

A rheumatoid arthritises betegek B limfocitáiban zajló jelátviteli folyamatok vizsgálata fehérjék foszforilációs profiljának összehasonlítása alapján

készítette:

Bankó Zsuzsanna

Biológus MSc.

Molekuláris-, Immun- és Mikrobiológia szakirány

témavezető:

Dr. Sármay Gabriella

Egyetemi tanár

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2012.10.26.

Tartalom

Irodalmi áttekintés	3
Célkitűzések	5
Anyagok és módszerek.....	5
Eredmények.....	8
1. A kontroll mintákban mérhető alapfoszforiláció	8
2. A α -IgG/M-mel történő stimuláció utáni foszforilációs értékek, illetve összehasonlításuk a kontrollal.....	9
3. CpG-vel történő stimuláció utáni foszforilációs értékek, illetve összehasonlításuk a kontrollal.....	12
4. A α -IgG/M-mel és CpG-vel szimultán történő stimuláció utáni foszforilációs értékek, illetve összehasonlításuk a kontrollal	15
Összefoglaló	19
Irodalom	22

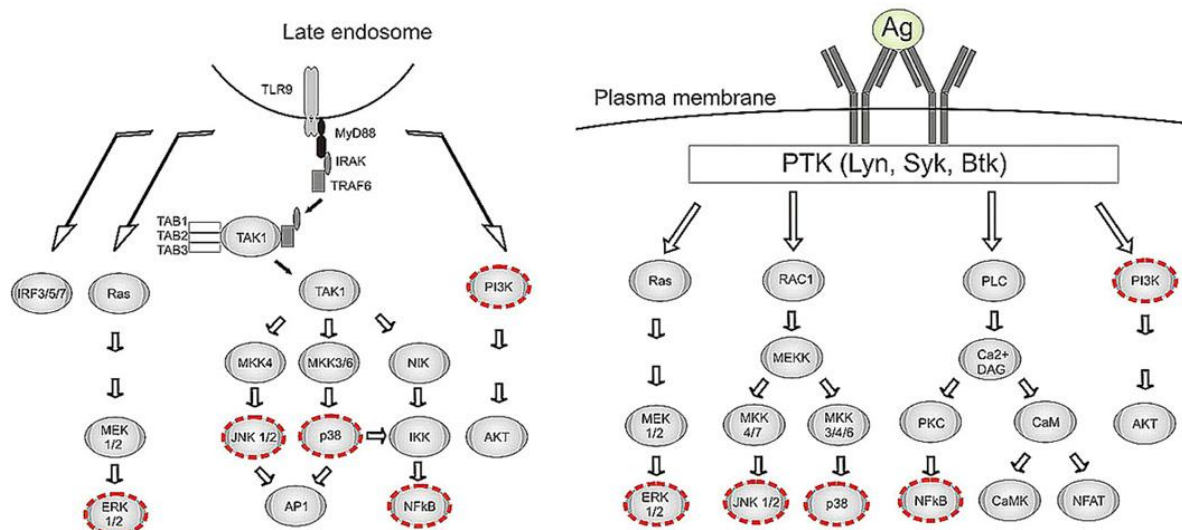
Irodalmi áttekintés

A rheumatoid arthritis (RA) olyan szisztémás autoimmun betegség, melynek kialakulásában fontos szerepet játszik az immunrendszer aktiválódása, bár jelenleg a kiváltó okokat nem ismerjük. A világ népességének közel 1%-át érinti (1). A betegség kialakulásában fontos szerepet játszó autoantitestek képzéséért a saját struktúrákat felismerő autoimmun B limfociták felelősek. Ilyen ellenanyag a rheuma faktor, amely az IgG konstans régióját felismerő ellenanyag, illetve az arginin poszttranszlációs módosításaként kialakuló citrullint tartalmazó fehérjék elleni autoantitestek (2). A B sejtek ezen kívül gyulladásos citokineket termelnek és hatékony antigén prezentáló sejtnek (APC) aktiválják a T sejtet immunválaszt (3,4), ezáltal több úton is képesek részt venni a betegség kialakításában.

A naív B sejtek ellenanyag-termelő plazmasejtté valóéréséhez elengedhetetlen a BCR-en keresztül érkező megfelelő erősségű szignál. Ezen kívül egyéb receptorokon keresztüli stimulus is hozzájárul a B sejtek aktiválásához. A TLR9 bakteriális eredetű metilátlan DNS motívumokat köt, és a B limfociták proliferációját, izotípusváltását, plazmasejttéérését segíti elő. A TLR9-en keresztül érkező erős jel képes olyan túlélő szignálokat közvetíteni, melyek hatására a szervezet saját struktúráit felismerő B limfociták nem kerülnek anergiás állapotba, illetve nem pusztulnak el apoptózissal - hozzájárulva ezáltal autoimmun betegségek kialakulásához (5-6). A betegek szinoviális ízületeiben található szöveti sejtekben kimutatták a MAPK-ok fokozott aktivitóját (7). Régóta ismert, hogy a szinoviális térbe migráló limfociták negyedleges nyirokcsomót is képesek létrehozni, és az itt található B limfociták képesek autoreaktív ellenanyagot termelő plazmasejtté alakulni (8, 9). Emellett az RA-s betegek szinóviájából izolált limfociták jelátviteli molekulái (p38, Erk és JNK) magasabb aktivitást mutattak, mint az egészségesekből származók (10).

Újabb kutatások kimutatták, hogy nemcsak a szinóviában lévő B limfociták mutatnak fokozott aktivitást, hanem a keringésben lévő limfociták jelátviteli molekuláinak is megváltozik a foszforilációs profilja autoimmun (RA-s, SLE-s) betegekben (1,11). A p38 és az ERK mitogén-aktivált szerin és treonin protein kinázok. Extracelluláris jelek hatására aktiválódnak, melyek lehetnek növekedési faktorok, citokinek, az ozmotikus stressz vagy a BCR-en keresztül érkező antigén stimulus (12). A kinázkaskád utolsó elemei transzkripciós faktorokat aktiválnak, melyek a DNS

átíródásának szabályozásán keresztül alakítják ki a sejt válaszát a különböző jelekre. A kináz kaszkádokat befolyásolja a TLR9-en keresztüli stimulus is, így mind a p38, mind az Erk aktiválódik CpG oligonukleotid (TLR9 agonista ligandum) hatására (13, 14; 15 - 1. ábra).



1. ábra Az ábra bal oldalán a TLR9-en keresztüli jelátviteli utak, a jobb oldalon pedig a BCR-en keresztüli útvonalak egyszerűsített sémája látható.

A CREB (CRE binding protein) a citoplazmában található fehérje, a több kináz foszforilálhatja (PKA, PKC, MAPK) és ennek következményeként képes bejutni a sejtmagba, ahol a c-AMP response element (CRE) promotor részhez kötődve többek között anti-apoptotikus molekulát átírását serkenti (16, 17, 18).

A fenti eredmények alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy a vizsgált jelátviteli molekulák alapaktiváltságban látható különbségek milyen hatással vannak a B sejtek aktivációjára. Feltételeztük, hogy a magasabb alapaktiváltság mellett ugyanakkora aktiváló stimulus kisebb mértékben tudja aktiválni a betegek B limfocitáit. Kutatásunk során ezért két különböző, a sejt aktiválódásában fontos kináz molekula (p38, ERK) és a jelátviteli útvonalak kimeneteként egy transzkripciós faktor (CREB) foszforiláltságát mértük BCR és/vagy TLR9 stimulus után áramlási citométeren. Ez a technika alkalmas arra, hogy egy mintán belül szimultán több populációban vizsgáljuk a számunkra fontos fehérjék foszforilációs szintjét. A foszforilációs mintázatok feltérképezése új információkat szolgáltat a betegség jobb megértéséhez, hiszen a korai tünetek több különböző betegségre utalhatnak,

ezért a foszforilációs mintázatok eltérései segítségül szolgálhatnak a betegség hatékonyabb diagnosztikájában.

Célkitűzések:

- megvizsgálni a p38, az ERK és a CREB bazális foszforilációját az egészségesekben és a betegekben,
- megmérni, hogy a BCR-en illetve TLR9-en keresztül érkező stimulus után hogyan változik ezen fehérjék foszforilációja,
- összehasonlítani az aktiválódás mértékét (az aktivált minták és kontroll minták hányadosa) és az így kapott értéket összevetni egészségesek és betegek között.

Anyagok és módszerek:

Minták:

Tíz beteg és tíz egészséges ember B limfocitáit vizsgáltuk. A betegség egyénenként változó, hullámzó lefutást mutat, aktuális állapotára a DAS (*Disease Activity Score*)-ból következtethetünk. Ha a DAS értéke 2 és 5 között van, akkor a beteg inaktívnak, ha 5-nél magasabb, akkor a betegség aktívnak számít. A kísérleteinkben szereplő betegek közül öten aktív betegnek (DAS: 9,57; 7,73; 5,99; 21,38; 6,93), öten pedig inaktívnak (DAS: 2,49; 2,48; 3,43; 2,41; 2,09) számítottak.

Sejt izolálás:

A perifériás mononukleáris sejteket (PBMC-t) perifériás vérből sűrűséggradiens centrifugálással izoláltuk Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) segítségével.

A sejteket az aktiváció előtt 10^7 sejt/ml-es koncentrációban üres médiumban (RPMI-I 0% FCS) inkubáltuk 30percig, 37 °C-on.

Aktiválás:

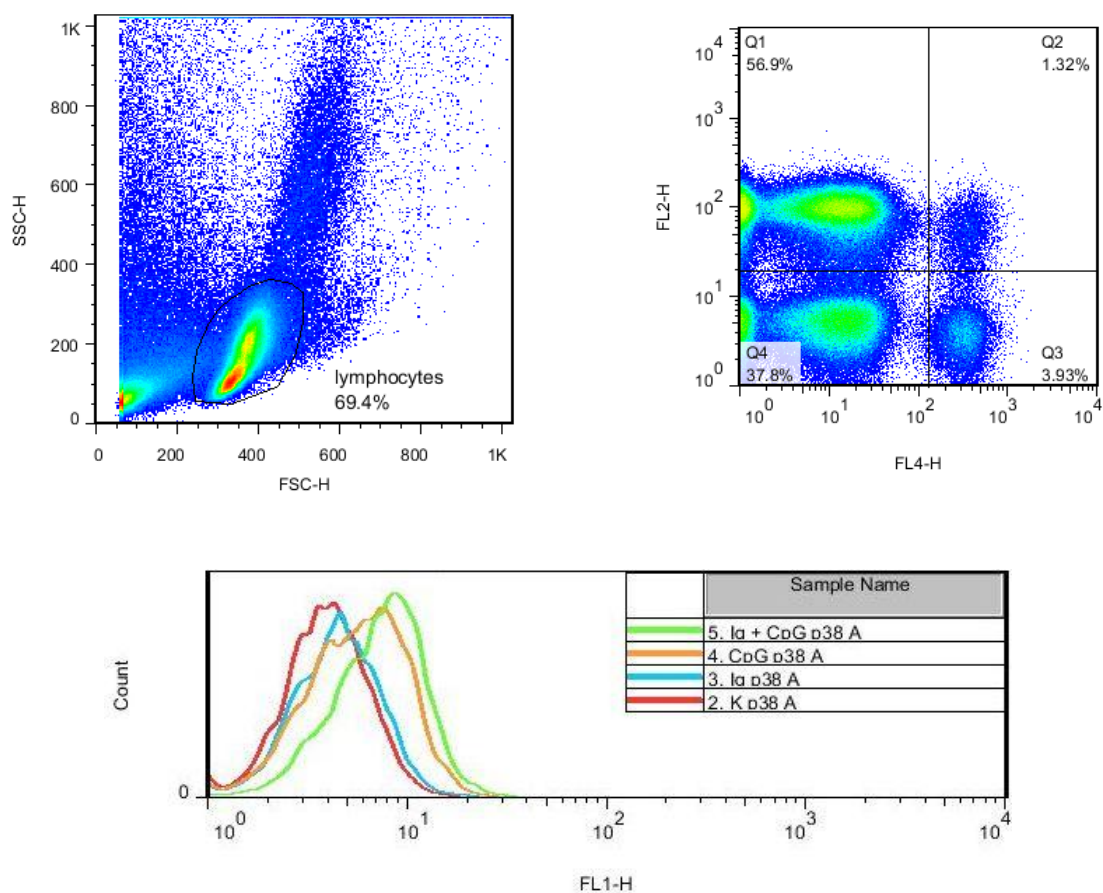
A sejtek BCR-en keresztüli aktiválása 7,5 µg/ml affinitás tisztított F(ab')₂ fragmentummal (Goat Anti-Human IgG + IgM (H+L) (Jackson Laboratories)), a TLR9-en történő aktiváció pedig 4 µg/ml metilálatlan CpG ODN-el (5'-tcgtcgtttgtcgtttgtcgt'-3') (Sigma) történt, 30percen keresztül, 37 °C-n. Az aktiváció leállítására 2% végkoncentrációjú paraformaldehidet használtunk.

Permeabilizálás és jelölés:

Az intracelluláris fehérjék jelöléséhez a sejteket permeabilizáltuk jégen 500µl Perm Buffer III-mal, majd A488-cal konjugált pp38, pERK és pCREB-et felismerő ellenanyagokkal festettük meg. A PBMC-ből a B sejteket anti-CD20-A647, ezen belül a memória B sejt populációt anti-CD27-PE ellenanyag segítségével különítettük el.

Mérés és kiértékelés:

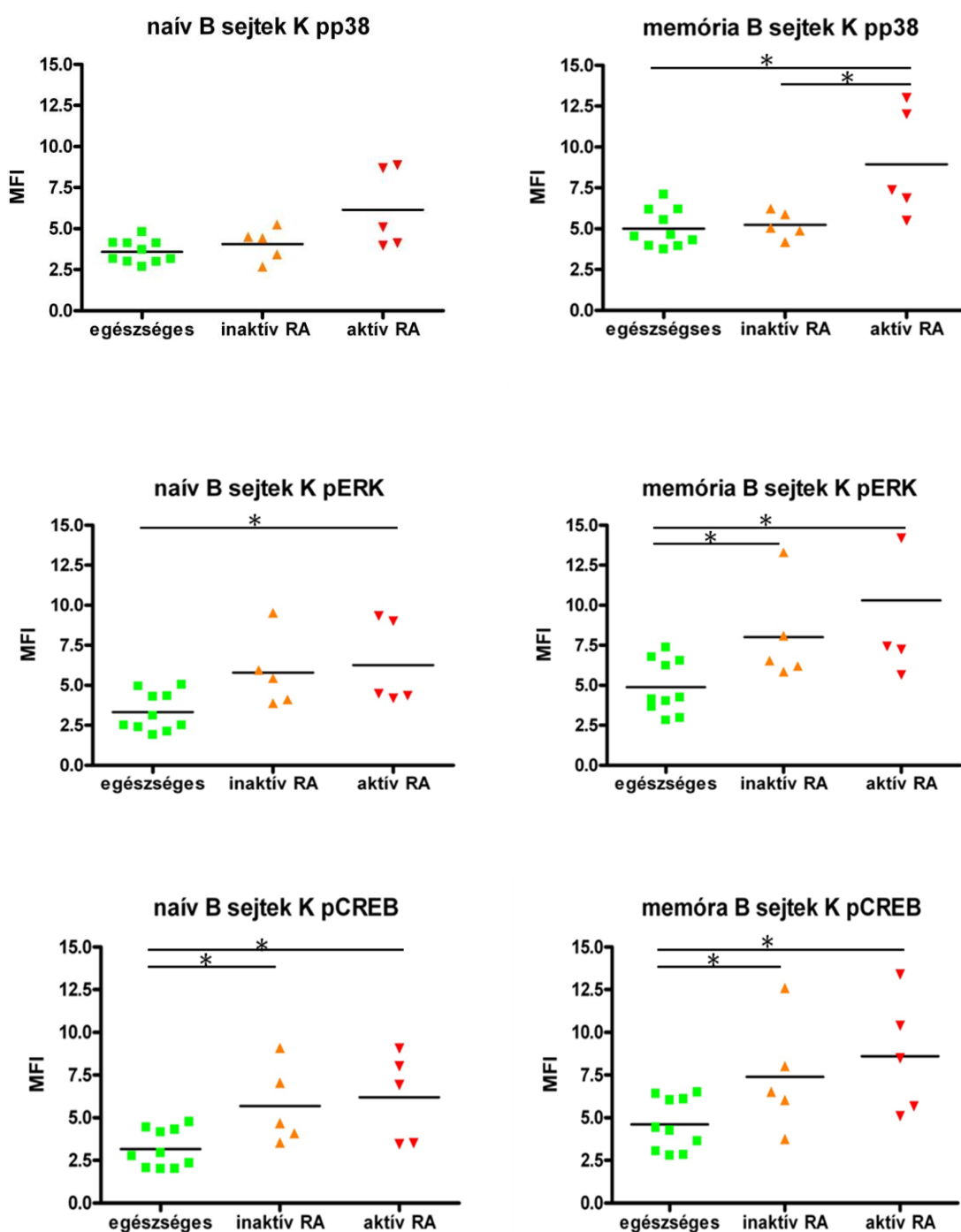
A naív és memória B sejtek jelátviteli molekuláinak foszforilációját áramlási citométeren (FACSCalibur) mértük. Az FSC-SSC alapján a PBMC-ből kiválasztottuk a limfocitákat, majd kvadráns analízissel elkülönítettük az A647-tel jelölődött B limfocitákat, illetve a PE-nel is jelölődött kettősen pozitív memória B limfocitákat (FL2-es ill. FL4-es csatornában). A foszforiláltság mértékében jelentkező különbségeket a sejtek FL1-es csatornában mért fluoreszcencia alapján állapítottuk meg (2. ábra). A minták közötti szignifikáns eltérést permutációs teszt segítségével igazoltuk.



2. ábra Az FSC-SSC alapján a PBMC-ből kiválasztjuk a limfocitákat, majd kvadráns analízissel elkülönítjük az A647-tel jelölődött B limfocitákat (Q3) és a PE-nel is jelölődött kettősen pozitív memória B limfocitákat (Q2). A hisztogrammon a p38 foszforilációjának változása látható különböző stimulusok hatására.

Eredmények:

1. A kontroll mintákban mérhető alapfoszforiláció (3. ábra)

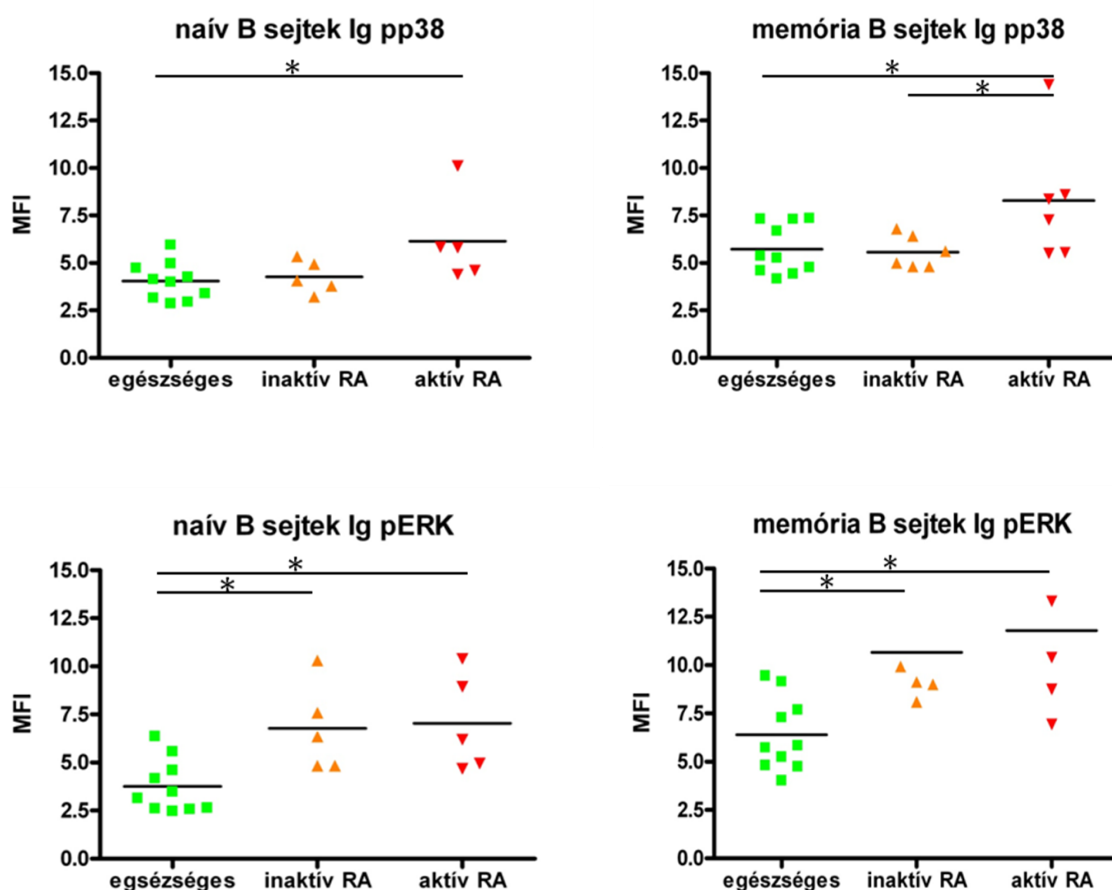


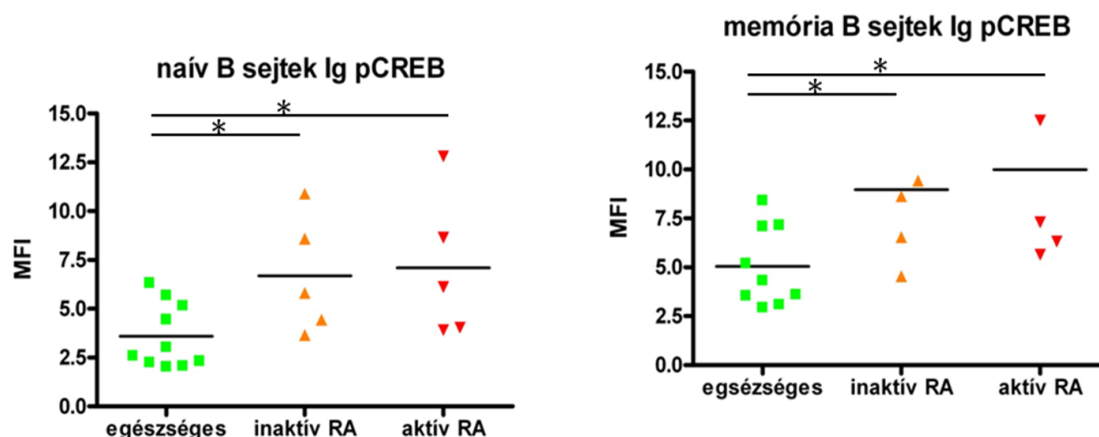
3. ábra A kontroll mintákban található fehérjék bazális foszforilációs szintje (1. sor: pp38 a naív B limfocitákban, pp38 a memória sejtekben; 2. sor: pERK a naív B limfocitákban, pERK a memória sejtekben, 3. sor: pCREB a naív B limfocitákban, pCREB a memória sejtekben)

A p38 fehérje bazális foszforilációs szintje szignifikánsan különbözik ($p < 0,05$) az egészséges emberekből izolált és az aktív betegekből származó naív és memória B limfocitákban. A memória B limfociták esetében emellett szignifikáns különbség figyelhető meg az inaktív és az aktív betegeken lévő p38 fehérje alapfoszforilációs szintjében is (3. ábra).

A pERK és a pCREB alapfoszforilációs szintje mind az aktív mind az inaktív betegekből származó B sejtekben jelentősen eltér az egészségesekből származó fehérjékétől, úgy a naív, mint a memória B sejt populációk esetében (3. ábra).

2. A α -IgG/M-mel történő stimuláció utáni foszforilációs értékek (4/a. ábra), illetve összehasonlításuk a kontrollal (4/b. ábra)

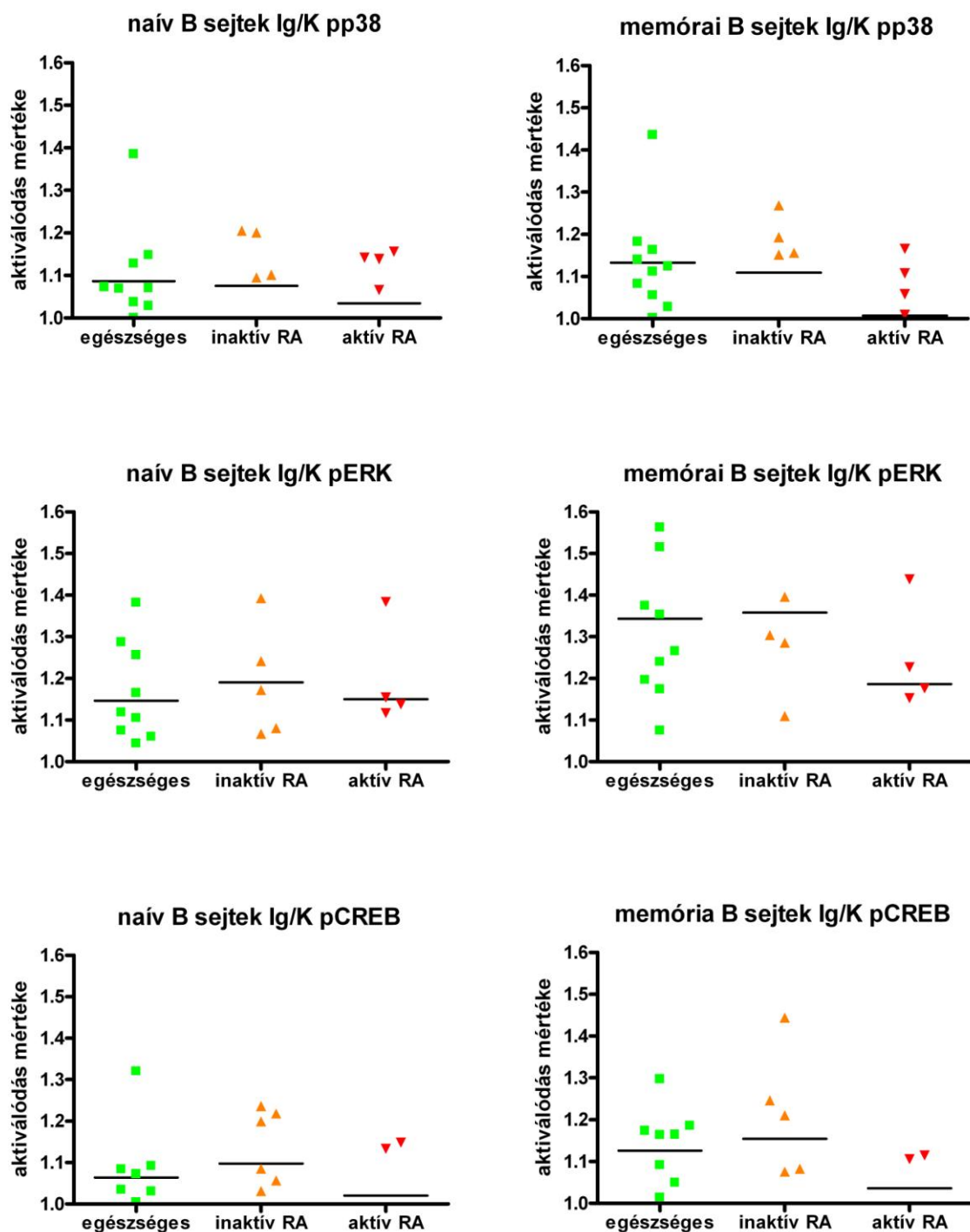




4/a. ábra Az α -IgG/M-mel kezelt mintákban található fehérjék foszforilációs szintje (1. sor: pp38 a naív B limfocitákban, pp38 a memória sejtekben; 2. sor: pERK a naív B limfocitákban, pERK a memória sejtekben, 3. sor: pCREB a naív B limfocitákban, pCREB a memória sejtekben)

A 4/a. ábrán látható, hogy a BCR-en keresztüli stimulust követően szignifikáns különbség figyelhető meg a p38 fehérje foszforilációs szintjében az egészségesekből, ill. az aktív betegekből izolált naív B limfocitákból származó minták esetében. A memória B limfociták mintáiban nem csak az egészségesekből és az aktív betegekből származó sejtek között figyelhető meg a különbség, hanem az inaktív és aktív betegekből származó minták között is. A pERK és a pCREB esetében mind a naív mind a memória B limfociták mintáiban szignifikáns emelkedés tapasztalható az egészségesek mintáihoz viszonyítva.

Mivel arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen mértékben tudnak aktiválódni a vizsgált jelátviteli molekulák a különböző állapotú betegeken illetve egészséges emberekben, ezért összehasonlítottuk a fehérjék aktivációjának mértékét a különböző stimulusokat követően. Egy adott fehérje aktivációjának mértékét úgy kaptuk meg, hogy a stimuláció után mért átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékét elosztottuk az aktiválatlan (kontroll) minta MFI értékével. Az α -IgG/M-mel való stimuláció után kapott eredményeket a következő ábra szemlélteti (4/b. ábra).

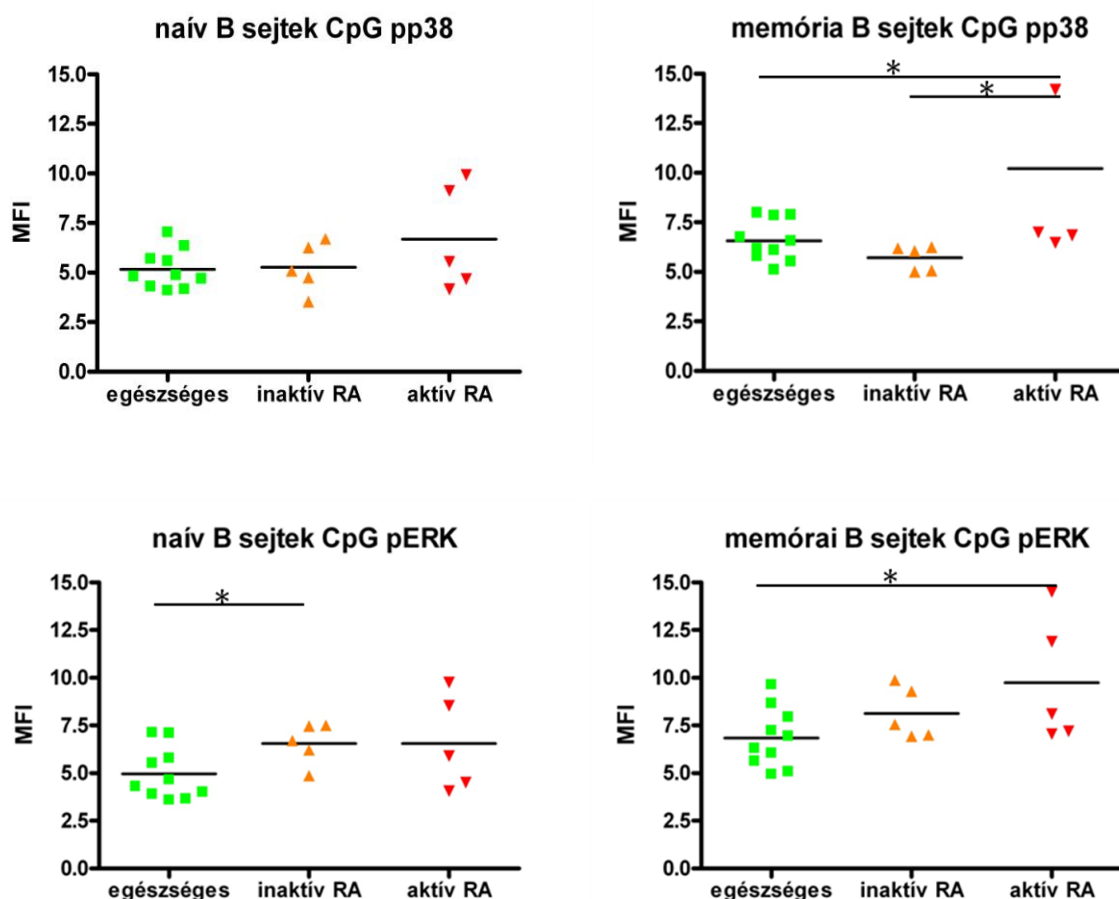


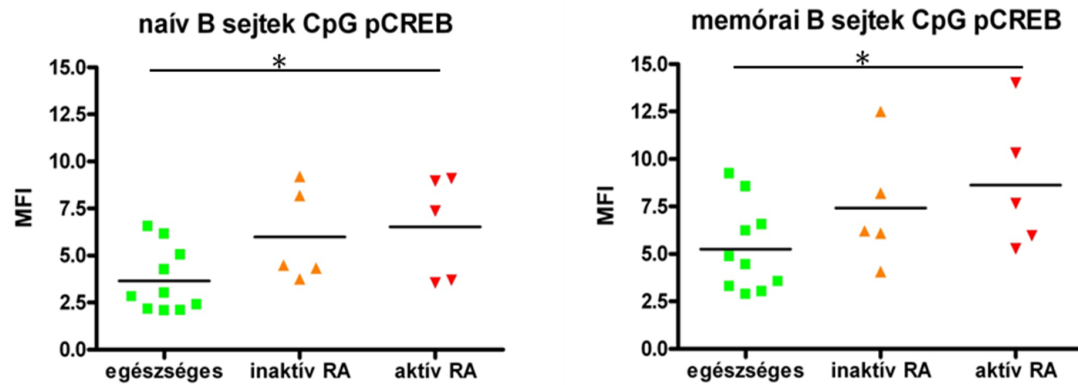
4/b. ábra Az α -IgG/M-mel kezelt mintákban található fehérjék foszforilációs szintje a kontrollal leosztva utal az aktiváció mértékére. (1. sor: α -IgG/M-mel kezelt pp38/K pp38 a naív B limfocitákban, α -IgG/M-mel kezelt pp38/K pp38 a memória sejtekben; 2. sor: α -IgG/M-mel kezelt pERK/ K pERK a naív B limfocitákban, és a memória sejtekben ;3. sor: α -IgG/M-mel kezelt pCREB/ K pCREB a naív B limfocitákban, és a memória sejtekben).

A 4/b. ábrán látszik, hogy a α -IgG/M-mel kezelt minták MFI értékét elosztva a megfelelő kontroll minták értékeivel egyik esetben sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, vagyis a betegek és az egészségesek BCR stimulusra hasonló mértékben aktiválódtak.

3. CpG-vel történő stimuláció utáni foszforilációs értékek (5/a. ábra), illetve összehasonlításuk a kontrollal (5/b. ábra)

A továbbiakban a TLR9-en keresztül történő stimuláció hatására bekövetkező változásokat hasonlítottuk össze.

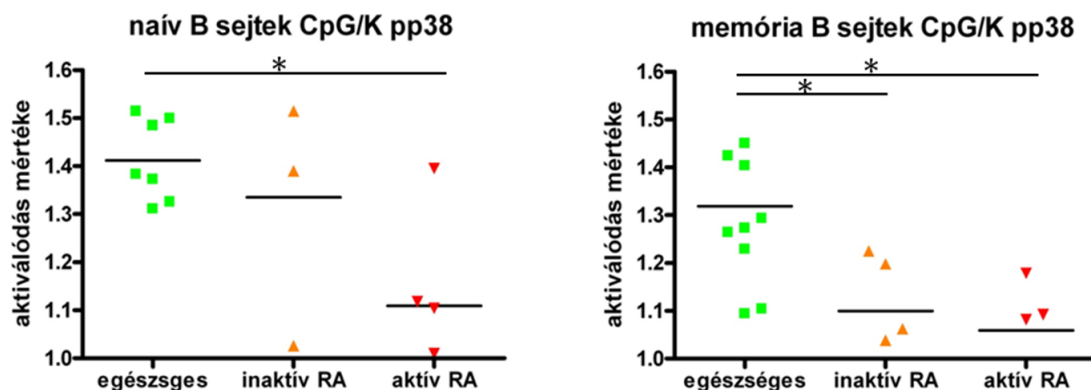


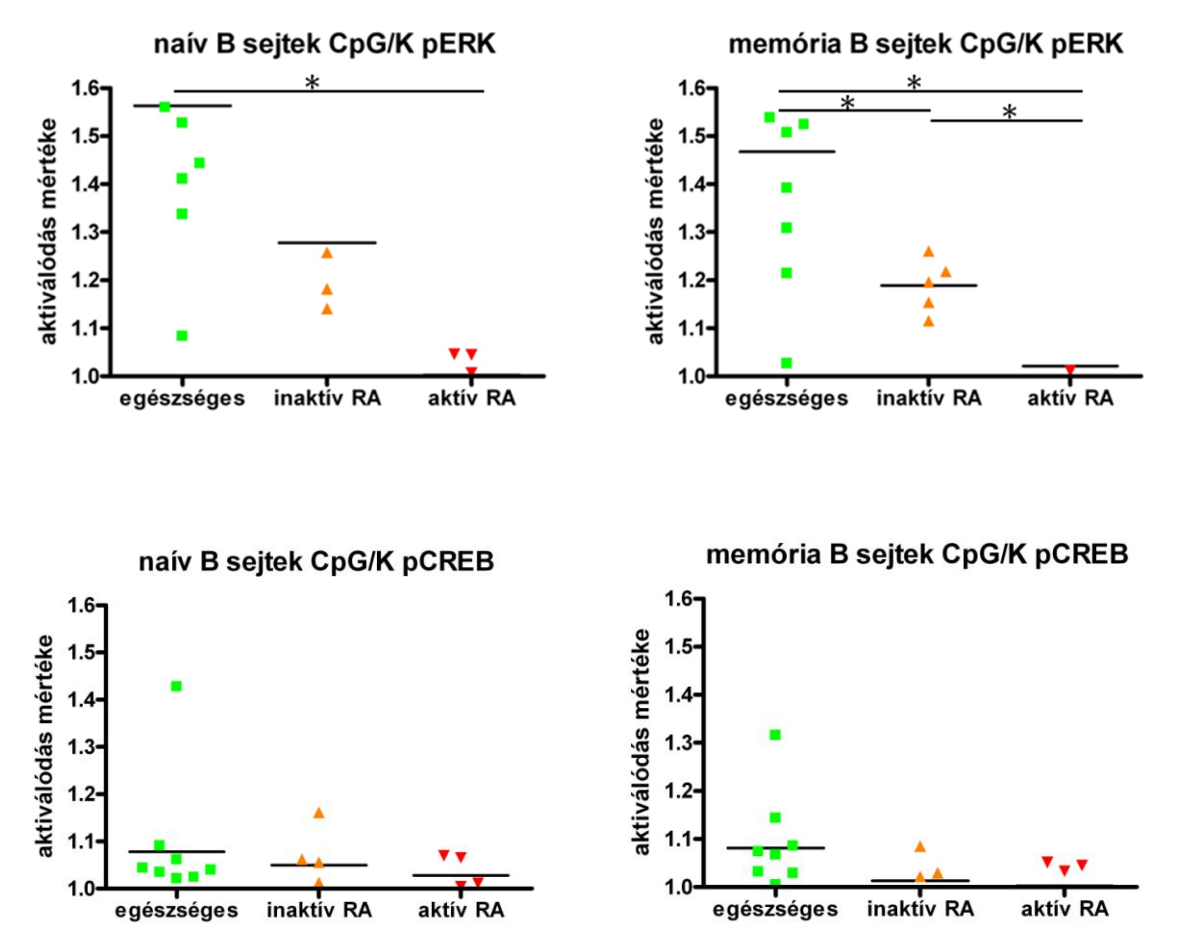


5/a. ábra Az CpG-vel kezelt mintákban található fehérjék foszforilációs szintje (1. sor: pp38 a naív B limfocitákban, pp38 a memória sejtekben; 2. sor: pERK a naív B limfocitákban, pERK a memória sejtekben, 3. sor: pCREB a naív B limfocitákban, pCREB a memória sejtekben)

5/a. ábrán látjuk, hogy a CpG-vel történő stimulust követően elsősorban a memória B sejtek esetében van szignifikáns különbség az egészségesek és az aktív betegek mintái között mindhárom jelátviteli molekula foszforilációs szintjében.

Az 5/b ábrán a kontrollhoz viszonyított foszforilációs szinteket látjuk ugyanezekben a mintákban.

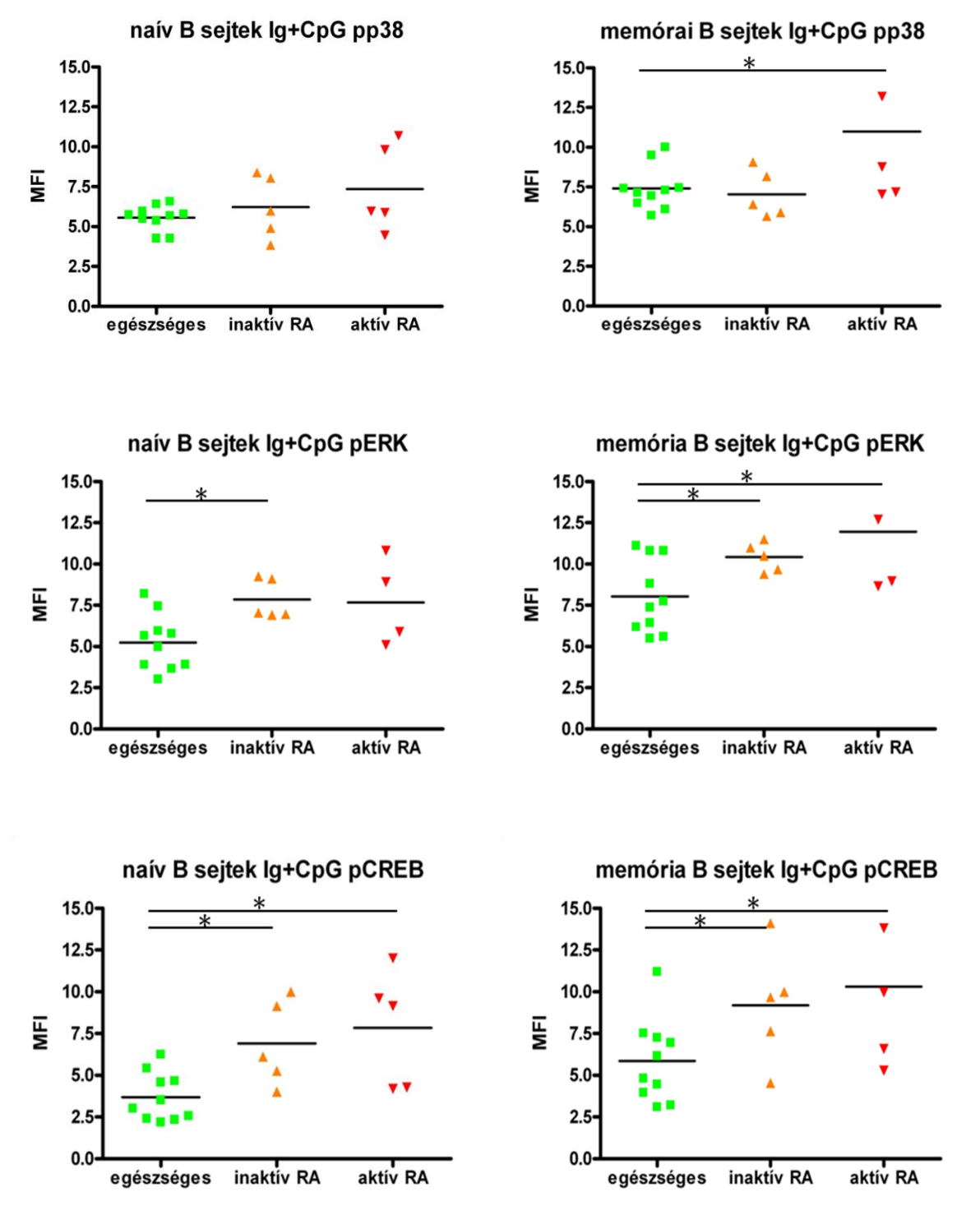




5/b. ábra A CpG-vel kezelt mintákban található fehérjék foszforilációs szintje a kontrollal leosztva, ez az aktiváció mértékére utal. (1. sor: CpG-vel kezelt pp38/ K pp38 a naív B limfocitákban, CpG-vel kezelt pp38/K pp38 a memória sejtekben; 2. sor: CpG-vel kezelt pERK/ K pERK a naív B limfocitákban, és a memória sejtekben, 3. sor: CpG-vel kezelt pCREB/ K pCREB a naív B limfocitákban, és a memória sejtekben)

TLR9-en keresztüli stimuláció során jelentős különbségek figyelhetők meg a fehérjék aktiválódásának mértékében naív és memória B limfociták között, valószínűleg azért, mert a naív B limfociták kevesebb TLR9-et fejeznek ki, mint a memória sejtek (19). Mindhárom általunk vizsgált fehérje esetében szignifikáns eltérés figyelhető meg egészségesek és aktív betegek között, utóbbi mintákban az aktiváció mértéke szignifikánsan alacsonyabb.

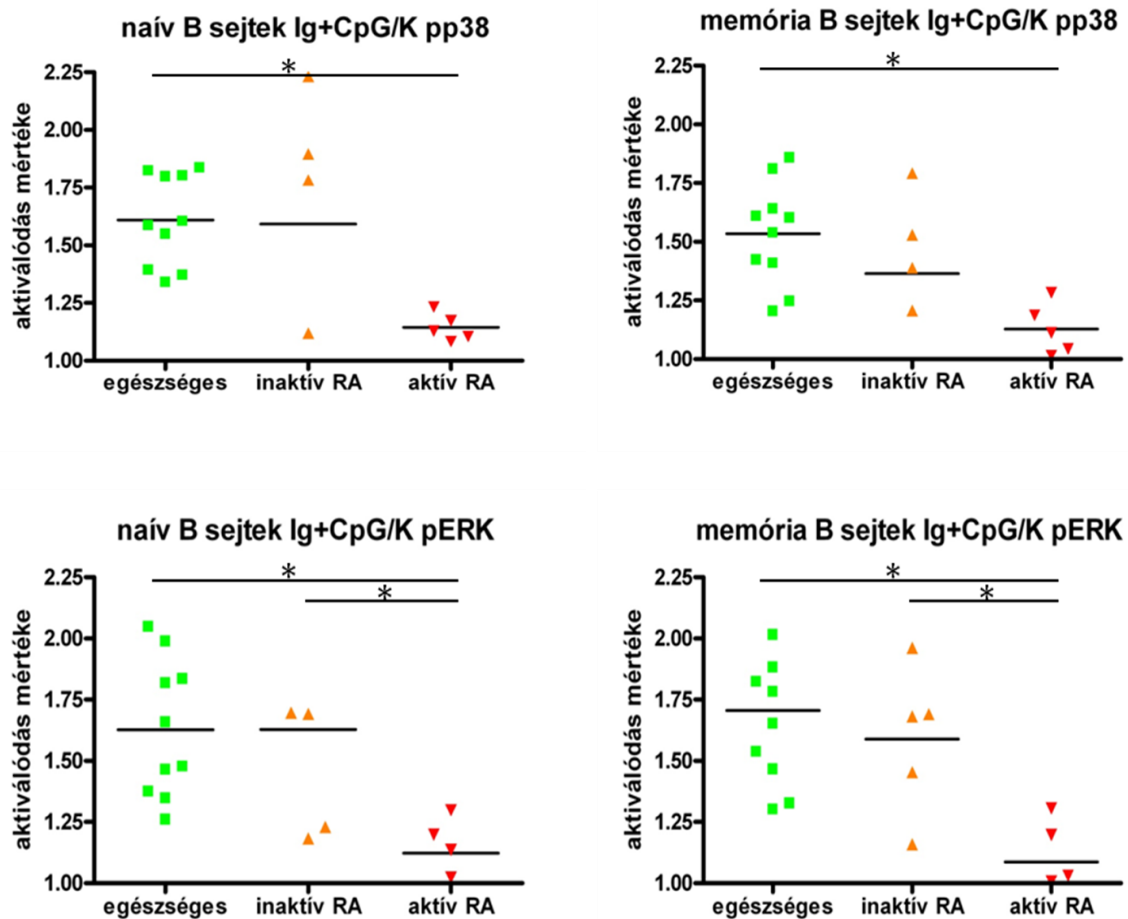
4. A α -IgG/M-mel és CpG-vel szimultán történő stimuláció utáni foszforilációs értékek (6/a. ábra), illetve összehasonlításuk a kontrollal (6/b. ábra)

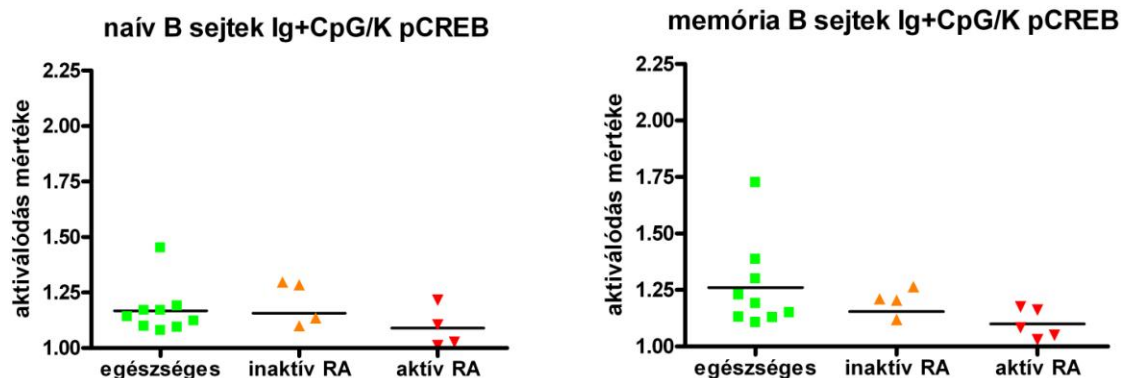


6/a. ábra Az α -IgG/M-mel és CpG-vel szimultán kezelt mintákban található fehérjék foszforilációs szintje (1. sor: pp38 a naív B limfocitákban, pp38 a memória sejtekben; 2. sor: pERK a naív B limfocitákban, pERK a memória sejtekben, 3. sor: pCREB a naív B limfocitákban, pCREB a memória sejtekben)

A 6.a ábrán látható, hogy a memória B limfocitákban jelentős különbség van, az egészségesek és az aktív betegek között a három fehérje foszforilációjának mértékében, az aktív betegek mintáiban nagyobb mértékű foszforiláció figyelhető meg. A pCREB vizsgálatokor ez az eltérés a naív B limfociták esetében is megfigyelhető.

Végül a kettős stimulust (anti-IgG+M) követően is megvizsgáltuk az aktiváció mértékét a kontrol nem stimulált mintákhoz képest.





6/b. ábra Az α -IgG/M-mel és CpG-vel kezelt mintákban található fehérjék foszforilációs szintje a kontrollal leosztva, ez az aktiváció mértékére utal. (1. sor: α -IgG+/M+CpG-vel kezelt pp38/K pp38 a naív B limfocitákban, α -IgG/M+CpG-vel kezelt pp38/K pp38 a memória sejtekben; 2. sor: α -IgG/M+CpG-vel kezelt pERK/ K pERK a naív B limfocitákban, és a memória sejtekben; 3. sor: α -IgG/M+CpG-vel kezelt pCREB/ K pCREB a naív B limfocitákban, és a memória sejtekben).

A p38 és a pErk esetében az aktív betegekből származó naív és memória B sejtekben szignifikánsan alacsonyabb fokú aktiváció figyelhető meg az egészségesekből származó mintákhoz képest. Az ERK esetében az aktív illetve az inaktív betegek aktivációja is eltér az egészségesekétől. A pCREB esetében aktivációs szint változás nem volt detektálható.

Eredményeink azt mutatják az aktiválatlan minták esetében, hogy szignifikáns különbség van nemcsak az aktív betegekből és az egészségesekből származó fehérjék között, hanem az inaktív betegekből és az egészségesekben található fehérjék között is mind naív, mind memória B limfociták esetében. A BCR-en keresztül érkező α -IgG/M stimulusra nem tapasztaltunk különbséget az aktiválódás mértékében az egészséges és az autoimmun betegségben szenvedők B sejtjei között.

A TLR9-en keresztüli stimulusra jelentős eltérést tapasztaltunk az aktiválódás mértékében. Az inaktív betegekből származó fehérjék kismértékű aktiválódást ugyan mutattak, de az aktív betegekből származók szinte semmit, az egészséges minták

viszont képesek voltak nagymértékben aktiválódni. Ez azt jelenti, hogy az aktív RA-s betegek B limfocitái in vivo bakteriális fertőzés esetén TLR9-en keresztül nem képesek tovább aktiválódni.

A memória B limfocitákban talált nagyobb különbségek valószínűleg a sejtekben nagyobb számban megtalálható TLR9 miatt lehetséges.

Amikor mindkét receptoron keresztül aktiváltuk a sejteket a p38 és az ERK esetében szignifikánsan megnőtt a fehérjék foszforilációs szintje az aktiválatlan mintákhoz képest. A CREB esetében ez a növekedés nem volt megfigyelhető.

Kutatásunkban kimutattuk, hogy a rheumatoid arthritisben szenvedő betegek B limfocitái magasabb aktiváltságú szinten vannak az egészségesekhez képest, és ez az erősebb aktiváltság bizonyos esetekben csökkenti a sejtek stimulusra adott válaszkészségét. Az aktiváló stimulusra adott válaszképességében mért különbségek felvetik annak a lehetőségét, hogy az egészséges és RA-s betegek B limfocitái másként reagálhatnak bizonyos fertőzésekkel szemben, ezért a továbbiakban érdekes lenne megvizsgálni, hogy a vizsgálatunkban tapasztalt jelátviteli különbségek a B sejtekben okoznak-e funkcionális eltéréseket.

Összefoglaló

A rheumatoid arthritis (RA) olyan szisztémás autoimmun betegség, melynek kialakulásában fontos szerepet játszik az immunrendszer aktiválódása. A betegekben található autoantitestek képzéséért a saját struktúrákat felismerő autoimmun B limfociták felelősek. A naív B sejtek ellenanyag-termelő plazmasejtté váló éréséhez elengedhetetlen a B sejt receptoron (BCR) keresztül érkező jel. Ezen felül egyéb receptorokon keresztüli stimulus is hozzájárulhat a B sejtek aktiválódásához: a Toll like receptorok családjába tartozik a mintázatfelismerő (pattern recognition) receptorok (PRR) közé. A TLR9 a bakteriális eredetű DNS-t ismeri fel, ezzel a B limfociták proliferációját, izotípus váltását és plazmasejtté érését stimulálja, ezáltal hozzájárulhat autoimmun betegségek kialakulásához. Az irodalomból ismert, hogy RA-s betegekből és egészségesekből izolált B sejtek jelátviteli molekuláinak nyugalmi foszforilációját összehasonlítva eltérések figyelhetők meg.

Kutatásunk során két különböző, a sejt aktiválódásában fontos kináz (p38, ERK) és egy transzkripciós faktor (CREB) foszforiláltságát mértük BCR és/vagy TLR9 stimulus után áramlási citofluoriméteren. Több mintában különbségeket találtunk az egészségesek és a betegek B sejtei között a kinázok illetve a CREB transzkripciós faktor aktivációjának mértékében.

A foszforilációs mintázatok feltérképezése RA-s betegek B sejteiben új információkat szolgáltat a betegség jobb megértéséhez.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease. Activation of the immune system is essential in the development of the disease. The autoimmune B lymphocytes - which can recognize certain own structures - are responsible for producing autoimmune antibodies in RA patients.

Signals through B cell receptor (BCR) are indispensable in the process where naive B lymphocytes are developing into antibody-secreting B cells. Moreover, some stimuli through other receptors can also be an enhancing factor in B cell activation: Toll-like receptors (TLR) belongs to the group of the pattern recognition receptors (PRR). TLR9 recognises the bacterial DNA and stimulates the proliferation and isotype-switching of B lymphocytes, and helps them in the development into a plasma B-cell, and this way it can contribute to the evolving of the autoimmune disease.

It is already well-known that when comparing the basal expression of phosphoproteins of RA patients and controls, we find differences in data. In our research we measured the phosphorylation of two kinases (p38, ERK) and a transcriptional factor (CREB) after BCR and/or TLR9 stimulation by flow cytometry. At several samples, we found differences between B cells of healthy individuals and RA patients regarding the activation of the kinases and the CREB. Mapping of the phosphorylation patterns in B cells of RA patients can provide new information for the better understanding of the disease.

Köszönetnyilvánítás:

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sármay Gabriellának, aki lehetővé tette, hogy kutatócsoportjában dolgozhassam, megismertetett a téma alapjaival és irányította a munkámat.

Köszönöm Szili Dánielnek, hogy mindvégig segítségemre volt a munkámban, megtanította a B limfociták izolálásának gyakorlati és elméleti alapjait.

Köszönöm Dr. Erdei Annának, az immunológiai Tanszék vezetőjének, hogy engedélyezte munkámat a tanszéken.

Szerzői Hozzájárulás

Munkám során egészségesek és RA-s betegek jelátvitelét hasonlítottam össze.

A perifériás vérből PBMC-t izoláltam. Az aktivátorok hozzáadása után fixáltam, majd a megfelelő ellenanyagokkal jelöltem a sejteket, végül áramlási citométeren mértem le őket.

A kiértékeléshez a Flowjo programot és permutációs tesztet használtam.

Irodalom:

1. Multiparameter Phospho-Flow Analysis of Lymphocytes in Early Rheumatoid Arthritis: Implications for Diagnosis and Monitoring Drug Therapy

Carole L. Galligan, Janet C. Siebert, Katherine A. Siminovitch, Edward C. Keystone, Vivian Bykerk, Omar D. Perez, Eleanor N. Fish (PLoS ONE, August 2009)

2. Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies

Gerard A. Schellekens, Ben A.W. de Jong, Frank H.J. van den Hoogen, Leo B.A. van de Putte, and Walther J. van Venrooij (J. Clin Invest, 1988 January)

3. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins.

Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D (Cell Press Immunity, April 1999)

4. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent.

Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM (J Immunol, 2001 Oct 15)

5. Flow cytometric assessment of the signaling status of human B lymphocytes from normal and autoimmune individuals

Amrie C Grammer, Randy Fischer, Olivia Lee, Xuan Zhang and Peter E Lipsky (Arthritis. Res Ther., 2004 February)

6. Toll-like receptors are potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis

Siamak Sandoghchian Shotorbani, Zhao-Liang Su and Hua-Xi Xu.(World J Biol Chem., 2011 July)

7. Toll-like receptor function in primary B cell defects

Thomas U. Marron, Joyce E. Yu and Charlotte Cunningham-Rundles (Front biosci., 2012 Jan)

8. **Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis.**

Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS et al. (Arthritis Rheum., 2000 Nov)

9. **Cell–cell interactions in synovitis Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis**

Cornelia M Weyand, Jörg J Goronzy, Seisuke Takemura and Paul J Kurtin (Arthritis Res. 2000)

10. **B cells in rheumatoid arthritis**

Hye-Jung Kim and Claudia Berek (Arthritis Res., 2000)

11. **Multidimensional Single Cell Based STAT Phosphorylation Profiling Identifies a Novel Biosignature for Evaluation of Systemic Lupus Erythematosus Activity**

Xinfang Huang, Yanzhi Guo, Chunde Bao, Nan Shen (Plus One, 2011 July)

12. **The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis**

G Schett, J Zwerina, and G Firestein (Ann Rheum Dis., 2008 July)

13. **The BCell Receptor Governs the Subcellular Location of Toll-like Receptor 9 Leading to Hyperresponses to DNA-Containing Antigens**

Akanksha Chaturvedi, David Dorward, Susan K. Pierce (Immunity, 2008 Jun)

14. **Convergence of CpG DNA- and BCRmediated signals at the c-Jun N-terminal kinase and NF-kB activation pathways: regulation by mitogen-activated protein kinases**

Ae-Kyung Yi, Jae-Geun Yoon and Arthur M. Krieg (Int. Immunol 2003 May)

15. **Understanding TLR9 action in Epstein-Barr virus infection**

Ludwig Zauner, David Nadal (fron Biosci., 2012 Jan)

16. **Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig**

Xie H, Rothstein TL. (J Immunol., 1995 Feb)

17. **Induction of *bcl-2* Expression by Phosphorylated CREB Proteins during B-Cell Activation and Rescue from Apoptosis**

Byrone E. Wilson, Evonne Mochon, Linda M. Boxer (Moll Cell Biol., 1996 October)

18. **Identification of a Membrane Ig-Induced p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Module That Regulates cAMP Response Element Binding Protein**

Phosphorylation and Transcriptional Activation in CH31 B Cell Lymphomas

Jennifer M. Swart, Daniele M. Bergeron and Thomas C. Chiles (J. Immunol., 2000 Mar)

19. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells

Nadia L. Bernasconi, Nobuyuki Onai, and Antonio Lanzavecchia (Blood, 2003 Jun)