogatásért, és hogy pusztán létükkel is értelmet adtak életemnek és munkámnak. Végül szeretnék köszönetet mondani szeretett Édesanyámnak, aki bár nagyon sokat tett azért, hogy egyszer majd megírhassek egy ilyen értekezést, annak megszületését már sajnos nem érthette meg.

Az értekezésben bemutatott, Magyarországon készült kísérleteket a European Research Council, a Wellcome Trust, a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal, a National Institutes of Health, az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok, a European Molecular Biology Organization, a Howard Hughes Medical Institute, a Gazdasági Versenyképesség Operatív Program, a Magyar Tudományos Akadémia, az Egészségügyi Tudományos Tanács és a Semmelweis Egyetem támogatta.

11. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, and 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.
2. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, and Lowell CA: Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002, **16**: 547-558.
3. Oberfell A, Eto K, Mócsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, and Shattil SJ: Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $\alpha_{IIb}\beta_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002, **157**: 265-275.
4. Mócsai A, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T, and Lowell CA: G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood* 2003, **101**: 4155-4163.
5. Newbrough SA, Mócsai A, Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, Lowell CA, and Koretzky GA: SLP-76 regulates Fc γ receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2003, **19**: 761-769.
6. Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, and Nakamura MC: The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**: 6158-6163.
7. Jakus Z, Berton G, Ligeti E, Lowell CA, and Mócsai A: Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on costimulation through low affinity Fc γ Rs: Full activation requires both integrin and nonintegrin signals. *J Immunol* 2004, **173**: 2068-2077.
8. Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, and Lowell CA: Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 2006, **7**: 1326-1333.
9. Fodor S, Jakus Z, and Mócsai A: ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett* 2006, **104**: 29-37.
10. Schymeinsky J, Sindrilaru A, Frommhold D, Sperandio M, Gerstl R, Then C, Mócsai A, Scharffetter-Kochanek K, and 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.
11. Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA, and Mócsai A: Immunoreceptor-like signaling by β_2 and β_3 integrins. *Trends Cell Biol* 2007, **17**: 493-501.
12. Jakus Z, Németh T, Verbeek JS, and Mócsai A: Critical but overlapping role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol* 2008, **180**: 618-629.
13. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M, and Mócsai A: Critical role of phospholipase Cy2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2009, **206**: 577-593.
14. Németh T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Z, Walzog B, Settleman J, and 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.
15. Jakus Z, Simon E, Balázs B, and Mócsai A: Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010, **62**: 1899-1910.
16. Mócsai A, Ruland J, and Tybulewicz VL: The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010, **10**: 387-402.
17. Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadan F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mócsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR, and Hawkins PT: PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal* 2011, **4**: ra23.
18. Kertész Z, Györi D, Körmendi S, Fekete T, Kis-Tóth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavölgyi E, Dobó-Nagy C, and Mócsai A: Phospholipase Cy2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption. *Eur J Clin Invest* 2011, **in press**.
19. Pereira S, Zhou M, Mócsai A, and Lowell C: Resting murine neutrophils express functional α_4 integrins that signal through Src family kinases. *J Immunol* 2001, **166**: 4115-4123.
20. Káldi K, Szeberényi J, Rada BK, Kovács P, Geiszt M, Mócsai A, and Ligeti E: Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2002, **71**: 695-700.

21. Abtahian F, Guerriero A, Sebзда E, Lu MM, Zhou R, Mócsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, and Kahn ML: Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 2003, **299**: 247-251.
22. Kitaura J, Song J, Tsai M, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Mócsai A, Kawakami Y, Liu FT, Lowell CA, Barisas BG, Galli SJ, and Kawakami T: Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcεRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**: 12911-12916.
23. Chen H, Mócsai A, Zhang H, Ding RX, Morisaki JH, White M, Rothfork JM, Heiser P, Colucci-Guyon E, Lowell CA, Gresham HD, Allen PM, and Brown EJ: Role for plasmin in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading. *Immunity* 2003, **19**: 95-104.
24. Berton G, Mócsai A, and Lowell CA: Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol* 2005, **26**: 208-214.
25. Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, Mócsai A, Poeschl J, Walzog B, and Sperandio M: Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol* 2007, **8**: 31.
26. Schymeinsky J, Mócsai A, and Walzog B: Neutrophil activation via β_2 integrins (CD11/CD18): Molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost* 2007, **98**: 262-273.
27. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mócsai A, Tschopp J, and Ruland J: Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009, **459**: 433-436.
28. Werninghaus K, Babiak A, Gross O, Holscher C, Dietrich H, Agger EM, Mages J, Mócsai A, Schoenen H, Finger K, Nimmerjahn F, Brown GD, Kirschning C, Heit A, Andersen P, Wagner H, Ruland J, and Lang R: Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRγ-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J Exp Med* 2009, **206**: 89-97.
29. Schymeinsky J, Gerstl R, Mannigel I, Niedung K, Frommhold D, Panthel K, Heesemann J, Sixt M, Quast T, Kolanus W, Mócsai A, Wienands J, Sperandio M, and Walzog B: A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on β_2 integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood* 2009.
30. Boyle KB, Gyori D, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Taylor PR, Mócsai A, Stephens LR, and Hawkins PT: Class IA phosphoinositide 3-kinase β and δ regulate neutrophil oxidase activation in response to *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Immunol* 2011, **186**: 2978-2989.
31. Mócsai A, Bánfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L, Faragó A, and 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.
32. Suszták K, Mócsai A, Ligeti E, and Kapus A: Electrogenic H^+ pathway contributes to stimulus-induced changes of internal pH and membrane potential in intact neutrophils: role of cytoplasmic phospholipase A_2 . *Biochem J* 1997, **325 (Pt 2)**: 501-510.
33. Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, and Berton G: Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol* 1999, **162**: 1120-1126.
34. Ligeti E, and Mócsai A: Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochem Pharmacol* 1999, **57**: 1209-1214.
35. 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, and Beaudet AL: Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 1998, **188**: 119-131.
36. Bakker AB, Hoek RM, Cerwenka A, Blom B, Lucian L, McNeil T, Murray R, Phillips LH, Sedgwick JD, and Lanier LL: DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. *Immunity* 2000, **13**: 345-353.
37. Hazenbos WL, Gessner JE, Hofhuis FM, Kuipers H, Meyer D, Heijnen IA, Schmidt RE, Sandor M, Capel PJ, Daeron M, van de Winkel JG, and Verbeek JS: Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in FcγRIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 1996, **5**: 181-188.
38. Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SM, van Lent PL, Hofhuis FM, van Ojik HH, Sedlik C, da Silveira SA, Gerber J, de Jong YF, Roozendaal R, Aarden LA, van den Berg WB, Saito T, Mosser D, Amigorena S, Izui S, van Ommen GJ, van Vugt M, van de Winkel JG, and Verbeek JS: FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 2002, **16**: 391-402.
39. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, and Ravetch JV: FcR γ -chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 1994, **76**: 519-529.
40. Galli SJ, Borregaard N, and Wynn TA: Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 2011, **12**: 1035-1044.
41. Miranti CK, and Brugge JS: Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 2002, **4**: E83-90.
42. Barczyk M, Carracedo S, and Gullberg D: Integrins. *Cell Tissue Res* 2010, **339**: 269-280.
43. Dorsam RT, and Gutkind JS: G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007, **7**: 79-94.

44. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, and Halbwachs-Mecarelli L: Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000, **80**: 617-653.
45. Luster AD, and Tager AM: T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol* 2004, **4**: 711-724.
46. Lowell CA, Soriano P, and Varmus HE: Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. *Genes Dev* 1994, **8**: 387-398.
47. Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, and Lowell CA: Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 1997, **7**: 69-81.
48. Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT, and Settleman J: The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* 2000, **127**: 4891-4903.
49. Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, and Vanhaesebroeck B: The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**: 8292-8297.
50. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, Pearce W, Meek SE, Salpekar A, Waterfield MD, Smith AJ, and Vanhaesebroeck B: Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science* 2002, **297**: 1031-1034.
51. Wang D, Feng J, Wen R, Marine JC, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ, and Ihle JN: Phospholipase $\text{C}\alpha 2$ is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* 2000, **13**: 25-35.
52. Clements JL, Yang B, Ross-Barta SE, Eliason SL, Hrstka RF, Williamson RA, and Koretzky GA: Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 1998, **281**: 416-419.
53. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, and Tybulewicz VL: Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995, **378**: 298-302.
54. Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, and Clapham DE: A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature* 2006, **440**: 1213-1216.
55. Sasaki M, Takagi M, and Okamura Y: A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science* 2006, **312**: 589-592.
56. Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, Nagata K, Iijima T, Horiuchi M, Matsusaki H, Hieshima K, Yoshie O, and Nomiyama H: RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2004, **200**: 941-946.
57. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, and Suda T: DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 2005, **202**: 345-351.
58. Deindl S, Kadlecsek TA, Brdicka T, Cao X, Weiss A, and Kuriyan J: Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 2007, **129**: 735-746.
59. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, and Pawson T: Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995, **378**: 303-306.
60. Costello PS, Turner M, Walters AE, Cunningham CN, Bauer PH, Downward J, and Tybulewicz VL: Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 1996, **13**: 2595-2605.
61. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, and DeFranco AL: A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997, **186**: 1027-1039.
62. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, and Pawson T: The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 1998, **18**: 4209-4220.
63. Chan AC, Kadlecsek TA, Elder ME, Filipovich AH, Kuo WL, Iwashima M, Parslow TG, and Weiss A: ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994, **264**: 1599-1601.
64. Chan TA, Chu CA, Rauen KA, Kroiher M, Tatarewicz SM, and Steele RE: Identification of a gene encoding a novel protein-tyrosine kinase containing SH2 domains and ankyrin-like repeats. *Oncogene* 1994, **9**: 1253-1259.
65. Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, Zhang Q, Chan AC, and Loh DY: Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 1995, **376**: 435-438.
66. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, and Watson SP: Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain. *FEBS Lett* 1997, **413**: 255-259.

67. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, and Watson SP: The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J* 1997, **16**: 2333-2341.
68. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, and Takayama H: A novel association of Fc receptor γ -chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* 1997, **272**: 23528-23531.
69. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, and Phillips JH: Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998, **391**: 703-707.
70. Koretzky GA, Abtahian F, and Silverman MA: SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**: 67-78.
71. Wilde JI, and Watson SP: Regulation of phospholipase C γ isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal* 2001, **13**: 691-701.
72. Wen R, Jou ST, Chen Y, Hoffmeyer A, and Wang D: Phospholipase C γ 2 is essential for specific functions of Fc ϵ R and Fc γ R. *J Immunol* 2002, **169**: 6743-6752.
73. Ji QS, Winnier GE, Niswender KD, Horstman D, Wisdom R, Magnuson MA, and Carpenter G: Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 2999-3003.
74. Irvin BJ, Williams BL, Nilson AE, Maynor HO, and Abraham RT: Pleiotropic contributions of phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) to T-cell antigen receptor-mediated signaling: reconstitution studies of a PLC- γ 1-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol* 2000, **20**: 9149-9161.
75. Pivniouk V, Tsitsikov E, Swinton P, Rathbun G, Alt FW, and Geha RS: Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* 1998, **94**: 229-238.
76. Pivniouk VI, Martin TR, Lu-Kuo JM, Katz HR, Oettgen HC, and Geha RS: SLP-76 deficiency impairs signaling via the high-affinity IgE receptor in mast cells. *J Clin Invest* 1999, **103**: 1737-1743.
77. Jumaa H, Wollscheid B, Mitterer M, Wienands J, Reth M, and Nielsen PJ: Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* 1999, **11**: 547-554.
78. Pappu R, Cheng AM, Li B, Gong Q, Chiu C, Griffin N, White M, Sleckman BP, and Chan AC: Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science* 1999, **286**: 1949-1954.
79. Hayashi K, Nittono R, Okamoto N, Tsuji S, Hara Y, Goitsuka R, and Kitamura D: The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**: 2755-2760.
80. Okkenhaug K, and Vanhaesebroeck B: PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 2003, **3**: 317-330.
81. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, and Stephens LR: Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 2006, **34**: 647-662.
82. Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, and Zimmerman GA: Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving β_2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* 2002, **9**: 30-35.
83. Mizgerd JP, Kubo H, Kutkoski GJ, Bhagwan SD, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, and Doerschuk CM: Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J Exp Med* 1997, **186**: 1357-1364.
84. Nurden AT, Fiore M, Nurden P, and Pillois X: Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood* 2011.
85. Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, and Hynes RO: β_3 -integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* 1999, **103**: 229-238.
86. McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, and Teitelbaum SL: Mice lacking β_3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* 2000, **105**: 433-440.
87. Bass MD, Morgan MR, Roach KA, Settleman J, Goryachev AB, and Humphries MJ: p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from $\alpha_5\beta_1$ integrin and syndecan-4. *J Cell Biol* 2008, **181**: 1013-1026.
88. Brouns MR, Matheson SF, and 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.
89. Nakahara H, Mueller SC, Nomizu M, Yamada Y, Yeh Y, and Chen WT: Activation of β_1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem* 1998, **273**: 9-12.
90. Vincent S, and Settleman J: Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur J Cell Biol* 1999, **78**: 539-548.
91. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, and Brugge JS: Regulation of the protein tyrosine kinase pp72^{Syk} by platelet agonists and the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem* 1994, **269**: 28859-28864.

92. Lin TH, Rosales C, Mondal K, Bolen JB, Haskill S, and Juliano RL: Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1995, **270**: 16189-16197.
93. Yan SR, Huang M, and Berton G: Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72^{syk} tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72^{syk} and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J Immunol* 1997, **158**: 1902-1910.
94. Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, and Shattil SJ: Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* 1998, **8**: 1289-1299.
95. Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS, and Shattil SJ: Regulation of the pp72^{syk} protein tyrosine kinase by platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Embo J* 1997, **16**: 6414-6425.
96. Woodside DG, Oberfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Shattil SJ, and Ginsberg MH: Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin β cytoplasmic domains. *Curr Biol* 2001, **11**: 1799-1804.
97. Woodside DG, Oberfell A, Talapatra A, Calderwood DA, Shattil SJ, and Ginsberg MH: The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin β cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 2002, **277**: 39401-39408.
98. Abram CL, and Lowell CA: The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**: 339-362.
99. Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, and Fassler R: The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol* 2009, **19**: 504-513.
100. Ye F, Kim C, and Ginsberg MH: Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *J Thromb Haemost* 2011, **9 Suppl 1**: 20-25.
101. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, and Kollias G: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991, **10**: 4025-4031.
102. Tolar J, Teitelbaum SL, and Orchard PJ: Osteopetrosis. *N Engl J Med* 2004, **351**: 2839-2849.
103. Del Fattore A, Cappariello A, and Teti A: Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone* 2008, **42**: 19-29.
104. Paloneva J, Kestila M, Wu J, Salminen A, Bohling T, Ruotsalainen V, Hakola P, Bakker AB, Phillips JH, Pekkarinen P, Lanier LL, Timonen T, and Peltonen L: Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat Genet* 2000, **25**: 357-361.
105. Paloneva J, Manninen T, Christman G, Hovanes K, Mandelin J, Adolfsson R, Bianchin M, Bird T, Miranda R, Salmaggi A, Tranebjaerg L, Kontinen Y, and Peltonen L: Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 2002, **71**: 656-662.
106. Raisz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005, **115**: 3318-3325.
107. Sambrook P, and Cooper C: Osteoporosis. *Lancet* 2006, **367**: 2010-2018.
108. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, and Mathis D: Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996, **87**: 811-822.
109. Takeshita S, Kaji K, and Kudo A: Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2000, **15**: 1477-1488.
110. Zigmond SH: Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 1977, **75**: 606-616.
111. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, and Muller R: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010, **25**: 1468-1486.
112. Fuortes M, Jin WW, and Nathan C: Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 1993, **120**: 777-784.
113. Laudanna C, Rossi F, and Berton G: Effect of inhibitors of distinct signalling pathways on neutrophil O₂⁻ generation in response to tumor necrosis factor- α , and antibodies against CD18 and CD11a: evidence for a common and unique pattern of sensitivity to wortmannin and protein tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **190**: 935-940.
114. Lowell CA, Fumagalli L, and Berton G: Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58^{c-fgr} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol* 1996, **133**: 895-910.
115. Meng F, and Lowell CA: A β_1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J* 1998, **17**: 4391-4403.

116. Suen PW, Ilic D, Cavegion E, Berton G, Damsky CH, and Lowell CA: Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck/Fgr deficient macrophages. *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 22): 4067-4078.
117. 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.
118. Nathan C, Srima S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, and 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.
119. Dib K, Melander F, and Andersson T: Role of p190RhoGAP in β_2 integrin regulation of RhoA in human neutrophils. *J Immunol* 2001, **166**: 6311-6322.
120. Berton G, Laudanna C, Sorio C, and 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.
121. Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML, and Koretzky GA: Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 2006, **26**: 6936-6949.
122. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, and Newman PJ: Identification of Fc γ RIIa as the ITAM-bearing receptor mediating $\alpha_{IIb}\beta_3$ outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood* 2008, **112**: 2780-2786.
123. Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP, and Teitelbaum SL: Syk, c-Src, the $\alpha_v\beta_3$ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 2007, **176**: 877-888.
124. Graham DB, Stephenson LM, Lam SK, Brim K, Lee HM, Bautista J, Gilfillan S, Akilesh S, Fujikawa K, and Swat W: An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J Exp Med* 2007, **204**: 2889-2897.
125. Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, and Bessis A: Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 2008, **28**: 8138-8143.
126. March ME, and Long EO: β_2 integrin induces TCR ζ -Syk-phospholipase C- γ phosphorylation and paxillin-dependent granule polarization in human NK cells. *J Immunol* 2011, **186**: 2998-3005.
127. Judd BA, Myung PS, Leng L, Obergfell A, Pear WS, Shattil SJ, and Koretzky GA: Hematopoietic reconstitution of SLP-76 corrects hemostasis and platelet signaling through $\alpha_{IIb}\beta_3$ and collagen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**: 12056-12061.
128. Wonerow P, Pearce AC, Vaux DJ, and Watson SP: A critical role for phospholipase C γ 2 in $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated platelet spreading. *J Biol Chem* 2003, **278**: 37520-37529.
129. Graham DB, Robertson CM, Bautista J, Mascarenhas F, Diacovo MJ, Montgrain V, Lam SK, Cremasco V, Dunne WM, Faccio R, Coopersmith CM, and Swat W: Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC γ 2 signaling axis in mice. *J Clin Invest* 2007, **117**: 3445-3452.
130. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, and Ravetch JV: Fc γ RIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005, **23**: 41-51.
131. Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, and Platzer E: Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc γ RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991, **78**: 885-889.
132. Cambien B, Pomeranz M, Millet MA, Rossi B, and Schmid-Alliana A: Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. *Blood* 2001, **97**: 359-366.
133. Cambien B, Pomeranz M, Schmid-Antomarchi H, Millet MA, Breitmayer V, Rossi B, and Schmid-Alliana A: Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocytic cell adhesion. *Blood* 2001, **97**: 2031-2037.
134. Shefler I, and Sagi-Eisenberg R: G $_i$ -mediated activation of the Syk kinase by the receptor mimetic basic secretagogues of mast cells: role in mediating arachidonic acid/metabolites release. *J Immunol* 2001, **167**: 475-481.
135. Tsuchida S, Yanagi S, Inatome R, Ding J, Hermann P, Tsujimura T, Matsui N, and Yamamura H: Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2000, **127**: 321-327.
136. Wan Y, Bence K, Hata A, Kurosaki T, Veillette A, and Huang XY: Genetic evidence for a tyrosine kinase cascade preceding the mitogen-activated protein kinase cascade in vertebrate G-protein signaling. *J Biol Chem* 1997, **272**: 17209-17215.
137. Wan Y, Kurosaki T, and Huang XY: Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996, **380**: 541-544.
138. Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, and Wymann MP: Phosphoinositide 3-kinase γ is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 2002, **16**: 441-451.

139. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, Wood WI, and Moore MW: Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* 1994, **265**: 682-684.
140. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, and Mathis D: From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999, **10**: 451-461.
141. Wipke BT, and Allen PM: Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001, **167**: 1601-1608.
142. Solomon S, Rajasekaran N, Jeisy-Walder E, Snapper SB, and Ilges H: A crucial role for macrophages in the pathology of K/BxN serum-induced arthritis. *Eur J Immunol* 2005, **35**: 3064-3073.
143. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, and Brenner MB: Mast cells: A cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002, **297**: 1689-1692.
144. Watts GM, Beurskens FJ, Martin-Padura I, Ballantyne CM, Klickstein LB, Brenner MB, and Lee DM: Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1. *J Immunol* 2005, **174**: 3668-3675.
145. 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, and Mathis D: Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 2002, **16**: 157-168.
146. Corr M, and Crain B: The role of FcγR signaling in the K/BxN serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 2002, **169**: 6604-6609.
147. Takai T: Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2005, **25**: 1-18.
148. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG, and Masuda ES: R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **319**: 998-1008.
149. Pine PR, Chang B, Schoettler N, Banquerigo ML, Wang S, Lau A, Zhao F, Grossbard EB, Payan DG, and Brahn E: Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol* 2007, **124**: 244-257.
150. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, and Grossbard E: Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2008, **58**: 3309-3318.
151. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, and Magilavy DB: An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2010, **363**: 1303-1312.
152. Clemens GR, Schroeder RE, Magness SH, Weaver EV, Lech JW, Taylor VC, Masuda ES, Baluom M, and Grossbard EB: Developmental toxicity associated with receptor tyrosine kinase Ret inhibition in reproductive toxicity testing. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009, **85**: 130-136.
153. Mun SH, Kim JW, Nah SS, Ko NY, Lee JH, Kim JD, Kim do K, Kim HS, Choi JD, Kim SH, Lee CK, Park SH, Kim BK, Kim YM, and Choi WS: Tumor necrosis factor α-induced interleukin-32 is positively regulated via the Syk/protein kinase Cδ/JNK pathway in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2009, **60**: 678-685.
154. Cha HS, Boyle DL, Inoue T, Schoot R, Tak PP, Pine P, and Firestein GS: A novel spleen tyrosine kinase inhibitor blocks c-Jun N-terminal kinase-mediated gene expression in synoviocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **317**: 571-578.
155. Cremasco V, Graham DB, Novack DV, Swat W, and Faccio R: Vav/Phospholipase Cγ2-mediated control of a neutrophil-dependent murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, **58**: 2712-2722.
156. Camps M, Ruckle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Francon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, and Rommel C: Blockade of PI3Kγ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2005, **11**: 936-943.
157. Ferrandi C, Ardisson V, Ferro P, Ruckle T, Zaratin P, Ammannati E, Hauben E, Rommel C, and Cirillo R: Phosphoinositide 3-kinase γ inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. *J Pharmacol Exp Ther* 2007, **322**: 923-930.
158. Soriano P, Montgomery C, Geske R, and Bradley A: Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991, **64**: 693-702.
159. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, and Schuh J: RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999, **13**: 2412-2424.
160. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, and Penninger JM: OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999, **397**: 315-323.

161. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, and Takai T: Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 2004, **428**: 758-763.
162. Cella M, Buonsanti C, Strader C, Kondo T, Salmaggi A, and Colonna M: Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 2003, **198**: 645-651.
163. Paloneva J, Mandelin J, Kiialainen A, Bohling T, Prudlo J, Hakola P, Haltia M, Kontinen YT, and Peltonen L: DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 2003, **198**: 669-675.
164. Humphrey MB, Daws MR, Spusta SC, Niemi EC, Torchia JA, Lanier LL, Seaman WE, and Nakamura MC: TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res* 2006, **21**: 237-245.
165. Ford JW, and McVicar DW: TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol* 2009, **21**: 38-46.
166. Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, and Choi Y: A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med* 2002, **195**: 201-209.
167. Ishikawa S, Arase N, Suenaga T, Saita Y, Noda M, Kuriyama T, Arase H, and Saito T: Involvement of FcRγ in signal transduction of osteoclast-associated receptor (OSCAR). *Int Immunol* 2004, **16**: 1019-1025.
168. Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, Cella M, Kim T, Rho J, Negishi-Koga T, Delaisse JM, Takayanagi H, Lorenzo J, Colonna M, Farndale RW, Choi Y, and Trowsdale J: OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest* 2011, **121**: 3505-3516.
169. Nemeth K, Schoppet M, Al-Fakhri N, Helas S, Jessberger R, Hofbauer LC, and Goettsch C: The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology. *J Immunol* 2011, **186**: 13-18.
170. Wu Y, Torchia J, Yao W, Lane NE, Lanier LL, Nakamura MC, and Humphrey MB: Bone microenvironment specific roles of ITAM adapter signaling during bone remodeling induced by acute estrogen-deficiency. *PLoS ONE* 2007, **2**: e586.
171. Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, Benoist C, and Gravalles EM: TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001, **159**: 1689-1699.
172. Redlich K, Hayer S, Maier A, Dunstan CR, Tohidast-Akrad M, Lang S, Turk B, Pietschmann P, Woloszczuk W, Haralambous S, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, and Schett G: Tumor necrosis factor α-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2002, **46**: 785-792.
173. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Wagner EF, and Schett G: Osteoclasts are essential for TNF-α-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002, **110**: 1419-1427.
174. Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JW, Ryan PF, Dunstan CR, Martin TJ, and Gillespie MT: Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2002, **161**: 1419-1427.
175. Schett G, Redlich K, Hayer S, Zwerina J, Bolon B, Dunstan C, Gortz B, Schulz A, Bergmeister H, Kollias G, Steiner G, and Smolen JS: Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 2042-2051.
176. Herrak P, Gortz B, Hayer S, Redlich K, Reiter E, Gasser J, Bergmeister H, Kollias G, Smolen JS, and Schett G: Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, **50**: 2327-2337.
177. Schett G, and Teitelbaum SL: Osteoclasts and arthritis. *J Bone Miner Res* 2009, **24**: 1142-1146.
178. Mao D, Eppl H, Uthgenannt B, Novack DV, and Faccio R: PLCγ2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest* 2006, **116**: 2869-2879.
179. Chen Y, Wang X, Di L, Fu G, Bai L, Liu J, Feng X, McDonald JM, Michalek S, He Y, Yu M, Fu YX, Wen R, Wu H, and Wang D: Phospholipase Cγ2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2008, **283**: 29593-29601.
180. Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, Hess PR, Zou Z, Chen M, Chen CY, Xu B, Lu MM, Zhou D, Sebzdka E, Santore MT, Merianos DJ, Stadtfeld M, Flake AW, Graf T, Skoda R, Maltzman JS, Koretzky GA, and Kahn ML: Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* 2010, **116**: 661-670.
181. Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, and Ruland J: Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 2006, **442**: 651-656.
182. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, and Reis e Sousa C: Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 2007, **8**: 630-638.

183. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, and Reis e Sousa C: Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 2009, **206**: 2037-2051.
184. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, Tateno H, Uno J, Hirabayashi J, Mikami Y, Takeda K, Akira S, and Saito T: C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**: 1897-1902.
185. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, Rosewell I, and Reis e Sousa C: Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 2009, **458**: 899-903.
186. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, and Saito T: Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* 2008, **9**: 1179-1188.
187. Ziegenfuss JS, Biswas R, Avery MA, Hong K, Sheehan AE, Yeung YG, Stanley ER, and Freeman MR: Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature* 2008, **453**: 935-939.
188. Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**: 292-304.
189. McInnes IB, and Schett G: Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**: 429-442.
190. Cheng X, Kinoshita M, Murali R, and Greene MI: The TNF receptor superfamily: role in immune inflammation and bone formation. *Immunol Res* 2003, **27**: 287-294.
191. Takayanagi H: The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1116**: 227-237.
192. Soysa NS, and Alles N: NF- κ B functions in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **378**: 1-5.
193. Tarakhovsky A, Turner M, Schaal S, Mee PJ, Duddy LP, Rajewsky K, and Tybulewicz VL: Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 1995, **374**: 467-470.
194. Faccio R, Teitelbaum SL, Fujikawa K, Chappel J, Zallone A, Tybulewicz VL, Ross FP, and Swat W: Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat Med* 2005, **11**: 284-290.
195. Turner M, and Billadeau DD: Vav proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**: 476-486.
196. Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, Sugahara A, Koito H, Ujike-Asai A, Nakamura A, Kanazawa K, Tan-Takeuchi K, Iwasaki K, Yokoyama WM, Kudo A, Fujiwara M, Asou H, and Takai T: Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest* 2003, **111**: 323-332.
197. Humphrey MB, Ogasawara K, Yao W, Spusta SC, Daws MR, Lane NE, Lanier LL, and Nakamura MC: The signaling adapter protein DAP12 regulates multinucleation during osteoclast development. *J Bone Miner Res* 2004, **19**: 224-234.
198. Faccio R, Zou W, Colaianni G, Teitelbaum SL, and Ross FP: High dose M-CSF partially rescues the Dap12^{-/-} osteoclast phenotype. *J Cell Biochem* 2003, **90**: 871-883.

12. ÖT LEGFONTOSABB KÖZLEMÉNY MÁSOLATA

A következő oldalakon az értekezés alapját képező alábbi öt legfontosabb közlemény másolata található.

Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA and 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.
Közlemény sorszáma a hivatkozási listában: [1]

Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL and Lowell CA: *Syk Is Required for Integrin Signaling in Neutrophils.*
Immunity 2002, **16**: 547-558.
Közlemény sorszáma a hivatkozási listában: [2]

Mócsai A*, Humphrey MB*, Van Ziffle JAG, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA and Nakamura MC: *The Immunomodulatory Adapter Proteins DAP12 and Fc-receptor γ -chain (FcR γ) Regulate Development of Functional Osteoclasts Through the Syk Tyrosine Kinase.*
Proc Natl Acad Sci USA 2004, **101**: 6158-6163.
*: megosztott első szerzők.
Közlemény sorszáma a hivatkozási listában: [6]

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.
*: megosztott első szerzők.
Közlemény sorszáma a hivatkozási listában: [8]

Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M and **Mócsai A**: *Critical Role of Phospholipase $\text{C}\alpha_2$ in Integrin and Fc Receptor-Mediated Neutrophil Functions and the Effector Phase of Autoimmune Arthritis.*
J Exp Med 2009, **206**: 577-593.
Közlemény sorszáma a hivatkozási listában: [13]

Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases¹

Attila Mócsai,^{2*} Zoltán Jakus,* Tibor Vántus,[†] Giorgio Berton,[‡] Clifford A. Lowell,[§] and Erzsébet Ligeti*

The aim of the present study was to investigate the role of tyrosine phosphorylation pathways in fMLP-induced exocytosis of the different secretory compartments (primary and secondary granules, as well as secretory vesicles) of neutrophils. Genistein, a broad specificity tyrosine kinase inhibitor, blocked the exocytosis of primary and secondary granules, but had only a marginal effect on the release of secretory vesicles. Genistein also inhibited the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK), raising the possibility that inhibition of ERK and/or p38 MAPK might be responsible for the effect of the drug on the degranulation response. Indeed, SB203580, an inhibitor of p38 MAPK, decreased the release of primary and secondary granules, but not that of secretory vesicles. However, blocking the ERK pathway with PD98059 had no effect on any of the exocytic responses tested. PP1, an inhibitor of Src family kinases, also attenuated the release of primary and secondary granules, and neutrophils from mice deficient in the Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn were also defective in secondary granule release. Furthermore, activation of p38 MAPK was blocked by both PP1 and the *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} mutation. Taken together, our data indicate that fMLP-induced degranulation of primary and secondary granules of neutrophils is mediated by p38 MAPK activated via Src family tyrosine kinases. Although piceatannol, a reportedly selective inhibitor of Syk, also prevented degranulation and activation of p38 MAPK, no fMLP-induced phosphorylation of Syk could be observed, raising doubts about the specificity of the inhibitor. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 4321–4331.

Stimulation of the chemoattractant receptors of neutrophils evokes multiple effector responses, including chemotaxis, superoxide production, and degranulation. The latter response consists of the release of the different intracellular compartments (several types of granules as well as the secretory vesicle compartment) (1) to the extracellular space or into the phagosome.

The receptor for the bacterial tripeptide fMLP, the most widely studied chemoattractant of neutrophils, activates a pertussis toxin-sensitive, heterotrimeric G protein belonging to the G_{i/o} family. One of the most characteristic features of fMLP signal transduction is the rapid induction of tyrosine phosphorylation of several intracellular proteins, including tyrosine kinases (2, 3), different members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)³ family

(4–6), adaptor proteins (3), and components of the small G protein network (7). Despite clear evidence of phosphorylation (and activation) of these proteins, little is known about their role in triggering the fMLP-induced effector responses.

Using broad specificity tyrosine kinase inhibitors, we and others suggested that tyrosine kinases might play a role in the fMLP-induced release of primary and secondary granules (Ref. 8 and references therein). In the last few years great progress has been made in understanding the roles of the different tyrosine kinases in the regulation of neutrophil functions (9). Activation of the Src-related kinase Lyn in response to fMLP stimulation has been reported by several authors (2, 3, 9, 10). Fgr, another member of the Src kinase family, has been shown to be associated with the secondary granules and to translocate to the plasma membrane upon fMLP stimulation of the cells (11). Similarly, Hck, the third Src family member present in neutrophils, is associated with primary granules and translocates to the phagosome during phagocytosis of serum-opsonized zymosan (12). Our pharmacological and gene knockout experiments performed on murine neutrophils showed that the fMLP-induced exocytosis of secondary granules is mediated by Src-related tyrosine kinases (13). However, these reports did not provide any clue to identification of possible downstream targets of tyrosine kinases. In addition, they did not address in detail the distinctive role of tyrosine phosphorylation in regulating exocytosis of the different granule populations and of secretory vesicles.

In the present report we analyzed the fMLP-induced exocytosis of primary and secondary granules as well as secretory vesicles in response to fMLP using inhibitors with reported selectivity for different tyrosine kinases or tyrosine-phosphorylated proteins and studying mice deficient in Src family kinases expressed in neutrophils.

*Department of Physiology, Semmelweis University of Medicine, Budapest, Hungary; [†]Joint Research Organization of the Hungarian Academy of Sciences and Department of Medical Chemistry, Molecular Biology, and Pathobiochemistry, Semmelweis University of Medicine, Budapest, Hungary; [‡]Department of Pathology, Section of General Pathology, University of Verona, Verona, Italy; and [§]Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143

Received for publication August 11, 1999. Accepted for publication February 11, 2000.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Hungarian National Scientific Research Fund (OTKA T25078) and the Hungarian Ministry of Education (FKFP 0041/1997; to E.L.), by National Institutes of Health Grants DK50267 and HL54476 (to C.A.L.), and the Fondazione Cariverona (Progetto Sanità; to G.B.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Attila Mócsai, Department of Physiology, Semmelweis University of Medicine, P.O. Box 259, 1444 Budapest, Hungary. E-mail address: mocsai@puskin.sote.hu

³ Abbreviations used in this paper: MAPK or MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; CB, cytochalasin B; DFP, di-isopropyl fluorophosphate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Fak, focal adhesion kinase; β -GU, β -glucuronidase; HSA, human serum albumin; Hsp27, heat shock protein 27; Lfr, lactoferrin; MAPKAPK2, MAPK-activated protein kinase 2; MBP, myelin basic protein; MSA, mouse serum albumin.

This study followed two major directions of investigation. First, to obtain information on the molecular identity of the kinases participating in the fMLP-induced degranulation response, we focused on 1) the ERK and p38 MAPK proteins, members of the MAP kinase family shown to become rapidly phosphorylated on adjacent Tyr and Thr residues and thereby activated upon chemoattractant stimulation (4–6, 14, 15); 2) the Src family of tyrosine kinases, the members of which have been implicated in several aspects of the degranulation process (see above); and 3) the Syk tyrosine kinase, the function of which is closely related to that of Src family kinases in several cellular systems (16–19). Our second objective was to compare the involvement of the above pathways in the fMLP-induced release of three exocytic compartments of human neutrophils: primary granules, secondary granules, and secretory vesicles. Previous reports indicated differences in calcium sensitivity (20) and inhibition by wortmannin (21) of fMLP-induced exocytosis among these three granule populations. All these differences warranted a comparative study on the role of tyrosine kinases in the release of the three exocytic compartments.

In the present paper we provide evidence that p38 MAPK, activated by Src family kinases has a central role in eliciting the fMLP-induced release of primary and secondary granules, but not in that of secretory vesicles.

Materials and Methods

Materials

Dextran T-500 and Ficoll-Paque were obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). fMLP, cytochalasin B (CB), and genistein were obtained from Sigma (St. Louis, MO). PD98059, PP1, and piceatannol were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). SB203580 was provided by SmithKline Beecham (King of Prussia, PA). Human lactoferrin (Lfr), human serum albumin (HSA), and goat anti-HSA Abs were obtained from Sigma. Rabbit anti-human Lfr Abs were either purchased from Sigma or provided by Dr. Katalin Németh (National Institute of Hematology and Blood Transfusion, Budapest, Hungary). Where necessary, Abs were labeled with HRP (22).

Unless otherwise stated, incubation of neutrophils was performed in HBSS (containing 0.5 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂) supplemented with 20 mM Na-HEPES (pH 7.4) and 0.1% BSA (HBSS-HB). All incubation media were prepared using sterile and endotoxin-free water.

Preparation of human neutrophils

Venous blood was drawn from healthy volunteers. After dextran sedimentation at room temperature, neutrophils were obtained by centrifugation at 4°C through Ficoll-Paque followed by hypotonic lysis of erythrocytes (8, 13). Unless otherwise stated, cells were then resuspended in ice-cold HBSS-HB and kept on ice until use. The preparations usually contained >98% polymorphonuclear cells; the viability, as determined by the erythrosin B dye exclusion test, was >98%.

Degranulation of human neutrophils

Human neutrophils at 10⁶/ml were incubated in HBSS-HB with or without the indicated inhibitors and/or 10 μ M cytochalasin B for 15 min on ice and for an additional 15 min at 37°C. The cells were then stimulated for 10 min with 100 nM fMLP. The reaction was stopped by cooling, and the suspension was centrifuged for 10 min at 2000 $\times$ *g* at 4°C. The extent of degranulation was determined by measuring the concentrations of the different granule markers in the supernatant. Addition of up to 0.2% DMSO (the maximum solvent concentration added with the inhibitors) had no influence on any of the exocytic responses tested (not shown).

The activity of the primary granule marker β -glucuronidase (β -GU) was determined by a fluorometric assay described previously (8). In some experiments the total cellular β -GU activity was also measured, using suspensions treated with 0.02% cetyl-trimethyl-ammonium bromide as detergent. The concentrations of the secondary granule marker Lfr (23) and HSA, a marker of secretory vesicles (24), were determined by ELISA. Maxisorp F96 plates (Nunc, Naperville, IL) were covered with the relevant unlabeled Abs and blocked by PBS supplemented with 0.5% BSA and 0.1% Tween 20. Plates were then incubated with diluted supernatants or known concentrations of Lfr or HSA, followed by treatment with peroxidase-labeled anti-human Lfr or anti-HSA Abs, and developed with *o*-phen-

ylenediamine. The OD of the samples was read using a Labsystems (Helsinki, Finland) iEMS microplate reader.

For determination of adhesion-dependence of the exocytic response, the effect of withdrawal of Mg²⁺ on the release of secondary granules was tested (13, 25). Cells were resuspended in HBSS-HB without CaCl₂, MgCl₂, and BSA, supplemented with 5 mM Na-EDTA. After incubation for 10 min at room temperature, cells were pelleted and resuspended in ice-cold HBSS-HB with or without 1 mM MgCl₂. The fMLP-stimulated release of Lfr was then determined as described above. Simultaneously, cells were plated on tissue culture plates precoated with human fibrinogen (13) and stimulated with 20 ng/ml human TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ) for 30 min at 37°C. Spreading of the cells was assessed visually under a phase contrast microscope.

Immunoblotting of human cell lysates and kinase assays

Cells at 2.5 $\times$ 10⁷/ml were pretreated exactly as described for degranulation experiments, followed by a 2-min stimulation with 100 nM fMLP at 37°C. Samples were then immersed in liquid N₂ to stop the reaction and were lysed by adding a Triton-based lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors (8) from a 5 $\times$ concentrated stock solution followed by a 10-min incubation on ice and spinning down at 16,000 $\times$ *g* for 1 min at 4°C. The Triton-soluble supernatant was used in further determinations.

For immunoblot experiments, the Triton-soluble lysate was mixed with sample buffer, boiled for 10 min, run on 12% SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose sheets. Blots were processed using phospho-specific rabbit polyclonal anti-ERK or anti-p38 MAPK Abs (both from New England Biolabs, Beverly, MA) followed by a peroxidase-labeled anti-rabbit Ab (Amersham, Aylesbury, U.K.). Blots were developed using Amersham's enhanced chemiluminescence system and exposed to x-ray film, and signal intensities were quantified by a Pharmacia-LKB (Uppsala, Sweden) Ultrascan XL laser densitometer. For control blots, non-phospho-specific rabbit polyclonal anti-ERK1 and anti-ERK2 (used in combination; both from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-p38 MAPK (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) with peroxidase-labeled anti-rabbit Abs (Amersham) were used. It should be noted that the slight difference in the migrations of ERK1 and ERK2 could only be resolved when the acrylamide/bisacrylamide ratio of the SDS-PAGE gel was increased to 37.5:1. Even when such gels were used, we never observed any duplication of the anti-p38 MAPK immunoreactive band.

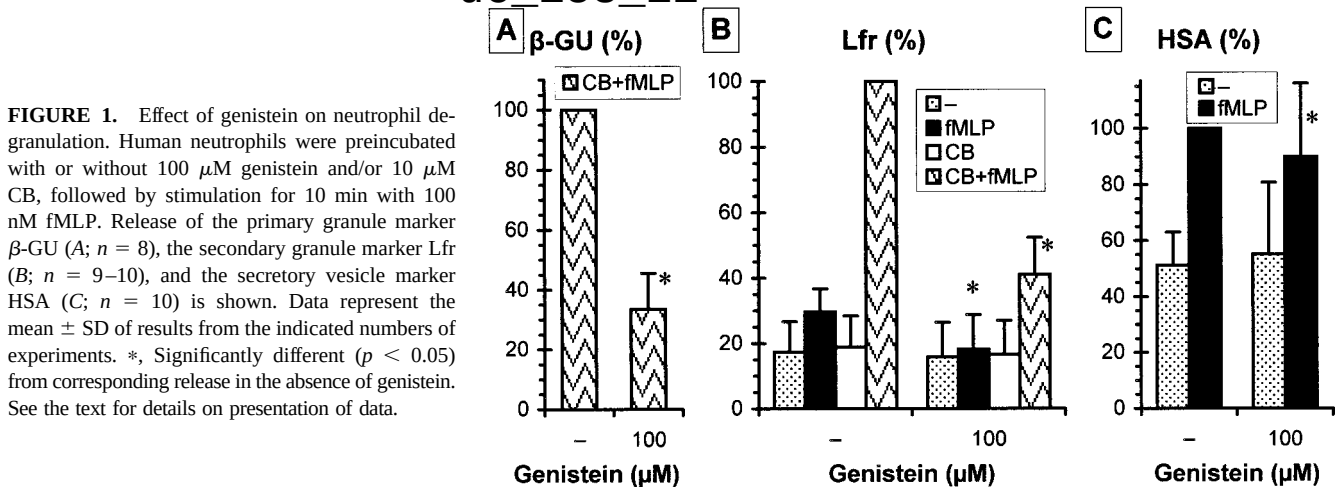
The activity of MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2), a kinase downstream of p38 MAPK, was measured by an *in vitro* kinase assay (26) using recombinant heat shock protein 27 (Hsp27), a substrate of MAPKAPK2. Triton-soluble lysates were supplemented with kinase buffer (15 mM Na-HEPES (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM Na-EGTA, 2 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM NaF, 5 μ M sodium pyrophosphate, 20 mM β -glycerophosphate, 2 μ M okadaic acid, 0.2 mM [γ -³²P]ATP (~200 μ Ci/ μ mol), and 20 μ g/ml human Hsp27 (Stressgen, Victoria, Canada) from a 2 $\times$ concentrated stock solution and incubated for 20 min at room temperature. The reaction was stopped by adding sample buffer, followed by boiling for 10 min. Samples were then run on a 12% SDS-PAGE, dried, and exposed to x-ray film or quantitated using a Bio-Rad (Hercules, CA) GS-525 PhosphorImager. To determine the incorporation of radioactivity into endogenous cellular proteins, parallel measurements without Hsp27 were also performed. Radioactivity in these samples was then subtracted from values obtained from Hsp27-containing tubes.

For the *in vitro* ERK kinase activity measurements (27), 100 μ l Triton-soluble cell lysates were incubated for 3 h with 3 μ g of rabbit polyclonal anti-ERK2 Abs (provided by Dr. Jackie R. Vandenheede, Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium). Immunocomplexes were captured with protein A-TSK gel and were washed three times with PBS containing 1% Nonidet P-40, and twice with kinase buffer containing 20 mM MOPS (pH 7.6), 2 mM EGTA, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, and 0.1% Triton X-100. The washed beads were resuspended in 30 μ l of kinase reaction mixture containing kinase buffer supplemented with 40 μ M ATP, 5 μ Ci of [γ -³²P]ATP, and 50 μ g myelin basic protein as kinase substrate. After incubation at 30°C for 15 min, the reaction was terminated by addition of sample buffer and heating at 100°C for 3 min. The proteins were separated on 11% SDS-PAGE, dried, and exposed to x-ray film. The myelin basic protein band was then cut out, and the incorporated radioactivity was quantified using a Wallac (Turku, Finland) 1409 liquid scintillation counter.

Determination of Tyr phosphorylation of Syk

Tyr phosphorylation of Syk was determined by immunoprecipitation followed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine (DFP) Abs. To prevent the degradation of Syk, these experiments were performed on neutrophils pretreated with 0.2 μ l/ml di-isopropyl fluorophosphate at the end

dc_158_11



of the cell preparation. Cells were stimulated with 100 nM fMLP or by hyperosmotic shock (addition of an extra 120 mM NaCl; Ref. 28) for 2 min. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of ice-cold PBS, followed by lysing the cells with a 5 $\times$ concentrated lysis buffer. Triton-soluble fractions were then prepared as described above and precleared by incubating for 60 min with protein G-Sepharose beads (Pharmacia). The precleared lysates were incubated for 60 min with 5 μ g/sample mouse monoclonal anti-human Syk Abs (Santa Cruz Biotechnology) and for a further 60 min with protein G-Sepharose beads. The beads were washed three times with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1 mM Na_3VO_4 and were boiled for 10 min in sample buffer. An aliquot of the supernatant was run on an 8% SDS-PAGE and immunoblotted using mouse monoclonal anti-phosphotyrosine Abs (clone 4G10 from Upstate Biotechnology). The Tyr phosphorylation of Syk was quantitated by densitometric analysis. The amounts of Syk immunoprecipitated from the different samples were compared by immunoblotting aliquots of the immunoprecipitates with the precipitating Abs.

Experiments on murine neutrophils

The *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} triple knockout mice deficient in all three Src family kinases present in neutrophils have been described previously (29). Preparation and stimulation of wild-type (C57BL/6) or *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} bone marrow neutrophils as well as determination of the release of the secondary granule marker Lfr were performed as previously described (13), using 1 μ M fMLP as stimulus. Exocytosis of mouse serum albumin (MSA) was measured by ELISA, using rabbit anti-MSA Abs (unlabeled or peroxidase labeled for capturing and developing, respectively; both from Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands). The assay was calibrated using purified MSA (Sigma). Phosphorylation of murine p38 MAPK was determined as described for human neutrophils, except that 1 μ M fMLP was used to induce a well measurable phosphorylation of the protein.

Presentation of data and statistical analysis

Degranulation assays were performed in triplicate or quadruplicate. The concentration of granule markers in the supernatants was expressed as a percentage of values of fMLP-stimulated samples of human cells without kinase inhibitors or of wild-type murine cells, in the presence (primary and secondary granules) or the absence (secretory vesicles) of CB. The 100% values for human cells corresponded to $29 \pm 16\%$ of the total cellular β -GU content in the case of primary granules (CB present; $n = 8$), $3.4 \pm 1.3 \mu\text{g Lfr}/10^6$ cells in the case of secondary granules (CB present; $n = 19$), and $189 \pm 77 \text{ ng HSA}/10^6$ cells in the case of secretory vesicles (CB absent; $n = 26$). Further information on presentation of results of degranulation experiments is provided at the beginning of *Results*. Data for phosphorylation and kinase activity are also expressed as a percentage of the fMLP-stimulated values without kinase inhibitors, except for the Syk phosphorylation experiments, where data are expressed as the fold increase over values obtained from nonstimulated samples.

Because of the floating zero point of the fluorometer used, the results of the β -GU measurements reflect the differences between but not the absolute

values of the β -GU activity of the samples. For this reason, only fMLP-stimulated values of β -GU (i.e., after subtraction of values in nonstimulated samples) are provided. None of the inhibitors used had any considerable effect on β -GU activity in supernatants of nonstimulated cells (not shown).

For statistical analysis throughout this paper, nonstimulated values were subtracted from fMLP-stimulated ones, and the obtained data were expressed as a percentage of similarly calculated values in the absence of kinase inhibitors or the *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} mutation. The mean $\pm$ SD of these values from the indicated number of experiments are provided. The difference in these normalized values from 100% was then analyzed using Student's paired two-population *t* test. Values of $p < 0.05$ at $n \geq 3$ were considered statistically significant.

Results

CB enhances the fMLP-induced release of primary and secondary granules, but not that of secretory vesicles of human neutrophils

In this report we investigated the signaling mechanisms leading to exocytosis of three different intracellular compartments of neutrophils: the primary and secondary granules as well as the secretory vesicles. The microfilament disrupting agent CB has long been known to enhance certain responses of neutrophils, including the release of primary and secondary granules (30). To determine optimal conditions for studying the exocytic activity of neutrophils we first investigated the effect of CB on the release of the three exocytic compartments tested. In accordance with previous findings (30), while fMLP induced a substantial release of the primary granule marker β -GU from human neutrophils pretreated with 10 μ M CB, no exocytosis of β -GU was observed in the absence of CB (not shown). CB strongly increased fMLP-induced release of the secondary granule marker Lfr, but exocytosis of Lfr from CB-untreated neutrophils could also be easily observed (for example, see Fig. 1B). In contrast, the exocytosis of HSA, a constituent of the secretory vesicles, was maximal even in the absence of CB, and no further increase was observed after pretreating the cells with CB (not shown). On the basis of these findings, only degranulation of primary granules from CB-pretreated cells and release of secretory vesicles from CB-untreated cells are shown throughout this paper (Figs. 1, 3, 4, 5, and 7). However, data on Lfr release are provided in both the presence and the absence of CB. Comparing the effects of kinase inhibitors on Lfr release in the presence and the absence of CB allowed us to speculate about whether the drugs act on fMLP signaling or on the cytoskeletal changes induced by CB.

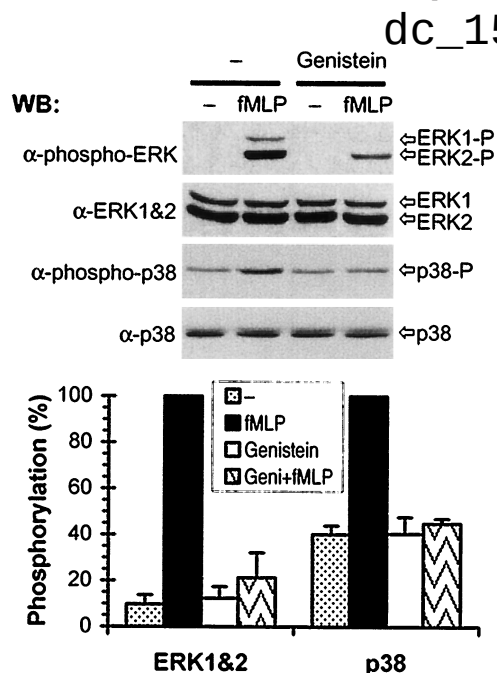


FIGURE 2. Effects of genistein on ERK and p38 MAPK phosphorylation. Human neutrophils were preincubated with or without 100 μ M genistein (Geni), followed by stimulation for 2 min with 100 nM fMLP. Total cell lysates were subjected to immunoblotting (WB) using the specified Abs. The diagram represents the mean $\pm$ SD of results of densitometric analysis of two experiments.

The tyrosine kinase inhibitor genistein inhibits exocytosis of primary and secondary granules and phosphorylation of ERK and p38 MAPK

As shown in Fig. 1, 100 μ M genistein, a broad specificity tyrosine kinase inhibitor, caused a strong inhibition of the fMLP-induced exocytosis of primary ($67 \pm 12\%$ inhibition) and secondary ($71 \pm 14\%$ inhibition) granules from CB-treated neutrophils. The fact that genistein also decreased the release of the secondary granule

marker Lfr from CB-untreated neutrophils ($77 \pm 17\%$ inhibition) suggests that the drug affects a signaling pathway initiated by fMLP itself, instead of acting on the cytoskeletal changes induced by CB. On the other hand, the release of HSA, a marker of secretory vesicles, was only moderately influenced by 100 μ M genistein ($29 \pm 22\%$ inhibition). Taken together, these data suggest that tyrosine kinases are strongly involved in the fMLP-induced degranulation of primary and secondary granules, but to only a lesser extent in that of secretory vesicles.

Exocytosis of the secondary granules can be induced in an integrin-dependent (adherent) manner, and we have recently shown that this adherent exocytosis is mediated by tyrosine kinases (13). To exclude the possibility that adhesive (e.g., intercellular) interactions were also involved in the fMLP-induced exocytosis by suspended neutrophils, we exploited the evidence that integrin function requires the presence of Mg^{2+} ions in the extracellular medium (13, 25). Withdrawal of Mg^{2+} ions from the incubation medium had no effect on the fMLP-induced release of Lfr (CB absent; $102 \pm 26\%$ remaining exocytosis; $n = 4$), while it prevented the TNF- α -induced spreading of neutrophils over fibrinogen-coated surface (not shown), a response known to involve integrin activation (25). Thus, in the assay conditions that we employed, fMLP triggered the exocytosis of secondary granules in an integrin-independent manner.

One of the earliest events of fMLP signal transduction is the tyrosine phosphorylation of several intracellular proteins, including ERK (ERK1 and ERK2) and p38 MAPK proteins. As shown in Fig. 2, phosphorylation of ERK ($90 \pm 7\%$ inhibition) and p38 MAPK ($94 \pm 9\%$ inhibition) proteins was blocked by 100 μ M genistein, raising the possibility that the inhibition of ERKs and/or that of p38 MAPK might mediate the effect of genistein on the degranulation response. To test this possibility, we next investigated the effect of pharmacological inhibition of the ERK and p38 MAPK pathways in fMLP-induced degranulation of neutrophils.

The p38 MAPK, but not the ERK, pathway is involved in the release of primary and secondary granules

Despite evidence of the rapid activation of the ERK cascade in response to fMLP stimulation (4, 14, 15) and the intensive search

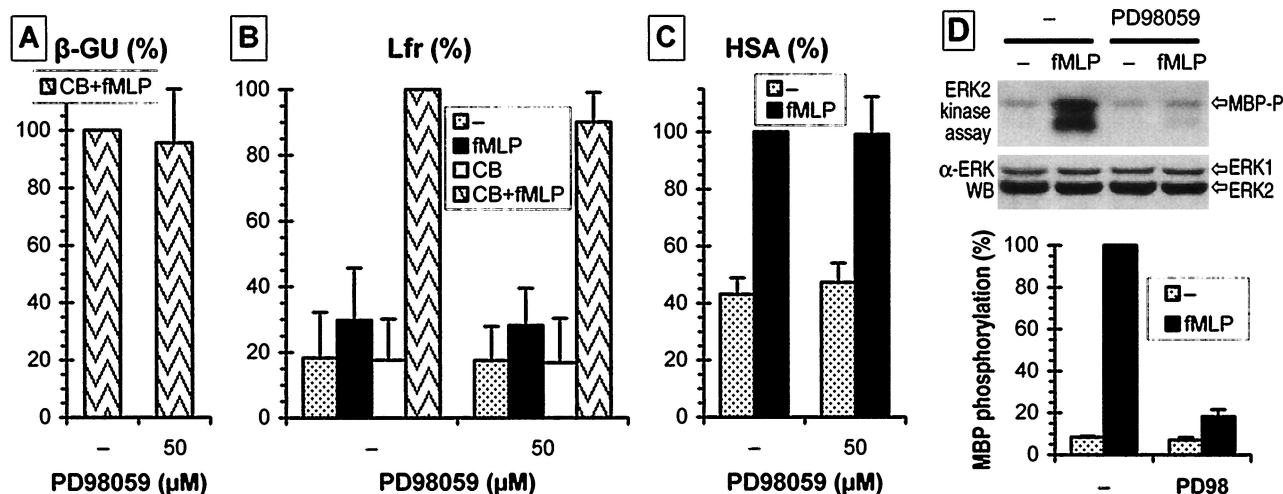


FIGURE 3. Effect of PD98059 on neutrophil degranulation and ERK activation. Human neutrophils were preincubated with or without 50 μ M PD98059 and/or 10 μ M CB, followed by stimulation for 10 (A–C) or 2 min (D) with 100 nM fMLP. Release of the primary granule marker β -GU (A; $n = 3$), the secondary granule marker Lfr (B; $n = 4$), and the secretory vesicle marker HSA (C; $n = 4$) is shown. Data represent the mean $\pm$ SD of results from the indicated numbers of experiments. See the text for details on presentation of data. D, Total cell lysates were subjected to in vitro ERK2 kinase assay or immunoblotting with a combination of anti-ERK1 and anti-ERK2 Abs (α -ERK WB). The diagram represents the mean $\pm$ SD of results from the ERK2 kinase assay in two experiments.

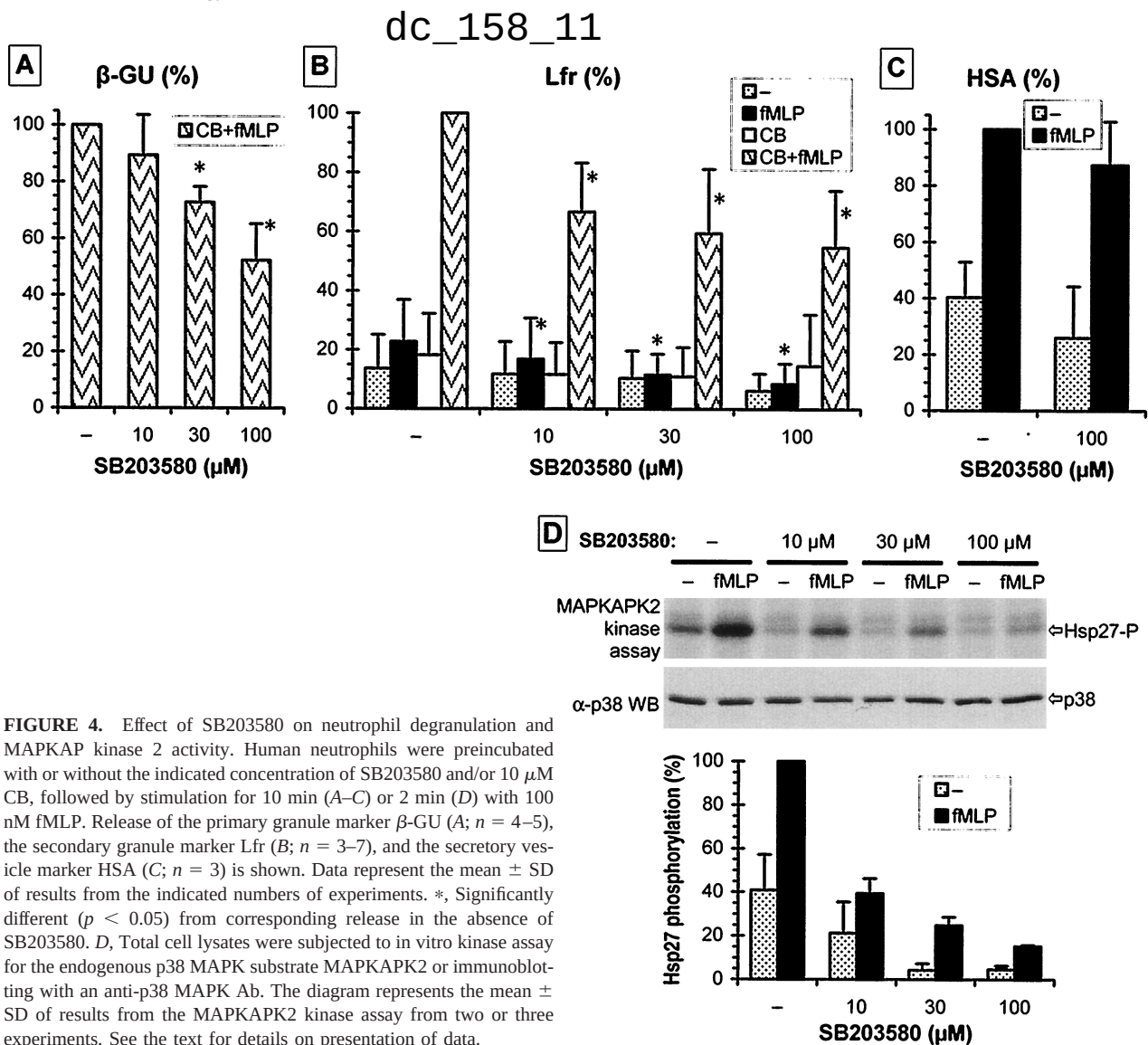


FIGURE 4. Effect of SB203580 on neutrophil degranulation and MAPKAPK2 activity. Human neutrophils were preincubated with or without the indicated concentration of SB203580 and/or 10 μ M CB, followed by stimulation for 10 min (A–C) or 2 min (D) with 100 nM fMLP. Release of the primary granule marker β -GU (A; $n = 4$ –5), the secondary granule marker Lfr (B; $n = 3$ –7), and the secretory vesicle marker HSA (C; $n = 3$) is shown. Data represent the mean $\pm$ SD of results from the indicated numbers of experiments. *, Significantly different ($p < 0.05$) from corresponding release in the absence of SB203580. D, Total cell lysates were subjected to in vitro kinase assay for the endogenous p38 MAPK substrate MAPKAPK2 or immunoblotting with an anti-p38 MAPK Ab. The diagram represents the mean $\pm$ SD of results from the MAPKAPK2 kinase assay from two or three experiments. See the text for details on presentation of data.

for its function in the fMLP-induced responses (8, 31, 32), no clear data supporting such a role has been presented. To determine the involvement of the ERK cascade in the exocytic activity of neutrophils, we used PD98059, an inhibitor of MEK1 and MEK2, the kinases responsible for phosphorylation of the ERK1 and ERK2 proteins (33). As shown in Fig. 3, 50 μ M PD98059 had no considerable effect on the release of β -GU (96 $\pm$ 19% remaining degranulation), Lfr (109 $\pm$ 37 and 89 $\pm$ 9% remaining degranulation in the absence and the presence of CB, respectively), or HSA (91 $\pm$ 24% remaining activity). Under identical conditions, 50 μ M PD98059 strongly inhibited fMLP-induced activation of the ERK cascade as determined using an in vitro ERK2 kinase assay (Fig. 3D; 88 $\pm$ 2% inhibition) or by immunoblotting using anti-phospho-ERK Abs (not shown). These data suggest that the ERK pathway, although clearly activated by fMLP, plays no role in triggering the exocytic responses of neutrophils.

In contrast to the ERK pathway, the p38 MAPK cascade has been implicated in fMLP-induced superoxide production and chemotaxis (6, 26) as well as in several responses triggered by TNF or LPS stimulation (26, 34) in neutrophils. We tested the role of p38 MAPK in the fMLP-induced exocytic activity of neutrophils using SB203580, an inhibitor of this kinase (35, 36). As shown in Fig. 4, SB203580 decreased the exocytosis of primary and secondary

granules from CB-pretreated neutrophils, reaching 48 $\pm$ 13 and 51 $\pm$ 19% inhibition, respectively, at a 100 μ M inhibitor concentration. The release of Lfr from CB-untreated neutrophils was also reduced by the drug (62 $\pm$ 5% inhibition at 100 μ M SB203580). However, 100 μ M SB203580 had no effect (102 $\pm$ 27% remaining exocytosis) on the release of the secretory vesicle marker HSA. The effect of SB203580 on p38 MAPK activity was determined using an in vitro kinase assay for MAPKAPK2, a known in vivo substrate of p38 MAPK (5). Fig. 4D shows that SB203580 blocked the activation of MAPKAPK2 in a concentration-dependent manner, reaching 85 $\pm$ 1% inhibition at 100 μ M. Taken together, these data indicate that the p38 MAPK pathway is involved in the fMLP-induced release of primary and secondary granules, but not in that of secretory vesicles. It should be noted, however, that while a major part of the inhibition of secondary granule release and MAPKAPK2 activation was attained by 10 μ M SB203580, a moderately higher concentration of the drug was required to prevent the exocytosis of primary granules. This observation points to a possible difference between the signaling of the two granule populations.

It should also be noted that in addition to the classical p38 MAPK (also known as p38 α or SAPK2a), a novel isoform of p38

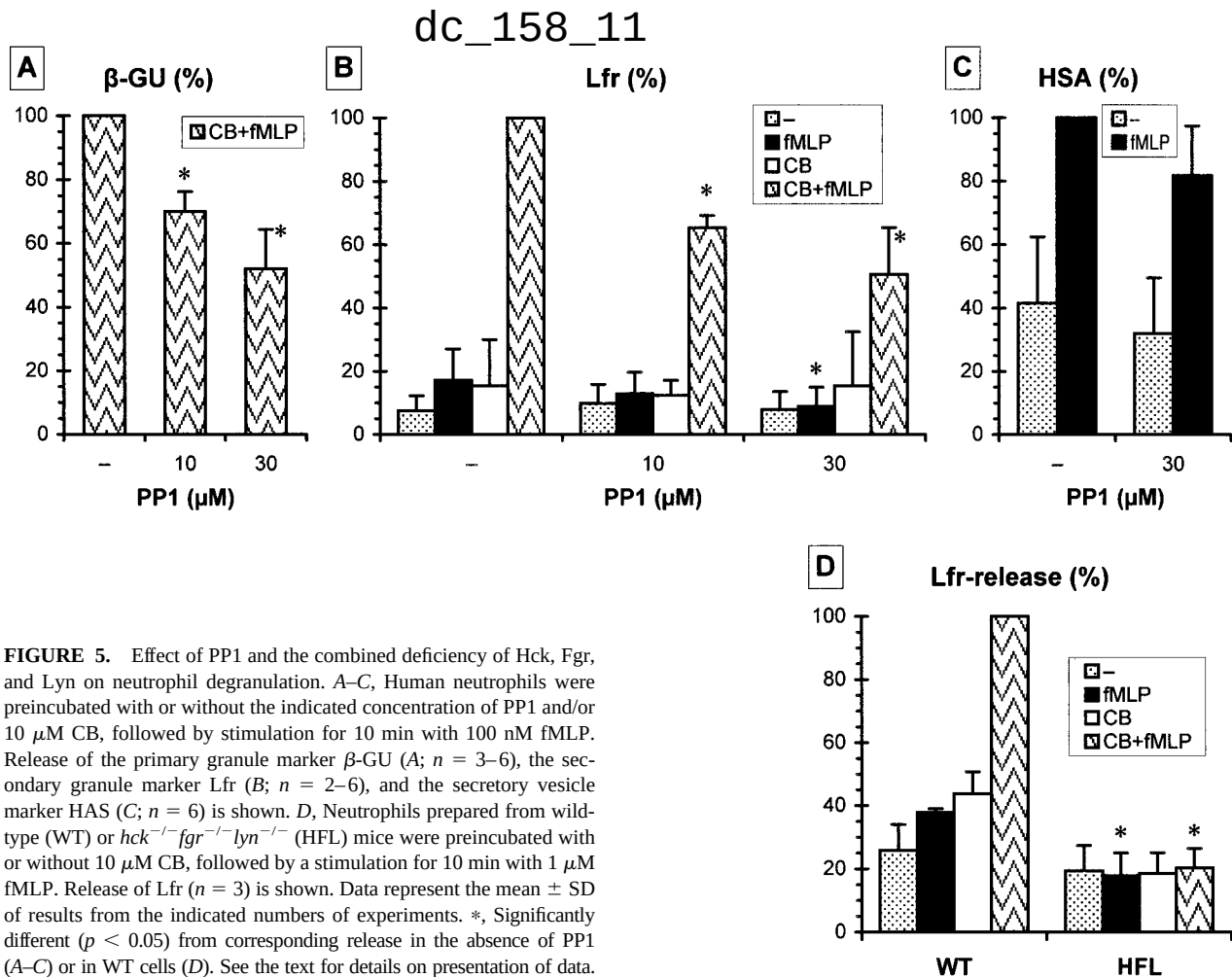


FIGURE 5. Effect of PP1 and the combined deficiency of Hck, Fgr, and Lyn on neutrophil degranulation. A–C, Human neutrophils were preincubated with or without the indicated concentration of PP1 and/or 10 μ M CB, followed by stimulation for 10 min with 100 nM fMLP. Release of the primary granule marker β -GU (A; $n = 3$ –6), the secondary granule marker Lfr (B; $n = 2$ –6), and the secretory vesicle marker HSA (C; $n = 6$) is shown. D, Neutrophils prepared from wild-type (WT) or *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} (HFL) mice were preincubated with or without 10 μ M CB, followed by a stimulation for 10 min with 1 μ M fMLP. Release of Lfr ($n = 3$) is shown. Data represent the mean $\pm$ SD of results from the indicated numbers of experiments. *, Significantly different ($p < 0.05$) from corresponding release in the absence of PP1 (A–C) or in WT cells (D). See the text for details on presentation of data.

MAPK, p38 δ (or SAPK4) has been shown to be present in neutrophils (37, 38). Although LPS stimulation of neutrophils activates only p38 α , treatment of the cells with H₂O₂ activates both p38 α and p38 δ (37). At present it is not known which of the two isoforms becomes activated in response to fMLP stimulation. In contrast to p38 α , p38 δ is not sensitive to SB203580 (39, 40) and does not phosphorylate MAPKAPK2 (39–41). Thus, the above experiments provide information only on the role of the classical isoform, p38 α .

The role of Src family kinases in neutrophil degranulation and activation of p38 MAPK

In the last few years great progress has been made in understanding the role of the different tyrosine kinases in the regulation of neutrophil functions (9). Several reports implicated the Src kinase family in different aspects of the fMLP-induced degranulation process (2, 3, 9–12). These findings together with the effect of genistein on the degranulation response prompted us to investigate the role of Src-related kinases in the exocytic activity of the different granules and secretory vesicles of neutrophils.

As shown in Fig. 5, PP1, a selective inhibitor of Src family kinases (42, 43) diminished the exocytosis of primary and secondary granules from CB-pretreated human neutrophils (48 ± 12 and $58 \pm 11\%$ inhibition, respectively, at 30 μ M PP1). PP1 also prevented the release of Lfr from CB-untreated neutrophils ($83 \pm 11\%$ inhibition at 30 μ M PP1), but had no considerable effect on the release of the secretory vesicle marker HSA ($92 \pm 26\%$ remaining activity at 30 μ M PP1).

To confirm that the effect of PP1 on granule release was in fact due to its action on Src family kinases, we investigated the fMLP-induced release of Lfr from neutrophils prepared from mice deficient in all three Src family kinases (Hck, Fgr, and Lyn) present in neutrophils (29). As shown in Fig. 5D, exocytosis of Lfr was strongly decreased in *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} triple mutant neutrophils compared with wild-type cells (97 ± 2 and $119 \pm 14\%$ inhibition in the presence and the absence of CB, respectively). This finding was in accordance with our previous observation that in the presence of CB, fMLP-induced release of Lfr was significantly decreased in *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-} double-mutant or PP1-treated wild-type murine neutrophils (13) and confirmed that Src family kinases are in fact involved in the exocytic activity of neutrophils. The more pronounced effect of the *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} mutation compared with that of PP1 probably reflects the complete absence of any Src-related kinase activity in the *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils, while some residual activity might be present in the PP1-treated cells.

Unfortunately, we were unable to study the fMLP-induced exocytosis of primary granules in the *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} mice because murine neutrophils do not release their intracellular β -GU enzymes under conditions inducing strong release of β -GU from human or of Lfr from murine cells (13). Surprisingly, we could not observe consistent release of MSA from wild-type or mutant cells in response to 1 μ M fMLP, i.e., under conditions causing maximal release of HSA from human neutrophils (data not shown). While this fact did not allow us to study fMLP-induced release of MSA from *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils, we did consistently observe

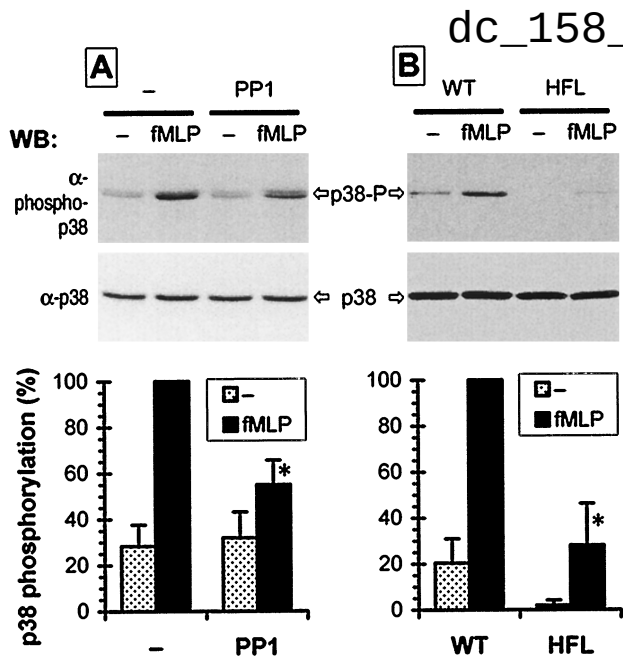


FIGURE 6. Effect of PP1 and the combined deficiency of Hck, Fgr, and Lyn on phosphorylation of p38 MAPK. Total cell lysates of fMLP-stimulated neutrophils were subjected to immunoblotting (WB) using the specified Abs. **A**, Results obtained with human neutrophils pretreated with or without 30 μ M PP1, followed by a 2-min stimulation with 100 nM fMLP. **B**, Results obtained with neutrophils from wild-type (WT) or *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} (HFL) mice stimulated for 1 min with 1 μ M fMLP. The diagrams represent the mean $\pm$ SD of results from densitometric analysis in three experiments. *, Significantly different ($p < 0.05$) from corresponding values in the absence of PP1 (**A**) or in WT cells (**B**).

that, similar to the effect of PP1 on HSA release (Fig. 5C), the unstimulated release of MSA was significantly lower in the triple mutant than in the wild-type cells (data not shown).

Several reports have implicated Src family kinases in the activation of the ERK pathway by G proteins (44–46), but very little is known of their role in the activation of p38 MAPK. This fact together with our observation that both the p38 MAPK pathway and Src family kinases seem to be involved in degranulation of neutrophils prompted us to examine the possible involvement of Src family kinases in the fMLP-induced activation of p38 MAPK.

As shown in Fig. 6A, 30 μ M PP1 exerted a strong ($67 \pm 17\%$) inhibition on the fMLP-induced phosphorylation of p38 MAPK in human neutrophils. Similarly, phosphorylation of p38 MAPK was strongly decreased in *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} triple-mutant murine neutrophils (Fig. 6B; $67 \pm 23\%$ decrease in phosphorylation). These observations suggest that Src family kinases play a major role in linking the G_i-coupled fMLP receptor to the p38 MAPK pathway.

Taken together, our observations presented in Figs. 4–6 suggest that the fMLP-induced release of primary and secondary granules is mediated by p38 MAPK activated by a Src family kinase-dependent mechanism.

Piceatannol inhibits both degranulation and activation of p38 MAPK

Besides Src family tyrosine kinases, Syk, a member of the Syk/ZAP-70 kinase family is also present in neutrophils (47). Activation of Syk by agonists of neutrophils (19, 47, 48) and the closely related functions of the Src and Syk/ZAP-70 kinase families in several cell types (16–19) prompted us to investigate the role of Syk in the signaling mechanisms initiated by fMLP in neutrophils.

As shown in Fig. 7, piceatannol, a reportedly selective inhibitor of Syk (49), exerted a strong inhibition of the fMLP-induced release of primary granules ($69 \pm 8\%$ inhibition at 100 μ M). The drug also prevented the exocytosis of secondary granules in both the presence and the absence of CB (71 ± 6 and $83 \pm 4\%$ inhibition, respectively, at 100 μ M), but exerted a statistically nonsignificant effect on the release of secretory vesicles ($49 \pm 30\%$ inhibition at 100 μ M). Furthermore, as shown in Fig. 7D, piceatannol prevented the activation of p38 MAPK triggered by fMLP ($74 \pm 21\%$ inhibition). These data resembled the effects of genistein and PP1 as well as the responses observed in *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils and raised the possibility that Syk, similar to its role in several other cellular systems, participates in a signaling pathway closely related to the Src family of tyrosine kinases.

Next we investigated the possible activation of Syk by fMLP in neutrophils. These experiments had two purposes. First, we planned to reveal whether Syk, similar to the immunoreceptor signaling pathways (16–18), is activated by an Src family-dependent mechanism in fMLP-treated neutrophils. Second, since a recent report raised the possibility of a nonspecific effect of piceatannol (50), we aimed to determine whether the effect of the drug on the degranulation and p38 MAPK activation correlated with that on the activity of Syk. Because the activity of Syk is closely related to its tyrosine phosphorylation, we investigated the tyrosine phosphorylation status of Syk in fMLP-stimulated neutrophils. Unexpectedly, the tyrosine phosphorylation of Syk precipitated from lysates of neutrophils stimulated for 2 min by 100 nM fMLP did not differ from that of unstimulated cells ($94 \pm 6\%$ remaining phosphorylation; Fig. 7E), while a strong (2.7 ± 1.8 -fold) increase in the Tyr phosphorylation of Syk was observed in neutrophils subjected to a hyperosmotic shock (addition of an extra 120 mM NaCl for 2 min) (28), showing that our method was capable of determining changes in the tyrosine phosphorylation status of Syk. We did not observe any increase in Syk Tyr phosphorylation when the cells were treated for a shorter (30 to 60 s) period, stimulated with 1 μ M fMLP, preincubated with 10 μ M CB or when pretreatment with DFP was omitted (data not shown). We did not observe any fMLP-induced increase in Syk activity when the immunoprecipitates were subjected to an in vitro kinase assay (data not shown). Although these data do not exclude the involvement of Syk in the signaling mechanisms initiated by fMLP in neutrophils, they point to the need for more specific approaches to define the role of this enzyme in the fMLP-induced neutrophil responses.

Discussion

Our results indicate that tyrosine phosphorylation plays an important role in the signaling events leading from stimulation of fMLP receptors to exocytosis of the primary and secondary granules of human neutrophils. The release of these two granule populations displayed a similar sensitivity to the inhibitors we used, whereas significant differences were observed when studying the exocytosis of the secretory vesicles (Figs. 1, 4, 5, and 7). In fact, tyrosine kinase activity does not seem to play a decisive role in the release of the secretory vesicles upon chemotactic stimulation.

The use of inhibitors acting on different tyrosine phosphorylation-dependent signaling pathways as well as the study of neutrophils genetically deficient in Src family kinases revealed that several types of kinases are involved in the exocytic process of primary and secondary granules. The following observations indicate that phosphorylation and consequent activation of p38 MAPK represents a key element: 1) the rapid activation of p38 MAPK, following the ligand binding to fMLP receptors, precedes or coincides with the degranulation response (5); 2) the decrease in

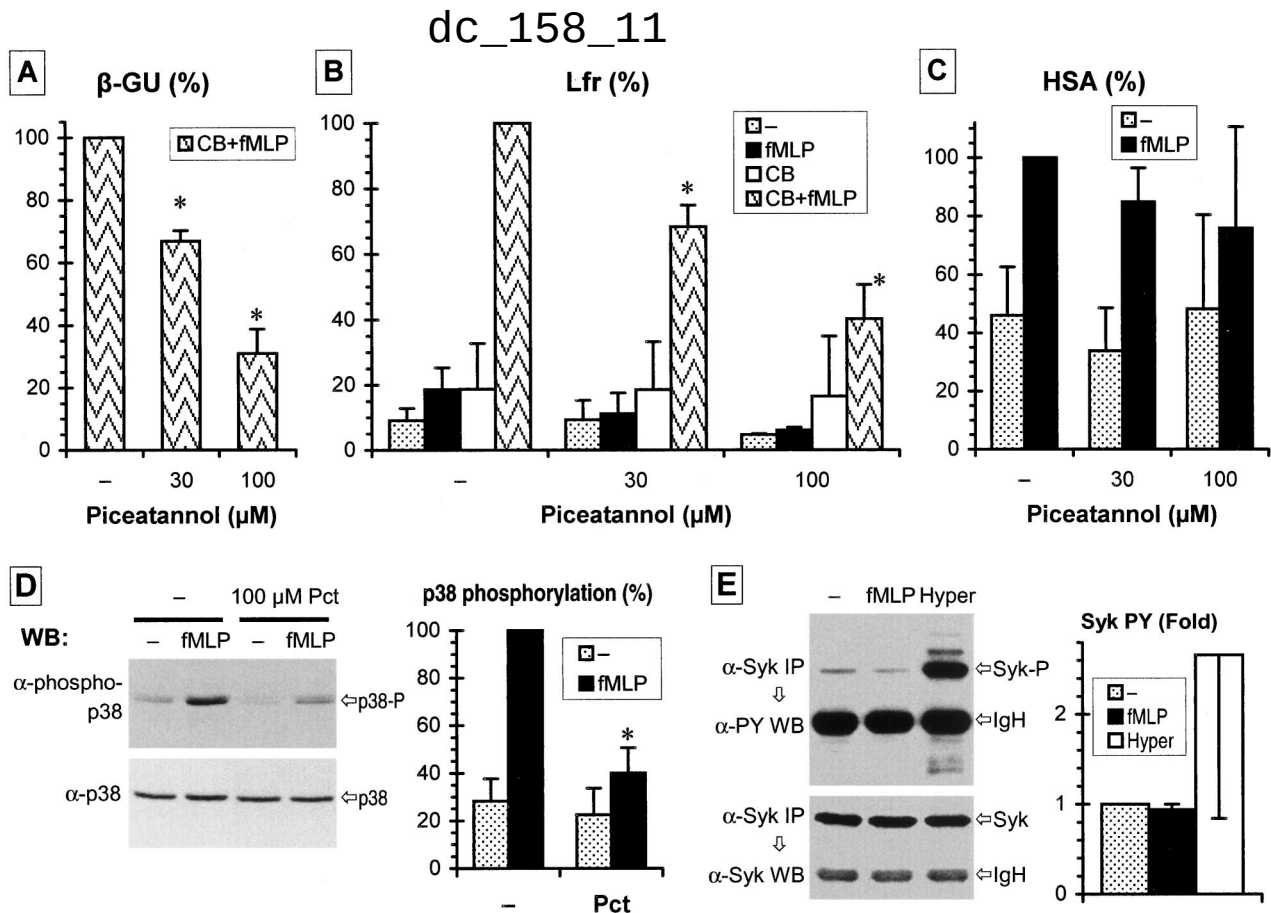


FIGURE 7. Effect of piceatannol on neutrophil responses and tyrosine phosphorylation of Syk. Human neutrophils were preincubated with or without the indicated concentration of piceatannol (Pct) and/or 10 μ M CB, followed by stimulation for 10 (A–C) or 2 min (D and E) with 100 nM fMLP or by hyperosmotic shock (addition of an extra 120 mM NaCl; Hyper). Release of the primary granule marker β -GU (A; $n = 3$ –4), the secondary granule marker Lfr (B; $n = 2$ –4), and the secretory vesicle marker HSA (C; $n = 3$ –4) is shown. Data represent the mean $\pm$ SD of results from the indicated numbers of experiments. D and E, Total cell lysates (D) or Syk immunoprecipitates (IP; E) were subjected to immunoblotting (WB) using the specified Abs. Diagrams represent the mean $\pm$ SD of results of densitometric analysis from three experiments. PY, phospho-tyrosine; IgH, Ig heavy chain. *, Significantly different ($p < 0.05$) from corresponding release in the absence of piceatannol. See the text for details on presentation of data.

degranulation in response to treatment with genistein, PP1, and piceatannol or in the *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils (Figs. 1, 5, and 7) correlates with a similar decrease in the phosphorylation of p38 MAPK (Figs. 2, 6, and 7); and, most importantly, 3) direct inhibition of p38 MAPK activity by SB203580 impairs the degranulation response (Fig. 4). To our knowledge this is the first demonstration of the involvement of p38 MAPK in exocytosis from neutrophils. However, it should be noted that the effective inhibition of p38 MAPK by SB203580 results in only ~50% inhibition of the release of granule contents. This finding points to the existence of a signaling pathway that does not involve the p38 MAPK cascade (or proceeds through p38 δ , the p38 MAPK isoform of neutrophils not sensitive to SB203580). The fact that genistein had a more profound effect on degranulation than SB203580 (Figs. 1 and 4), while both drugs strongly inhibited the p38 MAPK pathway (Figs. 2 and 4), suggests that some of the pathways bypassing the SB203580-sensitive p38 MAPK also require tyrosine kinase activity.

It should be noted that SB203580 has recently been reported to affect the Raf protein kinase. Paradoxically, while in vitro treatment with SB203580 inhibited the activity of Raf, the in vivo treatment of the cells led to an activation of the kinase (51, 52). Nevertheless, the inhibitor did not influence the signaling pathways known to be upstream or downstream of Raf (51, 52). These

uncertainties together with the fact that the ERK cascade, the main downstream effector of Raf, does not seem to be involved in the degranulation process (Fig. 3), suggest that the effect of SB203580 on the release of primary and secondary granules is not mediated by its influence on Raf.

Inhibition of the ERK cascade by PD98059 had no effect on the fMLP-induced exocytosis of secretory vesicles, and in accordance with previous findings (8, 31, 32), it did not affect the release of primary or secondary granule marker proteins either (Fig. 3). It should be noted that despite its immediate and profound activation, clear evidence for a functional role of ERKs in any of the fMLP-induced responses of neutrophils is still lacking.

fMLP has also been shown to activate Src family kinases in neutrophils (2, 3, 9, 10). These kinases seem to participate in the signaling of the exocytic process, because application of the Src family-selective inhibitor PP1 or the genetic deficiency of the Src family kinases expressed in neutrophils significantly decreased the fMLP-induced granule release (Fig. 5). This is in accord with our previous findings suggesting a role for Src family kinases in the fMLP-induced degranulation of the secondary granules in murine neutrophils (13).

The observation that both PP1 and the genetic deficiency of Src family kinases prevented activation of p38 MAPK (Fig. 6) places the site of action of Src-related kinases between the receptor and

p38 MAPK. These data together with those presented in Figs. 4 and 5 suggest that the exocytosis of primary and secondary granules proceeds through p38 MAPK activated by a Src family kinase-dependent mechanism.

In addition to providing information on neutrophil functions, some of the experiments presented in this paper may be relevant to G protein signal transduction in other cell types as well. In the last years great effort has been made to elucidate the mechanisms linking G protein-coupled receptors to the MAP kinase cascades (for review, see Ref. 53). It has been shown that nonreceptor tyrosine kinases activated by G proteins impinge on the Ras-Raf-ERK pathway through tyrosine phosphorylation of Shc and recruitment of Grb2 and Sos to the plasma membrane. The tyrosine kinases implicated in the G protein-mediated activation of ERK include members of the Src family as well as Syk, Btk, Csk, and Pyk2 (44–46, 54). On the other hand, despite several observations showing activation of the p38 MAPK pathway by G protein-coupled receptors, very little is known about the role of tyrosine kinases in this process. To our knowledge, the only relevant information on this topic was provided by Nagao et al. (55), who described the involvement of Src family kinases in the activation of p38 MAPK by a constitutively active form of $G_{\alpha 11}$. Our finding that Src-related kinases participate in the activation of the p38 MAPK by fMLP in neutrophils (Fig. 6) raises the possibility that members of the Src family have a more general role in linking G protein-coupled receptors to the p38 MAPK pathway in different cell types of the organism.

In this study we also tried to gain more information about the role of the Syk tyrosine kinase in the fMLP signaling of neutrophils. Piceatannol, a reportedly selective inhibitor of Syk, prevented the fMLP-induced release of primary and secondary granules as well as the activation of p38 MAPK (Fig. 7). The effect of the drug on granule release is in accordance with previous reports showing that Syk plays a major role in degranulation of mast cells and basophilic leukemia cells mediated by $F_{c\epsilon}$ -receptor activation (49, 56). Furthermore, the pattern of inhibition of neutrophil responses by piceatannol resembles the effect of PP1 and that of Src kinase deficiency, raising the possibility that Syk might participate in the same pathway linking fMLP receptors to the degranulation response via Src family kinases and p38 MAPK.

Surprisingly, the concentration of piceatannol effectively inhibiting the fMLP-induced degranulation of CB-treated neutrophils (30–100 μ M) is an order of magnitude higher than that recently described to inhibit spreading and H_2O_2 release of adherent neutrophils (3–10 μ M) (57). Interestingly, a similar difference between adhesion-dependent responses and degranulation in suspension exists in the case of genistein and PP1 as well. Although concentrations of genistein as low as 2–10 μ M are sufficient to block the adhesion-dependent superoxide release of neutrophils (58), 25–100 μ M of the drug is required to block granule release in suspension (Fig. 1 and Ref. 8). PP1 (10 μ M) almost completely abolishes the adhesion-dependent Lfr release of human and murine neutrophils (13), whereas 20–30 μ M was required to cause a partial decrease in the degranulation of suspended cells (Fig. 5) (13). In light of the fact that degranulation in suspension is defective in both $hck^{-/-}fgr^{-/-}$ (13) and $hck^{-/-}fgr^{-/-}lyn^{-/-}$ neutrophils (Fig. 5D), it is highly unlikely that the inhibition of degranulation in suspension by the latter two compounds was due to a nonspecific effect. Furthermore, the effective concentration of piceatannol in inhibiting the granule release in suspension falls within the range (50–100 μ M; i.e., 12–24 μ g/ml) required for inhibiting several cellular responses as well as the in vivo activation of Syk or ZAP-70 in other cell types (59–62). Thus, the above-mentioned

differences can reflect the extreme sensitivity of the adhesion-dependent neutrophil responses to tyrosine kinase inhibitors, rather than the nonspecific action of all three compounds. This high sensitivity of the adhesion-dependent functions might be related to tyrosine kinases involved in pathways (e.g., integrin signaling or the cytoskeletal rearrangement required for cell spreading) used by adhesion-dependent, but not by fMLP-induced, activation mechanisms.

However, while initial studies reported piceatannol to be highly selective toward Syk (49), a recent observation showed the inhibition of other tyrosine kinases by high concentrations of the drug (50). Although Src family kinases are not or are only minimally sensitive to piceatannol (49, 50, 59, 60), the compound inhibited focal adhesion kinase (Fak) at moderately high concentrations (50). The fact that neutrophils contain both Fak (57, 63, 64) and Pyk2 (28, 65, 66), a kinase closely related to Fak, raises the possibility that, in addition to Syk, piceatannol might affect other kinases present in neutrophils. Our finding that despite the effects of piceatannol on degranulation and p38 MAPK activation, no increase in the tyrosine phosphorylation of Syk in fMLP-stimulated neutrophils could be observed (Fig. 7E) supports the possibility of a nonspecific action of the drug. All these data point to the need for more specific approaches to determine whether Syk is in fact involved in fMLP signaling in neutrophils (e.g., by having a permissive effect or being activated only in a minor compartment of the cell) or whether piceatannol exerts its effect by inhibiting other cellular targets (e.g., members of the Fak kinase family). Solving this question is hampered by the fact that deficiency of the *syk* gene leads to perinatal lethality in mice (67, 68), making studies of *syk*^{-/-} neutrophils difficult to attain.

Taken together, our observations based on pharmacological and gene knockout approaches suggest that the binding of fMLP to its G_i -coupled seven-transmembrane receptor on the surface of neutrophils leads to the phosphorylation of p38 MAPK by a mechanism involving Src family kinases. p38 MAPK, in turn, plays a role in dictating, by an as yet unidentified mechanism, the release of both primary and secondary granules of the cells. The possible involvement of Syk in the above processes requires further consideration.

Acknowledgments

We thank Dr. Katalin Németh for the anti-Lfr Abs; Dr. Jackie R. Vandenhede for providing Ab, reagents, and equipment for the ERK kinase assay; Dr. Péter Csérmely for access to equipment for MAPKAPK2 assay and densitometry; Dr. András Kapus for helpful suggestions about the determination of Syk tyrosine phosphorylation; and the University of California, San Francisco, Blood Bank staff for providing human blood samples. The expert technical assistance of Erzsébet Seres-Horváth, Edit Fedina, and Klára Somogyi is greatly appreciated. A.M. dedicates this work to the memory of his beloved mother.

References

- Borregaard, N., and J. B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503.
- Gaudry, M., C. Gilbert, F. Barabe, P. E. Poubelle, and P. H. Naccache. 1995. Activation of Lyn is a common element of the stimulation of human neutrophils by soluble and particulate agonists. *Blood* 86:3567.
- Ptasznik, A., A. Traynor-Kaplan, and G. M. Bokoch. 1995. G protein-coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase-Shc adapter protein signaling complexes. *J. Biol. Chem.* 270:19969.
- Grinstein, S., and W. Furuya. 1992. Chemoattractant-induced tyrosine phosphorylation and activation of microtubule-associated protein kinase in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267:18122.
- Krump, E., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, W. Furuya, and S. Grinstein. 1997. Chemotactic peptide *N*-formyl-Met-Leu-Phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272:937.

dc 158 11

6. Nick, J. A., N. J. Avdi, S. K. Young, C. Knall, P. Gerwins, G. L. Johnson, and G. S. Worthen. 1997. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP. *J. Clin. Invest.* 99:975.
7. Dusi, S., M. Donini, F. Wientjes, and F. Rossi. 1996. Tyrosine phosphorylation and subcellular redistribution of p125^{cas} guanosine triphosphatase-activating protein in human neutrophils stimulated with fMLP. *FEBS Lett.* 383:181.
8. Mócsai, A., B. Bánfi, A. Kapus, G. Farkas, M. Geiszt, L. Buday, A. Faragó, and E. Ligeti. 1997. 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.* 54:781.
9. Berton, G. 1999. Tyrosine kinases in neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.* 6:51.
10. Welch, H., and I. Maridonneau-Parini. 1997. Lyn and Fgr are activated in distinct membrane fractions of human granulocytic cells. *Oncogene* 15:2021.
11. Gutkind, J. S., and K. C. Robbins. 1989. Translocation of the FGR protein-tyrosine kinase as a consequence of neutrophil activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8783.
12. Mohn, H., V. Le Cabec, S. Fischer, and I. Maridonneau-Parini. 1995. The Src-family protein-tyrosine kinase p59^{hck} is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation. *Biochem. J.* 309:657.
13. Mócsai, A., E. Ligeti, C. A. Lowell, and G. Berton. 1999. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* 162:1120.
14. Torres, M., F. L. Hall, and K. O'Neill. 1993. Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J. Immunol.* 150:1563.
15. Thompson, H. L., M. Shiroo, and J. Saklatvala. 1993. The chemotactic factor N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine activates microtubule-associated protein 2 (MAP) kinase and a MAP kinase kinase in polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 290:483.
16. Kurosaki, T. 1997. Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 9:309.
17. Chu, D. H., C. T. Morita, and A. Weiss. 1998. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165:167.
18. Daeron, M. 1997. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15:203.
19. Yan, S. R., M. Huang, and G. Berton. 1997. Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72^{syk} tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72^{syk} and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J. Immunol.* 158:1902.
20. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard. 1993. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.* 150:1535.
21. Capodici, C., S. Hanft, M. Feoktistov, and M. H. Pillinger. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway. *J. Immunol.* 160:1901.
22. Tijssen, P., and E. Kurstak. 1984. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* 136: 451.
23. Borregaard, N., K. Lollike, L. Kjeldsen, H. Sengelov, L. Bastholm, M. H. Nielsen, and D. F. Bainton. 1993. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* 51:187.
24. Borregaard, N., L. Kjeldsen, K. Rygaard, L. Bastholm, M. H. Nielsen, H. Sengelov, O. W. Bjerrum, and A. H. Johnsen. 1992. Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 90:86.
25. Yan, S. R., L. Fumagalli, and G. Berton. 1995. Activation of p58^{c-fgr} and p53/56^{lyn} in adherent human neutrophils: evidence for a role of divalent cations in regulating neutrophil adhesion and protein tyrosine kinase activities. *J. Inflamm.* 45:297.
26. Zu, Y. L., J. Qi, A. Gilchrist, G. A. Fernandez, D. Vazquez-Abad, D. L. Kreutzer, C. K. Huang, and R. I. Sha'afi. 1998. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF- α or fMLP stimulation. *J. Immunol.* 160:1982.
27. Assefa, Z., M. Garmyn, R. Bouillon, W. Merlevede, J. R. Vandenheede, and P. Agostinis. 1997. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 108:886.
28. Rizoli, S. B., O. D. Rotstein, and A. Kapus. 1999. Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils: a role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274:22072.
29. Meng, F., and C. A. Lowell. 1997. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 185:1661.
30. Henson, P. M., J. E. Henson, C. Fittschen, D. L. Bratton, and D. W. H. Riches. 1992. Degranulation and secretion by phagocytic cells. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd Ed. J. I. Gallin, I. M. Goldstein, and R. Snyderman, eds. Raven Press, New York, p. 511.
31. Kuroki, M., and J. T. O'Flaherty. 1997. Differential effects of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor on human neutrophil responses to chemotactic factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232:474.
32. Downey, G. P., J. R. Butler, H. Tapper, L. Fialkow, A. R. Saltiel, B. B. Rubin, and S. Grinstein. 1998. Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J. Immunol.* 160:434.
33. Dudley, D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges, and A. R. Saltiel. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7686.
34. Detmers, P. A., D. Zhou, E. Polizzi, R. Thieringer, W. A. Hanlon, S. Vaidya, and V. Bansal. 1998. Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in β_2 -integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J. Immunol.* 161:1921.
35. Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, et al. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739.
36. Cuenda, A., J. Rouse, Y. N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T. F. Gallagher, P. R. Young, and J. C. Lee. 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364:229.
37. Nick, J. A., N. J. Avdi, S. K. Young, L. A. Lehman, P. P. McDonald, S. C. Frasch, M. A. Billstrom, P. M. Henson, G. L. Johnson, and G. S. Worthen. 1999. Selective activation and functional significance of p38 α mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 103:851.
38. Hale, K. K., D. Trollinger, M. Rihaneck, and C. L. Manthey. 1999. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase α , β , γ , and δ in inflammatory cell lineages. *J. Immunol.* 162:4246.
39. Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen. 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* 16:3563.
40. Kumar, S., P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee, and P. R. Young. 1997. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:533.
41. Wang, X. S., K. Diener, C. L. Manthey, S. Wang, B. Rosenzweig, J. Bray, J. Delaney, C. N. Cole, P. Y. Chan-Hui, N. Mantlo, et al. 1997. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272:23668.
42. Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, and P. A. Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor: study of Lck- and Fyn T-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271:695.
43. Schindler, T., F. Sicheri, A. Pico, A. Gazit, A. Levitzki, and J. Kuriyan. 1999. Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol. Cell* 3:639.
44. Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge, and J. Schlessinger. 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383:547.
45. Wan, Y., T. Kurosaki, and X.Y. Huang. 1996. Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* 380:541.
46. Wan, Y., K. Bence, A. Hata, T. Kurosaki, A. Veillette, and X. Y. Huang. 1997. Genetic evidence for a tyrosine kinase cascade preceding the mitogen-activated protein kinase cascade in vertebrate G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 272:17209.
47. Asahi, M., T. Taniguchi, E. Hashimoto, T. Inazu, H. Maeda, and H. Yamamura. 1993. Activation of protein-tyrosine kinase p72^{syk} with concanavalin A in polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268:23334.
48. Corey, S. J., A. L. Burkhardt, J. B. Bolen, R. L. Geahlen, L. S. Tkatch, and D. J. Tweardy. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4683.
49. Oliver, J. M., D. L. Burg, B. S. Wilson, J. L. McLaughlin, and R. L. Geahlen. 1994. Inhibition of mast cell Fc ϵ RI-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* 269:29697.
50. Law, D. A., L. Nannizzi-Alaimo, K. Ministri, P. E. Hughes, J. Forsyth, M. Turner, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, V. J. Tybulewicz, and D. R. Phillips. 1999. Genetic and pharmacological analyses of Syk function in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling in platelets. *Blood* 93:2645.
51. Hall-Jackson, C. A., M. Goedert, P. Hedge, and P. Cohen. 1999. Effect of SB 203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo. *Oncogene* 18:2047.
52. Kalmes, A., J. Deou, A. W. Clowes, and G. Daum. 1999. Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Lett.* 444:71.
53. Gutkind, J. S. 1998. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273:1839.
54. Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, et al. 1999. β -Arrestin-dependent formation of β_2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283:655.
55. Nagao, M., J. Yamauchi, Y. Kaziro, and H. Itoh. 1998. Involvement of protein kinase C and Src family tyrosine kinase in $G_{\alpha_{11}}$ -induced activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273:22892.
56. Rivera, V. M., and J. S. Brugge. 1995. Clustering of Syk is sufficient to induce tyrosine phosphorylation and release of allergic mediators from rat basophilic leukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 15:1582.
57. Fernandez, R., and S. J. Suchard. 1998. Syk activation is required for spreading and H₂O₂ release in adherent human neutrophils. *J. Immunol.* 160:5154.
58. Laudanna, C., F. Rossi, and G. Berton. 1993. Effect of inhibitors of distinct signalling pathways on neutrophil O₂⁻ generation in response to tumor necrosis factor- α , and antibodies against CD18 and CD11a: evidence for a common and

- unique pattern of sensitivity to wortmannin and protein tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:935.
59. Keely, P. J., and L. V. Parise. 1996. The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase C γ 2 in platelets. *J. Biol. Chem.* 271:26668.
 60. Musch, M. W., E. M. Hubert, and L. Goldstein. 1999. Volume expansion stimulates p72^{syk} and p56^{lyn} in skate erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 274:7923.
 61. Soede, R. D., Y. M. Wijnands, I. Van Kouteren-Cobzaru, and E. Roos. 1998. ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J. Cell Biol.* 142:1371.
 62. Tsuchida, M., S. J. Knechtle, and M. M. Hamawy. 1999. CD28 ligation induces tyrosine phosphorylation of Pyk2 but not Fak in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 274:6735.
 63. Fuortes, M., W. W. Jin, and C. Nathan. 1994. β_2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 127:1477.
 64. Fernandez, R., L. A. Boxer, and S. J. Suchard. 1997. β_2 integrins are not required for tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils. *J. Immunol.* 159:5568.
 65. Fuortes, M., M. Melchior, H. Han, G. J. Lyon, and C. Nathan. 1999. Role of the tyrosine kinase Pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J. Clin. Invest.* 104:327.
 66. Yan, S. R., and M. J. Novak. 1999. β_2 integrin-dependent phosphorylation of protein-tyrosine kinase Pyk2 stimulated by tumor necrosis factor α and fMLP in human neutrophils adherent to fibrinogen. *FEBS Lett.* 451:33.
 67. Turner, M., P. J. Mee, P. S. Costello, O. Williams, A. A. Price, L. P. Duddy, M. T. Furlong, R. L. Geahlen, and V. L. Tybulewicz. 1995. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378:298.
 68. Cheng, A. M., B. Rowley, W. Pao, A. Hayday, J. B. Bolen, and T. Pawson. 1995. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378:303.

Syk Is Required for Integrin Signaling in Neutrophils

Attila Mócsai,¹ Meijuan Zhou,^{1,4} Fanying Meng,^{1,5}
Victor L. Tybulewicz,² and Clifford A. Lowell^{1,3}

¹Department of Laboratory Medicine
University of California
San Francisco, California 94143

²National Institute for Medical Research
London
United Kingdom

Summary

The Syk tyrosine kinase plays a critical role in the signaling machinery of various receptors of the adaptive immune system. Here we show that Syk is also an essential component of integrin signaling in neutrophils. *syk*^{−/−} neutrophils failed to undergo respiratory burst, degranulation, or spreading in response to proinflammatory stimuli while adherent to immobilized integrin ligands or when stimulated by direct cross-linking of integrins. Signaling from the β_1 , β_2 , or β_3 integrins was defective in *syk*^{−/−} cells. Syk colocalized with CD18 during cell spreading and initiated downstream signaling events leading to actin polymerization. Surprisingly, these defects in integrin-mediated activation did not impair the integrin-dependent in vitro or in vivo migration of *syk*^{−/−} neutrophils or of cells deficient in Src-family kinases. Thus, integrins use different signaling mechanisms to support migration and adherent activation.

Introduction

Neutrophils are key players of the innate immune response against microbial infection. At sites of inflammation, cellular and humoral factors induce the transition of circulating neutrophils from a quiescent, poorly adhesive state to a primed, strongly adhesive phenotype (Lowell and Berton, 1999). Concomitant firm adhesion to the endothelium leads to local arrest of neutrophils, which then migrate through the vessel wall and the extravascular tissue to the site of microbial invasion. Through the release of reactive oxygen radicals, digestive enzymes, and antimicrobial peptides, neutrophils then eliminate the invading microorganisms. Integrins play a critical role in adhesive interactions during neutrophil migration and activation. However, the intracellular signaling pathways linking integrins to the various effector mechanisms of neutrophils are poorly understood.

Syk, together with the related kinase ZAP-70, plays a central role in immunoreceptor (B cell- and T cell-receptor and F_ϵ -receptor) signaling (Turner et al., 2000; Chu et al., 1998). Targeted disruption of Syk leads to a blockade of antigen-receptor-dependent maturation of B cells

(Turner et al., 1995; Cheng et al., 1995), impaired T cell receptor function (Turner et al., 1995; Cheng et al., 1995; Colucci et al., 2000), and defects in responses mediated by $F_\epsilon\gamma$ and $F_\epsilon\epsilon$ receptors (Crowley et al., 1997; Kiefer et al., 1998; Costello et al., 1996). On the other hand, little is known about the role of Syk in nonadaptive immune mechanisms.

Besides being indispensable for immunoreceptor function, Syk also becomes activated upon ligation of cell surface integrins in neutrophils (Yan et al., 1997), monocytic cell lines (Lin et al., 1995), and through the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Clark et al., 1994; Gao et al., 1997). However, demonstration of a physiological role of such a pathway in primary cells has been hindered by the lethality of the *syk*^{−/−} mice and the nonspecific nature of the available pharmacological inhibitors (Fernandez and Suchard, 1998; Law et al., 1999; Mócsai et al., 2000; Miura et al., 2001).

In this work, we directly tested the role of Syk in integrin signaling of neutrophils using chimeric mice with a genetic deficiency of Syk in the hematopoietic compartment. We conclude that Syk plays a crucial role in multiple integrin-mediated effector functions of the innate immune system, but it is dispensable for integrin-dependent neutrophil migration both in vitro and in vivo.

Results

Generation of Bone Marrow Chimeras with *syk*^{−/−} Hematopoietic System

To overcome the perinatal lethality of *syk*^{−/−} mice, we generated bone marrow chimeras by injecting *syk*^{−/−} fetal liver cells into lethally irradiated recipients. Donor and recipient cells were distinguished based on allelic differences between CD45 epitopes of donor (CD45.2 from the C57BL/6 background) and recipient (CD45.1) mice. Purified bone marrow neutrophils of *syk*^{−/−} chimeras consisted virtually exclusively of donor (CD45.2⁺) cells (Figure 1B) which were devoid of Syk protein (Figure 1C). No differences in neutrophil yield (data not shown) or expression of the Gr1 maturation marker (Figure 1D) were observed between the wild-type and *syk*^{−/−} genotypes, indicating that Syk is not required for normal proliferation or differentiation in the granulocytic lineage. *syk*^{−/−} neutrophils expressed normal levels of all integrins tested (Figure 1D).

Defective Integrin-Dependent Functions in *syk*^{−/−} Neutrophils

At sites of inflammation, neutrophils are activated by proinflammatory stimuli while adherent to intercellular adhesion molecules or extracellular matrix proteins. These conditions can be mimicked by in vitro stimulation of neutrophils in the presence of an adhesion surface (Nathan, 1987), leading to spreading, respiratory burst, and degranulation of the cells (jointly referred to as adherent activation). These adhesion-dependent responses require the ligation of β_2 integrins (Nathan et al., 1989; Richter et al., 1990). As shown in Figure 2A, *syk*^{−/−} neu-

³ Correspondence: clowell@cgl.ucsf.edu

⁴ Present address: Bayer Corp., Berkeley, California 94710.

⁵ Present address: Telik Inc., South San Francisco, California 94080.

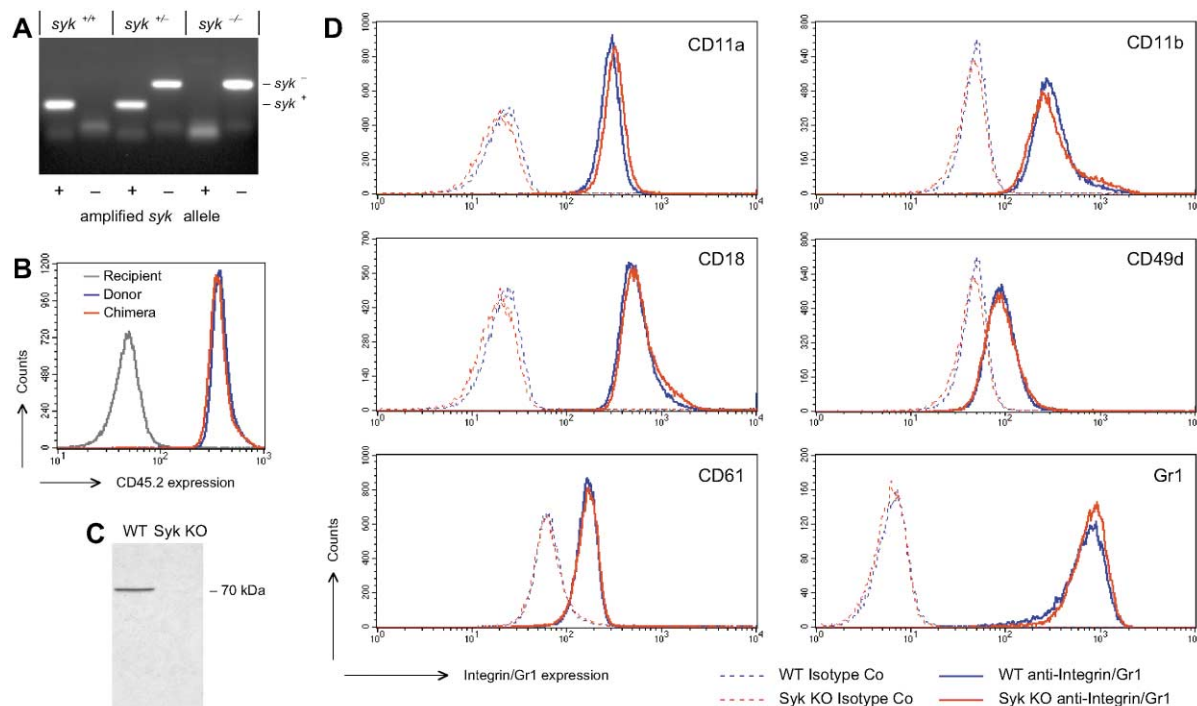


Figure 1. Generation of *syk*^{-/-} Chimeras and Normal Expression of Integrins on *syk*^{-/-} Neutrophils

(A) PCR analysis of *syk*^{+/+}, *syk*^{+/-} and *syk*^{-/-} embryos.

(B) Flow cytometry analysis of CD45 alleles on neutrophils purified from bone marrow chimeras. For controls, cells from a pretransplantation recipient (CD45.1 congenic on B6 background) and from a B6 mouse (CD45.2; same as the background of the *syk*^{-/-} donor) were used.

(C) Immunoblot analysis of Syk in neutrophils prepared from chimeras with wild-type or *syk*^{-/-} hematopoietic system.

(D) Flow cytometry analysis of integrin and Gr1 expression on *syk*^{-/-} neutrophils.

trophils are completely defective in respiratory burst (superoxide production) when plated on a fibrinogen-coated surface in the presence of TNF- α (TNF). Under identical conditions, neutrophils deficient in the β_2 integrin chain CD18 show a similar defect, confirming the integrin dependence of the response (Figure 2A). In addition to the respiratory burst defect, *syk*^{-/-} neutrophils also failed to undergo adhesion-dependent degranulation, as determined by the release of the secondary granule marker lactoferrin (Figure 2A). Other inflammatory mediators, such as the bacterial tripeptide formyl-MetLeuPhe (fMLP), bacterial lipopolysaccharide (LPS), or the chemokine MIP-2, failed to restore the defective integrin-dependent activation of *syk*^{-/-} neutrophils (Figure 2B). Syk-deficient neutrophils also failed to respond to TNF when plated on surfaces coated with collagen or FCS (Figure 2B) or with purified ICAM-1, the major integrin ligand involved in the local arrest of circulating leukocytes at the vessel wall (Figure 2C).

Correlated with the above defects in adhesion-dependent activation, *syk*^{-/-} neutrophils did not spread over a fibrinogen-coated surface (Figure 2D). This response was also absent in *CD18*^{-/-} cells (not shown). Furthermore, *syk*^{-/-} cells failed to manifest increased adhesion to fibrinogen- or FCS-coated surfaces following treatment with TNF (Figure 2E), likely due to their inability to signal actin cytoskeletal changes required for cell spreading. This adhesion response is also mediated by CD18, as shown by a defect in *CD18*^{-/-} cells (Figure 2E).

Taken together, the *syk*^{-/-} mutation renders neutrophils incapable of adhesion-dependent responses, irrespective of the type of response studied, the adhesion surface used, or the stimulus added.

Syk Is Not Required for Adhesion-Independent Neutrophil Functions

As shown in the above experiments, adherent activation of neutrophils requires two signals: a soluble proinflammatory stimulus (like TNF) and another signal generated during the ligation of integrins by the proteins immobilized onto the adhesion surface. According to the current paradigm, soluble stimuli provide intracellular signals that lead to an increase in affinity and avidity of cell surface integrins toward their ligands (inside-out signaling). Concomitant engagement of integrins generates a second signal, delivered from integrins to the interior of the cells, leading to actin cytoskeletal rearrangements and further cellular responses (outside-in signaling). We next determined whether the failure of Syk-deficient neutrophils to respond to adhesive stimuli was due to a defect in signaling of the soluble stimuli or in that triggered by engagement of integrins.

No difference was observed between wild-type, *syk*^{-/-}, or *CD18*^{-/-} neutrophils in respiratory burst or degranulation induced by the phorbol-ester PMA, a known adhesion-independent stimulus (Figure 3A). Moreover, in both wild-type and *syk*^{-/-} cells, responses to PMA stimulation in suspension were similar to those in adhesion (Mócsai et al., 1999 and data not shown),

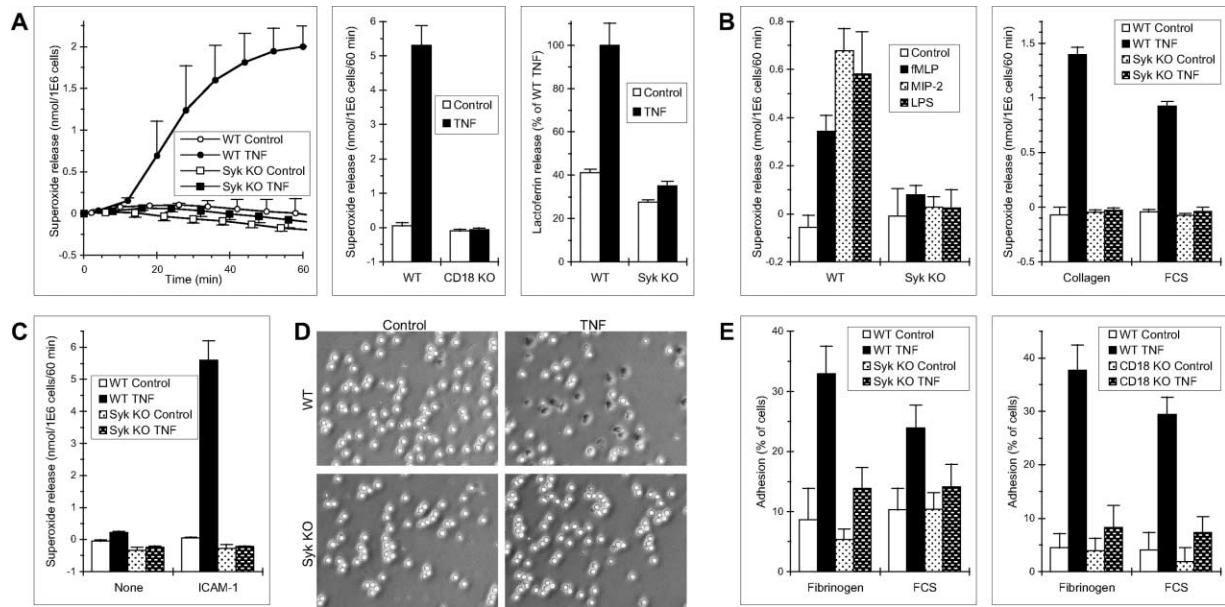


Figure 2. Defective Adhesion-Dependent Responses in *syk*^{-/-} Neutrophils

(A), Respiratory burst and degranulation of *syk*^{-/-} and *CD18*^{-/-} neutrophils plated on fibrinogen; (B and C), respiratory burst of *syk*^{-/-} neutrophils in response to fMLP, MIP-2, or LPS on fibrinogen, or to TNF on collagen, FCS, or murine ICAM-1; (D), spreading of *syk*^{-/-} neutrophils on fibrinogen; (E), adhesion of *syk*^{-/-} and *CD18*^{-/-} neutrophils to fibrinogen and FCS.

confirming that these responses are in fact independent of integrin ligation. Deficiency of Syk did not interfere with initial signaling from TNF receptors, since the TNF-induced upregulation of CD18 (Figure 3B) and shedding of L-selectin (Figure 3C) were both normal in *syk*^{-/-} neutrophils. Additionally, *syk*^{-/-} neutrophils manifested no major defects in G-protein-coupled receptor signaling of suspended cells (data not shown). Taken together, adhesion-independent responses seem not to be affected by the *syk*^{-/-} mutation. On the other hand, *syk*^{-/-} neutrophils spread normally in response to PMA (Figure 3D), whereas *CD18*^{-/-} cells were strongly defective in this response (data not shown). Thus, the integrins on *syk*^{-/-} cells can still bind their ligands and support spreading when the Syk-dependent signaling step is bypassed by PMA.

Syk Is Required for Responses Initiated by Direct Crosslinking of Integrins

To test whether outside-in integrin signaling initiated in the absence of concomitant inside-out signals required Syk, cells were plated on surfaces coated with an engineered polypeptide containing multiple copies of the integrin binding RGD motif of human fibronectin (poly-RGD). Likely due to the high valency of this integrin ligand, wild-type neutrophils plated on poly-RGD-coated surfaces released superoxide without any additional proinflammatory stimulus (Figure 4A). The integrin-dependence of the response to poly-RGD was confirmed by the fact that *CD18*^{-/-} neutrophils responded poorly to this ligand (Figure 4A). *syk*^{-/-} neutrophils were also unable to respond to the direct crosslinking of integrins by poly-RGD surfaces (Figure 4A).

To more specifically address the responses of *syk*^{-/-} neutrophils to integrin crosslinking, cells were plated in

microwells coated with surface-immobilized anti-integrin antibodies. When plated onto anti-CD18-antibody-coated surfaces, wild-type but not *syk*^{-/-} neutrophils responded with a strong release of superoxide (Figure 4B). Cells plated on isotype-matched control antibody did not release superoxide, and *CD18*^{-/-} neutrophils failed to respond to plate-bound anti-CD18 stimulation (Figure 4B). Antibody-mediated crosslinking of CD18 also resulted in exocytosis of secondary granules and spreading of the cells over the antibody surface in wild-type but not *syk*^{-/-} neutrophils (Figures 4B and 4C). These observations provide direct evidence that Syk is an essential component of signaling pathways from β_2 integrins to spreading, respiratory burst, and degranulation of neutrophils.

Syk Is Involved in Signaling from Multiple Integrins

The antibody-mediated crosslinking approach was also used to determine which integrins present in neutrophils signal through Syk. Plate-bound antibodies against the CD11a (α_L) or CD11b (α_M) subunits of β_2 integrins induced respiratory burst in wild-type but not in *syk*^{-/-} neutrophils (Figure 4D). Superoxide release could also be induced by antibodies against CD29 and CD61 (the β_1 and β_3 integrins, respectively), and these responses were also defective in the *syk*^{-/-} cells (Figure 4E). We have recently shown that murine neutrophils express functional CD49d (α_4) integrins, which probably pair with the β_1 or, possibly, the β_7 chain (Pereira et al., 2001). Respiratory burst triggered by immobilized anti- α_4 antibodies was also completely defective in *syk*^{-/-} neutrophils (Figure 4E). Taken together, these data suggest that Syk is required for signaling from multiple integrins, including, but not necessarily limited to, members of the β_1 , β_2 , and β_3 families.

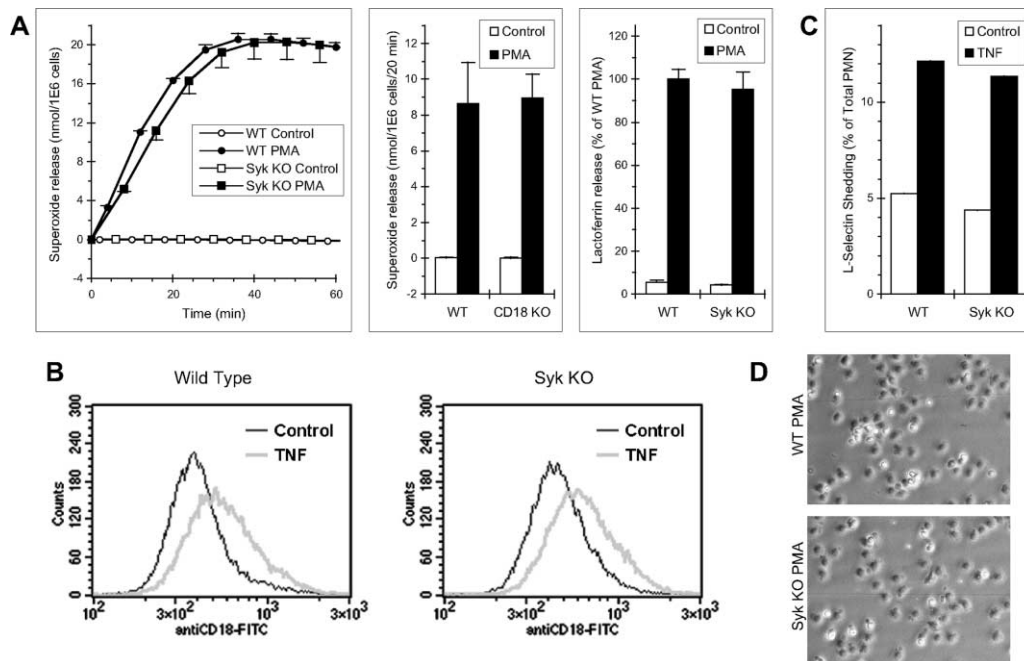


Figure 3. Normal Adhesion-Independent Responses in *syk*^{-/-} Neutrophils

(A), PMA-induced respiratory burst and degranulation of *syk*^{-/-} and *CD18*^{-/-} neutrophils plated on fibrinogen; (B), upregulation of CD18 in suspension; (C), percentage of cells that have shed L-selectin in suspension; (D), PMA-induced spreading on fibrinogen surface.

Neutrophil Integrin Engagement Activates Syk and Induces Its Colocalization with CD18

The results described above directly implicate Syk in outside-in integrin signaling and would predict that Syk becomes activated in cells spreading on ECM-ligands. Plating of wild-type neutrophils on a fibrinogen-coated surface was sufficient to induce a modest tyrosine phosphorylation of Syk which was further enhanced by stimulation with TNF and was particularly elevated in cells firmly adherent to the fibrinogen surface (Figure 5A). Stimulation with TNF in suspension did not induce Syk phosphorylation. Plating cells on poly-RGD induced strong Syk phosphorylation without any additional stimulus, and this increase was defective in *CD18*^{-/-} neutrophils (Figure 5B). Taken together, integrin-mediated activation of neutrophils leads to phosphorylation of Syk, which correlates with the CD18-dependent firm adhesion of the cells, rather than with stimulation by TNF.

The activation of Syk during β_2 integrin ligation suggests a close interaction between Syk and CD18. Indeed, coassociation of Syk and CD18 has been demonstrated by coimmunoprecipitation experiments using both human neutrophils and macrophage cell lines (Yan et al., 1997; Vines et al., 2001). To characterize this association in the context of cell shape changes during cell spreading, we followed the subcellular localization of Syk and CD18 by immunofluorescent staining and high-resolution digital microscopy. Following plating of wild-type neutrophils on poly-RGD, Syk and CD18 were enriched at the same submembraneous regions during the initial phase of cell spreading (Figure 5C, arrowheads). CD18 and Syk remained colocalized to the highly active edges of the cells throughout the spreading process (Figure 5C). However, less colocalization of the two pro-

teins could be observed in fully spread cells (data not shown). Addition of inflammatory stimuli like TNF (data not shown) or fMLP (Figure 5D; see Figure 5E for staining controls) significantly increased the colocalization of Syk and CD18 in cells actively crawling over the poly-RGD surface. We conclude that Syk and CD18 temporarily colocalize at cell edges of neutrophils where the active protrusion of cell membranes over plate-bound integrin ligands occurs during cell spreading and crawling.

Biochemical Characterization of the Integrin Signaling Pathways Involving Syk

Next we examined the tyrosine phosphorylation of Syk and of other potential signaling molecules in neutrophils plated on poly-RGD surfaces. Similar to immunoreceptor signaling, activation of Syk by integrin ligation is dependent on Src-family kinases, since tyrosine phosphorylation of Syk was absent in cells deficient in Hck, Fgr, and Lyn, the neutrophil-specific members of the Src kinase family (Figure 6A). *syk*^{-/-} neutrophils had normal level of protein tyrosine phosphorylation in resting state but failed to demonstrate increased phosphorylation upon direct crosslinking of integrins (Figure 6B). Similar results were obtained with *CD18*^{-/-} cells, while both background and stimulated tyrosine phosphorylation were dramatically decreased in *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils (Figure 6B), pointing to a more general role for Src-family kinases in signaling tyrosine phosphorylation events in these cells.

Three of the major tyrosine-phosphorylated bands (Figure 6B, closed arrowheads) comigrated with the c-Cbl (Cbl), Pyk2, and Vav1 (Vav) proteins (data not shown). Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of all three proteins could be detected in wild-type cells,

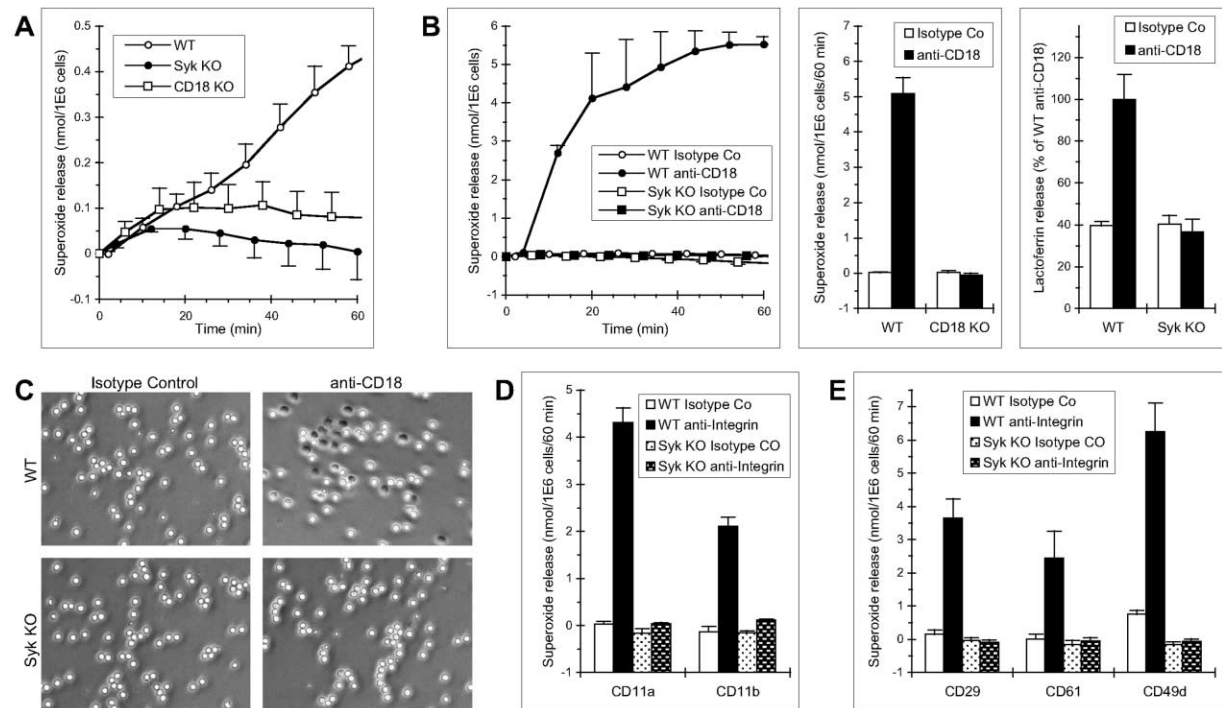


Figure 4. Defective Responses of *syk*^{-/-} Neutrophils to Direct Crosslinking of Integrins

(A), Respiratory burst of *syk*^{-/-} and *CD18*^{-/-} neutrophils plated on a poly-RGD surface without any additional stimulus; (B), respiratory burst and degranulation of *syk*^{-/-} and *CD18*^{-/-} neutrophils plated on an anti-CD18 coated surface without any additional stimulus; (C), spreading of the cells on an anti-CD18 coated surface; (D), respiratory burst triggered by antibodies against the α chains of β_2 integrins; (E), respiratory burst triggered by antibodies against non- β_2 integrins.

but it was strongly impaired in the Syk-deficient cells (Figure 6C).

The well-known activation of the Rac small GTPase family by Vav and the effect of the Rac-related proteins on actin-based motility raise the possibility that these proteins are involved in the Syk-mediated integrin-signaling pathway in neutrophils. However, we were unable to observe an integrin-mediated activation of Rac family members (see supplemental data at <http://www.immunity.com/cgi/content/full/16/4/547/DC1>) or an immediate Rac-effector protein, Pak1 (data not shown). In contrast, activation of p38 MAP kinase, which is further downstream of Rac and suggested to be involved in adhesion-dependent neutrophil functions (Detmers et al., 1998), was clearly demonstrated in wild-type but not *syk*^{-/-} neutrophils (Figure 6D). Activation of the MAP-kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2), a molecule directly downstream of p38 MAP kinase, was also defective in *syk*^{-/-} neutrophils plated on poly-RGD (Figure 6E). The MAPKAPK2-dependent phosphorylation of the heat shock protein Hsp27 is thought to be involved in the polymerization of cellular actin, providing a possible link between the above integrin signaling pathways and the actin cytoskeleton. To directly assess the polymerization of actin in neutrophils, we determined the distribution of cellular actin between the Triton-soluble (cytosolic) and Triton-insoluble (cytoskeletal) fractions. As shown in Figure 6F, plating wild-type neutrophils on a poly-RGD surface leads to a partial decrease of actin in the Triton-soluble fraction with a concomitant in-

crease in the Triton-insoluble fraction. This redistribution is absent in the *syk*^{-/-} neutrophils (Figure 6F). Redistribution of the actin-bundling protein α -actinin to the Triton-insoluble fraction was also easily demonstrated in wild-type neutrophils plated on poly-RGD but was completely absent in *syk*^{-/-} cells (Figure 6F). Thus, in neutrophil integrin signaling, Syk is required for an event prior to polymerization and cytoskeletal association of filamentous actin.

Syk Is Not Required for In Vitro or In Vivo Migration of Neutrophils

One of the major functions of integrins in the immune system is to support directed migration of leukocytes to sites of inflammation. To determine whether Syk is required for integrin-mediated migration of neutrophils, we tested the directed migration of *syk*^{-/-} neutrophils both in vitro and in vivo.

In vitro chemotaxis was determined by assessing migration through a fibrinogen-coated Transwell membrane in response to the bacterial peptide chemoattractant fMLP. Surprisingly, the overall transmigration of *syk*^{-/-} neutrophils was similar to that of wild-type cells, with partial decrease at lower but slight increase at higher fMLP concentrations (Figure 7A). Similar results were observed utilizing MIP-1 α or MIP-2 as chemoattractants (data not shown). The fact that *CD18*^{-/-} neutrophils are strongly defective at all fMLP concentrations tested (Figure 7C) confirms the integrin dependence of this assay. Thus, in contrast to the CD18-dependent

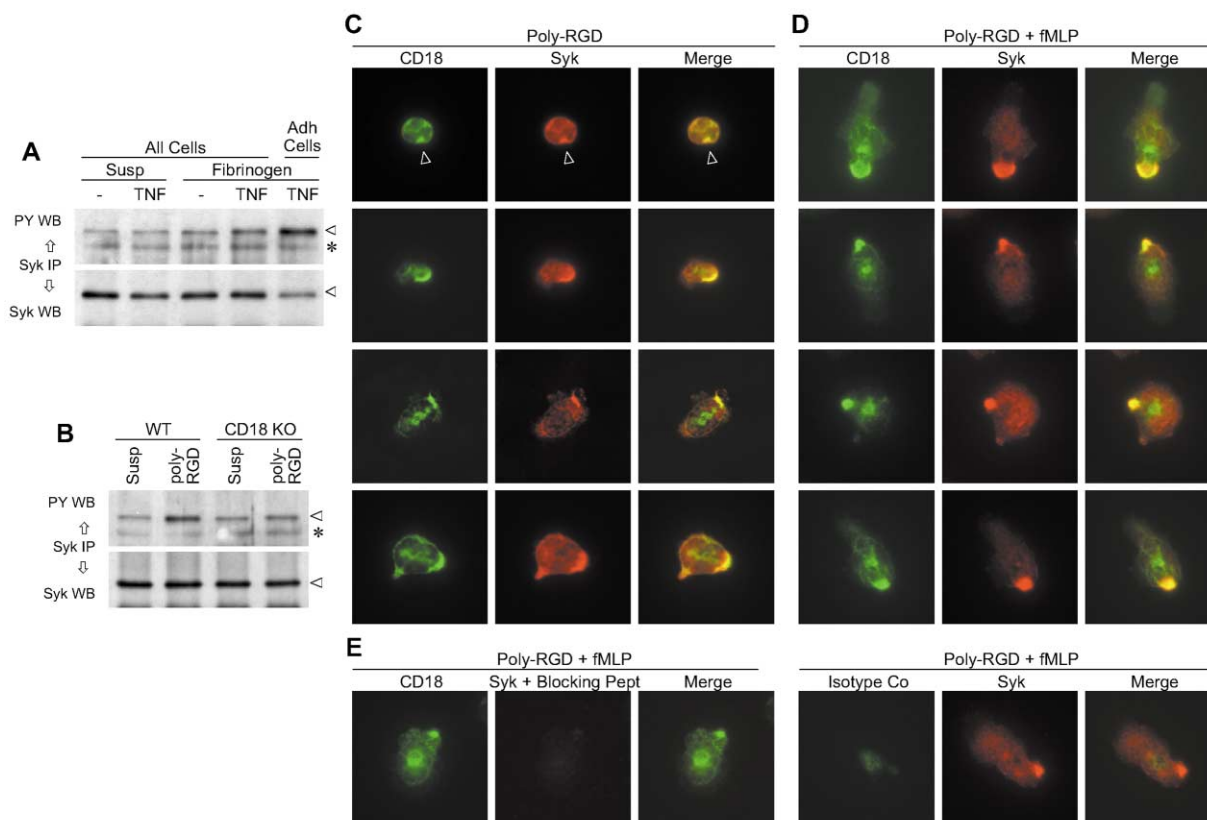


Figure 5. Activation of Syk and Colocalization of Syk and CD18

(A and B) (A) shows tyrosine phosphorylation of Syk in wild-type cells in response to TNF in suspension or on fibrinogen-coated surfaces. Syk was precipitated either from all (adherent and nonadherent) cells or only from firmly adherent cells resistant to a washing step. Syk immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with the indicated antibody. (B) shows tyrosine phosphorylation of Syk in wild-type and *CD18*^{-/-} neutrophils plated onto a poly-RGD surface. In (A) and (B), arrowheads indicate the location of Syk; asterisks indicate a nonspecific band, also present in immunoprecipitates from cell-free lysis buffer (data not shown).

(C-E) Localization of Syk and CD18 during spreading of wild-type neutrophils plated on poly-RGD with (D) or without (C) fMLP. (E) shows staining controls and is otherwise identical to (D). In (C), arrowheads indicate initial colocalization of Syk and CD18.

adherent activation events described in Figures 2–6, CD18-dependent in vitro migration of neutrophils does not require Syk.

To test the in vivo migration of neutrophils, we compared the peritoneal accumulation of wild-type and *syk*^{-/-} cells during a thioglycollate-induced sterile peritonitis. Since bone marrow chimeras with pure *syk*^{-/-} hematopoietic system lack B cells and develop chylous hemoperitoneum, subcutaneous bleeding, and gradual anemia, these mice were not suitable for our experiments, as these processes may have unpredictable secondary effects on neutrophil migration. Instead, we generated a series of mixed chimeric mice containing varying ratios of both wild-type and *syk*^{-/-} hematopoietic cells, allowing us to study the migration of wild-type and *syk*^{-/-} neutrophils under identical conditions within the same animal. To this end, lethally irradiated recipients were reconstituted with a mixture of wild-type and *syk*^{-/-} bone marrow cells at a percentage of 25%, 50%, or 75% *syk*^{-/-} bone marrow. Cells from the two genotypes were distinguished based on allelic differences in their CD45 epitopes. None of these chimeras developed any signs of bleeding or peritoneal leakage characteristic of pure *syk*^{-/-} bone marrow chimeras. A

sterile peritonitis was induced by intraperitoneal injection of the mixed chimeras with thioglycollate, and the percentage of *syk*^{-/-} neutrophils was compared in the peritoneal lavage fluid versus blood samples taken at three different time points during the assay. As shown in Figure 7B, the percentage of *syk*^{-/-} cells among peritoneal neutrophils was similar to or even slightly higher than their percentage among peripheral blood neutrophils in all mice. In contrast, when a series of wild-type/*CD18*^{-/-} mixed bone marrow chimeras were tested in the same sterile peritonitis model, CD18-deficient cells were significantly retarded in their ability to migrate into the inflamed peritoneum (Figure 7D), thus confirming the integrin dependence of this assay. These findings show that the absence of Syk in neutrophils does not interfere with their capacity to migrate to the inflamed peritoneum in an integrin-dependent manner in vivo.

Since our previous data (Figure 6A) had demonstrated that Src-family kinases are required for integrin-dependent Syk activation, and since deficiency of these kinases results in impaired integrin-dependent spreading, respiratory burst, and degranulation (Lowell et al., 1996; Mócsai et al., 1999; Pereira et al., 2001; our unpublished data), we tested the ability of triple-mutant

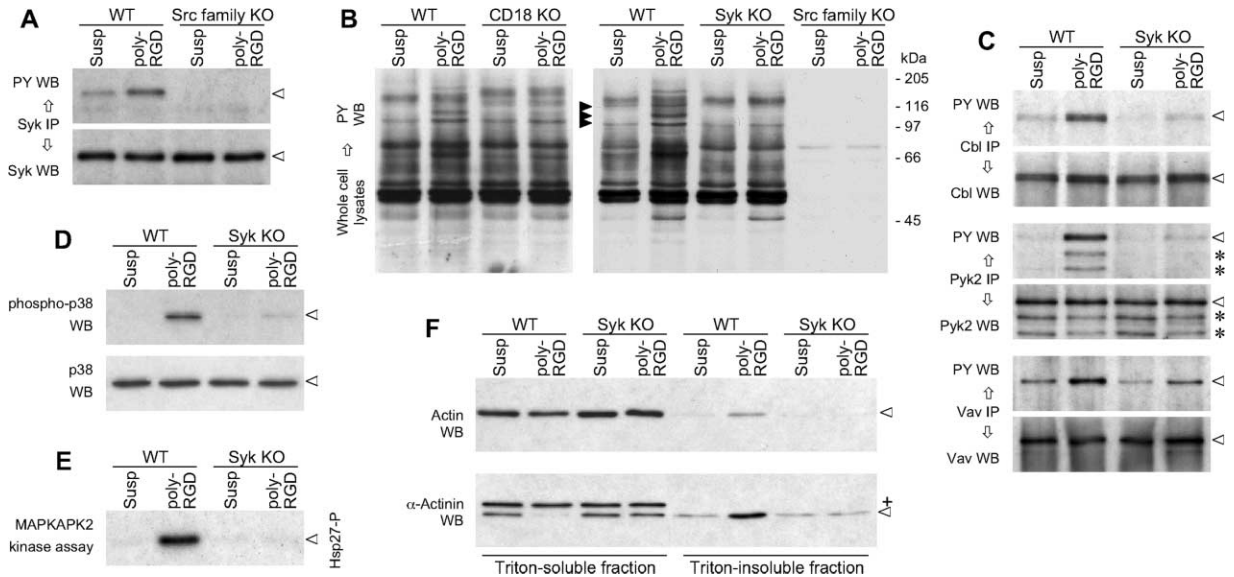


Figure 6. Identification of Signaling Molecules Participating in the Integrin Signaling through Syk

(A), Poly-RGD-induced tyrosine phosphorylation of Syk in neutrophils deficient of the Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn; (B), total cellular tyrosine phosphorylation in *syk*^{-/-}, *CD18*^{-/-}, and Src-family-deficient neutrophils; (C), tyrosine phosphorylation of Cbl, Pyk2, and Vav in *syk*^{-/-} neutrophils; (D), phosphorylation of the p38 MAP kinase in *syk*^{-/-} neutrophils; (E), activation of MAPKAP kinase 2 in *syk*^{-/-} neutrophils; (F), redistribution of actin and α -actinin between the Triton-soluble and Triton-insoluble fractions. Open arrowheads indicate migration of the relevant proteins. Closed arrowheads indicate (from top to bottom) migration of Cbl, Pyk2, and Vav. Bands indicated by asterisks are likely degradation products resulting from C-terminal proteolytic cleavage of Pyk2. The plus sign indicates a fully Triton-soluble protein of unknown identity, with a molecular mass (120 kDa) clearly higher than that of α -actinin (100 kDa).

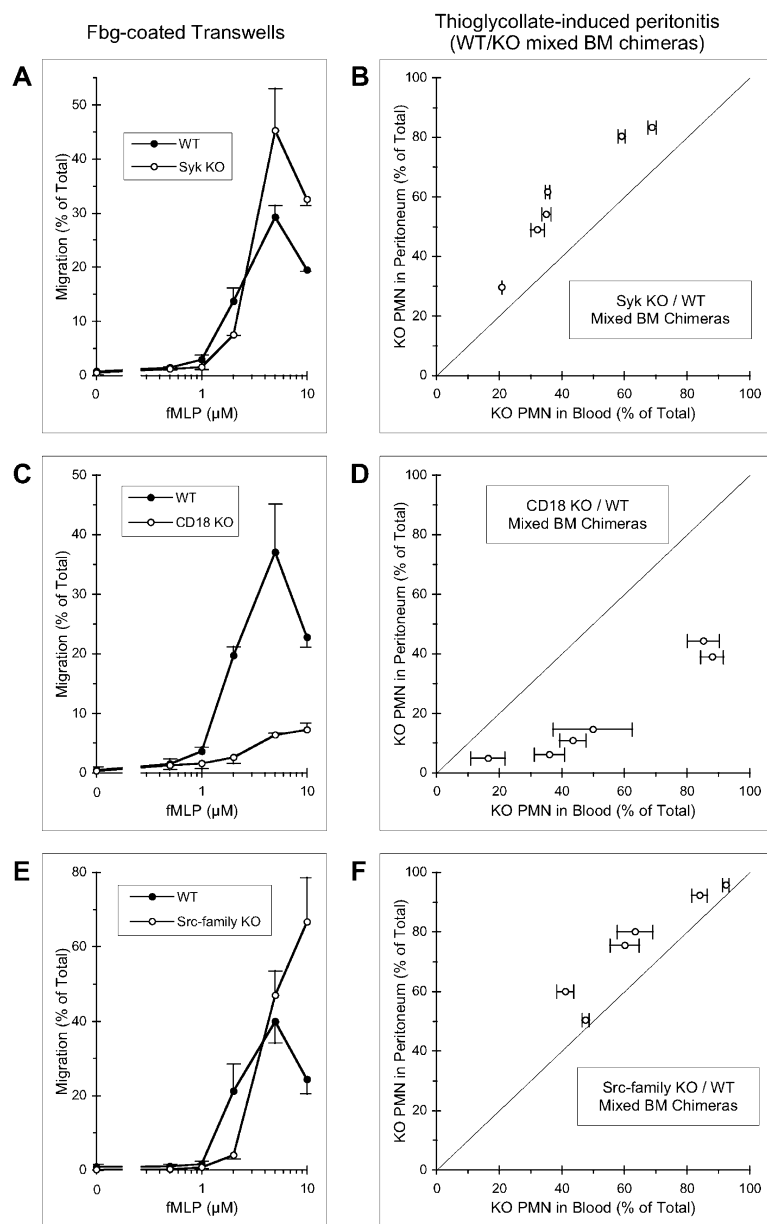
hck^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils to migrate in the above assay systems. As shown in Figure 7E, no overall defect was observed in the in vitro migration of *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils through a fibrinogen-coated Transwell membrane, though their migration was decreased at lower but increased at higher doses of the chemoattractant fMLP. Similarly, no defect in migration of *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} neutrophils was seen in the thioglycollate peritonitis model using a series of mixed bone marrow chimeras. Like the *syk*^{-/-} neutrophils, the percentage of Src-family-deficient cells in the peritoneal exudate was consistently close to or slightly higher than that in the peripheral blood (Figure 7F). The same conclusion was drawn from previous experiments comparing intact wild-type and *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} mice (data not shown). Thus, similar to Syk, Src-family kinases are not required for CD18-dependent migration of neutrophils either in vitro or in vivo. These results confirm, by an independent genetic approach, the different signaling requirements of CD18-dependent migration versus CD18-dependent adherent activation of neutrophils.

Discussion

In this paper, we have shown that Syk is indispensable for signaling events from β_1 , β_2 , and β_3 integrins, leading to activation of neutrophil effector functions (Figures 2, 3, 4, and 6). Previous studies of *syk*^{-/-} mice concluded that Syk is primarily involved in signaling from receptors of the adaptive immune system (B cell receptors, T cell receptors, and Fc receptors). Our findings indicate that this kinase is also critically involved in signaling mechanisms of innate immunity. Integrins are widely expressed

in all cells of the immune system and function as adhesion receptors in host-pathogen interaction, lymphocyte homing, antigen presentation, or target recognition by NK cells. Extrapolating our results to these mechanisms would suggest that the role of Syk is much broader than previously anticipated.

According to the current paradigm, integrin signaling occurs in two consecutive steps, designated as inside-out and outside-in signaling (see Results). In experiments using surface-bound molecules to directly cross-link integrins (Figure 4), the inside-out step is bypassed since the ligands are of sufficient valency (poly-RGD) or affinity (anti-integrin antibodies) to directly aggregate integrins and initiate outside-in signaling. The strong defect seen in *syk*^{-/-} neutrophils in these experiments indicates that Syk is intimately involved in outside-in signaling. On the other hand, the fact that *syk*^{-/-} neutrophils are also defective in stimulus-induced adhesion to integrin ligands (Figure 2E), a classical readout of inside-out signaling, suggests that Syk may also contribute to inside-out signaling. However, since this assay depends on cell spreading to achieve firm adhesion, the adhesion assay likely assesses both inside-out and outside-in signaling events. Moreover, interpretation of the adhesion data is complicated by the possibility that outside-in signals from one subset of integrins can trigger an inside-out signal, leading to increased adhesion through another subset of integrins (Disatnik and Rando, 1999; Kiessens et al., 2001). Therefore, our experiments do not formally prove that Syk is involved in inside-out signaling. A more direct measurement will be required to assess inside-out signaling independently of outside-in events in neutrophils.



In immunoreceptor signaling, Src family kinases phosphorylate immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) within the receptor complex, which then provide a docking site for the tandem SH2 domains of Syk and ZAP-70. The requirement for Src family kinases for the integrin-mediated activation of Syk (Figure 6A) as well as the physical association (Yan et al., 1997; Vines et al., 2001) and colocalization (Figures 5C and 5D) of Syk and CD18 would be consistent with a similar mechanism linking integrin ligation with activation of Syk. However, integrins lack ITAM motifs and, at least in heterologous expression systems, the integrin-mediated activation of Syk seemed to be independent of its tandem SH2-domains (Gao et al., 1997), suggesting that integrins and immunoreceptors use different mechanisms to activate Syk. Further experiments will be required to validate this hypothesis in primary cells such as neutrophils.

Signaling proteins downstream of the integrin-mediated activation of Syk include Cbl, Pyk2, and Vav (Figure 6C). Cbl has been suggested to be a positive regulator of integrin signaling, possibly via recruitment of PI3-kinase molecules to the plasma membrane (Meng and Lowell, 1998). The FAK-related kinase Pyk2 has been implicated in integrating multiple inputs into an effector function possibly similar to that of FAK. Vav is an exchange factor for the small GTP binding protein Rac, and thus it is suspected to mediate shape changes and related functions in response to cell activation. Although we could easily detect integrin-mediated activation of signaling responses both upstream and downstream of Rac (Figure 6), we were unable to directly demonstrate increased GTP loading of Rac itself (see supplemental data at <http://www.immunity.com/cgi/content/full/16/4/547/DC1>). It is possible that a low level of Rac activation at specific subcellular sites is all that is required to acti-

Figure 7. In Vitro and In Vivo Neutrophil Migration

Migration of *syk*^{-/-} ([A] and [B]), *CD18*^{-/-} ([C] and [D]), and Src-family-deficient ([E] and [F]) neutrophils. (A), (C), and (E) show in vitro migration through fibrinogen-coated Transwells; (B), (D), and (F) show the percentage of mutant neutrophils in peripheral blood and peritoneal lavage fluid of wild-type/mutant mixed bone marrow chimeras subjected to a thioglycollate-induced peritonitis. Values for the peritoneum represent the percentage of mutant cells in neutrophils from the peritoneal lavage fluid. Values for blood represent mean and SD of percentages of mutant cells among neutrophils in blood samples taken at 0, 2, and 4 hr time points. See the text for more details. Each data point represents one individual mouse.

vate downstream responses. Likewise, an increase in Rac-GTP levels at one subcellular site may be balanced by a relative decrease at other locations, keeping the total pool of intracellular Rac-GTP constant. Alternatively, as is the case with several other small GTPases, the cycling between GDP- and GTP-bound forms might be functionally more important than the level of GTP-loaded Rac itself. Targeted genomic mutations and imaging methods to look for activated Rac in primary neutrophils will be required to sort out the contribution of this pathway to leukocyte integrin signaling.

The contribution of Syk to integrin signaling does not seem to be specific for neutrophils. Syk-deficient platelets show impaired signaling from $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrins (Oberfell et al., 2002), and *syk*^{-/-} macrophages also fail to spread on immobilized ICAM-1 (Vines et al., 2001). It is yet to be determined whether this mechanism is also shared with further cell types, including nonhematopoietic cells.

Similar to spreading and other adhesion-dependent responses, *CD18*^{-/-} neutrophils were defective in directed migration both in the in vitro Transwell system and the in vivo thioglycollate peritonitis model (Figures 7C and 7D). There has been some controversy about the requirement for β_2 integrins in neutrophil migration during thioglycollate-induced peritonitis. While most studies concluded that this assay system is strongly dependent on the β_2 integrin LFA-1 (Lu et al., 1997; Schmits et al., 1996; Walzog et al., 1999), one report (Mizgerd et al., 1997) suggested that β_2 integrins are not required for this response. This apparent contradiction may stem from the 5- to 10-fold increase in circulating neutrophil count in *CD18*^{-/-} animals, which may have led Mizgerd et al. to overestimate the peritoneal accumulation of *CD18*^{-/-} neutrophils. Since our mixed bone marrow chimeric approach is intrinsically corrected for any changes in the circulating neutrophil count, the defective migration of *CD18*^{-/-} neutrophils in our hands indicates a cell-autonomous requirement for β_2 integrins in neutrophil migration into the inflamed peritoneum.

Perhaps the most surprising finding in our study is that, unlike other integrin-dependent neutrophil responses, Syk appears not to be required for integrin-mediated neutrophil migration (compare Figures 7A–7D). Furthermore, Src-family deficient neutrophils, which are completely defective in the CD18-dependent adherent activation assays, also migrated normally in both systems tested (Figures 7E and 7F). In preliminary experiments, Syk-deficient neutrophils also demonstrated normal migration in a subcutaneous “air-pouch” model in vivo (data not shown); hence the normal migratory capacity of *syk*^{-/-} neutrophils may not be restricted to specific inflammatory models. Thus, there seem to be different signaling requirements for the different CD18-dependent functions of neutrophils, i.e., adherent activation versus migration. At present, it is unclear whether leukocytes utilize two different integrin-signaling pathways, one leading to spreading, respiratory burst, and degranulation, and the other leading to migration. Alternatively, integrins may play a passive role in migration, i.e., their presence and/or ligand binding capability rather than their signaling capacity may be all that is required to support leukocyte migration. Furthermore, different integrins may have opposing roles in cell migra-

tion. If Syk and Src-family kinases were involved in signaling from both promigratory and antimigratory integrins, then the deficiency of these kinases would not have any major effect on the overall migration of the cells.

The inability of Src-family or Syk-deficient neutrophils to become activated by adhesive stimuli predicts that lack of these kinases would result in significantly reduced antimicrobial function and tissue damage during inflammatory responses. While this has been observed in the Src-family mutants (Lowell et al., 1994; Lowell and Berton, 1998; our unpublished results), the defects in multiple hematopoietic lineages in, and the eventual lethality of, the *syk*^{-/-} bone marrow chimeras makes assessing inflammatory processes in Syk-deficient chimeras a challenging task.

Both this paper and the majority of previous reports study the function of Syk in the context of the immune system or of the platelet collagen receptor GPVI, a molecule structurally and mechanistically related to F_c receptors. However, there is growing evidence that Syk can also function in nonimmune cells through mechanisms supposedly unrelated to immunoreceptors. Syk has recently been shown to play a tumor-suppressive role in breast cancer (Coopman et al., 2000). In another report (Tsujimura et al., 2001), Syk was shown to be expressed in the central nervous system, and it was suggested to be involved in neural differentiation of embryonic carcinoma cells. While neither tumor invasion nor neural development is related to immunoreceptor function, integrins play important roles in both these mechanisms. Thus, it is tempting to speculate that the role of Syk in these processes is related to its function in integrin signaling. Furthermore, since a number of integrins are required for normal embryonic development, the possible role of Syk in integrin signaling could also contribute to the lethal phenotype of *syk*^{-/-} mice. Further analysis of the Syk-mediated integrin-signaling pathway can lead to new paradigms of how integrins fulfill their wide spectrum of functional roles both inside and outside the immune system.

Experimental Procedures

Animals and Generation of Bone Marrow Chimeras

The mutation disrupting the *syk* gene (Turner et al., 1995) was maintained in heterozygous mice on C57BL/6 (B6) background (i.e., carrying the CD45.2 allele). Mice and embryos were genotyped by PCR (Figure 1A) using 5'-AGAGAAGCCCTGCCATGGAC-3' (*syk*⁺) and 5'-CCTTGGGAAAAGCGCTCCCTACCC-3' (*syk*⁻) as forward primers in combination with the 5'-GTCCAGGTAGACCTTTGGGC-3' reverse primer. The products (86 and 120 bp for *syk*⁺ and *syk*⁻, respectively) were resolved on a 2.5% agarose gel. *syk*^{-/-} and littermate *syk*^{+/-} fetal liver cells were obtained from E15–E17 embryos from timed matings of *syk*^{+/-} carriers. Bone marrow chimeras were generated by intravenous injection of unfractionated fetal liver cells into lethally irradiated congenic recipients carrying the CD45.1 allele on the B6 background (Taconic Farms, Germantown, NY). The complete repopulation of the granulocyte compartment and the absence of the Syk protein in these cells was confirmed by flow cytometry and immunoblotting, respectively (see below). Chimeras were used 4–8 weeks after the bone marrow transplantation.

Mice lacking CD18 (Wilson et al., 1993) (provided by Dr. Arthur L. Beaudet, Baylor College of Medicine, Houston, TX) and triple-mutant mice deficient in the Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn (Meng and Lowell, 1997) were on the B6 background. Control B6 mice were purchased from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). All animals were kept in a specific pathogen-free facility at UCSF

and used according to protocols approved by the UCSF Committee on Animal Research.

Isolation of Bone Marrow Neutrophils

Murine bone marrow neutrophils were prepared essentially as described (Mócsai et al., 1999). Purity of the preparation was assessed by flow cytometry using PE-labeled anti-Gr1 (RB6-8C5) and FITC-labeled anti-CD45.2 (clone 104) antibodies (both from Pharmingen, San Diego, CA) on a Beckton-Dickinson (Mountain View, CA) FAC-Scan. Greater than 90% of the cells were mature granulocytes based on forward and side scatter characteristics and Gr1^{hi} staining. The presence of Syk in neutrophil lysates was tested by immunoblotting.

Functional Responses

Functional tests were performed in HBSS supplemented with 20 mM HEPES (pH 7.4). All measurements were done at 37°C.

Coating 96-well tissue culture plates with extracellular matrix proteins or 20 µg/ml poly-RGD peptide (Sigma, St. Louis, MO) was performed as described (Lowell et al., 1996). Purified murine ICAM-1 (Pysznik et al., 1994) (provided by Dr. Fumio Takei, University of British Columbia, Vancouver, BC and Dr. Charlotte M. Vines, University of New Mexico, Albuquerque, NM) was immobilized to 96-well Immulon 4 (Dynex, Chantilly, VA) plates at 1 µg/ml, followed by blocking with 10% FCS. For antibody-mediated crosslinking experiments, monoclonal antibodies against murine integrins or isotype-matched control antibodies were immobilized on 96-well Immulon 4 plates. The rat IgG2a-κ antibodies 121/7 (anti-CD11a), C71/16 (anti-CD18), 9EG7 (anti-CD29), and R35-95 (isotype control), and the rat IgG2b-κ antibodies R1-2 (anti-CD49d) and R35-38 (isotype control) were purchased unlabeled and bound directly to the plates at 20 µg/ml in carbonate buffer. The rat IgG2b-κ antibodies M1/70 (anti-CD11b) and A95-1 (isotype control) and the hamster IgG1-κ antibodies 2C9.G2 (anti-CD61) and A19-3 (isotype control) were purchased biotinylated and bound to streptavidin-precoated plates (Lowell et al., 1996) at 2 µg/ml. Except for the 121/7 antibody (from Endogen, Woburn, MA), all antibodies were from Pharmingen. Antibody-coated plates were blocked with 10% FCS. Except for the anti-CD29 antibody 9EG7, cell stimulation by immobilized antibodies was performed in the absence of Mg²⁺ salts.

Adherent respiratory burst was measured by a cytochrome c reduction test essentially as described previously (Lowell et al., 1996). Where appropriate, 20 ng/ml murine TNF or 100 ng/ml murine MIP-2 (both from Peprotech, Rocky Hill, NJ) or 3 µM fMLP, 10 µg/ml LPS (from *E. coli* 0127:B8), or 100 nM PMA (all from Sigma) were used as stimulus.

Adherent degranulation of the secondary granule marker lactoferrin was determined by ELISA from supernatants of cells stimulated for 45 min, otherwise as described previously (Mócsai et al., 1999). Spreading of cells was assessed by phase contrast microscopy. Cell adhesion was determined by measuring the plate-bound acid phosphatase activity (Lowell et al., 1996) after washing the wells three times with ice-cold PBS supplemented with Ca²⁺ and Mg²⁺ salts, using a Labsystems (Helsinki, Finland) electronic multichannel Finnpiptette at low speed setting.

Fluorescent Microscopy

Neutrophils were stimulated in 8-well glass chamber slides (Nalge Nunc, Rochester, NY) precoated with poly-RGD as described above. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde, permeabilized by 0.2% Triton, and stained with a polyclonal anti-Syk antibody (N-19 from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by a goat anti-rabbit F_{ab}'₂ antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) and a FITC-labeled anti-CD18 antibody (C71/16). For staining controls, a blocking peptide of the anti-Syk antibody (Santa Cruz) was added or the anti-CD18 antibody was replaced by a FITC-labeled isotype control antibody (R35-95). Samples were mounted in ProLong antifade reagent (Molecular Probes). High-resolution digital microscopy was performed on a DeltaVision Restoration Microscopy System (Applied Precision, Issaquah, WA).

Expression of Cell Surface Integrins and of L-Selectin

Expression of cell surface integrins and of L-selectin was determined by flow cytometry. Cells were incubated with biotinylated

anti-integrin and isotype control antibodies (same as the ones used for plate coating, except for the rat IgG2a-κ anti-CD11a antibody M17/4 [Pharmingen]) followed by labeling with FITC-conjugated streptavidin (Pharmingen). The rat IgG2a-κ antibodies MEL-14 (anti-L-selectin) and RM4-5 (isotype control; anti-CD4) were directly conjugated with PE and thus used in a single-step labeling procedure (both antibodies from Pharmingen). To assess changes in expression levels upon stimulation, cells were incubated with 20 ng/ml TNF for 30 min prior to antibody labeling.

Immunoprecipitation, Western Blotting, and Kinase Assay

For biochemical studies, cells were incubated in suspension or in fibrinogen- or poly-RGD-coated 6 cm tissue culture dishes for 20 min. All cells (i.e., after pooling adherent and nonadherent cells in experiments in adhesion) were then lysed with a Triton-based lysis buffer (Mócsai et al., 1997) supplemented with 0.1% SDS and 0.5% sodium deoxycholate (RIPA). After removal of insoluble material, lysates were either boiled with sample buffer or processed for immunoprecipitation. To test redistribution of actin and α-actinin, the Triton-soluble fraction was obtained by lysing cells with a cytoskeleton stabilizing buffer (Yan et al., 1997). The Triton-insoluble material was then solubilized in RIPA.

For immunoprecipitation studies, RIPA lysates were precleared with protein A Sepharose (Zymed, South San Francisco, CA) and incubated with rabbit anti-Syk (N-19), anti-Cbl (C-15), or anti-Vav (C-14), or goat anti-Pyk2 (N-19) antibodies (all from Santa Cruz). Immune complexes were captured by protein A Sepharose, washed three times, and boiled in sample buffer. In experiments determining tyrosine phosphorylation of Syk in adherent cells, samples were obtained by combining cells from four identical plates, but nonadherent cells were washed away before lysing the adherent cells.

Cell lysates and immunoprecipitates were run on SDS-PAGE and immunoblotted using antibodies against phosphotyrosine (4G10; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), p38 MAP kinase (C-20; Santa Cruz), phospho-p38 MAP kinase (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), actin (C-11; Santa Cruz), α-actinin (AT6/172; Upstate Biotechnology), or the precipitating antibodies followed by peroxidase-labeled secondary antibodies (Amersham, Little Chalfont, UK, or Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). The signal was developed using Amersham's ECL system.

The activity of MAPKAPK2 was assessed by an immunocomplex kinase assay from RIPA lysates using agarose-conjugated anti-MAPKAPK2 antibodies for immunoprecipitation and recombinant human Hsp27 as kinase substrate (both reagents from Upstate Biotechnology), otherwise as described in Mócsai et al. (2000).

Rac/Cdc42 activation was tested by a GST-PBD pull-down assay (Benard et al., 1999) (see supplemental data at <http://www.immunity.com/cgi/content/full/16/4/547/DC1>).

In Vitro Migration

Transwell inserts (3 µm polycarbonate membrane; Corning, Acton, MA) were precoated with fibrinogen and filled with neutrophil suspensions. The inserts were placed into media containing indicated concentrations of fMLP in 24-well tissue culture plates. After 45 min, the plates were spun, the inserts were removed, and the number of neutrophils in the bottom of the wells was determined by an acid phosphatase assay (Lowell et al., 1996). Parallel samples were included to determine the signal intensity from the total cell number loaded into the Transwell inserts. Similar results were obtained when using a Neuro Probe (Gaithersburg, MD) 96-well chemotaxis chamber, which also allowed us to follow transmigrated cells still adherent to the bottom of the porous membrane (data not shown).

Thioglycollate-Induced Peritonitis

For these experiments, unfractionated bone marrow from a *syk*^{-/-} bone marrow chimera or from intact *CD18*^{-/-} or *hck*^{-/-}*fgr*^{-/-}*lyn*^{-/-} mice were mixed with the bone marrow from a congenic CD45.1 mouse (as wild-type) at ratios of 1:3, 1:1, or 3:1 (25%, 50%, or 75% mutant bone marrow, respectively) and injected into lethally irradiated recipients as described above. Neutrophils from the different genotypes could be distinguished based on the expression of the CD45.1 epitope on wild-type and CD45.2 on the mutant cells.

Sterile peritonitis was induced by i.p. injection of the mixed bone

marrow chimeras with 1 ml of 3% thioglycollate broth (UCSF Cell Culture Facility). Blood samples were taken immediately before, as well as 2 and 4 hr after, the thioglycollate injection. Mice were sacrificed at 4 hr, and the peritoneum was washed with ice-cold PBS supplemented with 2% FCS. Blood and peritoneal lavage samples were then stained with PE-labeled anti-Gr1 and FITC-labeled anti-CD45.2 antibodies and analyzed by flow cytometry. Neutrophils were selected based on their forward- and side-scatter characteristics and Gr1^{hi} staining, and the percentage of CD45.2⁺ (mutant) cells within this gate was determined. In preliminary experiments with B6 mice, the number of peritoneal neutrophils (Gr1^{hi} CD45.2⁺ cells) dramatically increased during this assay from $2.0 \pm 1.1 \times 10^4$ to $9.2 \pm 4.0 \times 10^5$, while the number of nongranulocytic (Gr1⁻ CD45.2⁺) leukocytes increased only modestly from $1.9 \pm 0.3 \times 10^6$ to $2.9 \pm 1.0 \times 10^6$.

Presentation of Results

Quantitative data are presented as mean $\pm$ SD of triplicate measurements; in flow cytometry at least 10,000 individual events were counted. Unless otherwise stated, all results are representative of three or more independent experiments.

Acknowledgments

We thank Giorgio Berton for in part inspiring this project; Art Beaudet for the *CD18*^{-/-} mice; Fumio Takei and Charlotte Vines for the murine ICAM-1; Gary Bokoch for reagents for Rac activation assays; Jeff Critchfield for help with initial bone marrow transfers; Hong Yu and Fang Liu for assistance with managing our mouse colony; Tony DeFranco and Henry Bourne for access to the Deltavision microscope; Neetu Gupta, Paul Herzmark, and Hiroshi Morisaki for help with microscopy; Niels Borregaard for suggestions about degranulation experiments; and Rick Brown, Hattie Gresham, Shalini Pereira, and Hua Chen for valuable suggestions. This work was supported by grants from the National Institutes of Health (HL-54476 and DK-58066) to C.A.L.

Received: May 25, 2001

Revised: February 22, 2002

References

- Benard, V., Bohl, B.P., and Bokoch, G.M. (1999). Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* 274, 13198–13204.
- Cheng, A.M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J.B., and Pawson, T. (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303–306.
- Chu, D.H., Morita, C.T., and Weiss, A. (1998). The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165, 167–180.
- Clark, E.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., Bolen, J., and Brugge, J.S. (1994). Regulation of the protein tyrosine kinase pp72^{syk} by platelet agonists and the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J. Biol. Chem.* 269, 28859–28864.
- Colucci, F., Guy-Grand, D., Wilson, A., Turner, M., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V.L., and Di Santo, J.P. (2000). A new look at Syk in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell development using chimeric mice with a low competitive hematopoietic environment. *J. Immunol.* 164, 5140–5145.
- Coopman, P.J., Do, M.T., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Bianco, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H., and Mueller, S.C. (2000). The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406, 742–747.
- Costello, P.S., Turner, M., Walters, A.E., Cunningham, C.N., Bauer, P.H., Downward, J., and Tybulewicz, V.L. (1996). Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells. *Oncogene* 13, 2595–2605.
- Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L., and DeFranco, A.L. (1997). A critical

- role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by $F_{c\gamma}$ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 186, 1027–1039.
- Detmers, P.A., Zhou, D., Polizzi, E., Thieringer, R., Hanlon, W.A., Vaidya, S., and Bansal, V. (1998). Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in β_2 -integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J. Immunol.* 161, 1921–1929.
- Disatnik, M.H., and Rando, T.A. (1999). Integrin-mediated muscle cell spreading. The role of protein kinase C in outside-in and inside-out signaling and evidence of integrin cross-talk. *J. Biol. Chem.* 274, 32486–32492.
- Fernandez, R., and Suchard, S.J. (1998). Syk activation is required for spreading and H_2O_2 release in adherent human neutrophils. *J. Immunol.* 160, 5154–5162.
- Gao, J., Zoller, K.E., Ginsberg, M.H., Brugge, J.S., and Shattil, S.J. (1997). Regulation of the pp72^{syk} protein tyrosine kinase by platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *EMBO J.* 16, 6414–6425.
- Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., and Pawson, T. (1998). The Syk protein tyrosine kinase is essential for $F_{c\gamma}$ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4209–4220.
- Kiosses, W.B., Shattil, S.J., Pampori, N., and Schwartz, M.A. (2001). Rac recruits high-affinity integrin $\alpha_v\beta_3$ to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* 3, 316–320.
- Law, D.A., Nannizzi-Alaimo, L., Ministri, K., Hughes, P.E., Forsyth, J., Turner, M., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., Tybulewicz, V.L., and Phillips, D.R. (1999). Genetic and pharmacological analyses of Syk function in $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling in platelets. *Blood* 93, 2645–2652.
- Lin, T.H., Rosales, C., Mondal, K., Bolen, J.B., Haskill, S., and Juliano, R.L. (1995). Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells. A possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 16189–16197.
- Lowell, C.A., and Berton, G. (1998). Resistance to endotoxin shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7580–7584.
- Lowell, C.A., and Berton, G. (1999). Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 65, 313–320.
- Lowell, C.A., Soriano, P., and Varmus, H.E. (1994). Functional overlap in the src gene family: inactivation of *hck* and *fgr* impairs natural immunity. *Genes Dev.* 8, 387–398.
- Lowell, C.A., Fumagalli, L., and Berton, G. (1996). Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58/60^{fgr} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* 133, 895–910.
- Lu, H., Smith, C.W., Perrard, J., Bullard, D., Tang, L., Shappell, S.B., Entman, M.L., Beaudet, A.L., and Ballantyne, C.M. (1997). LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 99, 1340–1350.
- Meng, F., and Lowell, C.A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 185, 1661–1670.
- Meng, F., and Lowell, C.A. (1998). A β_1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J.* 17, 4391–4403.
- Miura, K., Lavens-Phillips, S., and MacGlashan, D.W., Jr. (2001). Piceatannol is an effective inhibitor of IgE-mediated secretion from human basophils but is neither selective for this receptor nor acts on syk kinase at concentrations where mediator release inhibition occurs. *Clin. Exp. Allergy* 31, 1732–1739.
- Mizgerd, J.P., Kubo, H., Kutkoski, G.J., Bhagwan, S.D., Scharffetter-Kochanek, K., Beaudet, A.L., and Doerschuk, C.M. (1997). Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J. Exp. Med.* 186, 1357–1364.
- Mócsai, A., Bánfi, B., Kapus, A., Farkas, G., Geiszt, M., Buday, L., Faragó, A., and Ligeti, E. (1997). 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.* 54, 781–789.
- Mócsai, A., Ligeti, E., Lowell, C.A., and Berton, G. (1999). Adhesion-

- dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* **162**, 1120–1126.
- Mócsai, A., Jakus, Z., Vántus, T., Berton, G., Lowell, C.A., and Ligeti, E. (2000). Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* **164**, 4321–4331.
- Nathan, C.F. (1987). Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **80**, 1550–1560.
- Nathan, C., Srimal, S., Farber, C., Sanchez, E., Kabbash, L., Asch, A., Gailit, J., and Wright, S.D. (1989). Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J. Cell Biol.* **109**, 1341–1349.
- Obergfell, A., Eto, K., Mócsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A., and Shattil, S.J. (2002). Coordinate interactions of Csk, Src and Syk kinases with $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, in press.
- Pereira, S., Zhou, M., Mócsai, A., and Lowell, C. (2001). Resting murine neutrophils express functional α_4 integrins that signal through Src family kinases. *J. Immunol.* **166**, 4115–4123.
- Pyszniak, A.M., Welder, C.A., and Takei, F. (1994). Cell surface distribution of high-avidity LFA-1 detected by soluble ICAM-1-coated microspheres. *J. Immunol.* **152**, 5241–5249.
- Richter, J., Ng-Sikorski, J., Olsson, I., and Andersson, T. (1990). Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9472–9476.
- Schmits, R., Kundig, T.M., Baker, D.M., Shumaker, G., Simard, J.J., Duncan, G., Wakeham, A., Shahinian, A., van der Heiden, A., Bachmann, M.F., et al. (1996). LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* **183**, 1415–1426.
- Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S., and Yamamura, H. (2001). Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett.* **489**, 129–133.
- Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* **378**, 298–302.
- Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Tybulewicz, V.L. (2000). Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today* **21**, 148–154.
- Vines, C.M., Potter, J.W., Xu, Y., Geahlen, R.L., Costello, P.S., Tybulewicz, V.L., Lowell, C.A., Chang, P.W., Gresham, H.D., and Willman, C.L. (2001). Inhibition of β_2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* **15**, 507–519.
- Walzog, B., Scharffetter-Kochanek, K., and Gaehtgens, P. (1999). Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am. J. Physiol.* **276**, G1125–1130.
- Wilson, R.W., Ballantyne, C.M., Smith, C.W., Montgomery, C., Bradley, A., O'Brien, W.E., and Beaudet, A.L. (1993). Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J. Immunol.* **151**, 1571–1578.
- Yan, S.R., Huang, M., and Berton, G. (1997). Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72^{syk} tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72^{syk} and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J. Immunol.* **158**, 1902–1910.

Communicated by Arthur Weiss, University of California, San Francisco, CA, March 7, 2004 (received for review January 20, 2004)

Osteoclasts, the only bone-resorbing cells, are central to the pathogenesis of osteoporosis, yet their development and regulation are incompletely understood. Multiple receptors of the immune system use a common signaling paradigm whereby phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) within receptor-associated adapter proteins recruit the Syk tyrosine kinase. Here we demonstrate that a similar mechanism is required for development of functional osteoclasts. Mice lacking two ITAM-bearing adapters, DAP12 and the Fc receptor γ -chain (FcR γ), are severely osteopetrotic. *DAP12^{-/-}FcR γ ^{-/-}* bone marrow cells fail to differentiate into multinucleated osteoclasts or resorb bone *in vitro* and show impaired phosphorylation of the Syk tyrosine kinase. *syk^{-/-}* progenitors are similarly defective in osteoclast development and bone resorption. Intact SH2-domains of Syk, introduced by retroviral transduction, are required for functional reconstitution of *syk^{-/-}* osteoclasts, whereas intact ITAM-domains on DAP12 are required for reconstitution of *DAP12^{-/-}FcR γ ^{-/-}* cells. These data indicate that recruitment of Syk to phosphorylated ITAMs is critical for osteoclastogenesis. Although DAP12 appears to be primarily responsible for osteoclast differentiation in cultures directly stimulated with macrophage-colony stimulating factor and receptor activator of NF- κ B ligand cytokines, DAP12 and FcR γ have overlapping roles in supporting osteoclast development in osteoblast-osteoclast cocultures, which mirrors their overlapping functions *in vivo*. These results provide new insight into the biology of osteoclasts and suggest novel therapeutic targets in diseases of bony remodeling.

Osteoclasts are derived from hematopoietic precursor cells of the myeloid lineage. Although signals through the receptor activator of NF- κ B (RANK)/RANKL (RANK ligand) and colony-stimulating factor 1 receptor/macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) receptor/ligand pairs are clearly required for osteoclastogenesis, regulation by other receptor-mediated signals is less well defined (1). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signaling is critical for receptors of the adaptive immune system (B cell receptors, T cell receptors, and Fc receptors), and innate immune receptors that couple to the ITAM-adaptor proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) also regulate cellular differentiation and function in myeloid cells (2–4). The association of DAP12 deficiency with a human disease involving bony abnormalities (Nasu–Hakola disease or polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy) suggests that these receptors may play important roles in osteoclasts as well (5). In both humans and mice, loss of the DAP12 ITAM signaling adapter results in a significant defect in differentiation of osteoclast-like cells (OCLs) in cell culture (6–10) but does not completely block osteoclastogenesis *in vivo*. This observation suggests that other ITAM signaling adapter proteins, such as FcR γ , may also be involved in osteoclastogenesis. DAP12 and FcR γ are both transmembrane adapter proteins with ITAM domains that couple to downstream pathways through the Syk tyrosine kinase (4,

11). Thus, we studied mice doubly deficient in DAP12 and FcR γ and examined the functional role of Syk in osteoclasts.

Materials and Methods

Mice. We used offspring of $DAP12^{+/-}Fc\gamma R^{-/-} \times DAP12^{-/-}Fc\gamma R^{+/-}$ matings (B6/129 mixed background) derived from intercrossing $DAP12^{-/-}$ (12) and $Fc\gamma R^{-/-}$ (Taconic Farms) mice. Heterozygous animals were considered wild type given no suggestion of gene dosage effects for $DAP12$ or $Fc\gamma R$ in prior analyses. $syk^{-/-}$ fetal liver from progeny of $syk^{+/-}$ C57BL/6 parents (13) was used for bone marrow transplantation as described (14).

Micro-Computed Tomography (CT) Analysis. Proximal tibias were scanned by high resolution micro-CT (μ CT-20, Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) with a cubic voxel size of 9 μ m and with 3D structural parameters calculated (15, 16) (see *Supporting Methods*, which is published as supporting information on the PNAS web site). Groups were compared by a nonparametric Kruskal–Wallis with Dunn’s post hoc test (INSTAT, GraphPad, San Diego).

Histologic Analysis and Immunofluorescence Microscopy. Proximal tibias were fixed in PBS plus 4% paraformaldehyde, decalcified in 0.5 M EDTA (pH 7.4), paraffin-embedded, sectioned at 6 μ m, and stained by using standard techniques. Immunostaining was performed by using anti-Syk antibody (N-19, Santa Cruz Biotechnology), followed by Alexa Fluor-488-secondary antibody (Molecular Probes) and counterstaining with rhodamine-phalloidin.

In Vitro Osteoclast Cultures and Resorption Assays. These assays were performed as described (10). Briefly, nonadherent bone marrow cells after 48 h in complete α -MEM (Invitrogen) with 10 ng/ml murine M-CSF (osteoclast precursors) were plated at 0.5 million per cm^2 and cultured 4–7 d in 70 ng/ml RANKL and 10 or 100 ng/ml M-CSF (R & D Systems). Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining was performed with a commercial kit (catalog no. 387-A, Sigma). For resorption assays, osteoclast precursors were plated on BioCoat Osteologic slides (BD Biosciences) or dentine discs (Immunodiagnostic Systems, Tyne and Wear, England), and cultured with RANKL/M-CSF for 10 d as described (10). Groups were compared by one-way ANOVA analysis with

Abbreviations: ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; Fc γ , Fc receptor γ -chain; M-CSF, macrophage-colony-stimulating factor; RANK, receptor activator of NF- κ B; OCL, osteoclast-like cell; CT, computed tomography; TRAP, tartrate resistant acid phosphatase; OB, osteoblast; MNC, multinucleated cells; SMI, structure model index; OSCAR, osteoclast-associated receptor.

[‡]A.M. and M.B.H. contributed equally to this work.

****To whom correspondence should be addressed at:** Immunology/Arthritis Section, Department of Veterans Affairs Medical Center, University of California, 111R, 4150 Clement Street, San Francisco, CA 94121. E-mail: marynak@itsa.ucsf.edu.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

Bonferroni's correction for multiple comparisons with INSTAT software.

Osteoblasts (OB) isolated by described methods (17) were used for coculture experiments. Briefly, OB were allowed to migrate out of collagenase II (Sigma) and trypsin/versene-treated femur and calvaria fragments harvested from adult wild-type mice over 10 d in OB media [complete α -MEM with 50 μ g/ml L-ascorbic acid (Fisher)]. Confluent cultures were subcultured by plating 8,000 OB per 96-well plate. On day 2, 5×10^4 osteoclast precursors were seeded onto the OB monolayer, and the cocultures were incubated for 7 d, with OB media changed every 3 d.

Detection of Osteoclast Specific Gene Transcripts. Total RNA was obtained, reverse transcribed, and amplified by using murine primers for GAPDH, calcitonin receptor, cathepsin K, integrin β_3 , osteoclast-associated receptor (OSCAR), and RANK, as described (10).

Western Blot Analysis. OCLs cultured 5 d in 70 ng/ml RANKL and 10 ng/ml M-CSF or macrophages cultured 5 d in 10 ng/ml M-CSF were lysed in RIPA buffer followed by precipitation (14) with anti-Syk (N-19), anti-FcR γ (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) antibodies, an anti-DAP12 antiserum (generous gift of T. Takai, Tohoku University, Sendai, Japan), or a GST fusion protein of the tandem SH2-domains of murine Syk (from A. DeFranco, University of California, San Francisco). Blots of whole-cell lysates (20 μ g per sample) or precipitates were probed with anti-Syk, anti-DAP12, anti-FcR γ , anti-phosphotyrosine (4G10), anti-CD11b (M-19), anti-actin (C-2) antibodies (Santa Cruz Biotechnology) or anti-phospho-Syk (Y519/520; Cell Signaling Technology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary reagents (Amersham Pharmacia).

Retroviral Reconstitution. Retroviruses generated by using pMIG-W vector alone (from Y. Rafaei, University of California, San Francisco) or pMIG-W encoding murine Syk or a Syk SH2 mutant (R194A) were used to transduce *syk*^{-/-} osteoclast precursors. Retrovirus generated by using pMX-pie vector or PMX-pie encoding FLAG-tagged DAP12 or mutated DAP12 at Y65F and/or Y76F was used to infect *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} osteoclast precursors as described (10). Cells were then cultured with RANKL/M-CSF as above. See *Supporting Methods* for further details.

Results

***DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} Mice Have Severe Osteopetrosis.** *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} mice develop normally but are smaller than their wild-type littermates, with a rounded face and thickened, shortened femurs (data not shown), characteristic of osteopetrosis. Notably, *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} mice develop teeth, distinguishing their phenotype from Src- or RANKL-deficient animals (18, 19). We confirmed the osteopetrotic phenotype by micro-CT analysis of the proximal tibia (Fig. 1A). *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} mice had a relative bone volume of $88 \pm 3\%$ ($n = 4$), whereas wild-type mice averaged $15 \pm 2\%$ ($n = 3$) ($P < 0.001$). *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} tibias showed markedly increased trabecular number, trabecular thickness, and decreased trabecular separation compared with wild type. The marked negative value of the structure model index (SMI) in the *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} mice (SMI = -17.6 ± 4.1) indicates an overwhelmingly concave structure, solid with tube-like channels of marrow space, rather than the rod-like trabecular structure in wild-type animals (SMI = 1.7 ± 0.1). Parameters from bones of *FcR γ* ^{-/-} animals ($n = 3$) did not differ from wild type, whereas *DAP12*^{-/-} mice demonstrated marginally increased bone mass ($n = 2$), as described (8, 10). Histological examination of *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} bones showed large areas of unresorbed bone with cartilaginous streaks and small bone marrow cavities in comparison

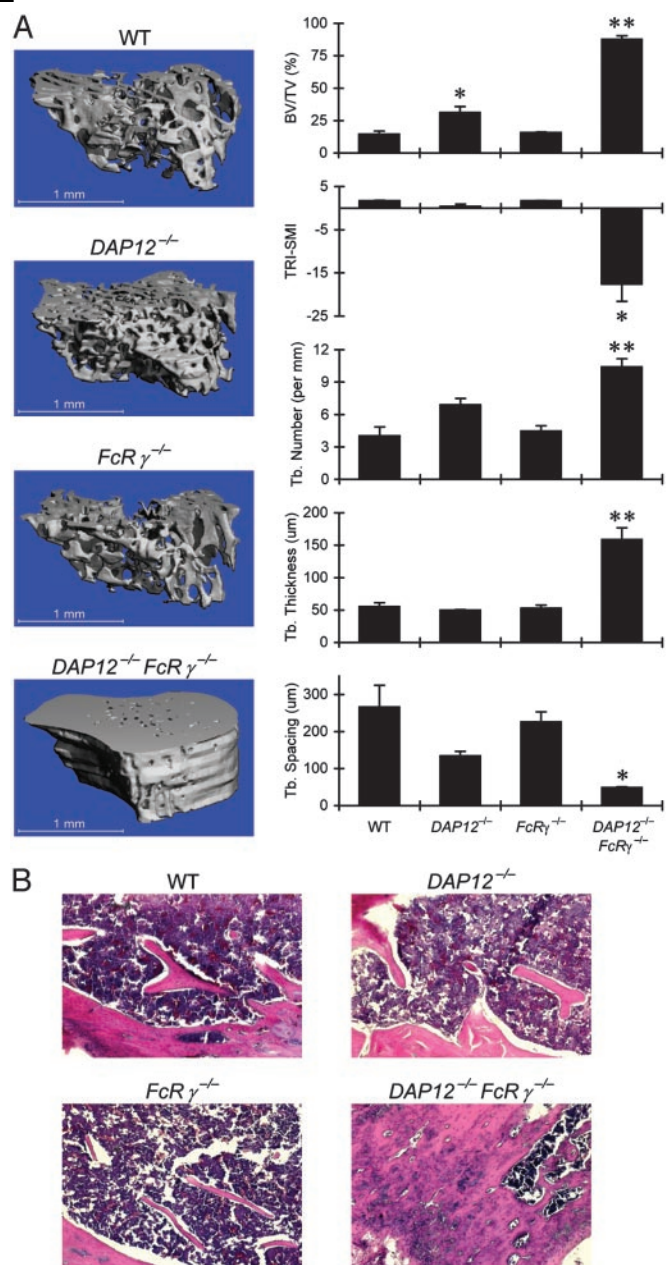


Fig. 1. Osteopetrosis in mice lacking DAP12 and FcR γ . (A) Three-dimensional reconstitution of micro-CT scans of proximal tibia and 3D trabecular quantitative parameters (mean $\pm$ SEM) of bone structure. Significant differences from wild-type are shown (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$). (B) Hematoxylin-eosin staining of decalcified sections of the primary spongiosa of proximal tibias. BV/TV, relative bone volume. TRI-SMI, 3D reconstruction image SMI.

with those from wild-type, *DAP12*^{-/-}, or *FcR γ* ^{-/-} animals (Fig. 1B).

Syk Colocalizes with Actin in Osteoclasts and Fails to Be Phosphorylated in *DAP12*^{-/-}*FcR γ* ^{-/-} Cells. In other cells, phosphorylation of ITAM tyrosines recruits and activates Syk through binding to its SH2 domains (2, 3, 11). We found that Syk is expressed in wild-type OCLs generated by 70 ng/ml RANKL and 10 ng/ml M-CSF *in vitro*, and it colocalizes with actin at the cell periphery (Fig. 2A). OCLs express a significantly higher amount of Syk than macrophages (Fig. 2B). By using a GST fusion protein containing the tandem SH2 domains of Syk [GST-Syk(SH2)₂], we show that Syk

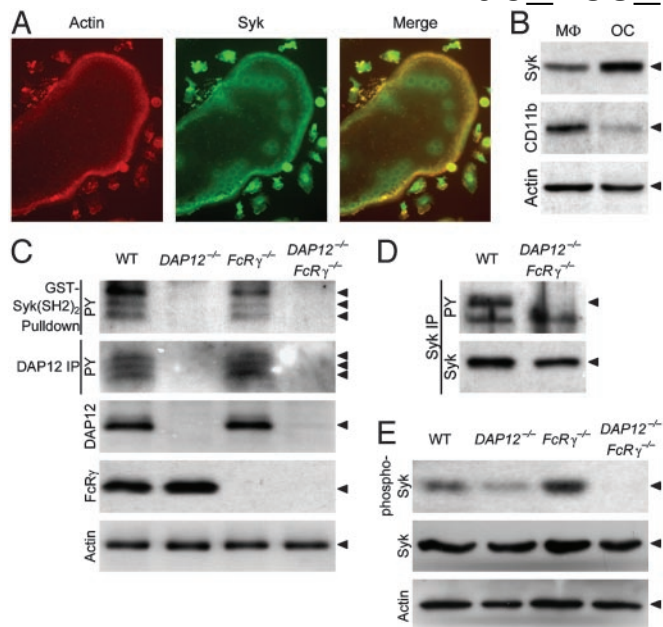


Fig. 2. Lack of Syk phosphorylation in $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ osteoclast-like cells. (A) OCLs stained with anti-Syk and phalloidin. (B) Expression of Syk in *in vitro* OCLs (OC) and macrophages (MΦ) compared with the macrophage marker CD11b and actin by immunoblotting. (C) Precipitation of whole-cell lysates with GST-Syk fusion protein containing the SH2 domains of Syk or DAP12 antiserum probed with anti-phosphotyrosine antibody. Whole-cell lysates show expression of DAP12, FcRγ, and actin. (D) Immunoprecipitation (IP) with anti-Syk followed by phosphotyrosine (PY) immunoblot. (E) Immunoblot of whole-cell lysate for Y519/520 phosphorylated Syk, total Syk, or actin.

can associate with tyrosine-phosphorylated proteins in osteoclast lysates consistent in size and phosphorylation pattern with DAP12 (Fig. 2C). No phosphorylated proteins are seen associated with GST-Syk(SH2)₂ in cells from $DAP12^{-/-}$ or $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ mice. Immunoprecipitation of Syk from OCL lysates demonstrates that Syk is tyrosine-phosphorylated (Fig. 2D), and this phosphorylation is notably absent in OCLs from $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ animals. Whole-cell lysates of wild-type OCLs show the phosphorylation of Syk at activation loop tyrosine residues (Y519/520), which is partially decreased in $DAP12^{-/-}$ (but not $FcR\gamma^{-/-}$) OCLs and

nearly completely absent in $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ OCLs (Fig. 2E), suggesting that FcRγ can partially compensate for the lack of DAP12 in maintaining Syk kinase activity in OCLs.

DAP12, FcRγ, and Syk Are Required for *in Vitro* Generation of Osteoclasts. In concert with the severe osteopetrosis in $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ mice, RANKL/M-CSF-treated $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ osteoclast precursors showed defective *in vitro* osteoclast differentiation (Fig. 3A). $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ OCLs were mononuclear, although clearly positive for the osteoclast marker TRAP. Single mutant $DAP12^{-/-}$ OCLs showed a similar phenotype, as previously described (6–10), whereas $FcR\gamma^{-/-}$ OCLs were indistinguishable from wild type. Similar to $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$ cells, OCLs from $syk^{-/-}$ precursors [obtained from bone marrow chimeras generated by using $syk^{-/-}$ fetal liver cells (14)] also failed to differentiate normally *in vitro*. Interestingly, mononuclear TRAP⁺ OCLs from $DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, or $syk^{-/-}$ cells all expressed markers generally associated with mature osteoclasts, including cathepsin K, β₃ integrin, calcitonin receptor, OSCAR, and RANK (Fig. 3B), suggesting that the block in differentiation *in vitro* is at an intermediate to late stage.

High-Dose M-CSF Partially Restores the Developmental Defect in $DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, and $syk^{-/-}$ Osteoclasts. Supraphysiologic stimulation of myeloid precursors with M-CSF has been shown to partially rescue osteoclastogenesis in mice lacking β₃ integrins (20, 21). We examined osteoclast differentiation from $DAP12^{-/-}$, $FcR\gamma^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, and $syk^{-/-}$ precursors *in vitro* with 10-fold excess (100 ng/ml) of M-CSF. In high-concentration M-CSF, wild-type and $FcR\gamma^{-/-}$ precursors formed extremely large, highly multinucleated OCLs, and formation of TRAP⁺ multinucleated OCLs from $DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, and $syk^{-/-}$ cells was partially restored (Fig. 3A).

$DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, and $syk^{-/-}$ Osteoclasts Fail to Resorb Mineralized Matrix. Next we examined functional resorption by the mutant OCLs *in vitro*. In contrast to wild-type or $FcR\gamma^{-/-}$ OCLs, $DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, or $syk^{-/-}$ OCLs failed to digest an artificial calcium phosphate substrate and formed barely detectable pits on dentin (Fig. 4). In cultures with high-concentration M-CSF with partially restored TRAP⁺ multinucleated cell formation, resorption on calcium phosphate substrate by $DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, and $syk^{-/-}$ OCLs was still minimal (Fig. 4A), suggesting that the ITAM signaling pathway may play a role in functional

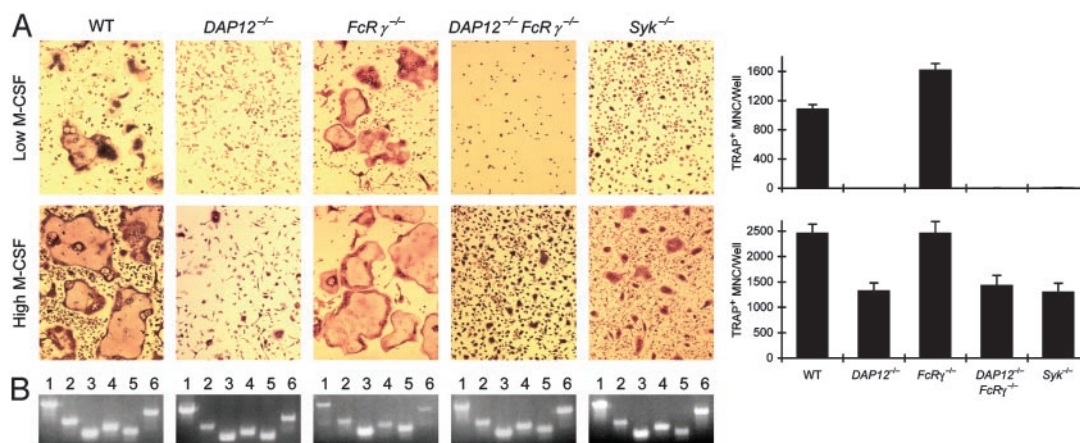


Fig. 3. DAP12/FcRγ and Syk are required for *in vitro* generation of osteoclast-like cells. (A) TRAP-stained OCLs generated in RANKL and 10 ("low") or 100 ng/ml ("high") M-CSF. TRAP⁺ multinucleated cells (MNC = 3 or more nuclei per cell) enumerated as mean ± SEM of 3 wells (2 cm² per well). (B) RT-PCR analysis of OCLs cultured in RANKL and 10 ng/ml M-CSF. 1, GAPDH; 2, calcitonin receptor; 3, cathepsin K; 4, integrin β₃; 5, OSCAR; 6, RANK. $DAP12^{-/-}$, $DAP12^{-/-}FcR\gamma^{-/-}$, and $syk^{-/-}$ groups were statistically different ($P < 0.001$) from wild type in both conditions.

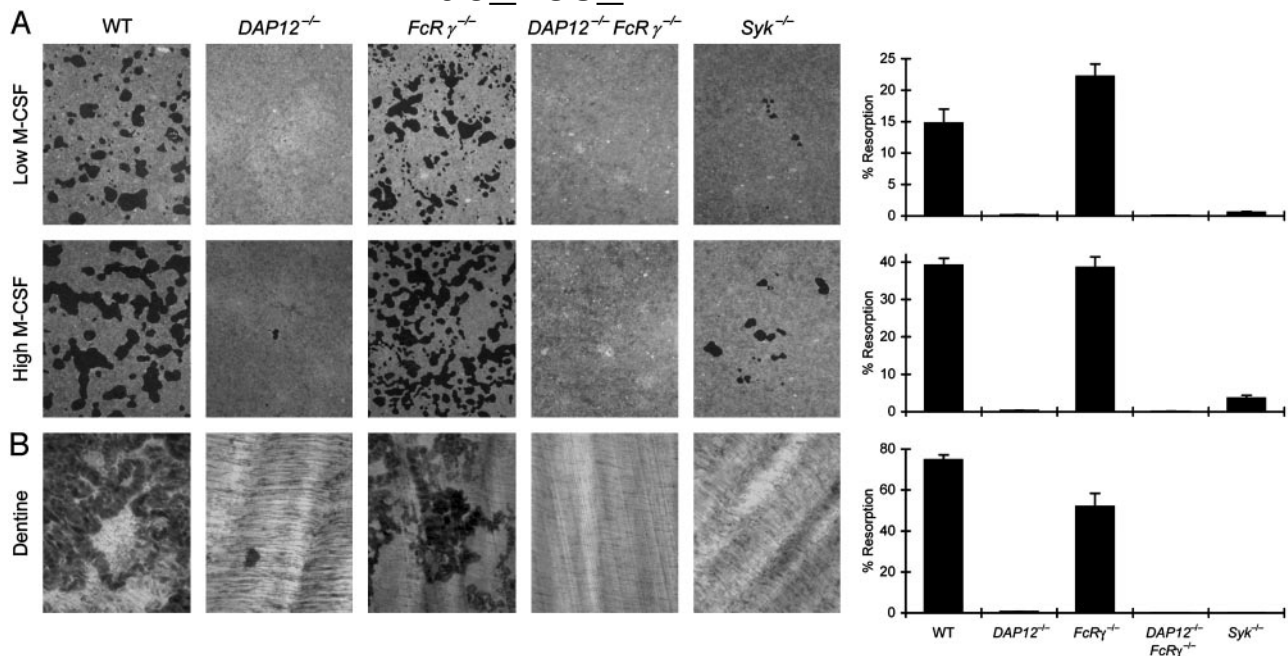


Fig. 4. DAP12/Fc γ and Syk are required for functional resorption of mineralized matrix. (A) OCLs generated in RANKL and M-CSF (10 or 100 ng/ml) on an artificial calcium phosphate substrate. The percentage of the resorption of substrate (dark areas) was quantified by dark-field microscopy and expressed as the mean $\pm$ SEM of three samples. (B) Bone resorption by OCLs on dentine slices with RANKL and 10 ng/ml M-CSF, visualized by toluidine blue staining and light microscopy. Resorption in the *DAP12*^{-/-}, *DAP12*^{-/-}Fc γ ^{-/-}, and *syk*^{-/-} groups was statistically different ($P < 0.001$) from wild type in all conditions.

resorption by osteoclasts in addition to their role in differentiation to TRAP⁺ multinucleated OCLs.

SH2 Domains of Syk are Required for Osteoclast Development and Mineralized Matrix Resorption. Recruitment of Syk to ITAM domains depends on the binding of its SH2 domains to phosphorylated tyrosines within the ITAM. In other cell types, the R194 residue in the distal SH2 domain of Syk is critical for ITAM-mediated signaling (22). We examined the effect of this mutation in osteoclastogenesis by using retroviral expression of wild-type and R194A Syk in *syk*^{-/-} precursor cells. Reconstitution of Syk expression in *syk*^{-/-} cells partially restored the *in vitro* formation and function of *syk*^{-/-} OCLs (Fig. 5 A and B). Although numbers of OCLs formed from *syk*-transduced *syk*^{-/-} cells remained lower than those in wild-type cell cultures, the difference correlated with lower expression levels of Syk in the retrovirally reconstituted samples (Fig. 5C) and the efficiency of retroviral transduction (30–40% as assessed by GFP expression; data not shown). Importantly, an SH2 domain mutant (R194A) of Syk that fails to bind to phosphorylated ITAM-containing chains did not reconstitute either phenotype or resorbing function of *syk*^{-/-} OCLs when expressed at levels equivalent to the retrovirally reconstituted wild-type Syk. These data indicate that Syk function in osteoclast formation requires SH2-phosphotyrosine binding.

Reintroduction of Intact DAP12 ITAM Is Required for Development and Function of *DAP12*^{-/-}*Fcγ*^{-/-} Osteoclasts. We similarly examined the requirement for phosphorylated tyrosines within the DAP12 ITAM for *in vitro* osteoclastogenesis. Reconstitution of wild-type mouse DAP12 but not single tyrosine (Y65 or Y76) or double tyrosine (Y65/Y76) ITAM mutants can partially restore the formation (Fig. 5D) and resorptive function (Fig. 5E) of *DAP12*^{-/-}*Fcγ*^{-/-} OCLs. Full restoration is likely not achieved because of a 25–30% transduction of *DAP12*^{-/-}*Fcγ*^{-/-} precursors. Equivalent expression of mouse DAP12 and the DAP12 ITAM mutants is demonstrated by cell surface expression of the FLAG epitope on FLAG-tagged DAP12 and the FLAG-tagged DAP12 ITAM mu-

tants (Fig. 5F). These results indicate that DAP12 is critical for osteoclastogenesis *in vitro* through phospho-ITAM-mediated recruitment of SH2 domain-containing proteins.

Coculture with OB Partially Restores *in Vitro* Osteoclast Formation in *DAPI2*^{-/-} Cells. To further examine the role of the adapter proteins in osteoclastogenesis, we examined *DAPI2*^{-/-}, *FcRγ*^{-/-}, *DAPI2*^{-/-}*FcRγ*^{-/-}, or *syk*^{-/-} precursors under alternate conditions for differentiation by using coculture of osteoclast precursors with OB. Coculture of *DAPI2*^{-/-} osteoclast precursors with wild-type murine OB resulted in partial normalization of OCL formation (Fig. 6A), and these OCLs resorbed an artificial bone matrix, although less than did wild-type OCLs (Fig. 6B). In contrast, *in vitro* OCL development or function of *DAPI2*^{-/-}*FcRγ*^{-/-} or *syk*^{-/-} precursors remained severely defective under coculture conditions, indicating a requirement for ITAM adapters and Syk. These results suggest that FcRγ can partially compensate for the lack of DAPI2 under osteoclast-OB coculture conditions. This finding may contribute to the lack of *in vivo* osteopetrosis seen in the *DAPI2*^{-/-} single mutants compared with the *DAPI2*^{-/-}*FcRγ*^{-/-} mice.

Discussion

These studies suggest a critical role for ITAM signals through the Syk tyrosine kinase during osteoclastogenesis and further illustrate the importance of this signaling pathway in the differentiation of hematopoietic cells toward highly specialized functions. ITAM-mediated signals dependent on Syk kinase or the related kinase ZAP-70 are known to play essential roles in the development and function of the adaptive immune system, particularly in T cells and B cells (2). The importance of ITAM-dependent receptors is also recognized in innate immune cells, including macrophages, neutrophils, dendritic cells, natural killer cells, and mast cells (2, 3, 14, 23). Syk may play a broader role in cellular regulation in that it can be directly activated through ligation of surface integrins and has been shown to be critical for specific integrin-mediated functions in macrophages, neutrophils, and platelets (14, 24, 25). Recent find-

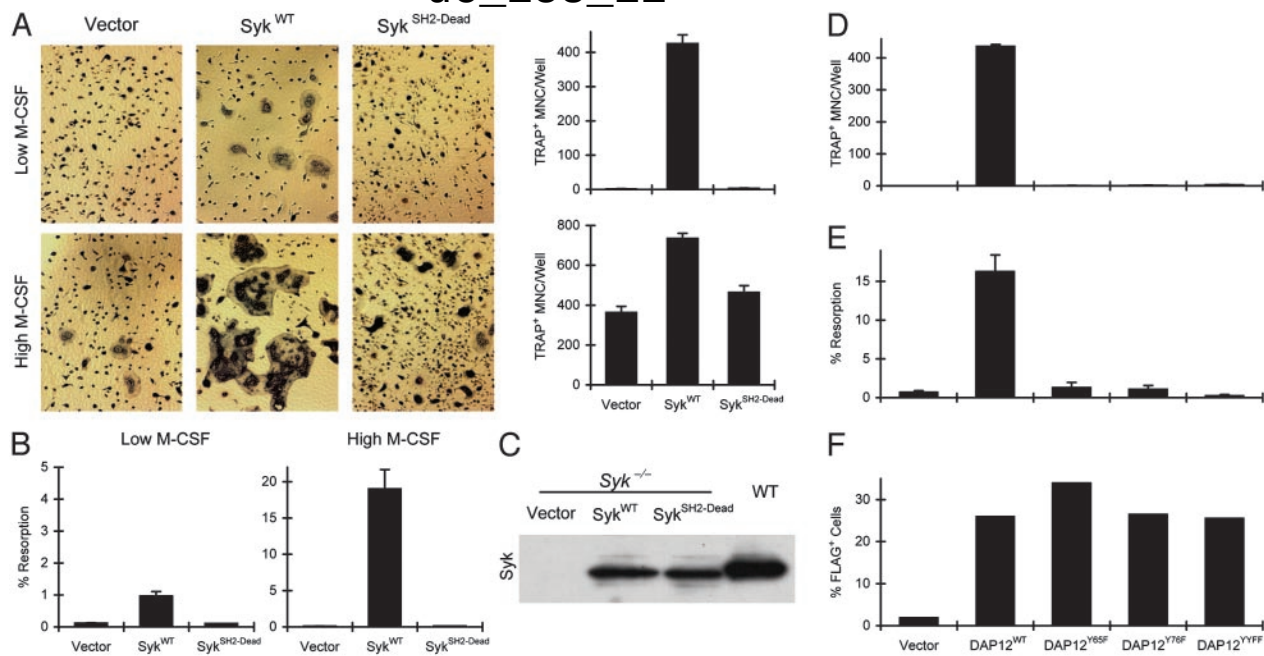


Fig. 5. SH2 domains of Syk and an intact DAP12 ITAM are required for *in vitro* osteoclast differentiation and function. TRAP⁺ MNC (A) and the percent resorption (B) of calcium phosphate substrate by *syk*^{-/-} precursors infected with retrovirus encoding vector alone, wild-type *syk*, or a SH2-dead mutant (R194A) of *syk* at indicated M-CSF concentrations. In both conditions, TRAP⁺ MNC number and percent resorption in the *Syk*^{WT} groups was statistically different ($P < 0.01$) from vector or *Syk*^{SH2-Dead}, with no difference between vector and *Syk*^{SH2-Dead} groups ($P > 0.05$). (C) Anti-Syk blot of whole-cell ligands from retrovirally transduced or wild-type OCLs. TRAP⁺ MNC (D) and percent resorption (E) from *DAP12*^{-/-} precursors infected with virus-encoding vector alone, wild-type DAP12, or ITAM tyrosine mutants (Y65, Y76, or both) of DAP12 cultured in 10 ng/ml M-CSF. (F) Expression of FLAG epitope on cells retrovirally transduced with FLAG-tagged DAP12 or FLAG-tagged DAP12 mutants.

ings that Syk is associated with a modified ITAM in ERM (ezrin, radixin, and moesin) proteins has also suggested its role in the cytoskeletal changes mediated by these proteins (26).

In the developing osteoclast, Syk may contribute to several of these pathways, given the importance of integrins and cytoskeletal rearrangements that take place during osteoclastogenesis (1, 27). The finding that the *in vitro* developmental defect but not the bone-resorbing capacity of OCLs from *DAP12*^{-/-}*FcRγ*^{-/-} or *syk*^{-/-} precursors can be partially restored by treatment with high-dose M-CSF is highly reminiscent of the recent studies on β_3

integrin-deficient cells (20, 21) and a recent report on *DAP12*^{-/-} cells (9). Similar to the report on *DAP12*^{-/-} cells (9), we found that *DAP12*^{-/-}*FcRγ*^{-/-} and *syk*^{-/-} preosteoclasts phosphorylated extracellular response kinase normally in response to M-CSF (data not shown), demonstrating that other signaling pathways are intact. The degree to which the deficiency of DAP12, *FcRγ*, or Syk directly affects $\alpha_v\beta_3$ integrin function in osteoclasts has not been fully explored. Syk-deficient neutrophils, macrophages, and platelets have been reported to show impaired signaling through integrins (14, 24, 25, 28), and Syk can associate with the cytoplasmic domain of integrin β -chains (28). Supporting our hypothesis that ITAM signaling is linked to integrins, Faccio *et al.* (9) recently reported that *DAP12*^{-/-} OCLs fail to migrate to osteopontin, an $\alpha_v\beta_3$ integrin ligand, whereas *syk*^{-/-} OCLs fail to phosphorylate Pyk2 or Src on adherence to osteopontin. Thus, it is possible that ITAM adapters may couple to cell surface integrins to provide osteoclast differentiation signaling through Src-family and Syk kinases. Such signaling likely cooperates with RANK and M-CSF receptor to provide optimal differentiation responses. Signals downstream of Syk (Cbl and Pyk2) (14) have been identified in osteoclast formation and function (21, 29–31). ITAM signaling in other cells also stimulates phospholipase C γ and Ca²⁺-flux (2, 11), leading to activation of nuclear factor of activated T cells transcription factors (NFAT). Signaling through intracellular pathways involving NFATc1 are also required during osteoclast differentiation (32). Interestingly, despite the clear defect in differentiation in development and function observed in *DAP12*^{-/-}, *DAP12*^{-/-}*FcRγ*^{-/-}, and *syk*^{-/-} OCLs, we found that they express markers traditionally associated with late-stage differentiated osteoclasts, including calcitonin receptor, integrin β_3 , and OSCAR. Faccio *et al.* reported that *DAP12*^{-/-} OCLs had reduced expression of osteoclast markers at low concentrations of M-CSF at days 2 and 4 of culture (9). Our examination of *DAP12*^{-/-} OCL at day 7 of culture did not show

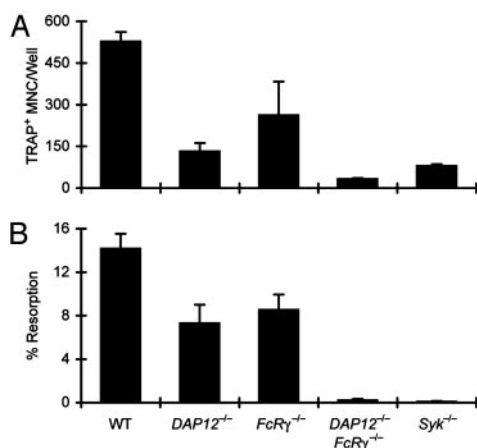


Fig. 6. Coculture partially restores *in vitro* osteoclast formation in *DAP12*^{-/-} cells but not *DAP12*^{-/-}*FcRγ*^{-/-} or *syk*^{-/-} cells. OB from wild-type mice were used to stimulate osteoclast precursors from wild-type, *DAP12*^{-/-}, *FcRγ*^{-/-}, *DAP12*^{-/-}*FcRγ*^{-/-}, or *syk*^{-/-} mice. The number of TRAP⁺ MNC (A) and the percent resorption (B) on calcium phosphate substrate is shown.

distinct differences, although it remains possible that expression of these markers is delayed.

DAPI2-deficient cells show a nearly complete defect of osteoclast development and *in vitro* bone resorption when OCLs are generated from precursors in the presence of M-CSF and RANKL. DAPI2 is clearly phosphorylated in such wild-type osteoclast cultures, whereas we were not able to detect phosphorylation of FcR γ under identical conditions (not shown). Furthermore, phosphoproteins that associate with the tandem SH2-domains of Syk are present in wild-type and FcR $\gamma^{-/-}$ but not in DAPI2 $^{-/-}$ OCLs. These results indicate that DAPI2, rather than FcR γ , is primarily responsible for supporting the development of osteoclasts under *in vitro* culture conditions where osteoclasts are present without OB.

An apparent paradox is raised by the observation that both DAPI2 $^{-/-}$ and DAPI2 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ OCLs show a severe defect *in vitro*, but only the DAPI2 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ mice manifest severe osteopetrosis *in vivo*. Comparison of the *in vitro* phenotypes of cytokine-treated osteoclast cultures with that of osteoclast-OB cocultures may provide a possible explanation for this difference. In osteoclast-OB cocultures, we observed development of multinucleated OCLs from DAPI2 $^{-/-}$ but not from DAPI2 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ precursors, suggesting that FcR γ is able to compensate for the lack of DAPI2 in the presence of OB. A possible scenario could be that OB promote osteoclastogenesis by a mechanism requiring FcR γ in osteoclasts (through, for example, the recently described OSCAR receptor, which is expected to associate with FcR γ). Such compensation may occur *in vivo* and explain the nearly normal bone density and the presence of multinuclear osteoclasts in DAPI2 $^{-/-}$ mice *in vivo* (8, 10). Furthermore, although the *in vitro* morphology of DAPI2 $^{-/-}$ versus DAPI2 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ OCLs (in the absence of OB) was very similar, we consistently observed some *in vitro* bone resorption by DAPI2 $^{-/-}$ but not by DAPI2 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ cells, and the phosphorylation of Syk was also further decreased in DAPI2 $^{-/-}$ FcR $\gamma^{-/-}$ compared with in DAPI2 $^{-/-}$ cells. Thus, FcR γ in DAPI2 $^{-/-}$ osteoclasts may allow a level of *in vivo* bone resorption sufficient for nearly normal bone density, even in the absence of additional signals from OB. An FcR γ -dependent signal may also

originate from other (nonosteoblastic) components of the bony microenvironment (e.g., stromal cells and soft tissue matrix) that are not present *in vitro*. Additionally we have not ruled out that the lack of both DAPI2 and FcR γ could lead to increased bone formation by OB, exacerbating the *in vivo* phenotype.

Although our study demonstrates the importance of the DAPI2 and FcR γ adapter proteins in osteoclast development and function, the full spectrum of associated receptors and their ligands has not been completely defined. It is likely that, similar to other innate immune cells, osteoclasts express a number of different receptors and associated ITAM-containing signaling adapters, which provide a diverse means of regulating osteoclastogenesis in response to local changes and cellular interactions. Differences in receptor or adapter expression between mice and humans likely explain the different phenotypic consequences of DAPI2 deficiency between species. The identification of the receptor/ligand interactions involved will be critical to identifying the role of these receptors and adapters in normal and pathological bony remodeling.

Osteoporosis has been linked to dysregulation of osteoclast function, placing this cell type in the center of pathogenesis of the disease. The signaling proteins and molecular interactions described here may provide novel therapeutic approaches for the pharmacological treatment of osteoporosis or other diseases involving bony remodeling. Small molecule inhibitors of Syk are already in development for use in treatment of allergic diseases. Our results may suggest their possible utility in bone diseases.

We thank V. Tybulewicz for *syk* $^{+/-}$ mice; Hong Yu, G. Cassafer, and E. Niemi for technical support; A. DeFranco and Y. Rafaei for DNA plasmids; and T. Takai for DAPI2 antiserum. A.M. is a Bolyai Postdoctoral Fellow of the Hungarian Academy of Sciences, M.B.H. is an Abbott Scholar in Rheumatology Research, L.L.L. is an American Cancer Society Research Professor, C.A.L. is a Scholar of the Leukemia and Lymphoma Society, and M.C.N. is an American Cancer Research Scholar. This work was supported by the Department of Veterans Affairs, National Institutes of Health Grants DK58066 (to C.A.L.), CA89294 (to L.L.L.), and AG17762 (to S.M.), Medical Research Council of Hungary Grant 044/2002 (to A.M.), and the Rosalind Russell Center for Arthritis Research.

- Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. (2003) *Nature* **423**, 337–342.
- Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J. P. & Tybulewicz, V. L. (2000) *Immunol. Today* **21**, 148–154.
- Lanier, L. L. & Bakker, A. B. (2000) *Immunol. Today* **21**, 611–614.
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. & Ravetch, J. V. (1994) *Cell* **76**, 519–529.
- Paloneva, J., Kestila, M., Wu, J., Salminen, A., Bohling, T., Ruotsalainen, V., Hakola, P., Bakker, A. B., Phillips, J. H., Pekkarinen, P., et al. (2000) *Nat. Genet.* **25**, 357–361.
- Cella, M., Buonsanti, C., Strader, C., Kondo, T., Salmaggi, A. & Colonna, M. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 645–651.
- Paloneva, J., Mandelin, J., Kiialainen, A., Bohling, T., Prudlo, J., Hakola, P., Haltia, M., Kontinen, Y. T. & Peltonen, L. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 669–675.
- Kaifu, T., Nakahara, J., Inui, M., Mishima, K., Momiyama, T., Kaji, M., Sugahara, A., Koito, H., Ujike-Asai, A., Nakamura, A., et al. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 323–332.
- Faccio, R., Zou, W., Colaizzi, G., Teitelbaum, S. L. & Ross, F. P. (2003) *J. Cell Biochem.* **90**, 871–883.
- Humphrey, M. B., Ogasawara, K., Yao, W., Spusta, S. C., Daws, M. R., Lane, N. E., Lanier, L. L. & Nakamura, M. C. (2004) *J. Bone Miner. Res.* **19**, 224–234.
- McVicar, D. W., Taylor, L. S., Gosselin, P., Willette-Brown, J., Mikhael, A. I., Geahlen, R. L., Nakamura, M. C., Linnemeyer, P., Seaman, W. E., Anderson, S. K., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32934–32942.
- Bakker, A. B., Hoek, R. M., Cerwenka, A., Blom, B., Lucian, L., McNeil, T., Murray, R., Phillips, L. H., Sedgwick, J. D. & Lanier, L. L. (2000) *Immunity* **13**, 345–353.
- Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L. & Tybulewicz, V. L. (1995) *Nature* **378**, 298–302.
- Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V. L. & Lowell, C. A. (2002) *Immunity* **16**, 547–558.
- Hildebrand, T. & Rueggsegger, P. (1997) *J. Microsc. (Oxford)* **185**, 67–75.
- Hildebrand, T. & Rueggsegger, P. (1997) *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.* **1**, 15–23.
- Bakker, A. & Klein-Nulend, J. (2003) *Methods Mol. Med.* **80**, 19–28.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. & Bradley, A. (1991) *Cell* **64**, 693–702.
- Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., et al. (1999) *Nature* **397**, 315–323.
- Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**, 749–758.
- Faccio, R., Novack, D. V., Zallone, A., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. (2003) *J. Cell Biol.* **162**, 499–509.
- Gao, J., Zoller, K. E., Ginsberg, M. H., Brugge, J. S. & Shattil, S. J. (1997) *EMBO J.* **16**, 6414–6425.
- Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M. & Colonna, M. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 1111–1122.
- Vines, C. M., Potter, J. W., Xu, Y., Geahlen, R. L., Costello, P. S., Tybulewicz, V. L., Lowell, C. A., Chang, P. W., Gresham, H. D. & Willman, C. L. (2001) *Immunity* **15**, 507–519.
- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S. L., Brugge, J. S., Lowell, C. A. & Shattil, S. J. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 265–275.
- Urzainqui, A., Serrador, J. M., Viedma, F., Yanez-Mo, M., Rodriguez, A., Corbi, A. L., Alonso-Lebrero, J. L., Luque, A., Deckert, M., Vazquez, J. & Sanchez-Madrid, F. (2002) *Immunity* **17**, 401–412.
- Teitelbaum, S. L. (2000) *J. Bone Miner. Metab.* **18**, 344–349.
- Woodside, D. G., Obergfell, A., Talapatra, A., Calderwood, D. A., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39401–39408.
- Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., DiDomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W. C. & Baron, R. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 181–195.
- Tanaka, S., Amling, M., Neff, L., Peyman, A., Uhlmann, E., Levy, J. B. & Baron, R. (1996) *Nature* **383**, 528–531.
- Lakkakorpi, P. T., Bett, A. J., Lipfert, L., Rodan, G. A. & Duong le, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11502–11512.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., et al. (2002) *Dev. Cell* **3**, 889–901.

Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

Attila Mócsai^{1,4}, Clare L Abram^{2,4}, Zoltán Jakus¹, Yongmei Hu², Lewis L Lanier³ & Clifford A Lowell²

At sites of inflammation, ligation of leukocyte integrins is critical for the activation of cellular effector functions required for host defense. However, the signaling pathways linking integrin ligation to cellular responses are poorly understood. Here we show that integrin signaling in neutrophils and macrophages requires adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs). Neutrophils and macrophages lacking two ITAM-containing adaptor proteins, DAP12 and FcR γ , were defective in integrin-mediated responses. Activation of the tyrosine kinase Syk by integrins required that DAP12 and FcR γ were first phosphorylated by Src family kinases. Retroviral transduction of neutrophils and macrophages with wild-type and mutant Syk or DAP12 demonstrated that the Src homology 2 domains of Syk and the ITAM of DAP12 were required for integrin signaling. Our data show that integrin signaling for the activation of cellular responses in neutrophils and macrophages proceeds by an immunoreceptor-like mechanism.

Integrins are transmembrane adhesion receptors that coordinate cellular responses with the extracellular environment. Integrin function is especially important in neutrophils and macrophages, key effector cells that kill or suppress invading microorganisms during the innate immune response. In neutrophils and macrophages, integrin signaling is critical for cellular functions such as firm adhesion, cell spreading, chemotaxis, the production of reactive oxygen intermediates and the release of antimicrobial granule proteins or various cytokines¹. Genetic deficiency in the β_2 integrin chain (CD18) in children, a disease known as type I leukocyte adhesion deficiency, leads to severe bacterial infections because of impaired innate immune function^{2,3}. A similar immune defect is also reflected by the spontaneous infections in mice after targeted deletion of the gene encoding CD18 (ref. 4). In contrast, exaggerated inflammatory responses occur when integrins become inappropriately activated, as noted in animals deficient in the C-terminal Src kinase Csk⁵. Those observations demonstrate the fact that tight control over integrin signaling and function is required for appropriate coordination of innate immune and inflammatory responses.

Although several molecules required for relaying signals 'downstream' of leukocyte integrins (often called 'outside-in' signaling) have been identified, the initial steps of β_2 integrin signaling remain poorly understood. Src family kinases are involved in an early step of integrin signaling in neutrophils⁶ and macrophages^{7,8}. Also, the Syk tyrosine kinase is essential for integrin signaling in neutrophils⁹, macrophages¹⁰ and platelets¹¹. As Syk is probably involved in a receptor-proximal event during integrin signal transduction, the mechanism of activation

of Syk by integrins and its relationship to Src family kinases may be the key to understanding the initiation of integrin signaling. Unfortunately, despite attempts to clarify that issue, the mechanism of activation of Syk by integrins remains poorly understood.

Syk and the related kinase Zap70 are also essential for signaling downstream of immunoreceptors, such as B cell and T cell receptors and Fc receptors. In contrast to integrin signal transduction, the mechanism of Syk activation initiated by ligation of these immunoreceptors is well characterized. Engagement of immunoreceptors leads to Src family kinase-mediated phosphorylation of immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) on receptor-associated transmembrane adaptor proteins¹². Those adaptors provide docking sites for the tandem Src homology 2 (SH2) domains of the Syk or Zap70 tyrosine kinases, which leads to kinase activation and initiation of further downstream signaling. Genetic deletion of the ITAM-bearing adaptors (the Fc receptor γ -chain (FcR γ), immunoglobulin α , immunoglobulin β and CD3 ζ) or of Syk or Zap70 leads to defective immunoreceptor-mediated responses, such as arrested B cell or T cell development or defective FcR ϵ -mediated allergic responses¹².

In contrast to the understanding of immunoreceptor signaling, the present view is that activation of Syk by integrins does not require the interaction of the Syk SH2 domains with phosphorylated ITAM tyrosines. That conclusion originated from work reporting that Syk activation by the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, when expressed in Chinese hamster ovary cells, does not require the Syk SH2 domains and cannot be prevented by sequestration of phosphorylated ITAM-containing molecules by overexpression of the tandem SH2 domains of Syk¹³.

¹Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine, 1088 Budapest, Hungary. ²Department of Laboratory Medicine and ³Department of Microbiology and Immunology and the Cancer Research Institute, University of California, San Francisco, California 94143, USA. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to A.M. (mocsai@puskin.sote.hu) or C.A.L. (clifford.lowell@ucsf.edu).

Received 20 July; accepted 6 October; published online 5 November 2006; doi:10.1038/ni1407

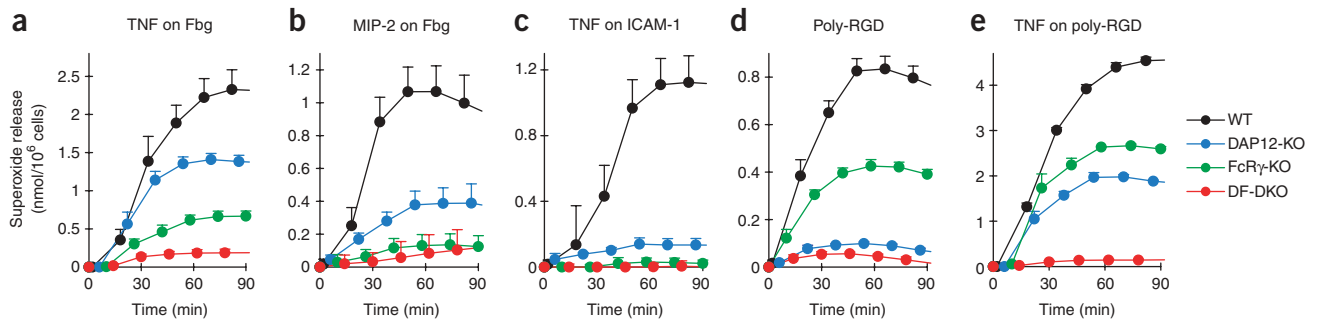


Figure 1 Defective integrin-mediated respiratory burst in DF double-knockout neutrophils. Superoxide release of wild-type neutrophils (WT), DAP12-knockout neutrophils (DAP12-KO), FcR γ -knockout neutrophils (FcR γ -KO) and DF double-knockout neutrophils (DF-DKO) plated on surfaces coated with integrin ligand (fibrinogen (Fbg; **a,b**), ICAM-1 (**c**) or poly-RGD (**d,e**)) in the presence or absence of an additional stimulus (50 ng/ml of mouse TNF (**a,c,e**), 100 ng/ml of mouse MIP-2 (**b**) or none (**d**)). Unstimulated values (no TNF or MIP-2) were subtracted from stimulated values in **a–c,e**; error bars, s.d. of triplicate measurements. Data are representative of a minimum of three independent experiments each.

Subsequent studies with bacterially expressed protein fragments and Chinese hamster ovary transfectants concluded that Syk associates directly with the cytoplasmic tail of various integrin β -subunits in a phosphorylated tyrosine-independent way^{14,15}. Those studies established the present view of phosphorylated ITAM-independent activation of Syk by integrins and suggested that immunoreceptors and integrins use two different signaling mechanisms. Unfortunately, the conclusion of those studies has not been confirmed in primary cells.

Given those uncertainties and the well established involvement of Src family kinases and ITAM-containing adaptors in Syk activation during immunoreceptor signaling, we sought to determine whether an ITAM-based mechanism was also required for integrin signaling in neutrophils and macrophages. Our analyses included various gene-targeted mouse strains combined with retroviral gene transduction of hematopoietic cells *in vivo*. Our results led us to conclude that integrin signaling in neutrophils and macrophages proceeds by an immunoreceptor-like mechanism using the ITAM-containing DAP12 and FcR γ adaptor proteins to couple integrin ligation to Syk activation and downstream signaling events.

RESULTS

Integrin responses in neutrophils lacking DAP12 and FcR γ

Neutrophils express at least two ITAM-containing transmembrane adaptors, DAP12 and FcR γ ¹². We first tested whether those molecules are required for integrin-mediated functional responses of neutrophils. Mice deficient in DAP12 (DAP12-knockout), FcR γ (FcR γ -knockout) or both adaptors (DF double-knockout) produced normal numbers of neutrophils with wild-type expression of various integrin subunits and the mouse granulocytic maturation marker Gr-1 (Supplementary Fig. 1 online), indicating that neutrophil development and integrin expression was unaffected in mice lacking either one adaptor or both adaptors.

Integrin-mediated neutrophil activation can be attained by plating the cells on a surface coated with integrin ligand (such as fibrinogen) in the presence of a proinflammatory stimulus such as tumor necrosis factor (TNF). Responses initiated by such activation require CD18 in humans¹⁶ and mice⁹. DF double-knockout neutrophils, lacking both DAP12 and FcR γ , were defective in integrin-mediated respiratory burst when plated on fibrinogen in the presence of TNF (Fig. 1a). That defect was not specific for TNF stimulation or fibrinogen, as DF double-knockout neutrophils were also impaired when plated onto fibrinogen in the presence of the chemokine MIP-2 (Fig. 1b) or when plated on ICAM-1 in the presence of TNF (Fig. 1c).

Although maximum stimulation of neutrophils requires both integrin signals and nonintegrin signals (such as TNF)¹⁷, plating of neutrophils on a surface coated with the 'engineered' multivalent integrin ligand peptide poly-RGD leads to superoxide release even in the absence of additional stimuli⁹. The defective responses of DF double-knockout neutrophils when plated on poly-RGD alone (Fig. 1d) suggested that DAP12 and/or FcR γ are required for signaling of integrins and not nonintegrin costimulatory signals. That was also confirmed by the normal responses of DF double-knockout neutrophils to TNF and MIP-2 in suspension (discussed below). The response of DF double-knockout neutrophils plated on poly-RGD in the presence of TNF, the strongest stimulus, was also defective (Fig. 1e).

In addition to stimulation of oxidative burst, engagement of CD18 by surface ligands induces degranulation, neutrophil spreading and cellular adhesion^{6,9,18}. Integrin signaling leading to the release of gelatinase granules (Fig. 2a) or of the secondary granule marker lactoferrin (data not shown) was impaired in the DF double-knockout neutrophils. DF double-knockout neutrophils also failed to spread over fibrinogen in the presence of TNF (Fig. 2b) or when plated on poly-RGD in the absence of any additional stimulus (data not shown). As a result, TNF-stimulated DF double-knockout cells did not adhere to fibrinogen as well as wild-type cells did (Fig. 2c). CD18 is required only partially for the adhesion of unstimulated neutrophils to fibrinogen⁹ (probably reflecting experimental background), which may explain the only slightly lower adhesion of unstimulated DF double-knockout cells. In all the functional assays reported above, neutrophils deficient in either DAP12 or FcR γ alone had phenotypes intermediate between those of wild-type and double-knockout responses (Figs. 1 and 2a,c), indicating partially redundant functions for DAP12 and FcR γ during integrin signaling of neutrophils.

The β_2 integrins are also required for directed migration of neutrophils to the site of inflammation⁹. However, CD18-mediated neutrophil migration can proceed in the absence of signaling molecules critical for most other CD18-dependent neutrophil functions^{9,19}. Like cells lacking Src family kinases or Syk⁹, DF double-knockout neutrophils showed a partial defect in migration toward submicromolar concentrations of the synthetic peptide fMLP (formyl-Met-Leu-Phe), but their migration was normal at higher concentrations of fMLP (Fig. 2d). DF double-knockout neutrophils also migrated normally toward various concentrations of MIP-2 *in vitro* (data not shown) and showed no substantial defect in migration in an *in vivo* thioglycollate peritonitis model (data not shown). These results indicated that like Src family kinases⁹, Syk⁹ and members of the

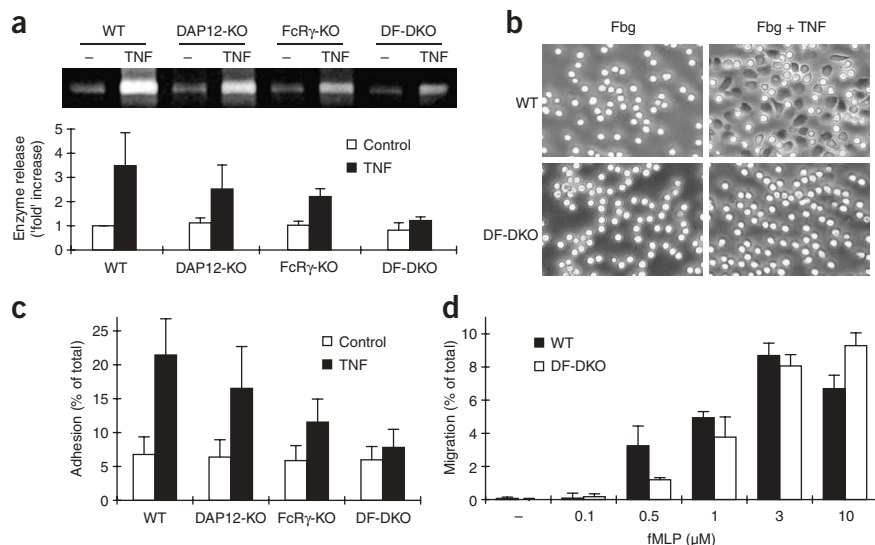


Figure 2 Defective integrin-mediated nonoxidative responses in DF double-knockout neutrophils. **(a)** Release of gelatinase granules by wild-type, DAP12-knockout, FcR γ -knockout and DF double-knockout neutrophils plated for 60 min on fibrinogen in the presence (TNF) or absence (– or Control) of 50 ng/ml of mouse TNF and analyzed by gelatinase zymogram. **(b)** Phase-contrast microscopy of wild-type and DF double-knockout neutrophils plated for 30 min on fibrinogen in the presence (right) or absence (left) of 50 ng/ml of mouse TNF. Original magnification, $\times 40$. **(c)** Firm adherence of neutrophils treated as described in **a**. **(d)** Migration of wild-type and DF double-knockout neutrophils through FCS-coated Transwells in response to increasing concentrations of fMLP, assessed after 60 min. Data are representative of a minimum of three independent experiments each (error bars, s.d. of triplicate measurements).

guanine nucleotide-exchange factor Vav family¹⁹, the ITAM-bearing molecules DAP12 and FcR γ are not critical for the CD18-dependent migration of neutrophils, despite being required for most other CD18-dependent neutrophil functions.

Integrin ligation initiates tyrosine phosphorylation of various downstream substrates. After integrin ligation, wild-type neutrophils showed increased tyrosine phosphorylation of many proteins (mainly in the 60- to 150-kilodalton range), whereas DF double-knockout neutrophils failed to show any notable changes (Fig. 3a). Specifically, integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Vav and the tyrosine kinase Pyk2, as well as phosphorylation of the Erk and p38 mitogen-activated protein kinases was impaired in DF double-knockout neutrophils (Fig. 3b–e).

Nonadherent responses in neutrophils lacking DAP12 and FcR γ

To investigate the response of DF double-knockout neutrophils to nonintegrin stimuli, we assessed many adhesion-independent responses. Upregulation of the CD11b and CD18 integrin chains (Fig. 4a,b) and phosphorylation of p38 as well as phosphorylation and degradation of the inhibitor I κ B α (Fig. 4c) all occurred normally in suspended DF double-knockout neutrophils stimulated by TNF. Phosphorylation of p38, as well as phosphorylation and degradation of I κ B α stimulated by the Toll-like receptor 2 agonist lipopeptide Pam₃CSK₄, were also similar in wild-type and DF double-knockout neutrophils (Fig. 4d). Similarly, deficiency in DAP12 and FcR γ did not affect actin polymerization responses (Fig. 4e), calcium signaling (Fig. 4f) or the phosphorylation of Erk or p38 (data not shown) after MIP-2 stimulation. Actin polymerization (data not shown), calcium signaling (Fig. 4g) and respiratory burst (Fig. 4h) induced by fMLP were normal in suspended DF double-knockout neutrophils. The double-mutant cells also responded normally to the nonphysiological neutrophil-activating agent phorbol 12-myristate 13-acetate (Fig. 4i). Thus, neither DAP12 nor FcR γ is required for adhesion-independent

neutrophil responses triggered by cytokines, Toll-like receptor ligands, chemokines or bacterial chemoattractants, indicating that the defective adhesion-dependent functions (Figs. 1–3) of the DF double-knockout cells were caused by impaired integrin signaling rather than by alterations in signaling induced by costimulatory agents such as TNF or MIP-2. Our results also demonstrated that DF double-knockout neutrophils do not have any general defects in actin polymerization, degranulation, assembly of the NADPH oxidase or initiation of multiple downstream signaling events.

Integrins signal through Src kinases, DAP12, FcR γ and Syk

The functional and signaling defects as well as the normal migratory and nonintegrin-mediated responses of DF double-knockout neutrophils are similar to those of cells deficient in Syk (Syk-knockout)^{9,20}. DAP12 and FcR γ both have functional ITAMs that can recruit and activate Syk in an immunoreceptor-like way. Consequently, we tested whether Syk activation via integrins required DAP12 or FcR γ . We readily detected phosphorylation of Syk in wild-type neutrophils plated on fibrinogen in the presence of TNF or on poly-RGD without a soluble stimulus. Kinetic analysis of the response induced by

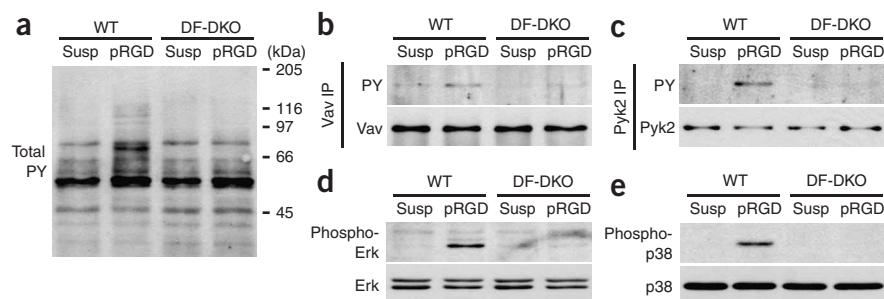


Figure 3 Defective integrin-mediated signaling in DF double-knockout neutrophils. Immunoassays of lysates of wild-type and DF double-knockout neutrophils kept in suspension (Susp) or plated for 15 min on a surface coated with poly-RGD (pRGD). **(a)** Immunoblot analysis of total lysates with antibody to phosphorylated tyrosine (PY). **(b,c)** Immunoprecipitation (IP) with anti-Vav **(b)** or anti-Pyk2 **(c)** followed by immunoblot analysis of total lysates with antibody to phosphorylated Erk (Phospho-Erk) or to total Erk (Erk; **d**) or with antibody to phosphorylated p38 (Phospho-p38) or to total p38 (p38; **e**). All data are representative of three or more independent experiments.

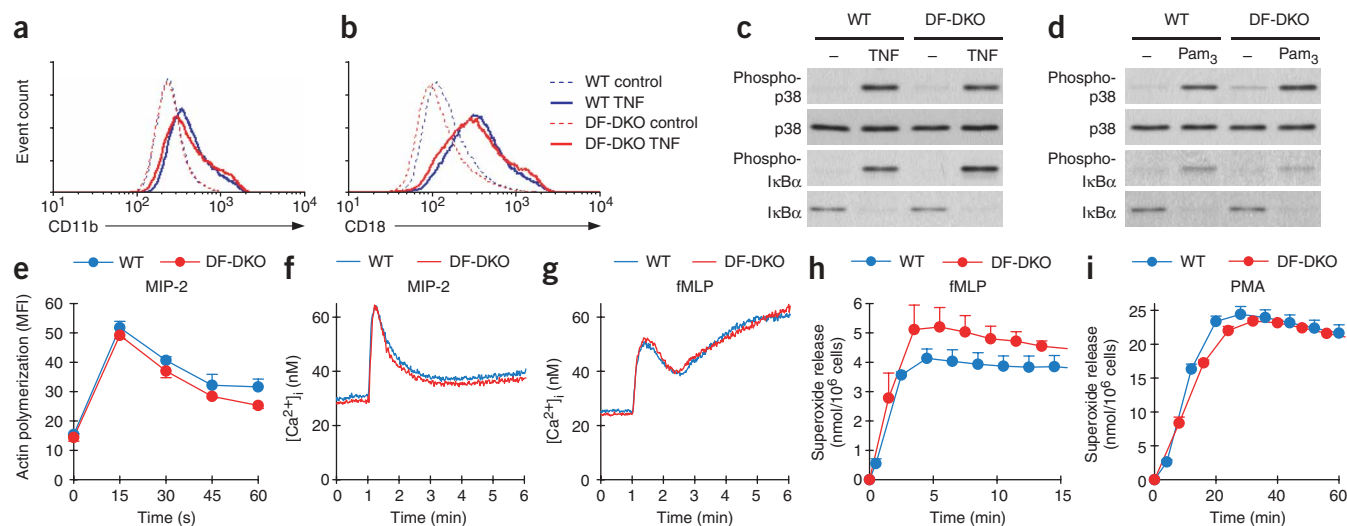


Figure 4 Normal adhesion-independent responses of DF double-knockout neutrophils. **(a,b)** Flow cytometry of surface expression of CD11b **(a)** and CD18 **(b)** by wild-type or DF double-knockout neutrophils stimulated in suspension for 30 min with 50 ng/ml of mouse TNF or left unstimulated (Control). **(c,d)** Immunoblot of lysates of suspended wild-type or DF double-knockout neutrophils left unstimulated (–) or stimulated for 5 min with 50 ng/ml of mouse TNF **(c)** or for 10 min with 1 μ g/ml of Pam₃CSK₄ (Pam₃; **d**). Antibodies, left margin (Phospho-, phosphorylated). **(e)** Actin polymerization by suspended wild-type or DF double-knockout neutrophils stimulated with 10 ng/ml of mouse MIP-2. MFI, mean fluorescent intensity. **(f,g)** Release of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) from suspended wild-type and DF double-knockout neutrophils stimulated with 100 ng/ml of mouse MIP-2 **(f)** or 3 μ M fMLP **(g)**. **(h,i)** Superoxide release from suspended wild-type and DF double-knockout neutrophils pretreated with 10 μ M cytochalasin B and stimulated with 3 μ M fMLP **(h)** or stimulated with 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; **i**). Unstimulated values are subtracted in **h** and **i**. Data are representative of a minimum of three independent experiments each (error bars, s.d. of triplicate measurements).

poly-RGD showed that Syk phosphorylation was detectable in wild-type cells after 5 min of stimulation and reached a maximum between 10 and 20 min (data not shown). In contrast, there was no Syk phosphorylation in DF double-knockout neutrophils plated on fibrinogen in the presence of TNF (**Fig. 5a**) or on poly-RGD without an additional stimulus (**Fig. 5b**). Basal phosphorylation of Syk in unstimulated cells is independent of both adhesion and β_2 integrins⁹.

Integrin-mediated phosphorylation of Syk was also defective in neutrophils lacking the Src family kinases Hck, Fgr and Lyn⁹ (**Fig. 5c,d**), as well as in human neutrophils pretreated with the Src family kinase inhibitor PP2 (**Supplementary Fig. 2** online). Such data are consistent with the fact that neutrophils deficient in Src family kinases have integrin signaling defects similar to those of Syk-knockout or DF double-knockout cells^{6,9,18,21}. Src family kinases mediate ITAM phosphorylation, resulting in recruitment of Syk during immunoreceptor signaling¹². We speculated that Src family kinases might phosphorylate DAP12 and/or Fc γ after integrin engagement in neutrophils. Plating wild-type neutrophils on poly-RGD induced DAP12 phosphorylation (**Fig. 5e**), which was absent in neutrophils lacking Src family kinases (**Fig. 5f**). To confirm that result and to assess adhesion-induced phosphorylation of the Fc γ chain, we used a glutathione S-transferase (GST) fusion protein of the tandem SH2 domains of Syk (GST-Syk-(SH2)₂) as a 'probe' for phosphorylated tyrosine. The GST-Syk-(SH2)₂ probe precipitated tyrosine-phosphorylated proteins of about 30 kilodaltons (corresponding to the molecular weight of DAP12 and Fc γ in nonreducing conditions) from adherent wild-type but not DF double-knockout neutrophils (**Fig. 5g**) with kinetics similar to those of Syk phosphorylation (data not shown). A similar phosphorylation signal was lacking in mouse neutrophils deficient in Src family kinases (**Fig. 5h**) and PP2-treated human neutrophils (**Supplementary Fig. 2**). Similar experiments with DAP12-knockout or Fc γ -knockout single-mutant cells in reducing conditions showed that the upper and lower bands of the immunoblot

corresponded to DAP12 and Fc γ , respectively (**Fig. 5i,j**). Notably, those phosphorylated proteins were not precipitated with a GST-Syk-(SH2)₂ fusion protein containing substitutions (R41A and R194A) known to impair the phosphorylated tyrosine-binding capacity of both SH2 domains (**Fig. 5k**). Although we were not able to detect immunoprecipitation of Syk together with DAP12 or Fc γ by immunoblot, we did note Syk autophosphorylation in Fc γ immunoprecipitates from adherent wild-type neutrophils but not from cells deficient in either Fc γ or Syk, which was consistent with integrin-stimulated recruitment of Syk to phosphorylated Fc γ (**Fig. 5l** and **Supplementary Fig. 3** and **Supplementary Note** online). However, we were unable to reproducibly use a similar approach to demonstrate association of Syk with DAP12 because of high signal background obtained with the antisera.

Our results presented above indicated that ligation of neutrophil integrins leads to phosphorylation of DAP12 and Fc γ by members of the Src kinase family. Such phosphorylation allows the adaptors to associate with the tandem SH2 domains of Syk by a phosphorylated ITAM-SH2 interaction, leading to Syk activation (**Supplementary Fig. 4** online). That pathway of integrin signaling to Syk is analogous to the ITAM-based signaling by classical immunoreceptors in lymphocytes.

Integrin signaling requires Syk SH2 domains and DAP12 ITAM

To confirm the functional involvement of an immunoreceptor-like, ITAM-based mechanism during integrin signaling in neutrophils, we did structure-function studies by expressing wild-type and mutant versions of Syk or DAP12 in Syk-knockout or DF double-knockout neutrophils *in vivo*. As neutrophils are short-lived, terminally differentiated cells in which expression of exogenously added gene products is very limited, these experiments required the transduction of hematopoietic stem cells, which we then injected into lethally irradiated recipient mice to allow *in vivo* generation of transduced neutrophils. That approach allowed us to use primary neutrophils for

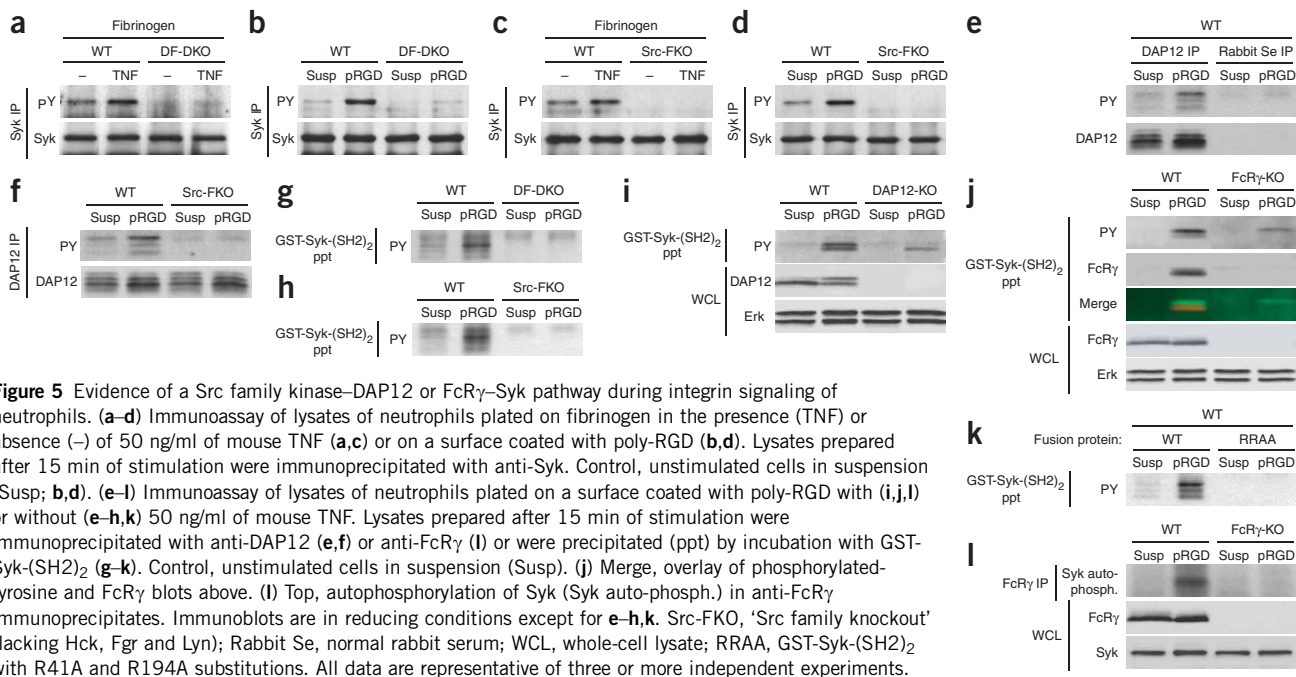


Figure 5 Evidence of a Src family kinase–DAP12 or FcR γ –Syk pathway during integrin signaling of neutrophils. **(a–d)** Immunoassay of lysates of neutrophils plated on fibrinogen in the presence (TNF) or absence (–) of 50 ng/ml of mouse TNF **(a,c)** or on a surface coated with poly-RGD **(b,d)**. Lysates prepared after 15 min of stimulation were immunoprecipitated with anti-Syk. Control, unstimulated cells in suspension (Susp); **b,d**. **(e–l)** Immunoassay of lysates of neutrophils plated on a surface coated with poly-RGD with **(i,j,l)** or without **(e–h,k)** 50 ng/ml of mouse TNF. Lysates prepared after 15 min of stimulation were immunoprecipitated with anti-DAP12 **(e,f)** or anti-FcR γ **(l)** or were precipitated (ppt) by incubation with GST-Syk-(SH2) $_2$ **(g–k)**. Control, unstimulated cells in suspension (Susp). **(j)** Merge, overlay of phosphorylated-tyrosine and FcR γ blots above. **(l)** Top, autophosphorylation of Syk (Syk auto-phosph.) in anti-FcR γ immunoprecipitates. Immunoblots are in reducing conditions except for **e–h,k**. Src-FKO, ‘Src family knockout’ (lacking Hck, Fgr and Lyn); Rabbit Se, normal rabbit serum; WCL, whole-cell lysate; RRAA, GST-Syk-(SH2) $_2$ with R41A and R194A substitutions. All data are representative of three or more independent experiments.

these studies and hence was much more physiologically relevant than previously published approaches. We transduced hematopoietic stem cells using an mouse stem cell virus-based bicistronic retroviral vector expressing green fluorescent protein (GFP) from a downstream internal ribosome entry site, thereby allowing the identification of transduced cells by flow cytometry²². Retroviral expression of wild-type Syk in Syk-knockout neutrophils restored the respiratory-burst response of cells stimulated by adhesion to poly-RGD in the presence of TNF (**Fig. 6a**). In contrast, an SH2-defective point mutant of Syk that no longer bound phosphorylated ITAMs (R194A)²² did not restore a functional response, although a similar percentage of cells expressed GFP and an equivalent amount of Syk protein was expressed (**Fig. 6b**). We obtained similar results when we restored Syk expression by retroviral introduction of wild-type or SH2-defective versions of a

Syk-GFP fusion protein (data not shown). Retroviral expression of a kinase-inactive Syk mutant also failed to correct the integrin-mediated functional defect of Syk-knockout neutrophils (data not shown). Our data suggested that functional phosphorylated tyrosine-binding SH2 domains of Syk (as well as Syk kinase activity) are required for the integrin-mediated activation of neutrophils.

We also tested whether expression of DAP12 or of an ITAM-defective mutant of DAP12 in which the two ITAM tyrosine residues were replaced by phenylalanine residues (Y65F and Y76F)²² was able to restore the adhesion-dependent functional responses of DF double-knockout neutrophils. Because cell surface expression of DAP12 is required for its function, we tested effective reconstitution by both immunoblot and flow cytometry analysis for the Flag epitope tag attached to the N terminus of recombinant DAP12. *In vivo* expression

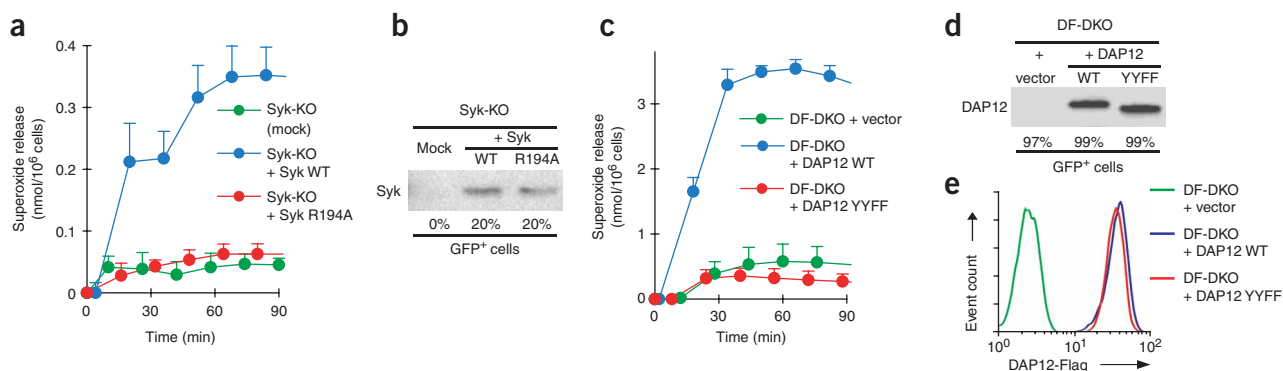


Figure 6 Critical function for the Syk SH2 domains and the ITAM tyrosine residues of DAP12 for integrin-mediated responses of neutrophils. Retrovirus-transduced Syk-knockout (**a,b**) or DF double-knockout (**c-e**) fetal liver hematopoietic stem cells were injected into lethally irradiated recipient mice and, after reconstitution of the hematopoietic system, neutrophils were isolated for functional and gene expression studies. (**a,c**) Respiratory burst of neutrophils (purified from reconstituted mice) stimulated with 50 ng/ml of mouse TNF on a surface coated with poly-RGD (unstimulated values are subtracted; error bars, s.d. of triplicate measurements). (**b,d**) Immunoblot of protein expression and flow cytometry for percent GFP⁺ cells (below lanes). Control, neutrophils purified from mice reconstituted with stem cells that were 'mock infected' (Mock) or were infected with vector only (+ vector). (**e**) Flow cytometry for surface expression of exogenous DAP12 on transduced DF double-knockout neutrophils, detected by anti-Flag. YYFF, DAP12 Y65F and Y76F mutant. Data in **a,b** and in **c-e** are from the same experiment and are representative of three to five independent experiments.

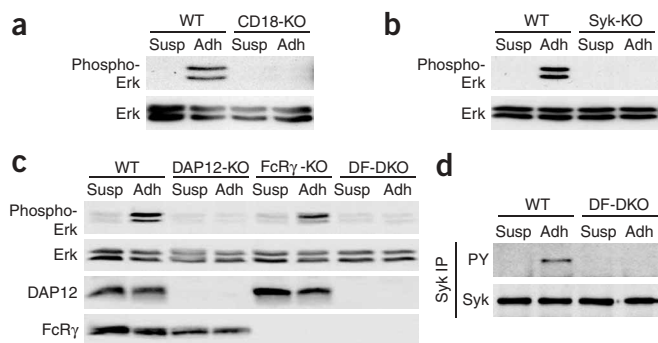


Figure 7 Defective integrin-mediated responses in DF double-knockout macrophages. Bone marrow-derived macrophages were plated on Valmark dishes for 30–45 min (Adh) or were kept in suspension (Susp), then lysates were prepared. (a–c) Immunoblot analysis of Erk phosphorylation. (d) Immunoprecipitation with anti-Syk, followed by immunoblot analysis of tyrosine phosphorylation. All data are representative of three or more independent experiments.

of wild-type DAP12 in DF double-knockout neutrophils restored the integrin-mediated respiratory burst (Fig. 6c) to a burst equivalent to that of single-mutant FcRγ-knockout cells. In contrast, the ITAM-defective DAP12 mutant was unable to restore superoxide release in DF double-knockout neutrophils, despite having similar expression (Fig. 6d,e). These results suggested that the ITAM tyrosines of DAP12 are required for the DAP12-dependent component of integrin-mediated neutrophil activation.

Integrin responses in macrophages lacking DAP12 and FcRγ

Like neutrophils, integrin-mediated activation of macrophages also requires Syk¹⁰, which prompted us to investigate whether DAP12 and FcRγ are involved in integrin signaling of macrophages. We plated bone marrow-derived macrophages on Valmark plastic Petri dishes, which engages CD18 integrins²³. As a 'readout' of integrin-mediated macrophage activation, we used biochemical analysis of Erk phosphorylation, because that response (unlike most functional responses, such as the release of proinflammatory cytokines) could be readily induced by cellular adhesion without a soluble stimulus and, as predicted from published studies^{10,23}, required both the CD18 integrin chain (Fig. 7a) and the Syk tyrosine kinase (Fig. 7b). Adhesion-dependent Erk phosphorylation was absent from DF double-knockout macrophages, with predominant involvement of DAP12 in this response (Fig. 7c). The defective Erk activation in DF double-knockout macrophages was not due to the lack of β₂ integrins or altered macrophage development, because wild-type and double-mutant cells had equal expression of CD18 as well as other integrins and macrophage markers (Supplementary Fig. 5 online and data not shown). Our data demonstrated that like neutrophils, macrophages lacking the ITAM-containing adaptors have defective integrin signaling responses, and although neutrophils can use both DAP12 and FcRγ, loss of DAP12 alone is sufficient to impair integrin signaling in macrophages. Adhesion-dependent Syk phosphorylation was also defective in DF double-knockout macrophages (Fig. 7d), consistent with a requirement for ITAM-containing adaptors in Syk activation.

Immunoreceptor-like signaling by macrophage integrins

To further confirm the ITAM model for integrin signaling in macrophages, we did a series of retroviral reconstitution experiments. Retroviral expression of wild-type Syk in Syk-knockout macrophages restored adhesion-dependent Erk phosphorylation, whereas comparable expression of the SH2-defective Syk mutant (R194A) did not (Fig. 8a). Similarly, reconstitution of DF double-knockout macrophages with wild-type DAP12 restored adhesion-dependent Erk phosphorylation, but reconstitution with the ITAM-defective DAP12 mutant did not (Fig. 8b). We confirmed equivalent expression of wild-type or mutant DAP12 by immunoblot and found equivalent surface expression of exogenous DAP12 by flow cytometry (Fig. 8b,c). These results indicated that an interaction between the Syk SH2 domains and the ITAM of DAP12 is required for signaling downstream of integrins in macrophages.

DISCUSSION

Many studies have demonstrated the dependence on Src family and Syk tyrosine kinases in both integrin and immunoreceptor signaling pathways. With those observations in mind, we tested the hypothesis that similar signaling adaptors are needed to initiate both pathways. We found that the ITAM-containing molecules DAP12 and FcRγ were indispensable for β₂ integrin-mediated Syk activation and cellular responses in neutrophils and macrophages. Integrin-dependent functions that do not require Src family kinases or Syk, such as neutrophil migration, also did not require DAP12 or FcRγ. After integrin ligation, the ITAM-bearing adaptor molecules became phosphorylated by Src family kinases and associated with the SH2 domains of Syk. Structure-function analysis of neutrophils and macrophages suggested that integrin signaling requires the SH2 domains of Syk and the ITAM tyrosine residues of DAP12 (and probably FcRγ). These data have demonstrated that signal transduction by β₂ integrins follows the ITAM-based paradigm of immunoreceptor signaling. The unexpected similarity between proximal signaling by adhesion receptors and receptors of the adaptive immune system can be extended further downstream, as members of the Vav and SLP-76 families, originally thought to be involved mainly in lymphocyte antigen receptor signaling^{24,25}, have been shown to be required for integrin signaling in neutrophils^{19,26}, macrophages²⁷, osteoclasts²⁸ and platelets²⁹.

Our findings challenge the present view of integrin signal transduction, which is proposed to be unrelated to immunoreceptor-like signaling mechanisms. In particular, it has been concluded that the SH2 domains of Syk are not required for its activation by the platelet integrin α_{IIb}β₃ heterologously expressed in Chinese hamster ovary

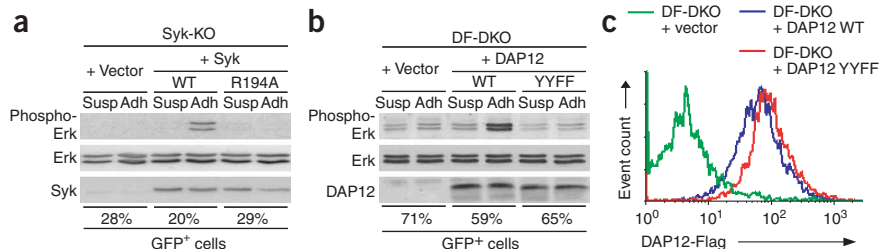


Figure 8 Immunoreceptor-like signaling by macrophage integrins. (a,b) Immunoblot analysis of Erk phosphorylation and flow cytometry of percent GFP⁺ cells (below lanes) for Syk-knockout (a) or DF double-knockout (b) bone marrow-derived macrophages infected with retrovirus containing wild-type or mutant Syk or DAP12, respectively, then plated on Valmark dishes for 30–45 min; cell lysates were prepared and analyzed. (c) Flow cytometry for surface expression of exogenous DAP12 on GFP⁺ macrophages from a,b, detected by anti-Flag staining. Data are representative of at least four independent experiments.

cells¹³. Although the reason for that apparent contradiction is unclear, it may result from differential signaling by β_2 and β_3 integrins or alternative signaling pathways used by the $\alpha_{IIb}\beta_3$ heterodimers when expressed in nonhematopoietic cells that do not express ITAM-containing adaptors. Related to that issue is the reported direct binding of Syk to the cytoplasmic tails of multiple integrin β -chains in a phosphorylated ITAM-independent way when expressed together in nonhematopoietic cells^{14,15}. However, those observations do not exclude the possibility of a phosphorylated ITAM-dependent step in the integrin-mediated activation of Syk.

Both DAP12 and Fc γ R associate with many cell surface receptors in various hematopoietic cell types¹². The molecular basis of that association is the presence of opposing charged residues in the transmembrane segments of the molecules involved, allowing intramembrane salt bridges to be formed between DAP12 or Fc γ R and their associated receptors. Integrins lack such charged residues in their transmembrane segments. Furthermore, the surface expression of integrins was normal in DF double-knockout leukocytes, unlike that of most DAP12- or Fc γ R-associated receptors. In addition, we were unable to demonstrate immunoprecipitation of DAP12 or Fc γ R together with CD18 in adherent neutrophils. Therefore, integrins are unlikely to associate directly with DAP12 or Fc γ R.

A more likely scenario is that DAP12- or Fc γ R-associated receptors are functionally linked to integrins and participate in their signal transduction in an ITAM-dependent way. That hypothesis is also supported by preliminary experiments in which a DAP12 transmembrane 'charge mutant' unable to associate with known DAP12-associated receptors failed to restore integrin-dependent signaling to DAP12-deficient macrophages (C.L.A. and C.A.L., unpublished observations). Although reports have suggested that ITAM-containing Fc receptors and integrins may function cooperatively^{17,30}, it is unlikely that the Fc receptors themselves couple ITAM-containing adaptors to the integrin signaling pathway, for several reasons. First, DF double-knockout cells have functional and signaling defects even in the absence of Fc receptor-ligating immunoglobulins; second, DAP12 is important in integrin-mediated responses even though it does not associate with Fc receptors; and third, TNF-induced responses of neutrophils plated on fibrinogen were normal in neutrophils lacking the Fc γ R-associated receptors Fc γ RI and Fc γ RIII (Z.J. and A.M., unpublished observations). Given the many non-Fc receptor molecules identified that associate with and signal through DAP12 and Fc γ R¹², it is likely that DAP12- or Fc γ R-associated molecules other than Fc receptors might be involved in integrin signaling of neutrophils and macrophages.

The association of integrins and ITAM-containing adaptors could be through interactions between amino acids outside the transmembrane domain, through interactions with other cell surface molecules, such as tetraspanins, which seem to regulate integrin signals in many cell types³¹, or through the association with lipid microdomains, although the last possibility has not been fully investigated in neutrophil signal transduction. Determining the molecular details of how β_2 integrins couple to DAP12 or Fc γ R is an area for further research. Furthermore, it is unclear whether integrins discriminate between different ITAM-containing adaptors for signaling, as do immunoreceptors.

We have shown here that integrin signaling in neutrophils and macrophages uses an ITAM-based, immunoreceptor-like mechanism acting via the DAP12 and Fc γ R adaptor molecules. Our findings fundamentally alter the present view of integrin 'outside-in' signal transduction in hematopoietic cells. They may also provide new insights into the pathogenesis of, and possible targets for the therapy of, infectious and inflammatory diseases.

Note added in proof: It has been independently confirmed that the SH2 domains of Syk are required for integrin signaling in neutrophils³².

METHODS

Animals. *Tyrbp*^{-/-} (DAP12-knockout) mice³³ were crossed with *Fcer1g*^{-/-} (Fc γ R-knockout) mice³⁴ (Taconic) to generate *Tyrbp*^{-/-}*Fcer1g*^{-/-} (DF double-knockout) mice. Single- and double-knockout mice as well as wild-type control mice were identified by PCR-based genotyping. *Syk*^{-/-} (Syk-knockout) mice have been described³⁵. Syk-knockout and wild-type control cells were obtained from bone marrow chimeras generated by using fetal liver cells to reconstitute lethally irradiated mice as described⁹. *Itgb2*^{-/-} (CD18-knockout) mice have been described⁴. Mice lacking the Src family kinases Hck, Fgr and Lyn have also been described⁹. All mice were backcrossed to the C57BL/6 background for six or more generations. Mice were kept in a specific pathogen-free facility (University of California, San Francisco) or in individually sterile ventilated cages in a conventional facility (Simmelweis University School of Medicine). All experiments were approved by the University of California, San Francisco Institutional Animal Care and Use Committee and by the Committee on Animal Experimentation of Semmelweis University.

Reagents. Antibodies were from the sources described^{9,20,22} except antibody to IkB α (anti-IkB α) (Cell Signaling Technologies), biotin-conjugated anti-Flag (Sigma), Alexa Fluor 680-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen) and IRDye 800-conjugated goat anti-mouse (Rockland Immunochemicals), and anti-Syk and anti-DAP12. The SH2-defective version of the GST-Syk-(SH2)₂ fusion protein was generated by the introduction of R41A and R194A substitutions with the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). Wild-type and mutant Syk and DAP12 constructs have been described²².

Neutrophil assays. Neutrophil isolation, flow cytometry and functional assays were done as described^{9,20}. For gelatinase zymography, sample buffer (10% (volume/volume) glycerol, 2% (weight/volume) SDS, 5 mg/ml of bromophenol blue and 62.5 mM Tris, pH 6.8) was added to cell supernatants, which were separated by zymogram gel electrophoresis (Invitrogen), were renatured in 2.5% (volume/volume) Triton X-100 and were developed overnight at 37 °C (in 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris, pH 7.4, and 2.5 μ g/ml of NaN₃) followed by Coomassie blue staining. An Alpha Innotech Alphaimager was used for quantification. Migration experiments were done with Transwell inserts with an FCS-coated, 3- μ m polycarbonate membrane (Corning) essentially as described⁹. Measurement of actin polymerization after chemokine or fMLP stimulation was done by a flow cytometry-based phalloidin-binding assay as described²⁰.

Immunoblot and immunoprecipitation. These experiments were done as described^{9,20,22}. Some immunoblots used fluorescence-labeled secondary antibodies followed by detection with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). The GST-Syk-(SH2)₂ fusion protein was coupled to glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) and the result was incubated with cell lysates prepared with Triton X-100 (ref. 36) or radioimmunoprecipitation assay buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (volume/volume) Triton X-100 buffer, 1% (weight/volume) sodium deoxycholate, 0.1% (weight/volume) SDS, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 10 μ g/ml of leupeptin, 2 μ g/ml of aprotinin, 1 mM dithiothreitol, 1 μ g/ml of pepstatin and 1 mM di-isopropyl fluorophosphate). Syk kinase autophosphorylation assays were done on anti-Fc γ R immunoprecipitates 'captured' with protein A/G PLUS-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) from Nonidet-P40 lysates (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl and 1% (volume/volume) Nonidet-P40, plus the inhibitors listed above). Beads were washed once with kinase assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂ and 1 mM dithiothreitol), then were incubated for 20 min at 25 °C in kinase assay buffer containing 10 μ Ci [γ -³²P]ATP. The reaction was stopped by the addition of sample buffer, then samples were boiled and separated by SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie blue, were destained and dried and were exposed to X-ray film.

Retroviral gene transduction. Retroviral supernatants were generated by transient cotransfection of 293T cells with the pMIG-W vector containing

wild-type and mutant Syk or DAP12 and plasmids containing MoMuLV gag-pol and VSVg envelope with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). For neutrophil reconstitution, fetal liver cells from day-16 Syk-knockout or DF double-knockout embryos were cultured for 24 h in DMEM with 10% (volume/volume) FCS containing penicillin and streptomycin, 20 ng/ml of mouse IL-3, 10 ng/ml of mouse IL-6 and 100 ng/ml of mouse SCF (R&D Systems). Retroviral supernatants supplemented with cytokines and 8 µg/ml of polybrene (Sigma) were added to fetal liver cells, which were then centrifuged for 1 h at 800g and 25 °C, followed by incubation for 8–12 h at 37 °C in 5% CO₂. A second infection was done, and 48–72 h after being collected, the infected fetal liver cells were injected into lethally irradiated 6- to 8-week-old male Ly5.1 congenic recipients (Taconic). Peripheral blood from the chimeras was analyzed by flow cytometry 6 weeks after transfer (to assess chimerism by GFP expression and staining for the Ly5.1 and Ly5.2 markers) before characterization of purified neutrophils.

For macrophage reconstitution, bone marrow was collected from Syk-knockout fetal liver chimeras or DF double-knockout mice. Cells were cultured for 24 h in α -MEM with 10% (volume/volume) FCS containing penicillin, streptomycin and conditioned medium from 3T3 cells expressing mouse monocyte colony-stimulating factor. Suspended cells were incubated overnight at 37 °C in 5% CO₂ with retroviral supernatants supplemented with 8 µg/ml of polybrene and medium conditioned with monocyte colony-stimulating factor, followed by a repeat overnight infection. The viral supernatant was replaced with culture medium and cells were differentiated for 6–9 d. Identical results were obtained with a published macrophage infection protocol³⁷. Infected macrophages were analyzed by flow cytometry for GFP expression and expression of the macrophage markers F4/80 and CD11b. Infected macrophages were detached from plates with cell-dissociation buffer (Invitrogen), were resuspended in DMEM with 2% (volume/volume) FCS and were allowed to 'rest' for 2–4 h at 37 °C on a rocking platform. Cells were collected in suspension or were plated onto Valmark plastic Petri dishes for 45 min at 37 °C before being lysed in radioimmunoprecipitation buffer.

Note: Supplementary information is available on the Nature Immunology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Refaeli for the pMIG-W vector; K. Makara and Á. Mikešy for mouse colony management; M. Kovács for help with experiments; and A. Erdei for access to equipment. *Syk*^{+/−} mice and anti-Syk were from V. Tybulewicz (National Institute for Medical Research); *Itgb2*^{−/−} (CD18-knockout) mice were from A. Beaudet (Baylor College of Medicine); anti-DAP12 was from T. Takai (Tohoku University); and the GST-Syk-(SH2)₂ fusion protein was from A. DeFranco (University of California, San Francisco). Supported by the US National Institutes of Health (TW006831 to C.A.L. and A.M.; AI065150 and AI065495 to C.A.L.; and AI068129 to L.L.L.), the Hungarian National Scientific Research Fund (T046409 to A. M.), the Wellcome Trust (A.M.), the European Molecular Biology Organization–Howard Hughes Medical Institute (A.M.), the Hungarian Academy of Sciences (Bolyai Research Fellowship to A.M.) and the American Cancer Society Research (L.L.L.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M. and C.A.L. initiated the study; A.M., C.L.A., Z.J. and C.A.L. designed and did the experiments; A.M. supervised the work in Budapest; Y.H. did fetal liver stem cell transfers and maintained mouse colonies; L.L.L. provided intellectual guidance and manuscript editing; and A.M., C.L.A. and C.A.L. wrote the manuscript.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureimmunology/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Berton, G. & Lowell, C.A. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal*. **11**, 621–635 (1999).
- Bunting, M., Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. & Zimmerman, G.A. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving β_2 integrins and selectin ligands. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 30–35 (2002).
- Rosenzweig, S.D. & Holland, S.M. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 620–626 (2004).

- Scharffetter-Kochanek, K. *et al.* Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J. Exp. Med.* **188**, 119–131 (1998).
- Thomas, R.M. *et al.* C-terminal SRC kinase controls acute inflammation and granulocyte adhesion. *Immunity* **20**, 181–191 (2004).
- Lowell, C.A., Fumagalli, L. & Berton, G. Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58^{c-fgr} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* **133**, 895–910 (1996).
- Suen, P.W. *et al.* Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck/Fgr deficient macrophages. *J. Cell Sci.* **112**, 4067–4078 (1999).
- Meng, F. & Lowell, C.A. A β_1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J.* **17**, 4391–4403 (1998).
- Mócsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V.L. & Lowell, C.A. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* **16**, 547–558 (2002).
- Vines, C.M. *et al.* Inhibition of β_2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* **15**, 507–519 (2001).
- Obergfell, A. *et al.* Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $\alpha_{IIb}\beta_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **157**, 265–275 (2002).
- Fodor, S., Jakus, Z. & Mócsai, A. ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol. Lett.* **104**, 29–37 (2006).
- Gao, J., Zoller, K.E., Ginsberg, M.H., Brugge, J.S. & Shattil, S.J. Regulation of the pp72^{syk} protein tyrosine kinase by platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *EMBO J.* **16**, 6414–6425 (1997).
- Woodside, D.G. *et al.* Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin β cytoplasmic domains. *Curr. Biol.* **11**, 1799–1804 (2001).
- Woodside, D.G. *et al.* The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin β cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* **277**, 39401–39408 (2002).
- Nathan, C. *et al.* Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J. Cell Biol.* **109**, 1341–1349 (1989).
- Jakus, Z., Berton, G., Ligeti, E., Lowell, C.A. & Mócsai, A. Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on costimulation through low affinity Fc γ Rs: full activation requires both integrin and nonintegrin signals. *J. Immunol.* **173**, 2068–2077 (2004).
- Mócsai, A., Ligeti, E., Lowell, C.A. & Berton, G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* **162**, 1120–1126 (1999).
- Gakidis, M.A. *et al.* Vav GEFs are required for β_2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J. Cell Biol.* **166**, 273–282 (2004).
- Mócsai, A. *et al.* G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood* **101**, 4155–4163 (2003).
- Pereira, S., Zhou, M., Mócsai, A. & Lowell, C. Resting murine neutrophils express functional α_4 integrins that signal through Src family kinases. *J. Immunol.* **166**, 4115–4123 (2001).
- Mócsai, A. *et al.* The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (Fc γ R γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6158–6163 (2004).
- Roach, T. *et al.* CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr. Biol.* **7**, 408–417 (1997).
- Turner, M. & Billadeau, D.D. Vav proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 476–486 (2002).
- Koretzky, G.A., Abtahian, F. & Silverman, M.A. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 67–78 (2006).
- Newbrough, S.A. *et al.* SLP-76 regulates Fc γ receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity* **19**, 761–769 (2003).
- Hall, A.B. *et al.* Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in Fc γ R- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* **24**, 305–316 (2006).
- Faccio, R. *et al.* Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat. Med.* **11**, 284–290 (2005).
- Obergfell, A. *et al.* The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **276**, 5916–5923 (2001).
- Zhou, M.J. & Brown, E.J. CR3 (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) and Fc γ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc γ RIII and tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* **125**, 1407–1416 (1994).
- Tarrant, J.M., Robb, L., van Sriel, A.B. & Wright, M.D. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol.* **24**, 610–617 (2003).
- Abtahian, F. *et al.* *Mol. Cell Biol.* **26**, 6936–6949 (2006).
- Bakker, A.B. *et al.* DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. *Immunity* **13**, 345–353 (2000).
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. & Ravetch, J.V. Fc γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* **76**, 519–529 (1994).
- Turner, M. *et al.* Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* **378**, 298–302 (1995).
- Mócsai, A. *et al.* 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.* **54**, 781–789 (1997).
- Nishiya, T. & DeFranco, A.L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 19008–19017 (2004).

Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis

Zoltán Jakus,¹ Edina Simon,¹ David Frommhold,² Markus Sperandio,³ and Attila Mócsai¹

¹Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine, 1094 Budapest, Hungary

²Department of Neonatology, University Children's Hospital, 69120 Heidelberg, Germany

³Walter Brendel Center of Experimental Medicine, Ludwig-Maximilians-University, 81377 Munich, Germany

β_2 integrins and Fc γ receptors are critically involved in neutrophil activation at the site of inflammation. Both receptor types trigger a receptor-proximal tyrosine phosphorylation cascade through Src family kinases and Syk, but further downstream signaling events are poorly understood. We show that phospholipase C (PLC) γ 2 is phosphorylated downstream of Src family kinases and Syk during integrin or Fc receptor-mediated activation of neutrophils. PLC γ 2^{-/-} neutrophils are completely defective in β_2 integrin or Fc γ receptor-mediated functional responses such as respiratory burst, degranulation, or cell spreading in vitro and show reduced adhesion/spreading in inflamed capillary venules in vivo. However, PLC γ 2^{-/-} neutrophils respond normally to various other agonists, including chemokines, bacterial formyl peptides, Toll-like receptor ligands, or proinflammatory cytokines, and migrate normally both in vitro and in vivo. To confirm the in vivo relevance of these observations, the effect of the PLC γ 2^{-/-} mutation was tested in the K/BxN serum transfer arthritis model, which is known to require β_2 integrins, Fc γ receptors, and neutrophils. PLC γ 2 deficiency completely protected mice from clinical signs and histological features of arthritis as well as from arthritis-induced loss of articular function. These results identify PLC γ 2 as a critical player of integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the neutrophil-mediated effector phase of autoimmune arthritis.

CORRESPONDENCE

Attila Mócsai:
mocsai@eok.sote.hu

Abbreviations used: ERK, extracellular signal-regulated kinase; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; PLC, phospholipase C.

Neutrophils play a critical role in innate immune defense, but their improper activation also contributes to tissue damage during autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (1–5). Neutrophils use several cell surface receptors to sense their environment including β_2 integrins, immunoglobulin Fc receptors, various G protein-coupled (e.g., formyl peptide or chemokine) receptors, Toll-like receptors, and receptors for various proinflammatory cytokines.

Lymphocyte antigen receptors, Fc ϵ receptors of mast cells, and Fc γ receptors of macrophages use a common receptor-proximal signal transduction machinery consisting of the sequential activation of Src family kinases, immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) containing transmembrane adapters, and the Syk or the ZAP-70 tyrosine kinase. Studies from other groups (6, 7) and our own unpublished

observations indicate that neutrophil Fc γ receptors also use a receptor-proximal Src family-ITAM-bearing adaptor-Syk signaling pathway. We have recently shown that β_2 integrins in neutrophils signal through a conceptually similar receptor-proximal pathway, using Src family kinases (8, 9), two ITAM-bearing transmembrane adapters (DAP12 and the Fc receptor γ chain) (10), and the Syk tyrosine kinase (11). We and others have reported similar ITAM-based integrin signaling pathways in other cell types including macrophages (10), platelets (12), osteoclasts (13), dendritic cells (14), and microglia (15). Collectively, integrins and Fc receptors in

© 2009 Jakus et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

various hematopoietic lineages signal through a conceptually similar ITAM-based receptor-proximal tyrosine phosphorylation cascade (for review see reference 16). However, the signal transduction mechanisms downstream of this common receptor-proximal pathway are poorly understood.

Phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC) enzymes catalyze the breakdown of the membrane lipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to inositol-3,4,5-trisphosphate and diacylglycerol, triggering a concomitant Ca^{2+} signal and protein kinase C activation. Of the best known PLC isoforms, the PLC β family is activated by G protein-coupled receptors, whereas the PLC γ family is activated downstream of tyrosine phosphorylation pathways. There are two known PLC γ isoforms: PLC γ 1 is ubiquitously expressed, whereas PLC γ 2 is preferentially expressed in the hematopoietic system. Genetic deficiency of PLC γ 1 leads to embryonic lethality, likely as a result of defective erythropoiesis and vasculogenesis (17, 18). In contrast, PLC γ 2-deficient mice are viable, their principal phenotype being a profound defect in B cell development and function (19).

Although PLC γ 2 is activated by various Fc receptors, its possible functional role downstream of those receptors is rather controversial. Genetic deficiency of PLC γ 2 attenuates Fc ϵ receptor-mediated degranulation of mast cells (19, 20) but it does not affect extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation or cytokine production under the same conditions (20). Although PLC γ 2 is required for Fc γ receptor-triggered Ca^{2+} signal in macrophages, PLC γ 2 $^{-/-}$ macrophages show normal phagocytosis of IgG-coated erythrocytes (20). The role of PLC γ 2 in Fc receptor-mediated functions in other cell types such as neutrophils is presently unknown.

PLC γ 2 is also activated by integrins but its role in integrin signal transduction is also controversial. Although a statistically significant decrease of spreading was reported in PLC γ 2 $^{-/-}$ platelets (21, 22), that difference only accounted for a 30% reduction of the $\alpha_2\beta_1$ integrin-induced increase in cell surface area (21) or a delayed kinetics and moderately smaller percentage of full spreading on an $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin ligand surface (22). Hence, PLC γ 2 appears to be a modulator rather than a critical component of integrin signaling in platelets. In contrast, a recent study focusing on the role of Vav family proteins in neutrophils suggested that PLC γ 2 downstream of Vav may be more directly involved in integrin signaling in these cells (23).

Rheumatoid arthritis is a severe chronic autoimmune disease affecting $\sim 1\%$ of the human population (24). The disease is initiated by the emergence of autoreactive T cells (initiation or immunization phase), which then trigger the second (effector or tissue destruction) phase, mediated in large part by cells of the innate immune system. These two phases are very clearly separated in the K/B $\times$ N arthritis model (25). This model is initiated by a transgenic autoreactive T cell receptor (KRN transgene) on the autoimmunity-prone MHC background from the NOD mouse strain. This initial phase leads to the generation of autoantibodies that trigger excessive joint inflammation and destruction resembling human

rheumatoid arthritis. Serum of affected mice can trigger the effector phase of the disease in otherwise normal mice (serum transfer arthritis) (26), allowing a clear separation of the two phases of the disease.

Analysis of the K/B $\times$ N and other models of autoimmune arthritis revealed that innate immune mechanisms are of critical importance in the later effector phase of the disease (26). Several studies using lineage depletion (27–29), genetic (30, 31), or combined genetic/reconstitution (32, 33) approaches indicate that neutrophils play a critical role in the effector phase of various animal models of autoimmune arthritis. However, the molecular mechanisms of how neutrophils contribute to the disease are very poorly understood.

Several cell surface receptors have been shown to be involved in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. These receptors include Fc γ receptors such as Fc γ RIII or Fc γ RI (34–43) as well as members of the β_2 integrin family (44, 45). However, it is at present unclear how (e.g., through what intracellular signaling mechanisms) Fc receptors and integrins participate in the development of joint inflammation.

The aforementioned results prompted us to test the role of PLC γ 2 in various *in vitro* neutrophil functions as well as in the development of neutrophil-mediated autoimmune arthritis *in vivo*. Our results indicate that PLC γ 2 is critically involved in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions as well as in the neutrophil-mediated effector phase of autoimmune arthritis.

RESULTS

PLC γ 2 is the dominant PLC γ isoform and is phosphorylated downstream of Src family kinases and Syk in neutrophils

First, we tested the expression level of the two PLC γ isoforms in neutrophils and compared it to that in other cell types. As shown in Fig. 1 A, PLC γ 2 was expressed at comparable levels in WT murine neutrophils and splenocytes but at much lower levels in WT thymocytes. In contrast, PLC γ 1 was expressed in neutrophils at a much lower level than in the thymus or the spleen. Although these results suggested that PLC γ 2 is the predominant PLC γ isoform in neutrophils, they did not allow the quantitative assessment of the relative expression of the two proteins in these cells. Hence, the expression of PLC γ 1 and PLC γ 2 was titrated against known amounts of recombinant Myc-tagged versions of the two proteins (Fig. S1 A, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20081859/DC1>). Based on those studies, WT mouse neutrophils were estimated to contain 53 ± 26 ng PLC γ 2 ($n = 3$) and 3.0 ± 1.2 ng PLC γ 1 ($n = 3$) per 10^6 cells, indicating that the expression of PLC γ 2 is ~ 18 -fold higher than that of PLC γ 1 in these cells. The expression of the two isoforms was also tested in PLC γ 2 $^{-/-}$ neutrophils (Fig. 1 B). Although no PLC γ 2 signal was observed in PLC γ 2 $^{-/-}$ cells, the expression of PLC γ 1 was not affected by the same mutation. The specificity of the antibodies used was also confirmed by the blocking effect of isoform-specific PLC γ -blocking peptides (Fig. S1 B). Collectively, these results indicate that

neutrophils express both PLC γ 1 and PLC γ 2, although PLC γ 2 is the predominant isoform. Furthermore, the genetic deficiency of PLC γ 2 does not affect the expression of PLC γ 1 in these cells.

We and others have previously shown that β_2 integrins signal through a receptor-proximal tyrosine phosphorylation cascade involving Src family kinases and Syk (8–11; for review see reference 16). Next, we tested whether PLC γ 2 is also phosphorylated under these conditions and whether Src family kinases and Syk participate in this process. As shown in Fig. 1 (C and D), plating WT neutrophils on a polyvalent

integrin ligand surface (poly-RGD) (11) triggered phosphorylation of PLC γ 2. Importantly, this phosphorylation response was absent in cells lacking the Src family kinases *Hck*, *Fgr*, and *Lyn* (Fig. 1 C) or the Syk tyrosine kinase (Fig. 1 D). Murine neutrophils can also be activated in an Fc γ RIII/Fc γ RIV-dependent manner by plating them on immobilized IgG immune complexes (46), leading to cellular responses that are dependent on Src family kinases and Syk (unpublished data). As shown in Fig. 1 (E and F), neutrophil activation by such immobilized immune complexes leads to phosphorylation of PLC γ 2 in WT but not in Src family-deficient (Fig. 1 E) or Syk-deficient (Fig. 1 F) neutrophils. These results suggest that PLC γ 2 is a downstream target of Src family kinases and Syk during both integrin and Fc receptor-mediated activation of neutrophils.

PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras and neutrophil surface marker expression

Our next aim was to test the role of PLC γ 2 in functional responses of neutrophils, using cells that are genetically deficient of this phospholipase isoform. Because we (and others) have not been able to breed homozygous PLC γ 2^{-/-} mice (indicating a fertility defect in PLC γ 2^{-/-} males and/or females), the mutation was maintained in heterozygous (PLC γ 2^{+/-}) form. Even under such conditions, only 12% (rather than the expected 25%) of a total of 379 offsprings from PLC γ 2^{+/-} $\times$ PLC γ 2^{+/-} matings were found to be of the PLC γ 2^{-/-} genotype at weaning age, indicating a partial defect in survival of PLC γ 2^{-/-} embryos or newborn pups, which is likely a result of a lymphatic vascular developmental defect (47) similar to that seen in SLP-76^{-/-} and Syk^{-/-} mice (48). To overcome this problem, bone marrow transplantation was used to generate chimeric mice with a PLC γ 2^{-/-} hematopoietic system. To this end, recipient mice carrying the CD45.1 allele on the C57BL/6 genetic background were lethally irradiated and then injected intravenously with isolated PLC γ 2^{-/-} or control C57BL/6 bone marrow cells (both donor strains carry the CD45.2 allele). Repopulation of the neutrophil compartment by donor-derived cells was confirmed by flow cytometric analysis of the donor-specific CD45.2 allele in peripheral blood leukocytes 4–5 wk after transplantation (Fig. S2, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20081859/DC1>). Using this approach, 99.3 $\pm$ 1.6% (n = 120) and 99.1 $\pm$ 2.4% (n = 135) of peripheral blood neutrophils of WT and PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras, respectively, were found to be of donor origin. Though quite laborious, this approach allowed us to significantly increase the number of mice available for our studies. Unless otherwise stated, all of the following experiments were performed using such WT and PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras.

We next tested whether the deficiency of PLC γ 2 affected neutrophil development or expression of major cell surface receptors. Our bone marrow neutrophil isolation protocol yielded 12.1 $\pm$ 3.3 $\times 10^6$ WT and 12.4 $\pm$ 4.8 $\times 10^6$ PLC γ 2^{-/-} neutrophils per mouse (n = 23; P = 0.62), indicating that the lack of PLC γ 2 did not cause a quantitative change in

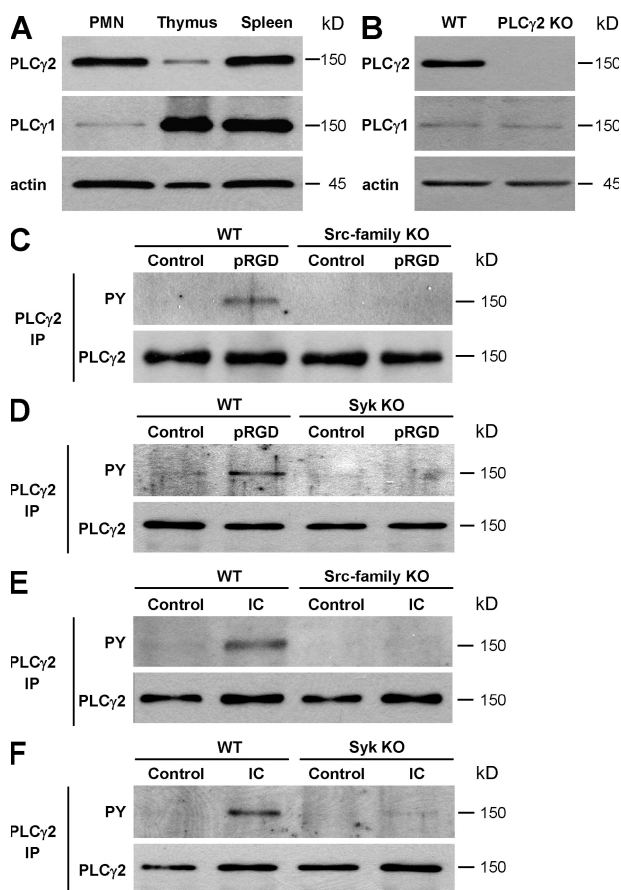


Figure 1. Expression and activation of PLC γ 2 in neutrophils.

(A) Expression of PLC γ 2 and PLC γ 1 in WT neutrophils compared with WT thymocytes and splenocytes. (B) Analysis of PLC γ 1 and PLC γ 2 expression in WT and PLC γ 2^{-/-} (PLC γ 2 KO) neutrophils. (C and D) PLC γ 2 phosphorylation in WT, Src family-deficient (*Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-}; Src-family KO), or Syk^{-/-} (Syk KO) neutrophils plated on a polyvalent integrin ligand (poly-RGD)-coated surface (pRGD) or left in suspension (control). PLC γ 2 phosphorylation was tested by immunoprecipitation (IP) followed by immunoblotting with antibodies against phosphotyrosine (PY). (E and F) Phosphorylation of PLC γ 2 in neutrophils of the various genotypes plated on an IgG immune complex-coated (IC) or control-treated surface. Immunoblotting for actin (A and B) and PLC γ 2 (C–F) served as loading controls. Molecular mass values represent the estimated apparent molecular mass of the proteins. Each panel represents three to five independent experiments with similar results.

neutrophil production. $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils also expressed normal levels of the Gr1 granulocyte differentiation marker (Fig. 2 A) and the general leukocyte marker CD45 (Fig. S2). The $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ mutation did not affect expression of the β_2 integrin chain CD18 (Fig. 2 B) or the α chains of LFA-1 (CD11a; Fig. 2 C) or Mac-1 (CD11b; Fig. 2 D). There was no difference between the two genotypes in cell surface staining with a common $\text{Fc}\gamma\text{RII}/\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ -recognizing antibody (Fig. 2 E) or a monoclonal antibody against $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ (Fig. 2 F). Collectively, genetic deficiency of $\text{PLC}\gamma 2$ did not affect neutrophil maturation or the expression of major cell surface integrins or $\text{Fc}\gamma$ receptors.

$\text{PLC}\gamma 2$ is required for integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions

In the following experiments, the role of $\text{PLC}\gamma 2$ in *in vitro* neutrophil functions was investigated. Robust neutrophil activation can be achieved by plating the cells on an integrin ligand (e.g., fibrinogen)-coated surface in the presence of a soluble proinflammatory agonist, such as TNF (49), mimicking activation of neutrophils adherent to the extracellular matrix at the site of inflammation. This response is completely dependent on β_2 integrins both in humans (50) and mice (11) (see Fig. S4). As shown in Fig. 3 A, neutrophils obtained

from $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ bone marrow chimeras failed to produce superoxide when plated on a fibrinogen-coated surface in the presence of TNF. In a limited number of experiments, a similar defect was also seen in neutrophils isolated from intact (nonchimeric) $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ mice (Fig. S3 A, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20081859/DC1>). $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils also failed to release the tertiary granule marker gelatinase (Fig. 3 B) or spread over the fibrinogen surface (Fig. 3 C) under identical conditions. A similar defect was seen when fibrinogen-adherent neutrophils were stimulated by other soluble proinflammatory agents, such as the TLR2 agonist lipopeptide Pam₃CSK₄, the TLR4-specific ligand ultrapurified LPS, the GM-CSF cytokine, or the MIP-2 chemokine, which is the mouse homologue of human IL-8 (Fig. 3 D), in a CD18-dependent manner (Fig. S4).

Although both integrin ligation and a separate proinflammatory stimulus is required for maximal activation of adherent neutrophils under physiological conditions (49, 51), β_2 integrin-mediated *in vitro* neutrophil activation can also be achieved by plating the cells on surfaces coated with an engineered polyvalent integrin ligand (poly-RGD) in the absence of any additional stimulus (11). $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils failed to release superoxide when plated on a poly-RGD-coated surface (Fig. 3 E) and they did not spread on this polyvalent integrin ligand surface either (Fig. 3 F).

Collectively, $\text{PLC}\gamma 2$ appears to be critically involved in the adhesion-dependent activation of neutrophils. Together with the fact that both TNF and the other soluble proinflammatory agonists signal normally in $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils in suspension (Fig. 4), our results indicate that $\text{PLC}\gamma 2$ is required for signaling by integrins rather than by receptors of the soluble proinflammatory agents.

Neutrophils can also be activated by immobilized IgG immune complexes in an $\text{Fc}\gamma\text{RIII}/\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ -dependent manner (46), mimicking their activation upon immune complex deposition in autoimmune diseases. Our unpublished observations indicate that this response also requires Src family kinases and Syk. As shown in Fig. 3 G, neutrophils isolated from $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ bone marrow chimeras failed to release superoxide when plated on immobilized IgG immune complexes. Similar results were also obtained using neutrophils isolated from intact $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ mice (Fig. S3 B). The $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ mutation also abrogated gelatinase release (Fig. 3 H) and neutrophil spreading (Fig. 3 I) under such conditions. Hence, $\text{PLC}\gamma 2$ is also critically involved in $\text{Fc}\gamma$ receptor-mediated functional responses of neutrophils.

$\text{PLC}\gamma 2$ is not required for signaling by G protein-coupled receptors, Toll-like receptors, and various cytokine receptors

Next, we tested integrin and Fc receptor-independent responses in $\text{PLC}\gamma 2$ -deficient neutrophils. As a first approach, the cells were stimulated with the nonphysiological protein kinase C-activating agent PMA, which is known to activate neutrophils even in the absence of important cell surface receptors such as β_2 integrins (11) or intracellular signaling molecules like

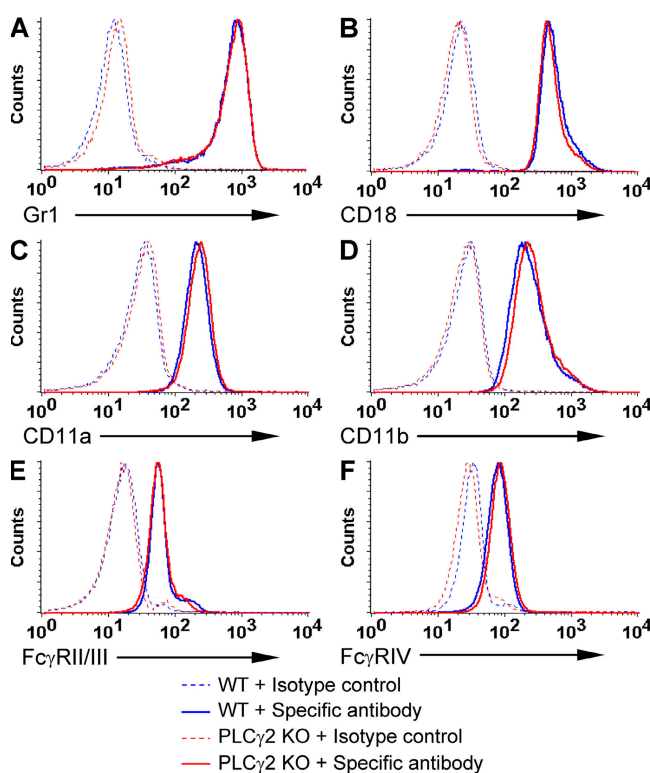


Figure 2. Expression of cell surface molecules on $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils. Expression of the indicated cell surface molecules on unstimulated WT and $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ ($\text{PLC}\gamma 2$ KO) bone marrow neutrophils was tested by flow cytometry. Each panel represents three to six independent experiments with similar results.

Src family kinases (9) or Syk (11). PMA-stimulated $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils, which were isolated either from $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ bone marrow chimeras (Fig. 4 A) or intact $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ mice (Fig. S3 C), released normal amounts of superoxide, indicating

that $\text{PLC}\gamma 2$ is not required for distal steps of NADPH oxidase activation.

Robust integrin and Fc receptor-independent neutrophil activation can also be triggered by the bacterial formyl-peptide

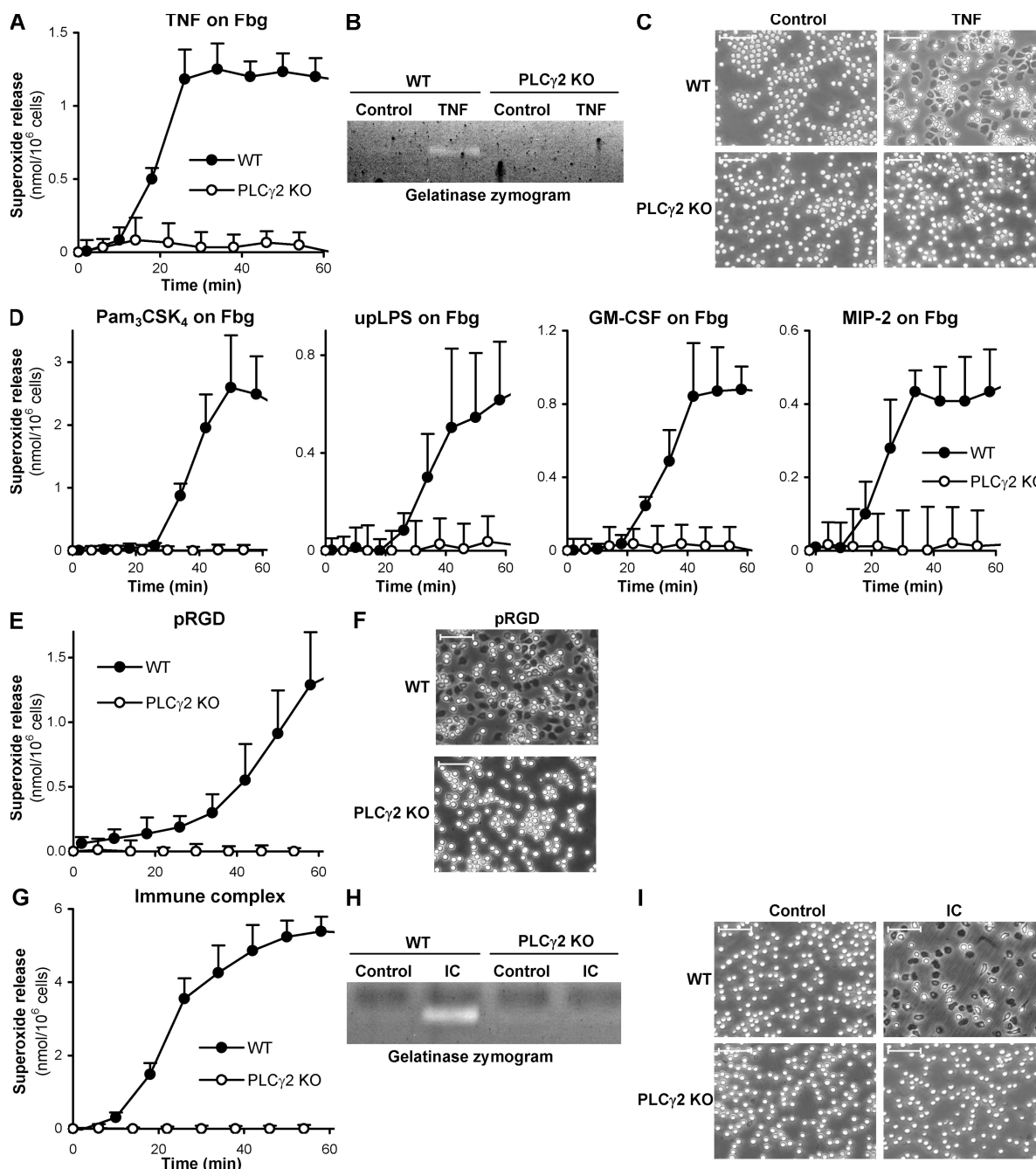


Figure 3. Defective integrin and Fc receptor-mediated responses of $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ neutrophils. (A–C) WT and $\text{PLC}\gamma 2^{-/-}$ ($\text{PLC}\gamma 2$ KO) neutrophils were activated by 50 ng/ml of murine TNF on a fibrinogen (Fbg)-coated surface and the resulting superoxide production (A), gelatinase release (B), and cell spreading (C) followed. (D) Superoxide release of fibrinogen-adherent neutrophils activated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pam₃CSK₄, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ultrapurified LPS (upLPS), 10 ng/ml of murine GM-CSF, or 100 ng/ml of murine MIP-2. (E and F) Superoxide release (E) and spreading (F) of neutrophils plated on a polyvalent integrin ligand (poly-RGD)-coated surface (pRGD) in the absence of any additional stimulus. (G–I) Superoxide release (G), degranulation (H), and spreading (I) of neutrophils plated on immobilized IgG immune complexes (IC). Unstimulated control values were subtracted in A, D, and G. Error bars represent SD of triplicate readings. Bars, 50 μm . Each panel is representative of three to five independent experiments with similar results.

fMLP (which activates G_i protein-coupled receptors), especially if the cells are preincubated with the cytoskeletal disrupting agent cytochalasin B. Under such conditions, fMLP induced similar superoxide production (Fig. 4 B and Fig. S3 D for neutrophils from bone marrow chimeras and intact mice, respectively) and gelatinase release (Fig. 4 C) from WT and PLCγ2^{-/-} cells, indicating that PLCγ2 is not required for formyl peptide receptor signal transduction.

In the experiments presented in Fig. 3, adhesion-dependent activation of neutrophils was tested in the presence of various soluble proinflammatory agonists. Because those agonists

do not induce major functional responses (such as respiratory burst) in the absence of an integrin ligand surface (Fig. S4), their integrin-independent signaling capacity was assessed by testing up-regulation of cell surface integrins or activation of intracellular signaling pathways in suspension. TNF triggered normal up-regulation of the CD18 or CD11b integrin chains (Fig. 4 D), normal phosphorylation of the p38 MAP kinase (Fig. 4 E), and normal phosphorylation and degradation of the NF-κB pathway inhibitor Iκ-Bα (Fig. 4 E) in PLCγ2^{-/-} neutrophils. PLCγ2 was not required for phosphorylation of p38 MAP kinase or phosphorylation/degradation of Iκ-Bα

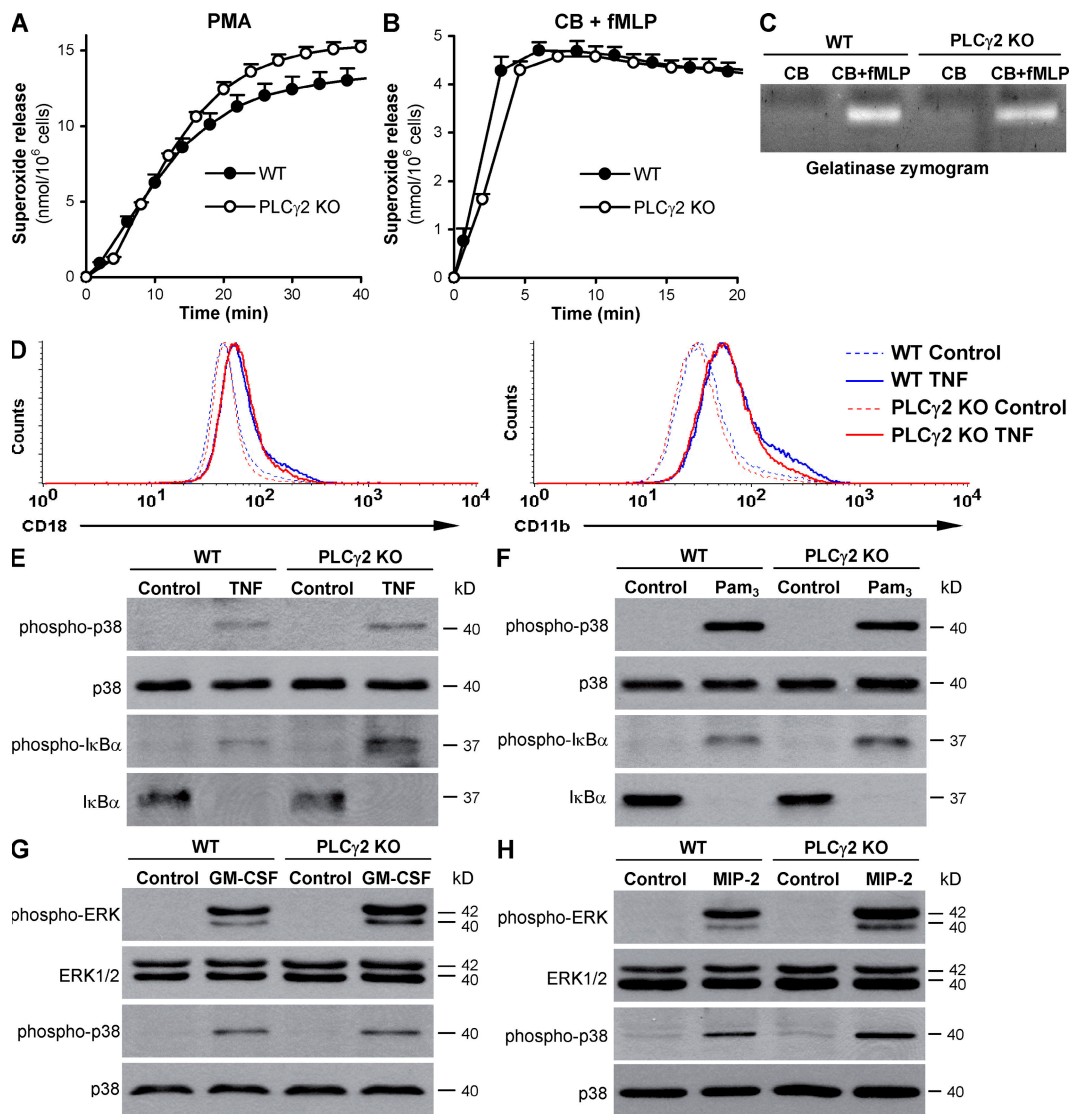


Figure 4. PLCγ2 is not required for integrin and Fc receptor-independent neutrophil functions. (A) Superoxide release of WT and PLCγ2^{-/-} (PLCγ2 KO) neutrophils stimulated with 100 nM PMA. (B and C) Superoxide production (B) and gelatinase release (C) triggered by 3 μM fMLP from neutrophils preincubated with 10 μM cytochalasin B (CB). (D) Up-regulation of CD18 and CD11b upon activation of neutrophils by 50 ng/ml of murine TNF in suspension. (E and F) Phosphorylation of the p38 MAP kinase (p38) and of Iκ-Bα and degradation of Iκ-Bα upon activation of neutrophils with 50 ng/ml of murine TNF (E) or 1 μg/ml Pam₃CSK₄ (Pam₃; F). (G and H) Phosphorylation of ERK and the p38 MAP kinase upon neutrophil activation by 10 ng/ml of murine GM-CSF (G) or 100 ng/ml of murine MIP-2 (H). Molecular mass values represent the estimated apparent molecular mass of the proteins. Unstimulated controls were subtracted in A and B. Error bars represent SD of triplicate readings. Each panel is representative of three to four independent experiments with similar results.

triggered by the TLR2-specific ligand Pam₃CSK₄ either (Fig. 4 F). Similarly, GM-CSF (Fig. 4 G) and the MIP-2 chemokine (Fig. 4 H) triggered normal ERK and p38 MAP kinase phosphorylation in PLC γ 2^{-/-} neutrophils.

Collectively, PLC γ 2 is not required for integrin and Fc receptor-independent functional and signaling responses of neutrophils. These results also suggest that the defective adherent activation of PLC γ 2^{-/-} neutrophils (Fig. 3) is caused by a defect in integrin signaling rather than that of the soluble proinflammatory agonists.

Normal migration of PLC γ 2-deficient neutrophils

Neutrophil migration to the site of inflammation is mediated by several cell surface receptors including chemokine/chemoattractant receptors and β_2 integrins. Our previous studies indicated that Src family kinases and Syk, which are indispensable for various β_2 integrin-dependent effector functions of neutrophils, are surprisingly not required for β_2 integrin-mediated cell migration (11). Those studies prompted us to test whether PLC γ 2 participates in β_2 integrin-mediated migration of neutrophils.

In an *in vitro* Transwell assay system, PLC γ 2-deficient neutrophils migrated as well as WT cells toward increasing concentrations of the bacterial tripeptide fMLP through a fibrinogen-coated polycarbonate membrane of 3- μ m pore size (Fig. 5 A). Because neutrophil migration under these conditions requires β_2 integrins (11), these results indicate that PLC γ 2 is not required for β_2 integrin-mediated neutrophil migration *in vitro*.

A competitive migration assay during a sterile peritonitis (11) was used to assess the *in vivo* migration of PLC γ 2^{-/-} neutrophils. To this end, mixed bone marrow chimeras carrying both CD45.2-expressing PLC γ 2^{+/+} or PLC γ 2^{-/-} cells, along with CD45.1-expressing PLC γ 2^{+/+} cells in their hematopoietic compartment, were generated. After the induction of a sterile peritonitis by intraperitoneal injection of sterile thioglycollate broth, the percentage of neutrophils from the two donor genotypes was determined both in the bloodstream and the peritoneal infiltrate. Any difference in this percentage between the two compartments would indicate different migratory capacities of neutrophils from the two donor strains. When both CD45.1- and CD45.2-expressing donor cells were of PLC γ 2^{+/+} genotype, the percentage of CD45.2-expressing neutrophils did not differ between the blood and the peritoneum (Fig. 5 B), indicating that the different alleles of CD45 do not affect neutrophil migration. In contrast, when CD45.2-expressing PLC γ 2^{-/-} bone marrow cells and CD45.1-expressing PLC γ 2^{+/+} cells were present the percentage of PLC γ 2^{-/-} cells in the inflamed peritoneum was consistently higher than that in the bloodstream (Fig. 5 B). Calculation of the relative migratory capacity of neutrophils revealed that the accumulation of PLC γ 2^{-/-} neutrophils in the inflamed peritoneum was nearly twice more efficient than that of PLC γ 2^{+/+} cells (Fig. 5 C). These results are in sharp contrast with the severe reduction of migration of CD18^{-/-} neutrophils in a similar assay (11). Therefore, in contrast to

CD18, PLC γ 2 is not required for, or may even act as a negative regulator of, neutrophil migration into the inflamed peritoneum. Collectively, these results indicate that, similar to Src family kinases and Syk, PLC γ 2 is not required for CD18-dependent *in vitro* or *in vivo* migration of neutrophils.

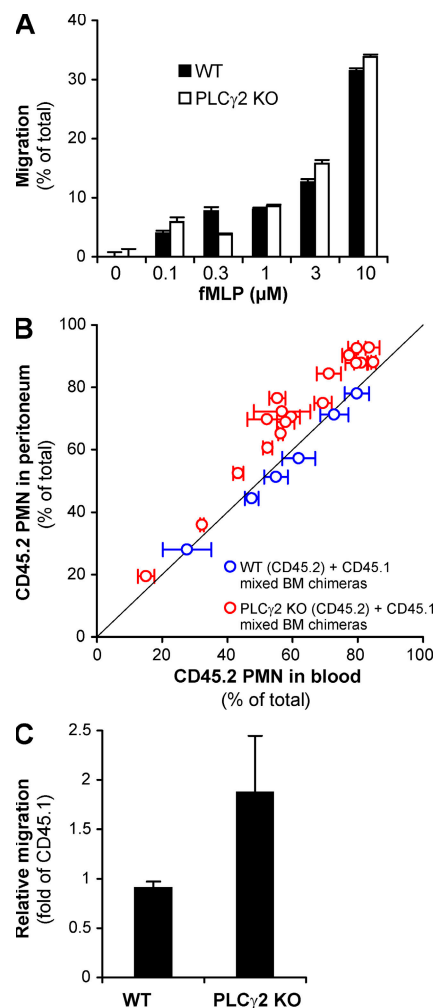


Figure 5. Normal *in vitro* and *in vivo* migration of PLC γ 2^{-/-} neutrophils. (A) Migration of WT and PLC γ 2^{-/-} (PLC γ 2 KO) neutrophils toward the indicated concentrations of fMLP through fibrinogen-coated transwell membranes of 3- μ m pore size. Error bars represent SD of duplicate readings. Data are representative of three independent experiments. (B and C) Competitive migration of CD45.2-expressing and CD45.1-expressing neutrophils during thioglycollate-induced sterile peritonitis in mixed bone marrow chimeras. (B) Percentage of CD45.2-expressing WT or PLC γ 2^{-/-} cells in the blood and the peritoneal lavage fluid. Each data point represents an individual mouse. The thin diagonal line marks points of identical percentage of CD45.2 cells in the blood and the peritoneum. Error bars represent SD from three blood samples taken at different time points from the same mouse. The data are combined from two independent experiments. (C) Relative migratory capacity of CD45.2-expressing WT or PLC γ 2^{-/-} neutrophils relative to the CD45.1-expressing cells calculated from the data presented in B. Error bars represent SD of values from 6 (WT) or 18 (PLC γ 2^{-/-}) individual mice.

Leukocyte–endothelial interaction in fMLP-treated cremaster muscles in vivo

To gain further insight into the relationship between spreading, adherent activation, and cell migration in neutrophils, as well as to exclude the possibility that the aforementioned differences between the role of PLC γ 2 in these processes (compare Figs. 3 and 5) stem from the very different assay systems used, we performed the simultaneous analysis of leukocyte adhesion, spreading, and extravasation in individual venules of fMLP-superfused cremaster muscles of WT and PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras. As shown in Table S1 (available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20081859/DC1>), there was no difference in the various hemodynamic parameters or total leukocyte counts between the two genotypes. The PLC γ 2^{-/-} mutation did not affect rolling flux fraction (36 ± 11 and $28 \pm 12\%$ in WT and PLC γ 2^{-/-} chimeras, respectively) or leukocyte adhesion (Fig. 6 A) under resting conditions either. However, although local superfusion of the cremaster muscle of WT chimeras with 1 μ M fMLP triggered a significant increase in stable adhesion of leukocytes

to the vessel wall, no such effect was observed in PLC γ 2^{-/-} chimeras (Fig. 6 A). fMLP also induced the spreading of WT leukocytes, as indicated by the flattening (decreased diameter perpendicular to the vessel wall) of the cells adherent to the endothelium (Fig. 6 B). This spreading (flattening) response was strongly reduced in PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras at early time points (Fig. 6 B), although the mutant cells were able to partially flatten down at later time points after fMLP stimulation. Besides these real-time in vivo microscopic observations, parallel cremaster muscle samples were subjected to whole mount histological analyses. Those studies again revealed that the fMLP-induced increase of the intravascular leukocyte count (an approximate measure of leukocyte adhesion) was significantly attenuated in PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras (Fig. 6 C), likely reflecting the described adhesion/spreading defect (Fig. 6, A and B). Despite all these observations, the fMLP-induced increase of the number of perivascular leukocytes (an approximate measure of leukocyte extravasation) in PLC γ 2^{-/-} chimeras was similar to or even slightly higher than that in WT control chimeras (Fig. 6 D),

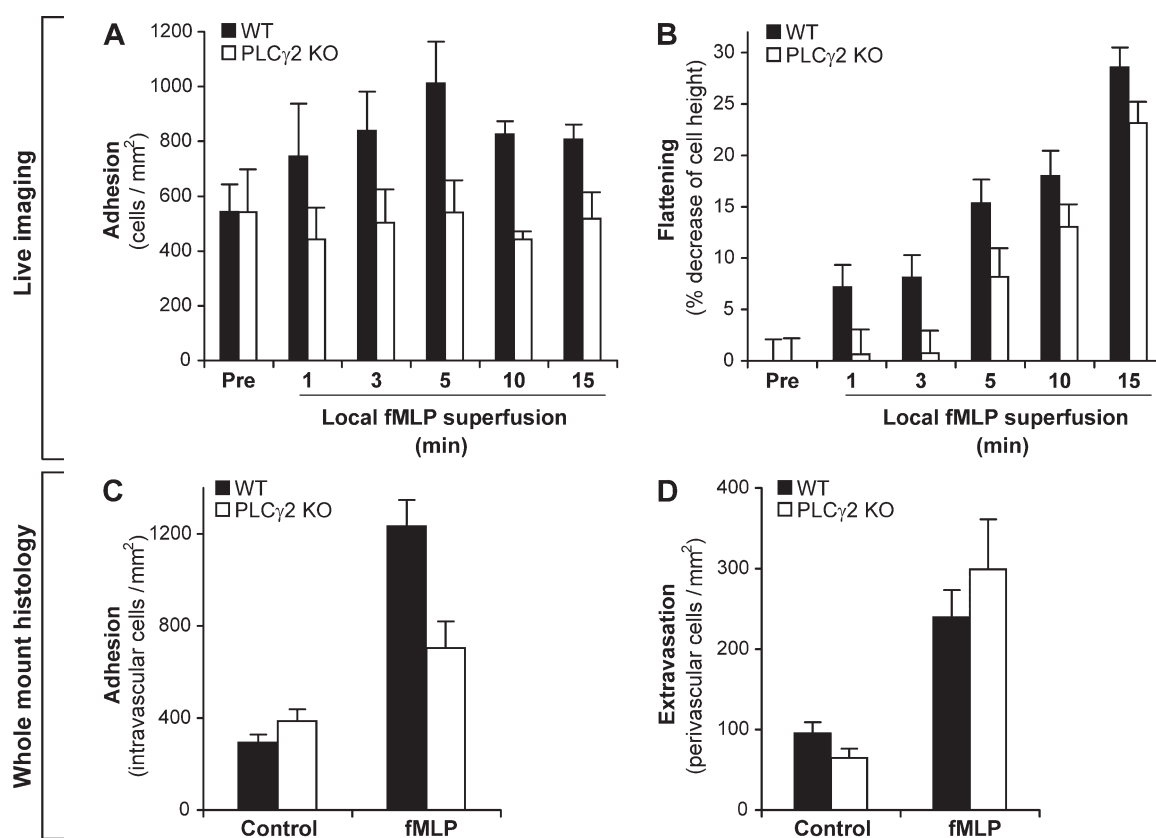


Figure 6. Leukocyte–endothelial interaction in fMLP-treated cremaster muscle venules in vivo. (A and B) Intravital microscopy of postcapillary cremaster muscle venules superfused with 1 μ M fMLP. (A) Leukocyte adhesion in postcapillary venules of WT and PLC γ 2^{-/-} (PLC γ 2 KO) bone marrow chimeras before (pre) and at the indicated time points during superfusion with fMLP. (B) Leukocyte spreading in fMLP-superfused cremaster muscle venules. The rate of spreading is expressed as the percent decrease in cell diameter perpendicular to the vessel wall. Mean and SEM of data obtained from four WT and five PLC γ 2 KO chimeras are shown. (C and D) Leukocyte adhesion (C) and extravasation (D) assessed by histological analysis of whole mount preparations of cremaster muscles of WT or PLC γ 2 KO bone marrow chimeras superfused for 15 min in the presence or absence of 1 μ M fMLP. The mean and SEM are shown of the number of intravascular (C) and perivascular (D) leukocytes in 29–41 individual vessels per group from four WT and five PLC γ 2 KO chimeras, each tested independently during the same day.

suggesting that transendothelial migration of leukocytes was not impaired in the absence of PLC γ 2. These results again indicate that a defective adhesion/spreading response in the absence of PLC γ 2 does not translate into impaired migration of leukocytes through the vessel wall.

PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras are protected from macroscopic and microscopic signs of autoimmune arthritis

The role of PLC γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions raise the possibility that PLC γ 2 may be

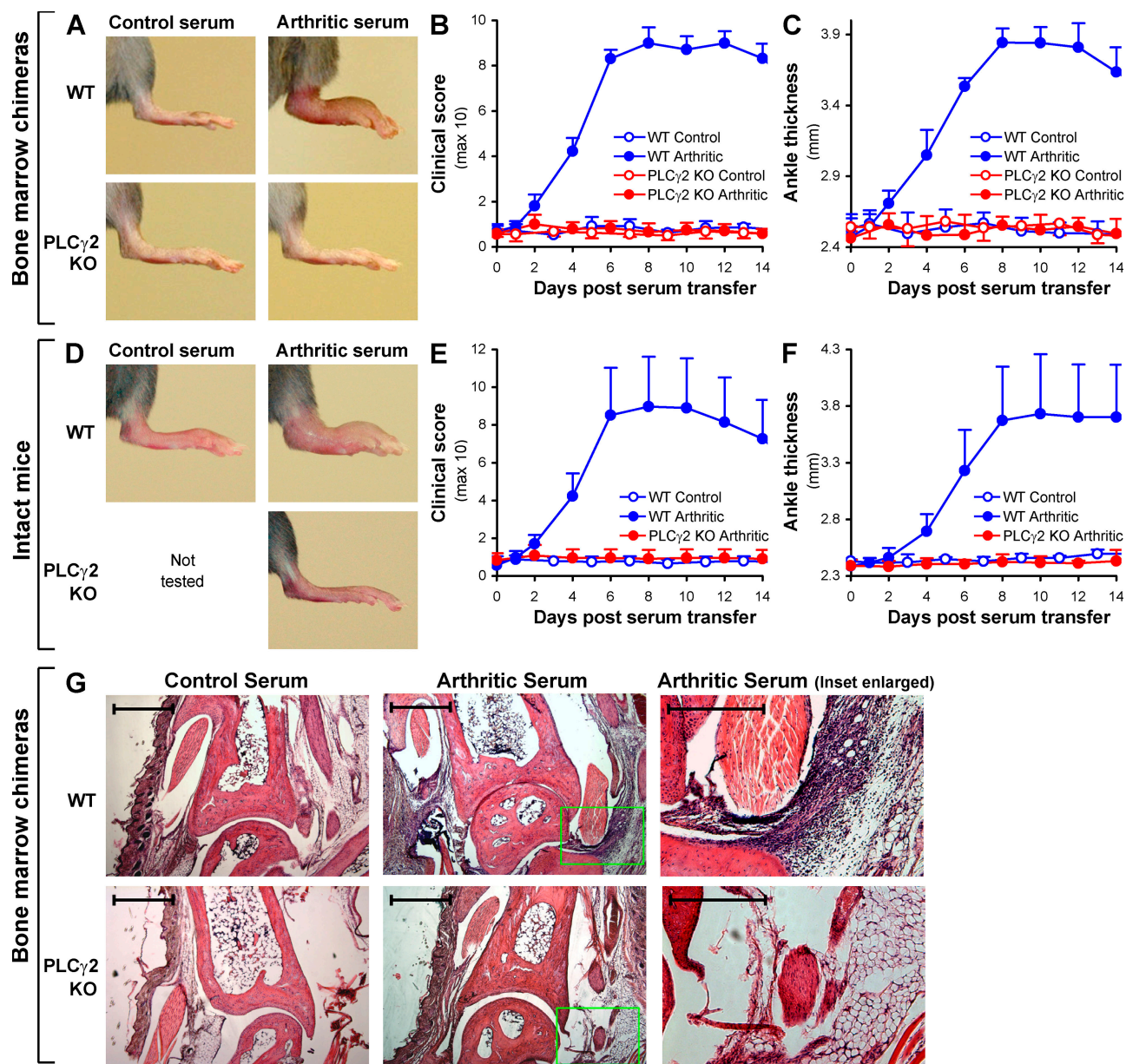


Figure 7. PLC γ 2 is required for the development of K/BxN serum transfer arthritis. WT and PLC γ 2^{-/-} (PLC γ 2 KO) bone marrow chimeras (A–C and G) or intact (nonchimeric) mice (D–F) were injected with 400 μ l of arthritic (K/BxN) or nonarthritic control serum and the development of arthritis followed. (A) Photographs of the hind limb of mice of the indicated treatment and hematopoietic genotype 10 d after serum injection. Pictures are representative of a total of 17–23 individual mice per group from eight independent experiments. (B and C) Hind limb clinical score (B) and ankle thickness (C) of mice of the indicated treatment and genotype. Error bars represent the SD of four to eight individual clinical scores or ankle thickness values from a single experiment repeated a total of eight times. (D–F) Hind limb photographs (D), clinical score (E), and ankle thickness (F) of intact (nonchimeric) mice of the indicated treatment and genotype. Data are from three mice per group tested in parallel. Error bars represent the SD of six individual hind limb values from three mice per group. (G) Histological analysis of the ankle joint of mice of the indicated treatment and hematopoietic genotype 4 d after serum injection. The photomicrographs on the right are enlarged from the highlighted areas in the middle pictures. Original magnification, 5 $\times$. Bars: (left and middle) 200 μ m; (right) 100 μ m. Photomicrographs are representative of a total of four to six samples per group from three independent experiments.

involved in the pathogenesis of inflammatory diseases mediated by these factors. To test this possibility, we turned to the K/B×N serum transfer arthritis model, an autoantibody-mediated model of the effector phase of autoimmune arthritis. Prior studies from other groups indicated that this model requires neutrophils (27, 32, 33) as well as the presence of β_2 integrins (44) and Fc γ receptors (34–41). We have also confirmed the latter two conclusions (unpublished data).

To test the role of PLC γ 2 in the K/B×N serum transfer arthritis model, WT or PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras were injected with arthritogenic K/B×N serum or normal serum from nonarthritic (KRN transgene negative) littermates. Although WT bone marrow chimeras injected with arthritogenic serum developed severe arthritis of their hind paws (Fig. 7 A), no sign of the disease was seen in similarly

treated PLC γ 2^{-/-} chimeras (Fig. 7 A), indicating a major role for PLC γ 2 in the development of K/B×N serum transfer arthritis. Quantification of arthritis severity by clinical scoring revealed that arthritis became evident 2 d after injection of WT chimeras with arthritogenic serum, peaked between 8–12 d, and started to cease afterward. Importantly, no signs of arthritis were seen at any time point in PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras injected with arthritogenic K/B×N mouse serum (Fig. 7 B). Treatment of WT chimeras with arthritogenic serum also triggered a robust increase of their ankle thickness (Fig. 7 C), whereas the same treatment had no effect on ankle thickness of PLC γ 2^{-/-} chimeras (Fig. 7 C). Collectively, PLC γ 2 within the hematopoietic compartment is indispensable for the development of macroscopic signs of autoimmune arthritis in the K/B×N serum transfer model.

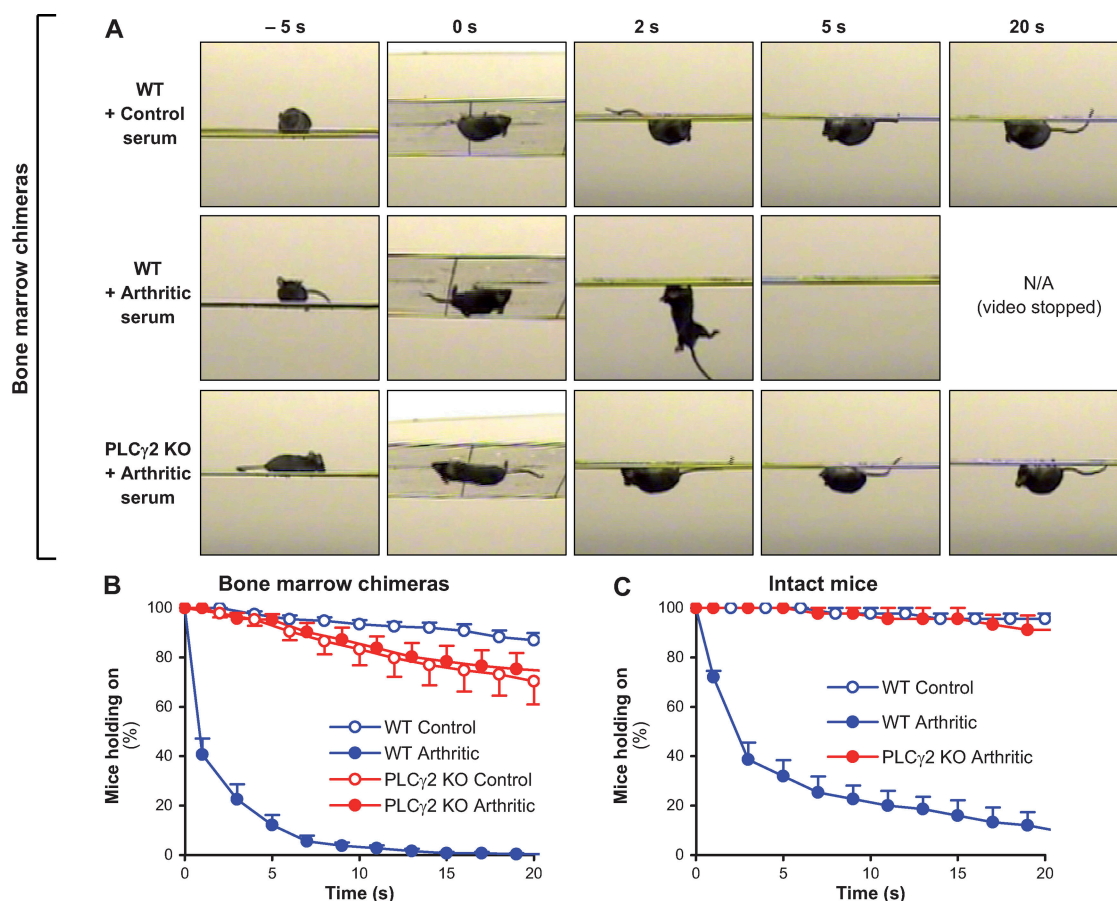


Figure 8. PLC γ 2 deficiency protects from arthritis-induced loss of articular function. WT and PLC γ 2^{-/-} (PLC γ 2 KO) bone marrow chimeras (A and B) or intact (nonchimeric) mice (C) were injected with 400 μ l of arthritic (K/B×N) or nonarthritic control serum. 6–12 d after the serum injection, the mice were placed on a custom-made wire grid, flipped over, and the time for which the mice were able to hold on to the lower side of the grid was recorded. (A) Snapshots at the indicated time points from video captures of mice of the indicated treatment and hematopoietic genotype 10 d after serum injection. The snapshots are representative of a total of 165–263 individual measurements on 10–16 mice per group from four independent experiments. (B) Quantitative analysis of the articular function as represented by the percentage of the bone marrow chimeras from a given group to hold on to the grid for a given period of time after the grid has been flipped over from four independent experiments. Error bars represent SEM of 10–16 individual “holding on curves” (obtained from 12–21 measurements on each single mouse between 8 and 12 d after serum transfer). (C) Quantitative analysis of the articular function of intact mice of the indicated treatment and genotype. Error bars represent SEM of three individual holding on curves (obtained from 18 measurements on each single mouse between 8 and 12 d after serum transfer).

To exclude the possibility that these results were affected by the bone marrow transplantation approach (e.g., by the use of irradiation that by itself may affect the course of autoimmune arthritis [reference 52]), the same experiments were repeated on a small cohort of intact (nonchimeric) WT and PLC γ 2^{-/-} mice. As shown in Fig. 7 (D–F), genetic deficiency of PLC γ 2 completely abrogated the development of all clinical signs of K/B $\times$ N serum transfer arthritis even in such nonchimeric animals.

We also performed histological analysis of the ankle joint of bone marrow chimeras of the various experimental groups. As shown in Fig. 7 G, a robust leukocytic infiltration of the periarticular tissues could be observed in WT chimeras injected with arthritogenic serum relative to those injected with nonarthritogenic control serum. Importantly, no such infiltration was seen in PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras injected with arthritogenic serum (Fig. 7 G), indicating that PLC γ 2 is required for the development of microscopic signs of arthritis such as the accumulation of leukocytes in the periarticular space.

PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras are protected from arthritis-induced loss of articular function

Besides the macroscopic and microscopic signs of inflammation, arthritis also leads to severe impairment of articular function. This was assessed by testing the ability of the mice to hold on to the bottom of a horizontal wire grid similar to a regular wire cage lid. As shown in the video snapshots in Fig. 8 A, although WT chimeras injected with control serum were able to hold on to the wire grid for the entire 20-s assay period, WT chimeras injected with arthritogenic serum were not able to hold on for more than a few seconds, indicating an arthritis-induced loss of articular function. Importantly, PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras injected with arthritogenic serum had no difficulties in holding on to the wire grid for the entire assay period (Fig. 8 A).

To obtain a more quantitative assessment of joint function, this experiment was repeated several times on each individual mouse during the plateau phase of the disease, and the percentage of mice that were still holding on to the wire grid at a given time point was calculated analogous to Kaplan-Meier survival curves (Fig. 8 B). As shown in Fig. 8 B, nearly 90% of control-treated WT chimeras held on to the wire grid until the end of the 20-s assay period. In contrast, only 40% of WT chimeras injected with arthritogenic serum held on for >1 s, and practically none of them did so for the entire assay period (Fig. 8 B). Importantly, most of the PLC γ 2^{-/-} chimeras were able to hold on to the wire grid for the entire 20-s period irrespective of whether they were injected with arthritogenic or control serum (Fig. 8 B). In a small set of experiments, a similar protection from arthritis-induced loss of articular function was seen in intact (nonchimeric) PLC γ 2^{-/-} mice (Fig. 8 C), indicating that the effect of PLC γ 2 deficiency on articular function was not affected by the bone marrow transplantation approach used. Collectively, mice lacking PLC γ 2 are also protected from arthritis-induced loss of articular function.

DISCUSSION

Rheumatoid arthritis is a severe chronic disease affecting ~1% of the human population. Although the therapy of the disease has significantly improved during the last decades, it is still far from being solved. This is exemplified by the still widespread use of the highly cytotoxic chemotherapeutic agent methotrexate, the severe cardiovascular complications of COX-2 inhibitors, or the tremendous costs and possible side effects (e.g., reactivation of silent tuberculosis) of anti-TNF therapeutics. Better understanding of rheumatoid arthritis at the molecular level would strongly facilitate the development of novel treatment strategies for the disease.

The experiments presented in this paper provide evidence for the role of PLC γ 2 in the K/B $\times$ N arthritis model, one of the most widely used animal models of rheumatoid arthritis. A unique feature of this model is that its effector phase can be clearly separated from its initiation phase by transferring the serum of an arthritic K/B $\times$ N mouse to an otherwise nonarthritic recipient (26). Our experiments performed using this serum transfer model (Figs. 7 and 8) indicate that PLC γ 2 participates in the effector phase of the disease. Furthermore, the fact that bone marrow chimeras with PLC γ 2^{-/-} hematopoietic system but PLC γ 2^{+/+} nonhematopoietic tissues are protected from K/B $\times$ N serum transfer arthritis indicates that PLC γ 2 within the hematopoietic system is indispensable for disease development.

The effector phase of rheumatoid arthritis is mediated by several cell types, likely including various phagocytic lineages. To our knowledge, of those lineages only neutrophils have been consistently linked to the development of the inflammatory process in a diverse array of arthritis models and experimental approaches (27–33). Of the other phagocytes, liposome-mediated depletion studies suggested a pathogenetic role for macrophages (53), but another genetic study indicated that certain macrophage subsets play a negative rather than a positive role in autoimmune arthritis (54). Although an elegant series of genetic and reconstitution studies indicated the role of mast cells in the development of K/B $\times$ N serum transfer arthritis (55), another study using a different genetic approach suggested that arthritis development may proceed normally in the absence of mast cells (56). Based on these results, the most likely explanation for our *in vivo* results is that PLC γ 2 within neutrophils is required for the autoantibody-induced inflammation process. The second most likely PLC γ 2-dependent compartment would be the mast cell lineage, which also expresses PLC γ 2 and may be activated through integrins and Fc γ receptors. However, because mast cells are long-lived radioresistant cells that survive a lethal irradiation in most tissues (57, 58), it is unlikely that our bone marrow transplantation approach was able to replace the majority of the recipients' mast cells. Hence, it is unlikely that the complete defect of arthritis development in PLC γ 2^{-/-} bone marrow chimeras is caused solely by the deficiency of PLC γ 2 in mast cells.

Several cell surface receptors have also been shown to participate in various models of autoimmune arthritis. Several

studies using mice lacking the Fc receptor common γ chain (34–37) or Fc γ receptor-specific ligand binding α chains (36–42) indicated a critical role for Fc γ receptors in various autoimmune arthritis models (43). The role of β_2 integrins (44) or their putative ligands (44, 45) has also been shown in various autoimmune arthritis models. Somewhat surprisingly, however, there is very little information available on whether and to what extent signaling molecules downstream of these receptors play a role in the development of autoimmune arthritis. In this context, it is particularly important that our study identifies PLC γ 2, a component of integrin and Fc receptor signal transduction, as a critical player of the effector phase of autoimmune arthritis.

Neutrophils are critical players of the innate immune response but they also participate in tissue destruction during autoimmune diseases (1–3, 5). Integrins and Fc receptors are two major groups of cell surface receptors participating in neutrophil activation at the site of inflammation or bacterial invasion. We and others have shown that integrin and Fc receptor signaling in neutrophils are both mediated by a receptor-proximal tyrosine phosphorylation cascade consisting of Src family kinases, ITAM-bearing adaptor molecules, and the Syk tyrosine kinase (6–11; for review see reference 16) (unpublished data). In the present work, we identify PLC γ 2 as a common downstream mediator of integrin and Fc receptor signaling in neutrophils (Fig. 3). PLC γ 2 thus appears to be a new member of a growing family of intracellular molecules participating in both integrin and Fc receptor signal transduction in these cells (6–11, 59–61; for review see reference 16). In contrast, PLC γ 2 is dispensable for neutrophil activation through several other cell surface receptors such as G protein-coupled formyl peptide or chemokine receptors, various cytokine receptors (TNF and GM-CSF), or members of the Toll-like receptor family (Fig. 4). Hence, PLC γ 2 plays a specific role in signaling by a defined subset of neutrophil activatory receptors.

In addition to participating in adhesion-dependent functional responses of neutrophils, β_2 integrins are also required for the migration of the cells to the site of inflammation. Somewhat surprisingly, although PLC γ 2 is required for the former response (Fig. 3), β_2 integrin-mediated (11) neutrophil migration can occur in the absence of PLC γ 2 (Fig. 5). This is, however, in line with the normal migration of neutrophils lacking Src family kinases (11), Syk (11), ITAM-bearing adaptors (10), or members of the Vav family (60) under CD18-dependent conditions (11). Therefore, β_2 integrins likely use other PLC γ 2-independent pathways to support neutrophil migration to the site of inflammation.

It is also puzzling how and to what extent spreading and extravasation can be dissected at the cellular and molecular level, given the generally accepted view that spreading and firm leukocyte adhesion precedes the transmigration of leukocytes through the vessel wall. Our prior studies on leukocyte-endothelial interactions in Syk $^{-/-}$ bone marrow chimeras (62, 63) indicated that a significant level of extravasation is possible even when adhesion is severely reduced and leukocyte spreading over the endothelium is apparently completely

absent. Similar studies on PLC γ 2 $^{-/-}$ bone marrow chimeras presented in this paper also indicate that severely defective adhesion (Fig. 6, A and C), and decreased and delayed spreading (Fig. 6 B) do not necessarily hinder the extravasation (Fig. 6 D) of leukocytes. Hence, transmigration of leukocytes through the vessel wall is possible even if adhesion and spreading are severely defective. It is at present unclear how transendothelial migration occurs under these conditions. One possibility is that integrin-mediated spreading and firm adhesion simply coincide with concomitant transmigration without any major role of the former two processes in the latter one. Alternatively, spreading and adhesion may play dual roles by promoting transmigration, for example, through arresting the leukocytes at the site of inflammation, but also hindering it, for example, by holding leukocytes back by the adhesive process. If so, then a defective adhesion/spreading response would not have any major net effect on transmigration of leukocytes. Further studies will be required to reveal whether and how these or other mechanisms can explain transmigration of leukocytes when their spreading and/or adhesion responses are severely impaired.

Along the same line of thinking, it is also interesting to note that our histological analyses showed a complete lack of leukocytic infiltration in periarticular regions of PLC γ 2 $^{-/-}$ bone marrow chimeras injected with arthritogenic K/B $\times$ N serum (Fig. 7 G). Based on the normal migration of PLC γ 2 $^{-/-}$ neutrophils under other conditions (Figs. 5 and 6), we hypothesize that the lack of PLC γ 2 blocks the development of the inflammatory environment (chemokines, cytokines, and inflammatory endothelium). Hence, the otherwise migration-competent neutrophils are not attracted to the periarticular tissues in PLC γ 2 $^{-/-}$ bone marrow chimeras.

All of the experiments presented in this paper have been performed on inbred mice on the C57BL/6 genetic background. This strain is the most widely used genetically homogeneous mouse strain, allowing the most accurate comparison of our results with those from other investigators. However, we cannot exclude the possibility that PLC γ 2 would be less critically involved in *in vitro* neutrophil functions and/or the effector phase of autoimmune arthritis on a different genetic background. Such a phenomenon could theoretically be possible through compensation by either PLC γ 1 or a PLC γ -independent mechanism. Although it would be rather difficult to predict the possible extent of compensation by the latter mechanism, studies showing that overexpression of PLC γ 1 in PLC γ 2 $^{-/-}$ cells was not able to restore B cell maturation (64) or the development of multinucleated osteoclasts (65) suggest that there is relatively little room for functional compensation between the two members of the PLC γ family.

In addition to providing clear evidence for a role of PLC γ 2 in integrin-mediated neutrophil functions and the development of K/B $\times$ N serum transfer arthritis, our studies also raise several novel questions that have yet to be addressed in the future. Although we hypothesize that the effect of the PLC γ 2 $^{-/-}$ mutation *in vivo* is a result of a neutrophil defect, this has yet to be confirmed more directly, for example, by

lineage-specific deletion of PLC γ 2 in neutrophils. The same holds true for whether our in vivo phenotype is indeed caused by an integrin and/or Fc receptor signaling defect and whether PLC γ 2 $^{-/-}$ neutrophils are indeed capable of migrating to the site of inflammation during a full-blown K/B $\times$ N serum transfer arthritis. Although our studies strongly implicate PLC γ 2 in the effector phase of autoantibody-mediated arthritis, its contribution to other aspects of the disease have yet to be tested, for example, using the TNF-mediated human TNF-transgenic Tg197 (66) or the IL-17-mediated SKG point mutant (67, 68) models. It is also unclear whether the lipase activity and/or other structural features of PLC γ 2 contribute to its role in neutrophil functions in vitro and arthritis development in vivo. This, and the reason for why PLC γ 1 is apparently not able to compensate for the lack of PLC γ 2, will need to be tested by reexpression of various PLC γ 2 mutants and/or PLC γ 1 in PLC γ 2 $^{-/-}$ bone marrow cells, for example, by using a retroviral reconstitution strategy (10). Finally, the role of PLC γ 2 in the various aspects of antimicrobial functions of leukocytes (such as phagocytosis by myeloid lineage cells) and its relationship to that of Src family kinases and Syk has yet to be tested in more detail.

Collectively, we found that PLC γ 2 is a central component of integrin and Fc receptor signal transduction in neutrophils, linking the receptor-proximal Src family-ITAM adaptor-Syk cascade to functional responses of these cells. Our results also identify PLC γ 2 as a critical player of the effector phase of autoimmune arthritis, most likely through its role in integrin and Fc receptor signaling of neutrophils. These studies provide novel insight into the cellular and molecular mechanisms of autoimmune inflammation and may eventually point to novel targets of future therapies of major human diseases such as rheumatoid arthritis.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Heterozygous mice carrying a deleted PLC γ 2 allele (PLC γ 2 tm1Jm , referred to as PLC γ 2 $^{-/-}$) (19) were obtained from J. Ihle (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN). Because of the limited fertility and survival of homozygous PLC γ 2 $^{-/-}$ mice, the mutation was maintained in heterozygous form by a PLC γ 2 $^{+/+}$ $\times$ PLC γ 2 $^{+/+}$ breeding strategy. Offsprings were genotyped by allele-specific PCR reaction from tail DNA using 5'-GCCCTCTGCACAGCACACATATGG-3' WT-specific and 5'-CAAGGTGAGATGACAGGAGATCC-3' mutant-specific forward primers along with the 5'-TTCACCGCATCTCTTTGAGTCC-3' common reverse primer. Triple Src family-deficient (*Hck* $^{tm1Hav/tm1Hav} *Fgr* $^{tm1Hav/tm1Hav}$ *Lyn* $^{tm1Sor/tm1Sor}$, referred to as *Hck* $^{-/-}$ *Fgr* $^{-/-}$ *Lyn* $^{-/-}$) mice (69) were obtained from C. Lowell (University of California, San Francisco, San Francisco, CA) and kept as triple homozygous mutants. Mice carrying the *Syk* tm1Tyb mutation (70) (referred to as the *Syk* $^{-/-}$ allele) were obtained from V. Tybulewicz (National Institute for Medical Research, London, UK). The *Syk* $^{-/-}$ mutation was maintained in heterozygous form and used to obtain *Syk* $^{-/-}$ neutrophils by fetal liver transplantation as previously described (11). Mice carrying the KRN T cell receptor transgene (25) were obtained from D. Mathis and C. Benoist (Harvard Medical School, Boston, MA) and maintained in heterozygous form by mating with C57BL/6 mice. KRN transgene-positive mice were identified by flow cytometry (see Flow cytometry) based on the high percentage of V β 6 TCR-expressing cells among CD4-positive T cells (25). Complete CD18-deficient (*Itgb* $^{tm2Bay/tm2Bay}$, referred to as CD18 $^{-/-}$) mice (71) were obtained from A. Beaudet (Baylor College of Medicine, Hous-$

ton, TX). Fc receptor γ chain-deficient (*Fcer1g* $^{tm1Rav/tm1Rav}$, referred to as *FcR γ* $^{-/-}$) mice (72) were purchased from Taconic. All these mice were backcrossed to the C57BL/6 genetic background for eight or more generations. WT control C57BL/6 mice were purchased from the Hungarian National Institute of Oncology. NOD mice, as well as a congenic strain carrying the CD45.1 allele on the C57BL/6 genetic background (B6.SJL-*Ptpr^c*), were purchased from The Jackson Laboratory. Mice were kept in individually sterile ventilated cages (Tecniplast) in a conventional facility. All animal experiments were approved by the Semmelweis University (Budapest, Hungary) Animal Experimentation Review Board or the Regierungspräsidentium Karlsruhe (Karlsruhe, Germany).

To obtain bone marrow chimeras with PLC γ 2 $^{-/-}$ hematopoietic system, recipients carrying the CD45.1 allele on the C57BL/6 genetic background were lethally irradiated by 11 Gy from a ^{60}Co source using an irradiator (Gammatron 3; Siemens) and then injected intravenously with unfractionated bone marrow cells from PLC γ 2 $^{-/-}$ or WT C57BL/6 control mice. On average, bone marrow cells of a single donor mouse were injected into 10–12 recipients. 4–6 wk after transplantation, peripheral blood samples were stained for Gr1 and CD45.2 and analyzed by flow cytometry (see Flow cytometry). Repopulation of the hematopoietic compartment by donor-derived cells was defined as the percentage of CD45.2-positive (donor-derived) cells in the Gr1-positive granulocyte gate. Bone marrow chimeras were used 5–10 wk after the transplantation.

Neutrophil isolation. Mouse neutrophils were isolated from the bone marrow of the femurs and tibias by hypotonic lysis followed by Percoll (GE Healthcare) gradient centrifugation as previously described (73). Neutrophil isolation was performed at room temperature using sterile and endotoxin-free reagents. Cells were kept at room temperature in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free medium until use (usually less <30 min) and prewarmed to 37°C before activation. Neutrophil assays were performed at 37°C in Hank's balanced salt solution (Invitrogen) supplemented with 20 mM Hepes, pH 7.4.

Flow cytometry. For neutrophil studies, isolated neutrophils, peripheral blood samples, or peritoneal lavage fluids were stained with PE-conjugated anti-Gr1 (RB6-8C5), FITC-conjugated anti-CD45.2 (clone 104), biotinylated anti-CD11b (M1/70), or unconjugated antibodies against CD18 (C71/16), CD11a (M17/4), Fc γ RII/III (2.4G2), or Fc γ RIV (9E9; obtained from J. Ravetch, Rockefeller University, New York, NY) (74). To identify KRN transgene-positive mice, peripheral blood samples were labeled with FITC-conjugated anti-CD4 (RM4-5) and PE-conjugated anti-TCR V β 6 (RR4-7) antibodies. Unconjugated antibodies were visualized with FITC-conjugated anti-rat IgG whereas biotinylated anti-CD11b was visualized with streptavidin-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Unless otherwise stated, all flow cytometry antibodies and their isotype controls were purchased from BD. All staining was performed in the presence of 2% FCS (Invitrogen). Samples were fixed in FACS Lysing Solution (BD) and analyzed on a FACS-Calibur (BD) using CellQuest software (BD). Neutrophils and CD4-positive T cells were identified based on positive labeling for Gr1 and CD4, respectively, along with their typical forward- and side-scatter characteristics.

In vitro functional assays. Adhesion-dependent activation was performed by stimulating murine neutrophils with 50 ng/ml of recombinant murine TNF (PeproTech), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pam $_3$ CSK $_4$ (EMC Microcollections), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ultrapurified LPS (InvivoGen), 10 ng/ml of recombinant murine GM-CSF (PeproTech), or 100 ng/ml of recombinant murine MIP-2 (PeproTech) while adherent to a plastic surface coated with 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of human fibrinogen (MP Biomedicals) as previously described (10, 11). Integrin-mediated activation in the absence of another soluble stimulus was achieved by plating neutrophils on surfaces precoated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of engineered polyvalent integrin ligand peptide (poly-RGD; F5022; Sigma-Aldrich). Neutrophil activation by immobilized immune complexes was achieved by plating the cells on immobilized HSA-anti-HSA (both obtained from Sigma-Aldrich) immune complexes without any additional stimulus as previously described (46). Activation of neutrophils in suspension was performed in Mg^{2+} -free

media essentially as previously described (10, 11, 73, 75) using 100 nM PMA (Sigma-Aldrich), 3 μ M fMLP (Sigma-Aldrich), or 50 ng/ml TNF. fMLP-stimulated cells were pretreated with 10 μ M cytochalasin B (CB; Sigma-Aldrich) for 10 min before cell activation. Where necessary, the reaction was stopped after 10 min (degranulation triggered by CB+fMLP) or 30 min (integrin and Fc receptor-mediated degranulation and spreading responses; TNF-induced integrin up-regulation).

Superoxide release was determined by a real-time cytochrome *c* (Sigma-Aldrich) reduction test, as previously described (51), using a multiplate reader (Multiskan Ascent; Thermo Fisher Scientific) in dual wavelength (550 and 540 nm) kinetic measurement mode. To simplify the presentation, unstimulated control values were subtracted from those of stimulated samples. Exocytosis of gelatinase was determined by in-gel gelatinase zymography as previously described (10, 46). Cell spreading was assessed after formalin fixation using an inverted microscope (DMI 6000B; Leica) with a 20 $\times$ phase-contrast objective connected to a charge-coupled device camera (DFC480; Leica).

Biochemical and signaling studies. Unstimulated WT and PLC γ 2^{-/-} neutrophils were lysed in a 1% Triton X-100–based lysis buffer (11, 73), and their Triton-soluble fraction were boiled in sample buffer, run on SDS-PAGE, and immunoblotted with antibodies against PLC γ 2 (Q-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), PLC γ 1 (1249; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), or β -actin (AC-74; Sigma-Aldrich), followed by peroxidase-labeled secondary antibodies (GE Healthcare). Where indicated, primary antibodies were preincubated with 0.4 μ g/ml of the relevant blocking peptides (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) before incubation with the immunoblotting membrane. Lysates prepared from thymus or spleen cells of WT mice served for comparisons of signal intensity.

Purified recombinant Myc-tagged human PLC γ 1 and PLC γ 2, expressed in Sf9 insect cells using a baculoviral expression system, were obtained from P. Gierschik (University of Ulm, Ulm, Germany) (76). For the quantification (titration) of PLC γ 1 and PLC γ 2 expression in neutrophils, various amounts of the two recombinant proteins along with murine neutrophil lysates were run on SDS-PAGE and immunoblotted using the aforementioned PLC γ 1 and PLC γ 2 antibodies as well as an antibody against the Myc epitope (clone 9E10; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The amino acid sequences of the human and murine proteins are practically identical around the putative antibody recognition sites in the cases of both PLC γ isoforms, whereas there is hardly any similarity between PLC γ 1 and PLC γ 2 at the same sites, which justifies the use of recombinant human PLC γ isoforms along with the aforementioned polyclonal antibodies for the quantification of the two murine proteins.

For biochemical signaling experiments, neutrophils were plated on a poly-RGD or immobilized immune complex surface, or they were stimulated by 50 ng/ml TNF, 1 μ g/ml Pam₃CSK₄, 10 ng/ml GM-CSF, or 100 ng/ml MIP-2 in Mg²⁺-free media in suspension. After 3-min (MIP-2) or 10-min (all other stimuli) incubations, the reaction was stopped and cell lysates were prepared in a Triton X-100–based lysis buffer (11, 73), except for immunoprecipitation assays where the lysis buffer was supplemented with 0.1% SDS and 0.5% sodium deoxycholate (RIPA). PLC γ 2 was precipitated using the Q-20 PLC γ 2 antibody and captured using a 1:1 mixture of protein A Sepharose (Invitrogen) and protein G Agarose (Invitrogen). Triton-soluble whole-cell lysates or PLC γ 2 immunoprecipitates were immunoblotted with antibodies against phosphotyrosine (clone 4G10; Millipore), PLC γ 2, p38 MAP kinase (C-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), ERK1/2 (combination of C-16 [ERK1] and C-14 [ERK2]; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), I κ -B α (Cell Signaling Technology), or phosphospecific antibodies (Cell Signaling Technology) against the p38 MAP kinase, ERK, and I κ -B α (14D4).

In vitro and in vivo migration. In vitro migration of neutrophils was assessed by a Transwell assay system essentially as previously described (10, 11). In brief, Transwell inserts with polycarbonate filters of 3- μ m pore size (Corning) were precoated with human fibrinogen, filled with suspensions of WT or PLC γ 2^{-/-} murine neutrophils, and inserted in 24-well plate wells filled with assay media containing varying concentrations of fMLP. The

migration of neutrophils into the lower compartment during a 60-min period was assessed by an acid phosphatase assay as previously described (11).

A competitive migration assay during sterile peritonitis in mixed bone marrow chimeras (11) was used to assess in vivo migration of neutrophils. To this end, bone marrow cells of PLC γ 2^{-/-} mice on the C57BL/6 genetic background (i.e., carrying the CD45.2 allele) were mixed with bone marrow cells from congenic mice expressing CD45.1 on the C57BL/6 genetic background at varying ratios ranging from 10 to 70% of CD45.2-expressing cells. This mixed cell suspension was injected intravenously into lethally irradiated CD45.1-expressing recipient mice, giving rise to mixed bone marrow chimeras carrying CD45.2-expressing PLC γ 2^{-/-} and CD45.1-expressing PLC γ 2^{+/+} hematopoietic cells. To exclude any effect of the different CD45 alleles on cell migration, a few control chimeras were generated in a similar fashion but using PLC γ 2^{+/+} (intact C57BL/6) mice as the CD45.2-expressing donor strain, giving rise to mixed chimeras with CD45.1- and CD45.2-expressing PLC γ 2^{+/+} hematopoietic cells. 5–8 wk after transplantation, the mixed bone marrow chimeras were injected intraperitoneally with 1 ml of 3% thioglycollate broth (Heipha Diagnostics). Blood was taken directly before as well as 2 and 4 h after the injection, and the peritoneal cavity was lavaged at 4 h. The relative percentage of CD45.1- and CD45.2-expressing neutrophils in the peripheral blood and peritoneal lavage samples was determined by flow cytometry in the Gr1-positive granulocyte gate. Relative migration of neutrophils of the CD45.2-positive PLC γ 2^{-/-} or PLC γ 2^{+/+} genotypes (relative to the CD45.1-expressing PLC γ 2^{+/+} cells) was calculated as follows:

$$\text{relative migration} = \frac{\left(\frac{\text{percentage of CD45.2 cells in peritoneum}}{\text{percentage CD45.2 cells in blood}} \right)}{\left(\frac{\text{percentage of CD45.1 cells in peritoneum}}{\text{percentage of CD45.1 cells in blood}} \right)}$$

Intravital microscopy and whole mount cremaster muscle preparation. Bone marrow chimeras were anesthetized using intraperitoneal injection of ketamine and xylazine and the cremaster muscle was prepared for intravital imaging as previously described (63). Intravital microscopy was performed on an upright microscope (BX51; Olympus) with a 40 $\times$ 0.75 NA saline immersion objective. The microcirculation was recorded using a charge-coupled device camera (CF8/1; Kappa) coupled to a recorder (S-VHS; Panasonic). Superfusion of the cremaster muscle and local treatment with 1 μ M fMLP was performed as previously described (63). Postcapillary venules ranged from 25 to 35 μ m in diameter and were observed before and during fMLP administration.

Geometric and hemodynamic parameters, such as vessel diameter, leukocyte diameter, and vessel segment length, of postcapillary venules were assessed from recorded video tapes using a digital image processing system as previously described (77). Spreading of adherent leukocytes in postcapillary venules was assessed by measuring the diameter (height) of attached leukocytes perpendicular to the vessel wall before and at various time points during fMLP superfusion as previously described (63). Mean blood flow velocities and wall shear rates (γ_w) were estimated as previously described (63). Rolling leukocyte flux fraction was defined as the ratio of rolling leukocytes to the total number of leukocytes passing the same vessel per minute (78). Leukocyte adhesion was defined as the number of adherent cells per millimeters squared of vessel surface area (63). Systemic leukocyte concentration was determined from blood samples taken at the end of the experiment as previously described (63).

For whole mount preparations, mouse cremaster muscles were surgically prepared, as described in the first paragraph of this section, and superfused with 1 μ M fMLP in superfusion buffer for 15 min. Thereafter, cremaster muscles were fixed with 4% paraformaldehyde and whole mounts were prepared as previously described (79). Fixed cremaster muscles were stained with Giemsa and analyzed for the number of intravascular and perivascular leukocytes using an upright microscope (Axioskop; Carl Zeiss, Inc.) through a 100 $\times$ 1.3 NA oil immersion objective. Whole mounts from untreated cremaster muscles prepared from both WT and PLC γ 2^{-/-} bone

marrow chimeras served as negative controls. All cremaster muscle experiments were independently assessed by two investigators blinded for the treatment and genotype of the mice.

K/B×N serum transfer arthritis. Mice carrying the KRN T cell receptor transgene (25) on the C57BL/6 genetic background were mated with NOD mice to obtain KRN transgene-positive offsprings on the C57BL/6 × NOD F1 genetic background (K/B×N mice) as well as their transgene-negative (B×N) littermates. The presence of the transgene was determined by flow cytometry as well as by looking for visible signs of arthritis in the K/B×N mice. Blood was taken by retroorbital bleeding and sera from transgene-positive and transgene-negative mice were pooled separately.

Arthritis was induced by intraperitoneal injection of 400 µl of arthritogenic (K/B×N) or control serum into WT or PLCγ2^{-/-} bone marrow chimeras or intact (nonchimeric) mice, followed by daily assessment of arthritis development for 2 wk. Visible clinical signs of arthritis were scored on a 0–10 scale by two investigators blinded for the origin and treatment of the mice. Ankle thickness was measured by a spring-loaded caliper (Kroeplin). For histological analysis, mice were killed 4 d after serum transfer and their ankle joints were fixed in formalin (Sigma–Aldrich). The joints were then decalcified, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (Histopathology Llc.). Photomicrographs were taken on a microscope (DMI 6000B; Leica).

To assess articular function, mice were placed on a custom-made wire grid (Charles River Laboratories) with identical wire thickness and spacing to a regular wire cage lid. The wire grid was flipped upside down and the length of time the mice held on to the grid was recorded. This test was performed three times daily during the period of 8–12 d after the serum injection. The obtained data were combined into holding-on curves similar to Kaplan–Meier survival curves.

Online supplemental information. Fig. S1 shows expression level of PLCγ isoforms in neutrophils and provides detailed information about PLCγ antibody specificity. Fig. S2 shows repopulation of PLCγ2^{-/-} bone marrow chimeras by donor-derived neutrophils after bone marrow transplantation. Fig. S3 shows functional responses of neutrophils from intact (nonchimeric) PLCγ2^{-/-} mice. Fig. S4 shows CD18-dependent activation of adherent neutrophils by various proinflammatory agonists. Table S1 shows hemodynamic and microvascular parameters in fMLP-stimulated cremaster muscle venules. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20081859/DC1>.

We thank James Ihle for the PLCγ2^{-/-} mice; Diane Mathis and Christophe Benoist for the KRN transgenic mice; Clifford Lowell for the Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-} mice; Arthur Beaudet for the CD18^{-/-} mice; Victor Tybulewicz for the Syk^{+/+} carriers; Peter Gierschik for recombinant PLCγ1 and PLCγ2; Tamás Németh, Dávid Győri, and Árpád Mikešy for help with experiments; Melitta Weissinger and Susanne Bierschenk for expert technical assistance during the cremaster muscle experiments; and Anna Erdei, Erzsébet Ligeti, József Mandl, and István Turai for access to equipment.

This work was supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA T046409 to A. Mócsai), the Hungarian Office for Research and Technology (NKFP-A1-0069/2006 to A. Mócsai), the US National Institutes of Health (R03 TW006831 to A. Mócsai) and the European Research Council (Starting Independent Investigator Grant No. 206283 to A. Mócsai). A. Mócsai was an International Senior Research Fellow of the Wellcome Trust and an EMBO/HHMI Scientist. Z. Jakus and A. Mócsai were recipients of Bolyai Research Fellowships from the Hungarian Academy of Sciences.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 19 August 2008

Accepted: 13 February 2009

REFERENCES

- Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173–182.
- Weiss, S.J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320:365–376.
- Eyles, J.L., A.W. Roberts, D. Metcalf, and I.P. Wicks. 2006. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils – forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2:500–510.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* 420:846–852.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80:617–653.
- Kiefer, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein, and T. Pawson. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18:4209–4220.
- Suzuki, Y., C. Gomez-Guerrero, I. Shirato, O. Lopez-Franco, J. Gallego-Delgado, G. Sanjuan, A. Lazaro, P. Hernandez-Vargas, K. Okumura, Y. Tomino, et al. 2003. Pre-existing glomerular immune complexes induce polymorphonuclear cell recruitment through an Fc receptor-dependent respiratory burst: Potential role in the perpetuation of immune nephritis. *J. Immunol.* 170:3243–3253.
- Lowell, C.A., L. Fumagalli, and G. Berton. 1996. Deficiency of Src family kinases p59/61^{hck} and p58^{lck} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* 133:895–910.
- Mócsai, A., E. Ligeti, C.A. Lowell, and G. Berton. 1999. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* 162:1120–1126.
- Mócsai, A., C.L. Abram, Z. Jakus, Y. Hu, L.L. Lanier, and C.A. Lowell. 2006. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat. Immunol.* 7:1326–1333.
- Mócsai, A., M. Zhou, F. Meng, V.L. Tybulewicz, and C.A. Lowell. 2002. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 16:547–558.
- Abtahian, F., N. Bezman, R. Clemens, E. Sebzda, L. Cheng, S.J. Shattil, M.L. Kahn, and G.A. Koretzky. 2006. Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 26:6936–6949.
- Zou, W., H. Kitaura, J. Reeve, F. Long, V.L. Tybulewicz, S.J. Shattil, M.H. Ginsberg, F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum. 2007. Syk, c-Src, the αvβ3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J. Cell Biol.* 176:877–888.
- Graham, D.B., L.M. Stephenson, S.K. Lam, K. Brim, H.M. Lee, J. Bautista, S. Gilfillan, S. Akilesh, K. Fujikawa, and W. Swat. 2007. An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204:2889–2897.
- Wakselman, S., C. Bechade, A. Roumier, D. Bernard, A. Triller, and A. Bessis. 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J. Neurosci.* 28:8138–8143.
- Jakus, Z., S. Fodor, C.L. Abram, C.A. Lowell, and A. Mócsai. 2007. Immunoreceptor-like signaling by β2 and β3 integrins. *Trends Cell Biol.* 17:493–501.
- Ji, Q.S., G.E. Winnier, K.D. Niswender, D. Horstman, R. Wisdom, M.A. Magnussen, and G. Carpenter. 1997. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-γ1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:2999–3003.
- Liao, H.J., T. Kume, C. McKay, M.J. Xu, J.N. Ihle, and G. Carpenter. 2002. Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 277:9335–9341.
- Wang, D., J. Feng, R. Wen, J.C. Marine, M.Y. Sangster, E. Parganas, A. Hoffmeyer, C.W. Jackson, J.L. Cleveland, P.J. Murray, and J.N. Ihle. 2000. Phospholipase Cγ2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity.* 13:25–35.
- Wen, R., S.T. Jou, Y. Chen, A. Hoffmeyer, and D. Wang. 2002. Phospholipase Cγ2 is essential for specific functions of FcεR and FcγR. *J. Immunol.* 169:6743–6752.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, W.L. Dean, J. Frampton, and S.P. Watson. 2003. Integrin α2β1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCγ2. *J. Cell Biol.* 160:769–780.
- Wonerow, P., A.C. Pearce, D.J. Vaux, and S.P. Watson. 2003. A critical role for phospholipase Cγ2 in αIIbβ3-mediated platelet spreading. *J. Biol. Chem.* 278:37520–37529.

23. Graham, D.B., C.M. Robertson, J. Bautista, F. Mascarenhas, M.J. Diacovo, V. Montgrain, S.K. Lam, V. Cremasco, W.M. Dunne, R. Faccio, et al. 2007. Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC γ 2 signaling axis in mice. *J. Clin. Invest.* 117:3445–3452.
24. Firestein, G.S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 423:356–361.
25. Kouskoff, V., A.S. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 87:811–822.
26. Korganow, A.S., H. Ji, S. Mangialaio, V. Duchatelle, R. Pelanda, T. Martin, C. Degott, H. Kikutani, K. Rajewsky, J.L. Pasquali, et al. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*. 10:451–461.
27. Wipke, B.T., and P.M. Allen. 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 167:1601–1608.
28. Nandakumar, K.S., L. Svensson, and R. Holmdahl. 2003. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: Description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am. J. Pathol.* 163:1827–1837.
29. Tanaka, D., T. Kagari, H. Doi, and T. Shimoizato. 2006. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology*. 119:195–202.
30. Jonsson, H., P. Allen, and S.L. Peng. 2005. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat. Med.* 11:666–671.
31. Lawlor, K.E., I.K. Campbell, D. Metcalf, K. O'Donnell, A. van Nieuwenhuijze, A.W. Roberts, and I.P. Wicks. 2004. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:11398–11403.
32. Chen, M., B.K. Lam, Y. Kanaoka, P.A. Nigrovic, L.P. Audoly, K.F. Austen, and D.M. Lee. 2006. Neutrophil-derived leukotriene B₄ is required for inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203:837–842.
33. Kim, N.D., R.C. Chou, E. Seung, A.M. Tager, and A.D. Luster. 2006. A unique requirement for the leukotriene B₄ receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203:829–835.
34. Nakamura, A., T. Nukiwa, and T. Takai. 2003. Deregulation of peripheral B-cell development in enhanced severity of collagen-induced arthritis in Fc γ RIIB-deficient mice. *J. Autoimmun.* 20:227–236.
35. Kleinau, S., P. Martinsson, and B. Heyman. 2000. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fc γ receptors. *J. Exp. Med.* 191:1611–1616.
36. Ji, H., K. Ohmura, U. Mahmood, D.M. Lee, F.M. Hofhuis, S.A. Boackle, K. Takahashi, V.M. Holers, M. Walport, C. Gerard, et al. 2002. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity*. 16:157–168.
37. Kagari, T., D. Tanaka, H. Doi, and T. Shimoizato. 2003. Essential role of Fc γ receptors in anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 170:4318–4324.
38. Kaplan, C.D., Y. Cao, J.S. Verbeek, M. Tunyogi-Csapo, and A. Finnegan. 2005. Development of proteoglycan-induced arthritis is critically dependent on Fc γ receptor type III expression. *Arthritis Rheum.* 52:1612–1619.
39. Diaz de Stahl, T., M. Andren, P. Martinsson, J.S. Verbeek, and S. Kleinau. 2002. Expression of Fc γ RIII is required for development of collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 32:2915–2922.
40. Nabbe, K.C., A.B. Blom, A.E. Holthuysen, P. Boross, J. Roth, S. Verbeek, P.L. van Lent, and W.B. van den Berg. 2003. Coordinate expression of activating Fc γ receptors I and III and inhibiting Fc γ receptor type II in the determination of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex-mediated arthritis. *Arthritis Rheum.* 48:255–265.
41. Ioan-Facsinay, A., S.J. de Kimpe, S.M. Hellwig, P.L. van Lent, F.M. Hofhuis, H.H. van Ojik, C. Sedlik, S.A. da Silveira, J. Gerber, Y.F. de Jong, et al. 2002. Fc γ RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity*. 16:391–402.
42. Boross, P., P.L. van Lent, J. Martin-Ramirez, J. van der Kaa, M.H. Mulder, J.W. Claassens, W.B. van den Berg, V.L. Arandhara, and J.S. Verbeek. 2008. Destructive arthritis in the absence of both Fc γ RI and Fc γ RIII. *J. Immunol.* 180:5083–5091.
43. Boross, P., and J.S. Verbeek. 2006. The complex role of Fc γ receptors in the pathology of arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 28:339–350.
44. Watts, G.M., F.J. Beurskens, I. Martin-Padura, C.M. Ballantyne, L.B. Klickstein, M.B. Brenner, and D.M. Lee. 2005. Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1. *J. Immunol.* 174:3668–3675.
45. Flick, M.J., C.M. LaJeunesse, K.E. Talmage, D.P. Witte, J.S. Palumbo, M.D. Pinkerton, S. Thornton, and J.L. Degen. 2007. Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin $\alpha_4\beta_2$ binding motif. *J. Clin. Invest.* 117:3224–3235.
46. Jakus, Z., T. Németh, J.S. Verbeek, and A. Mócsai. 2008. Critical but overlapping role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J. Immunol.* 180:618–629.
47. Ichise, H., T. Ichise, O. Ohtani, and N. Yoshida. 2009. Phospholipase C γ 2 is necessary for separation of blood and lymphatic vasculature in mice. *Development*. 136:191–195.
48. Abtahian, F., A. Guerriero, E. Sebzdá, M.M. Lu, R. Zhou, A. Mócsai, E.E. Myers, B. Huang, D.G. Jackson, V.A. Ferrari, et al. 2003. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*. 299:247–251.
49. Nathan, C.F. 1987. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 80:1550–1560.
50. Nathan, C., S. Srimal, C. Farber, E. Sanchez, L. Kabbash, A. Asch, J. Gailit, and S.D. Wright. 1989. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J. Cell Biol.* 109:1341–1349.
51. Jakus, Z., G. Berton, E. Ligeti, C.A. Lowell, and A. Mócsai. 2004. Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on co-stimulation through low affinity Fc γ Rs: full activation requires both integrin and nonintegrin signals. *J. Immunol.* 173:2068–2077.
52. Kotzin, B.L., S. Strober, E.G. Engleman, A. Calin, R.T. Hoppe, G.S. Kansas, C.P. Terrell, and H.S. Kaplan. 1981. Treatment of intractable rheumatoid arthritis with total lymphoid irradiation. *N. Engl. J. Med.* 305:969–976.
53. Solomon, S., N. Rajasekaran, E. Jeisy-Walder, S.B. Snapper, and H. Illges. 2005. A crucial role for macrophages in the pathology of K/BxN serum-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 35:3064–3073.
54. Bruhns, P., A. Samuelsson, J.W. Pollard, and J.V. Ravetch. 2003. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity*. 18:573–581.
55. Lee, D.M., D.S. Friend, M.F. Gurish, C. Benoist, D. Mathis, and M.B. Brenner. 2002. Mast cells: A cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science*. 297:1689–1692.
56. Zhou, J.S., W. Xing, D.S. Friend, K.F. Austen, and H.R. Katz. 2007. Mast cell deficiency in *Kit^{W^{sh}}* mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J. Exp. Med.* 204:2797–2802.
57. Gurish, M.F., and J.A. Boyce. 2002. Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 22:107–118.
58. Kitamura, Y., M. Shimada, K. Hatanaka, and Y. Miyano. 1977. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*. 268:442–443.
59. Newbrough, S.A., A. Mócsai, R.A. Clemens, J.N. Wu, M.A. Silverman, A.L. Singer, C.A. Lowell, and G.A. Koretzky. 2003. SLP-76 regulates Fc γ receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity*. 19:761–769.
60. Gakidis, M.A., X. Cullere, T. Olson, J.L. Wilsbacher, B. Zhang, S.L. Moores, K. Ley, W. Swat, T. Mayadas, and J.S. Brugge. 2004. Vav GEFs are required for β_2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J. Cell Biol.* 166:273–282.
61. Utomo, A., X. Cullere, M. Glogauer, W. Swat, and T.N. Mayadas. 2006. Vav proteins in neutrophils are required for Fc γ R-mediated signaling to Rac GTPases and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase component p40^{phox}. *J. Immunol.* 177:6388–6397.

62. Schymeinsky, J., A. Sindrilaru, D. Frommhold, M. Sperandio, R. Gerstl, C. Then, A. Mócsai, K. Scharffetter-Kochanek, and B. Walzog. 2006. 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*. 108:3919–3927.
63. Frommhold, D., I. Mannigel, J. Schymeinsky, A. Mócsai, J. Poeschl, B. Walzog, and M. Sperandio. 2007. Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol*. 8:31.
64. Wen, R., Y. Chen, J. Schuman, G. Fu, S. Yang, W. Zhang, D.K. Newman, and D. Wang. 2004. An important role of phospholipase C γ 1 in pre-B-cell development and allelic exclusion. *EMBO J*. 23:4007–4017.
65. Chen, Y., X. Wang, L. Di, G. Fu, L. Bai, J. Liu, X. Feng, J.M. McDonald, S. Michalek, Y. He, et al. 2008. Phospholipase C γ 2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem*. 283:29593–29601.
66. Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, and G. Kollias. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*. 10:4025–4031.
67. Sakaguchi, N., T. Takahashi, H. Hata, T. Nomura, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Sakihama, T. Matsutani, I. Negishi, S. Nakatsuru, and S. Sakaguchi. 2003. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 426:454–460.
68. Hirota, K., M. Hashimoto, H. Yoshitomi, S. Tanaka, T. Nomura, T. Yamaguchi, Y. Iwakura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 2007. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med*. 204:41–47.
69. Meng, F., and C.A. Lowell. 1998. A β_1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *EMBO J*. 17:4391–4403.
70. Turner, M., P.J. Mee, P.S. Costello, O. Williams, A.A. Price, L.P. Duddy, M.T. Furlong, R.L. Geahlen, and V.L. Tybulewicz. 1995. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature*. 378:298–302.
71. Scharffetter-Kochanek, K., H. Lu, K. Norman, N. van Nood, F. Munoz, S. Grabbe, M. McArthur, I. Lorenzo, S. Kaplan, K. Ley, et al. 1998. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J. Exp. Med*. 188:119–131.
72. Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J.V. Ravetch. 1994. FcR γ -chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell*. 76:519–529.
73. Mócsai, A., H. Zhang, Z. Jakus, J. Kitaura, T. Kawakami, and C.A. Lowell. 2003. G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood*. 101:4155–4163.
74. Nimmerjahn, F., P. Bruhns, K. Horiuchi, and J.V. Ravetch. 2005. Fc γ RIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. 23:41–51.
75. Mócsai, A., Z. Jakus, T. Vántus, G. Berton, C.A. Lowell, and E. Ligeti. 2000. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol*. 164:4321–4331.
76. Walliser, C., M. Retlich, R. Harris, K.L. Everett, M.B. Josephs, P. Vatter, D. Esposito, P.C. Driscoll, M. Katan, P. Gierschik, and T.D. Bunney. 2008. Rac regulates its effector phospholipase C γ 2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem*. 283:30351–30362.
77. Pries, A.R. 1988. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp*. 7:327–345.
78. Sperandio, M., J. Pickard, S. Unnikrishnan, S.T. Acton, and K. Ley. 2006. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol*. 416:346–371.
79. Frommhold, D., A. Ludwig, M.G. Bixel, A. Zarbock, I. Babushkina, M. Weissinger, S. Cauwenberghs, L.G. Ellies, J.D. Marth, A.G. Beck-Sickinger, et al. 2008. Sialyltransferase ST3Gal-IV controls CXCR2-mediated firm leukocyte arrest during inflammation. *J. Exp. Med*. 205: 1435–1446.