

XXXI. OTDK

***A CR3 és CR4 komplementreceptorok szerepe humán
fagociták adherenciájában***



OTDK dolgozat

Készítette: Kriston Csilla, biológus hallgató

Témavezető: Dr. Sándor Noémi, Dr. Bajtay Zsuzsa

ELTE Immunológiai Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

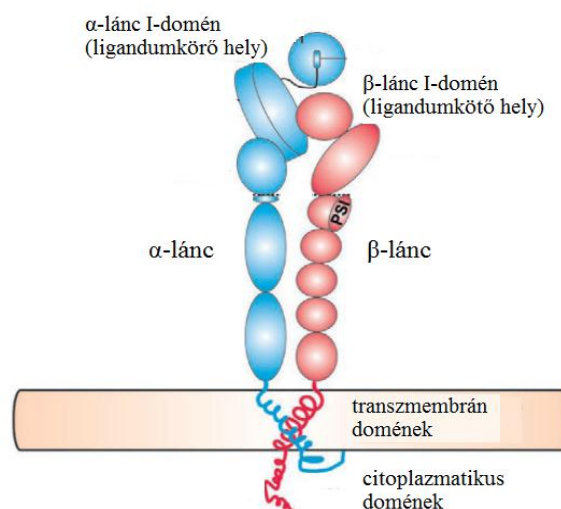
1. Bevezető.....	3
2. Célkitűzés.....	7
3. Anyag és módszer	8
3.1 Monociták izolálása, monocita eredetű dendritikus sejtek és makrofágok előállítása	8
3.2 Áramlási citofluorimetriás vizsgálat	9
3.3 Adherencia-vizsgálat	9
3.4 Fibrinogénnel fedett felszínen történő differenciáltatás	10
4. Eredmények és értékelésük.....	11
4.1 CD11b és CD11c expresszió vizsgálata	11
4.2 Adherencia vizsgálatok optimális körülményeinek beállítása.....	12
4.2.1 A fibrinogén-koncentráció hatása az adherenciára	12
4.2.2 A hőmérséklet hatása az adherenciára	12
4.2.3 Fibrinogénnel fedett-felszínhez történő adherencia időkinetikája.....	13
4.2.4 Spreading-vizsgálatokhoz szükséges inkubációs idők meghatározása.....	14
4.3 CD11b és CD11c specifikus ellenanyagokkal történő kezelés hatása monociták, makrofágok és dendritikus sejtek adherenciájára.....	15
4.4 A fibrinogén hatása a differenciációra	18
5. Összefoglalás	21
6. Summary	22
7. Irodalom	23
8. Köszönetnyilvánítás	25
9. Nyilatkozat	26

1. Bevezető

A sejt-sejt, illetve a sejt-extracelluláris mátrix közti kapcsolatokat kialakító adhéziós molekulák legnagyobb családját az integrinek alkotják. Az integrin-molekulák a kötések kialakítása mellett számos folyamatot közvetítenek: szerepük van a sejtek fejlődésében, túlélési szignált szolgáltatnak, fontosak a trombusképződésben, a sejtek aktivációjában, mozgásában, limfociták homing-folyamataiban és a leukociták vérerekből való kilépésében (extravazáció) gyulladás során (Arnaout, 1996). Az integrinek heterodimer transzmembrán glikoproteinek, melyek egy-egy nem kovalens módon kapcsolódó α és β polipeptidláncból épülnek fel (1. ábra). A kizárólag leukocitákon megjelenő β_2 integrinek esetében négyféle α alegység kapcsolódhat egy közös β alegységhez (CD18), kialakítva így az LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) és az újonnan felfedezett CD11d/CD18 molekulákat. A β_2 integrinek jelentőségét mutatja a CD18 alegység mutációja miatt kialakuló Leukocita Adhézión Deficiencia (LAD) I-es formájának, illetve a β_2 integrinek aggregációs zavarát okozó Wiskott-Aldrich szindróma (WAS) megjelenése. Ezek a betegségek súlyos visszatérő fertőzéssel járnak, sérül a monociták és neutrofil

granulociták intravaszkuláris adhéziója, zavart szenved a transzendenteliális migráció, a fagocitózis és a citotoxikus T-sejt-válasz (Arnaout 1990; Zhang et al. 2006).

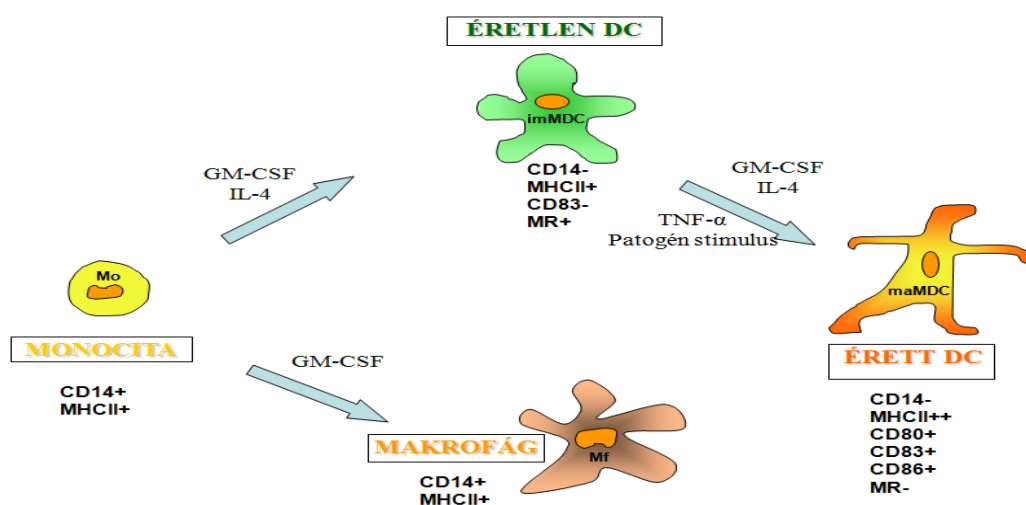
A CR3 (CD11b/CD18) és CR4 (CD11c/CD18) komplementreceptorok monocitákon, szöveti makrofágokon, NK-sejteken, a legtöbb dendritikus sejten és neutrofil granulocitákon expresszálódnak (Hogg et al. 1986). A CR3 receptor főbb ligandumai a fibrinogén, az ICAM-1, az iC3b és C3b komplementfragmentumok, az LPS, a β -glükán, a X. faktor stb. (Diamond et al. 1993). A CR4 receptor a fibrinogén, az iC3b, az ICAM-1, VCAM-1, az LPS, a X. faktor stb. megkötésére képes (Sadhu et al. 2007). A CR3 receptorról rengeteg tanulmány született, melyek a kemotaxis, opszonizált fagocitózis, adhézió, transzendenteliális migráció, az oxidatív burst és a sejtszétterülés (spreading) folyamatában betöltött szerepét részletezik. A CR4



1. ábra A β_2 integrinek általános felépítése (Askari és mtsai nyomán-módosítva)

funkciójáról azonban jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. A hasonló molekuláris szerkezet (az extracelluláris doménjük 87%-os homológiát mutat) és ligandum-specificitás miatt gyakran funkciót is átfedőnek vélik a CR3-mal. Kutatócsoportunk legújabb eredményei alapján azonban kijelenthetjük, hogy egyes folyamatokban a két komplementreceptor eltérő szereppel bír. Az iC3b-vel opszonizált partikulumok felvételében mindkét receptor részt vesz, azonban a CR3 hozzájárulása elsődleges. RNS-csendesítéssel végzett kísérletek igazolják, hogy a CD11b-expressziót gátolva a CR4 egyedül nem képes a fagocitózis indukciójára, míg a CD11c lánc hiányában az opszonizált részecskék felvétele csak elhanyagolható mértékben csökken (Sándor et al. 2012). Ezen eredmények ismeretében felmerül a kérdés, hogy más folyamatokban is eltérő mértékben vesz-e részt a CR3 és CR4 receptor.

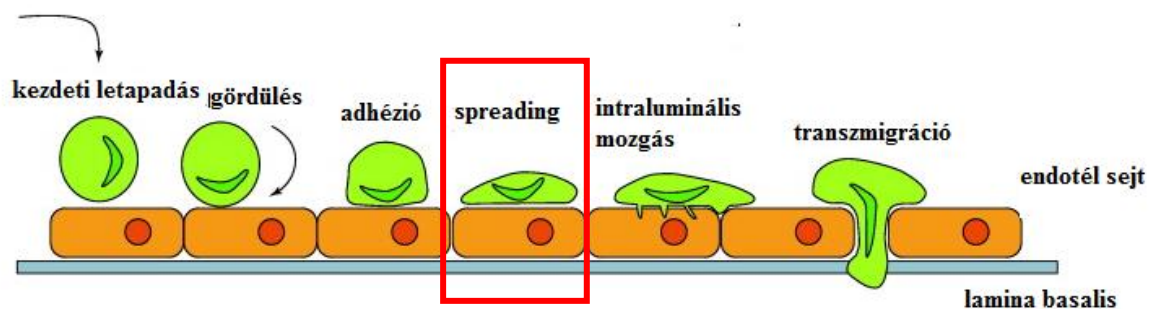
Mivel a CR3 és CR4 receptorok főbb ligandumai közé tartoznak az extracelluláris mátrix fehérjéi, ezért a két receptor adhézióban betöltött szerepe különös figyelmet érdemel. A CR3 és CR4 közvetítette adhézió elengedhetetlen a monocita fenotípus kialakításához és a monocita-makrofág útvonal végbemeneteléhez (Tushinski et al. 1982). A csontvelői mieloid progenitor sejtől fejlődő monociták a véráramba jutnak, majd pár nap múlva a keringésből kilépve a szövetekben makrofágokká differenciálódnak. A makrofágok mellett dendritikus sejtek is differenciálódhatnak monocita előalakból, a két funkcionálisan különböző sejtípus tehát azonos eredettel rendelkezhet. A monocita-dendritikus sejt átalakulás főleg gyulladás esetén valósul meg. A monocitából történő differenciációs folyamatok laboratóriumi körülmények közt in vitro is megvalósulnak. Vérből izolált monocita-tenyészetből GM-CSF hozzáadásával makrofágok, GM-CSF és IL-4 jelenlétében dendritikus sejtek differenciálthatók (2. ábra).



2. ábra Monocita eredetű makrofágok és dendritikus sejtek in vitro differenciáltatása

A monociták makrofággá, illetve dendritikus sejtté történő fejlődése során fokozódik a CD11b és CD11c láncok expressziója (Miller et al. 1986; Ammon et al. 2000). A β_2 integrinek meghatározó szerepét a differenciációs folyamatokban Prudovsky és munkatársai bizonyították. Antisense-CD11b-vel kezelt U937 humán monocitoid sejtek sokkal kisebb mértékű adhézióra képesek és a monocita differenciációs markerek is csak kis mértékben expresszálódnak. (Prudovsky et al. 2002). Ismert, hogy a monocitából makrofággá történő differenciáció során a sejtek adheráló és fagocitotikus aktivitása nő. A makrofággá történő differenciációhoz elengedhetetlen az adherencia in vivo körülmények közt. Adherencia hiányában a monociták nem tudnak makrofággá érni. Dendritikus sejtek esetében az éréshez nem szükséges feltétlenül a letapadás, de funkcióinak ellátáshoz elengedhetetlen.

Az integrinek közvetítette adhézió a differenciáció mellett számos más folyamathoz is hozzájárul, mint például a kemotaxishoz, fagocitózishoz és az extravazációhoz. Az extravazációs folyamat meghatározó lépése a spreading, a sejtek szétterülése az endotélhez történő adherenciát követően, melyet β_2 integrinek közvetítenek (3. ábra). A sejtek kitapadásakor az integrinek ligandum kötődés hatására aggregálódnak, csoportokba tömörülnek, kialakítva így a fokális adhéziós korongot, melynek az aktinváz átrendezésében van szerepe (Critchley et al. 1999). A spreading során új fokális adhéziós korongok keletkeznek és a gyors aktinpolimerizáció hatására a sejt nyúlványokat képez.



3. ábra Az extravazáció (Schymeinsky és mtsai, 2011 nyomán-módosítva)

TRENDS in Cell Biology

A fibrinogén a CR3 és a CR4 receptor közös liganduma, így a fibrinogénhez való adherenciához mindkét receptor hozzájárul, azonban a pontos szerepek nem tisztázottak. A fibrinogén, a véralvadási kaszkádban betöltött szerepe mellett, fontos a gyulladásos válasz kialakításában. A fibrinogén egy akut-fázis fehérje, tehát gyulladás során proinflammatorikus citokinek (IL-1, IL-6) hatására a májban fokozódik szintézise, így szérumbeli koncentrációja nő. A fibrinogén hidat képez a vérben keringő monociták CR3, illetve CR4 receptora és az endotélsejtek ICAM-1 molekulája közt, elősegítve ezzel a gyulladásos sejtek kitapadását az

endotélhez, majd az extravazációt (Sriramarao et al. 1996). A sérült erekből felszabaduló és a gyulladás területén lerakódó fibrinogén, illetve fibrin fontos szerepet játszik a gyulladásos sejtek, elsősorban neutrofil granulociták felhalmozódásában (Vorup-Jensen et al. 2004; Kuijper et al. 1997). A CR3, CR4 receptorok általi fibrinogén-kötés különböző sejtípusok citokin- és kemokin szekrécióját is befolyásolja: DC-kben az IL-6, IL-8, MIP-1 β és MCP-1, míg makrofágokban a TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β termelését fokozza (Thacker et al. 2008; Fan és Edgington, 1993; Smiley et al. 2001).

Sokáig a CR3 receptort hitték elsődlegesnek a fibrinogén-kötésben. Ezt igazolja, hogy CD11b-deficiens egerekben a neutrofil granulociták adherenciája fibrinogénhez nagymértékben csökkent, így a gyulladásos válasz is zavart szenvedett (Lu et al. 1997). A CR4 receptorról, illetve a két receptor fibrinogén-kötésben betöltött együttes szerepéről csak kevés ismeret áll rendelkezésre. Georgakopoulos és munkatársai bizonyították, hogy monocitáknál kezeléstől függően változik, hogy a CR3 vagy a CR4 a domináns fibrinogén-kötő receptor (Georgakopoulos et al. 2008). Egy másik tanulmány neutrofil granulocitákon vizsgálta a két receptor szerepét. Azt találták, hogy különböző antagonisták hatására a CR3 és CR4 részvétele a fibrinogén-adhézióban eltér (Loike et al. 1991). Az eddigiekkel szemben a fiziológiához közelebb álló körülmények közt szeretnénk volna tanulmányozni a két receptor esetlegesen eltérő szerepét a fibrinogénhez történő adherenciában monocitáknál, makrofágoknál és dendritikus sejteknél. Továbbá kíváncsiak voltunk, milyen hatással van a fibrinogén a monocitából makrofággá, illetve dendritikus sejtté való differenciációra.

2. Célkitűzés

Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk:

- Monociták, makrofágok, dendritikus sejtek CD11b és CD11c expresszióját
- A fibrinogén-koncentráció hatását monociták, makrofágok és dendritikus sejtek kitapadására
- A hőmérséklet hatását dendritikus sejtek adherenciájára
- Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek fibrinogénhez történő adherenciájának időkinetikáját
- CD11b és CD11c specifikus ellenanyagokkal történő kezelés hatását monociták, makrofágok és dendritikus sejtek fibrinogénhez történő adherenciájára
- A fibrinogénnel fedett felszínhez történő adherencia hatását a monocitából makrofággá, illetve dendritikus sejtté történő differenciálódásra.

3. Anyag és módszer

3.1 Monociták izolálása, monocita eredetű dendritikus sejtek és makrofágok előállítása

A monocitákat egészséges véradó donoroktól származó buffy-coatból izoláljuk. A buffy-coatot falcon csövekbe töltjük, majd centrifugáljuk (1200 rpm, 8-10 perc, 18°C, fékezés nélkül). A határréteget leszívjuk, kevés PBS-sel hígítjuk és óvatosan 15 ml Ficoll-paque oldatra rétegezzük. A Ficoll-paque történő sűrűséggradiens centrifugálással (2200 rpm, 20-25 perc, 18°C, fékezés nélkül) perifériás mononukleáris sejteket (PMNS) szeparálunk. A monociták elválasztása a limfocitáktól adheráló képességük alapján történik. Ehhez a preparálást megelőző napon 2%-os, bidesztillált vízben 80 °C-on feloldott, majd sterilre szűrt zselatinoldattal fedünk Petri-csészéket (10ml/Petri-csésze). A Ficoll-paque oldaton történő centrifugálás után kapott plazmát leszívjuk és a Petri-csészékre pipetázzuk (10ml/Petri-csésze), majd 37 °C-on CO₂-termosztátban inkubáljuk 40 percig. Ez alatt a Ficoll-paque oldat felszínén összegyűlt PMNS-t falcon csövekbe gyűjtjük és háromszor mossuk PBS-sel (1200 rpm, 7-8 perc, 4°C). A mosási lépéseket követően a sejteket 1 ml kevert humán savóval kiegészített gentamycines 10 % FCS-t tartalmazó RPMI1640 médiumban vesszük fel. A Petri-csészékről leszívjuk a folyadékot, egyszer PBS-sel mossuk, majd rápipetázzuk a PMNS-t tartalmazó oldatot (10ml/Petri-csésze) és 37 °C-on CO₂-termosztátban inkubáljuk 35-40 percig. Ezalatt a monociták kitapadnak a zselatinnal fedett műanyag felszínre. 40 perc után mikroszkóppal ellenőrizzük a kitapadt monocitákat, illetve az úszó limfocitákat. A nem adherens sejteket leszívjuk, majd 10 ml 37 °C-os RPMI1640 médiummal 4-5x mosva, rázató használatával eltávolítjuk a maradék ki nem tapadt sejtet. A kitapadt monocitákat 6mM EDTA-val szedjük fel 7-8 percig 37 °C-on CO₂-termosztátban inkubálva. A monocitákat falcon csövekbe gyűjtjük és mossuk (1200 rpm, 7-8 perc, 4°C). Ezután még kétszer mossuk a sejteket: először RPMI1640 médiummal, majd 10 % FCS-t tartalmazó RPMI1640 médiummal (1200 rpm, 7-8 perc, 4°C). A monocitákat 12- lyukú sejtenyésztő tálcára pipetázzuk 10⁶ sejt/ml-es koncentrációban. Ezzel a módszerrel 90% feletti tisztaságú monocitákat nyerhetünk.

A monocitákat 40 ng/ml rhuGM-CSF és 1000U/ml rhuIL-4 jelenlétében 5 nap alatt éretlen monocita eredetű dendritikus sejtekké, 80 ng/ml rhuGM-CSF hozzáadásával monocita eredetű makrofágokká differenciáltatjuk. A differenciáltatás során a citokineket (GM-CSF és IL-4) 2

naponta pótoljuk. A differenciáltatások sikerességét áramlási citofluorimetriával követjük nyomon, a dendritikus sejtek jellemzői sejtfelszíni molekuláinak mennyiségi meghatározásával: CD14⁺ CD83⁺, CD86^{lo}. A makrofágok jellemzői membránfehérjéi: CD14⁺ és MHCII⁺.

3.2 Áramlási citofluorimetriás vizsgálat

Mindegyik sejtípus esetén mintánként 2×10^5 sejtet jelöltünk. A jelölések előtt a mintákat 5 percig jégen Fc receptor blokkolóval kezeltük, majd a sejteket az alábbi elsődleges ellenanyagokkal jelöltük a gyártó által javasolt koncentrációban: anti-humán CD11b-PE (Dako), anti-humán CD11c-Alexa647 (BioLegend), anti-humán CD14-PE (Santa Cruz Biotechnology), anti-humán MHCII-FITC (BD Biosciences), anti-humán CD86-FITC (BD Biosciences). A jelölést 20 percig jégen, sötétben végeztük. Ezt követően a mintákat FACS-pufferrel (PBS, 1%FCS, 0,1% Na-azid) mostuk (1200 rpm, 7-8 perc, 4°C). A méréseket FACS Calibur készüléken végeztük CellQuestPro szoftverrel. Mintánként 10000 sejtet mértünk. Az adatok kiértékeléséhez FCS Express3 szoftvert alkalmaztunk. A kiértékelésnél mintánként a különböző fluoreszcens csatornában mért jel intenzitásának középértékét (MFI) használtuk. Az eredményeket Δ MFI-ben adtuk meg, mely a minta és az izotípuskontroll MFI-értékének különbsége. Az ábrázolt adatok a független donorok adataiból vont átlag és szórás.

3.3 Adherencia-vizsgálat

A kísérletet megelőző napon 5 és 10 μ g/ml-es, PBS-ben hígított fibrinogén-oldatból (Merck) 96-lyukú sejtenyésző tálcára lyukanként 100 μ l-t mérünk be. A fibrinogénnel fedett sejtenyésző tálcát 1 éjszakán át 4°C-on tartjuk. Következő nap a sejtenyésző tálcáról a folyadékot óvatosan leszívjuk, majd kétszer mossuk 200 μ l PBS-sel.

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához a sejteket CFSE festékkel festjük meg, mely 480 nm-es hullámhosszon mutat fluoreszcenciát. 10^6 db sejthez 110 μ l CFSE-oldatot (PBS-ben 1:100 arányban hígítva) mérünk, majd a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten, sötétben állni hagyjuk. Ezután a sejteket háromszor mossuk (1200 rpm, 7-8 perc, 4°C) 10% FCS-t tartalmazó RPMI1640 médiummal. Az első mosási lépés előtt a mintákat 10 percig 4°C-on tartjuk. A fluoreszcensen jelölt sejtszuspenziókból lyukanként 5×10^4 sejtet mérünk fibrinogénnel fedett 96 lyukú sejtenyésző lemezre.

A CD11b és CD11c láncokat gátló kísérletekben a CFSE-vel fluoreszcensen jelölt sejteket a sejttenyésztő lemezre mérés előtt specifikus ellenanyagokkal kezeljük. A sejtszuspenziókhoz anti-CD11b (BioLegend), anti-CD11c (BioLegend), izotípus-kontrollként pedig egér IgG1 (BioLegend) ellenanyagot adunk 10, illetve 20 µg/ml-s koncentrációban. Az ellenanyagok bemérése után a mintákat 10 percig jégen tartjuk, majd fibrinogénnel fedett 96 lyukú sejttenyésztő tálcára lyukanként 5×10^4 sejtet teszünk.

Mindegyik kísérletben a sejttenyésztő tálcát 1 órán át 37°C-on CO₂-termosztátban inkubáljuk, ezalatt a sejtek letapadnak. Ezt követően a nem adherens sejteket óvatosan leszívjuk, majd a mintákat kétszer mossuk 200 µl PBS-sel. A mosási lépéseket követően a kitapadt sejteket 100 µl PBS-ben vesszük fel a mikroszkópos vizsgálathoz.

Az adherens sejteket Olympus IX81 mikroszkóppal vizsgáljuk Fluowiev500 szoftver alkalmazásával. 10x nagyítású objektívvel mintánként négy tetszőleges, különböző látótérrel készítünk képeket. Egy látótér a tenyésztő edény felszínének ~25%-át fedi le. A négy látótérben lévő sejtek összege adja meg a kísérletekben közölt adherens sejtszám értéket. Az ellenanyaggal történő gátlásos vizsgálatoknál 100%-nak a nem kezelt sejtek számát tekintettük, ennek arányában fejeztük ki az egyes kezelések estében mért sejtszámokat.

3.4 Fibrinogénnel fedett felszínen történő differenciáltatás

PBS-ben hígított 10 µg/ml-es fibrinogénnel (Merck) fedünk 12-lyukú sejttenyésztő tálcát (lyukanként 500 µl) 37 °C-on CO₂-termosztátban 1 órán keresztül inkubálva. Ezt követően a folyadékot leszívjuk a sejttenyésztő tálcáról, majd az izolált monocitákat 10^6 sejt/ml-es koncentrációban vesszük fel és 5 nap alatt érett dendritikus sejtekké, illetve makrofágokká differenciáltatjuk a fentebb ismertetett módon (3.1).

Ezekben a vizsgálatokban kontrollnak a fibrinogénnel nem fedett sejttenyésztő lemezen differenciálódott sejteket tekintettük.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 CD11b és CD11c expresszió vizsgálata

Irodalmi adatokból ismert, hogy mind a három sejttípus konstitutívan expresszálja a CR3 és CR4 receptorok α -láncait, a CD11b és CD11c láncokat (Ammon et al. 2000; Georgakopoulos et al. 2008; Sándor et al. 2012). Ezt áramlási citofluorimetriás mérésekkel ellenőriztük. Az eredmények alapján jól látszik, hogy mindhárom sejttípus kifejezi a vizsgált receptor-láncokat (1. táblázat).

1. táblázat Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek CD11b, CD11c expressziójának összehasonlítása

	Monocita	Makrofág	Dendritikus sejt
CD11b	44 $\pm$ 7	546 $\pm$ 42	1409 $\pm$ 193
CD11c	1246 $\pm$ 75	1990 $\pm$ 208	3744 $\pm$ 386

A bemutatott eredmények három független donorból származó Δ MFI értékek átlaga $\pm$ szórása

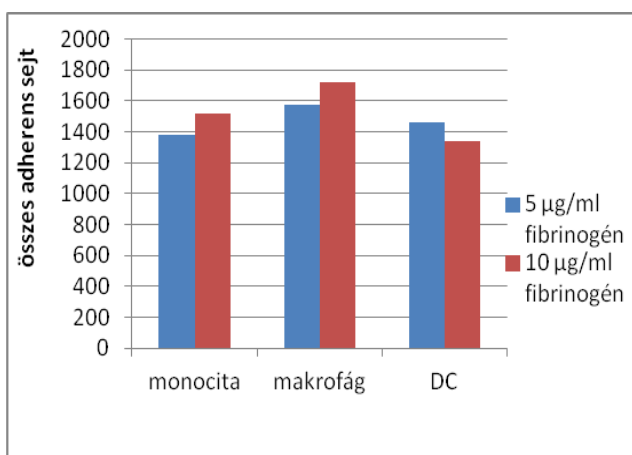
Az eredmények alapján látható, hogy a monocitából makrofággá, illetve dendritikus sejté történő fejlődés során mind a CD11b mind a CD11c kifejeződése fokozódik. Ez megegyezik az irodalomban említett eredményekkel (Miller et al. 1986; Ammon et al. 2000). A dendritikus sejtek mindkét receptor-lánc esetén nagyobb mértékű expresszióval jellemezhetők, mint a makrofágok. Vizsgálataink szerint mindhárom sejttípusról elmondható, hogy a CD11c kifejeződése nagyobb, mint a CD11b láncé. Ammon és munkatársai csak makrofágok esetén tapasztalták ezt a tendenciát (Ammon et al. 2000). Monocitáknál és dendritikus sejteknél azt figyelték meg, hogy a CD11b expresszió nagyobb mértékű, mint a CD11c expressziója. Ez a különbség az eltérő tenyésztési körülményekkel magyarázható.

4.2 Adherencia vizsgálatok optimális körülményeinek beállítása

A CR3 és CR4 receptorok funkcionális vizsgálata előtt a kitapadás időbeli kinetikáját, valamint a fibrinogén-koncentráció és az előinkubáció hőmérsékletének hatását tanulmányoztuk a három sejttípus adherenciájára. A kapott eredmények alapján beállítottuk az optimális körülményeket a CR3 és CR4 receptorok adherenciában betöltött szerepének vizsgálatához.

4.2.1 A fibrinogén-koncentráció hatása az adherenciára

Kíváncsiak voltunk, hogyan befolyásolja a fibrinogén mennyisége az egyes sejttípusok adherenciáját. A vizsgálatok során 5 és 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú fibrinogént alkalmaztunk adhezív szubsztrátnak. Az alkalmazott koncentrációkat irodalmi adatok alapján választottuk. A fibrinogén fiziológiás koncentrációja igen tág határok közt mozog, átlagos koncentrációja 2,55 mg/ml (Tobiásová-Czetőová et al. 2005). A különböző fibrinogén-koncentrációk egyik sejttípusnál sem befolyásolták jelentősen az adherenciát, mindegyik kísérletnél maximum $\pm 10\%$ eltérést tapasztaltunk az adherens sejtek számában. Monociták és makrofágok esetén nagyobb fibrinogén-koncentráció mellett több sejt tapadt ki. Dendritikus sejteknél azonban az adherens sejtek száma kisebb fibrinogén-koncentráció mellett mutatott maximumot (4. ábra). Ezen mérés alapján a monociták és makrofágok vizsgálatánál a továbbiakban 10 $\mu\text{g/ml}$, dendritikus sejteknél 5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú fibrinogént alkalmaztunk.



4. ábra A fibrinogén-koncentráció hatása a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek kitapadására (Egy reprezentatív kísérlet eredménye)

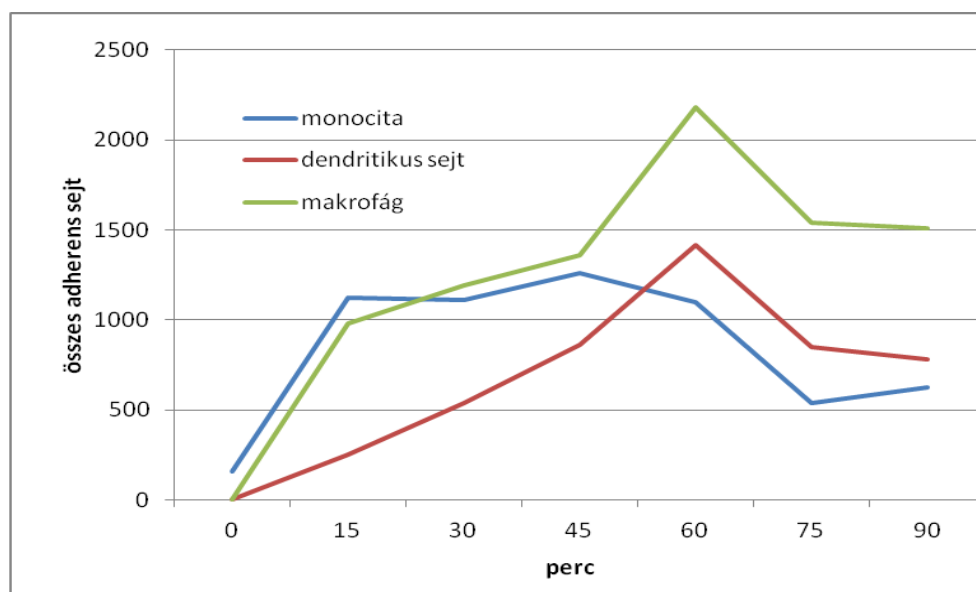
4.2.2 A hőmérséklet hatása az adherenciára

Az adherencia vizsgálata során a monocitákat és a makrofágokat a vizsgálat megkezdéséig jégen tartjuk, hogy megakadályozzuk a sejtek spontán kitapadását. Dendritikus sejtek esetében a korrekt összehasonlíthatóság érdekében megvizsgáltuk a 4°C-on és 37°C-on történő előinkubáció hatását az adherenciára. Eredményeink alapján a kitapasztás előtti

4°C-on történő inkubálás nem csökkentette az adherens dendritikus sejtek számát. A további kísérleteknél a dendritikus sejteket a kitapasztás előtt 4°C-on tartottuk.

4.2.3 Fibrinogénnel fedett-felszínhez történő adherencia időkinetikája

Monocitáknál, makrofágoknál és dendritikus sejteknél vizsgáltuk a fibrinogénhez történő adherencia időbeli kinetikáját. A kísérletünk célja a kitapasztás optimális idejének kiválasztása volt az egyes sejttípusok esetén. A különböző sejttípusok kitapadását 1-90 percig 15 perces felbontásban tanulmányoztuk. Makrofágok és dendritikus sejtek esetében 60 perces inkubációs időnél tapasztaltunk maximális kitapadást (5. ábra). Monocitáknál más dinamikát láttunk, maximális adherenciát 15-60 perces tartományban figyeltünk meg (5. ábra). Ennek alapján a 60 perces inkubációs időt találtuk optimálisnak további kísérleteinkben. Az 5. ábrán jól látszik az is, hogy a három sejttípus közül a makrofágok rendelkeznek a legnagyobb adherencia képességgel. Ez az eredményünk összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a vizsgált sejtek fagocitotikus képességét összehasonlítva, a makrofágokra jellemző a leghatékonyabb fagocitózis.



5. ábra Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek adherenciájának időbeli kinetikája
(Egy reprezentatív kísérlet eredménye)

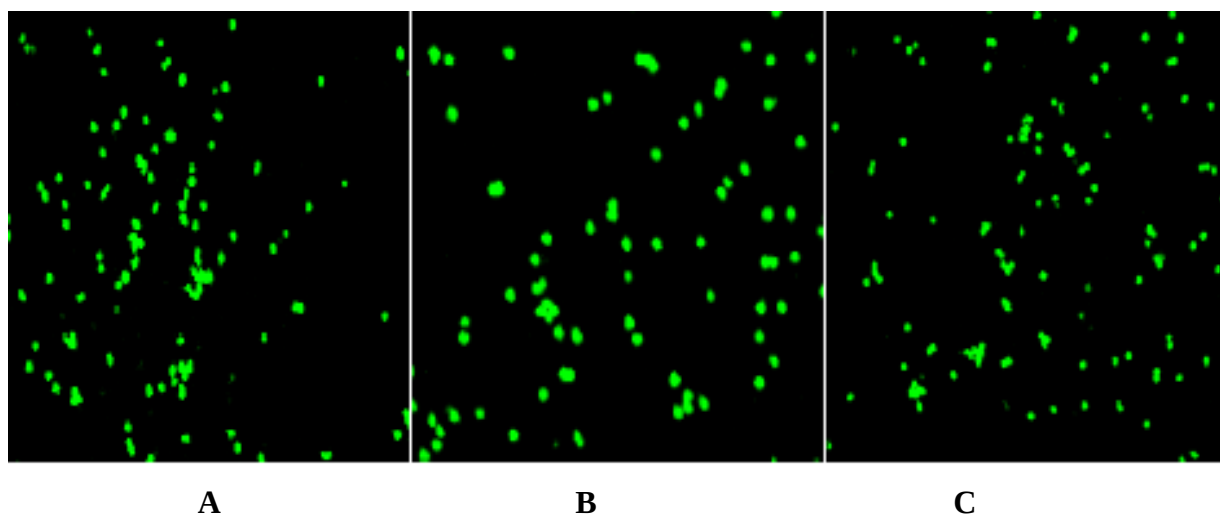
Az előbb felsorolt vizsgálatok alapján olyan kísérleti rendszert állítottunk be, melyben a három sejttípus fibrinogénhez történő adherenciája normál körülmények közt mérhető.

4.2.4 Spreading-vizsgálatokhoz szükséges inkubációs idők meghatározása

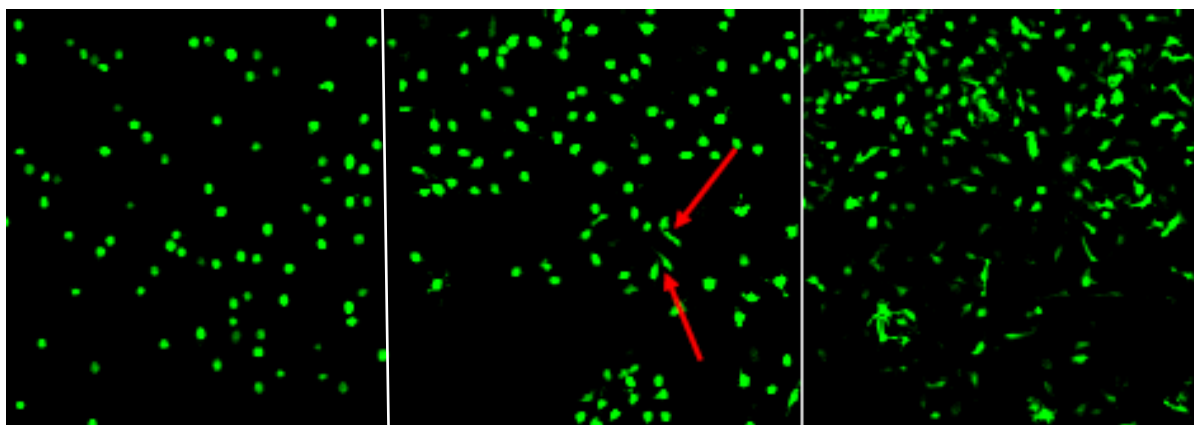
Irodalmi adatokból ismert, hogy az adherens immunsejtek az endotél sejtekhez, valamint az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódása meghatározó a sejtek aktiválódása és differenciálódása során. Kíváncsiak voltunk, kísérleti rendszerünkben megvalósítható-e a három sejtípus esetében a kitapadás spreading folyamatának tanulmányozása. Ezért megvizsgáltuk a monociták, makrofágok és dendritikus sejtek morfológiáját az inkubációs idő függvényében.

Monociták adherenciáját tanulmányozva, habár már 15 perc után maximális kitapadást mutatnak (5. ábra), a 0-90 perces inkubációs időintervallum sem bizonyult elegendőnek a sejtek spreading folyamatának kiváltásához, mivel egyik minta esetében sem láttunk szétterült sejteket (6. ábra/A-C). Dendritikus sejtek esetében 30 perces inkubálást követően a sejtek mind gömb alakúak, szabályos formájúak, spreading-et egy esetben sem tapasztaltunk (7. ábra/A). 60 perces inkubáció hatására néhány sejtnél már megfigyelhető a kitapadás utáni szétterülés, 90 perces inkubációt követően pedig a sejtek túlnyomó többsége állabakat képez (7. ábra/B-C). Makrofágoknál már 60 percnél meghatározó a spreading, azonban 90 perces inkubációs időt követően a folyamat még kifejezettebb (8. ábra/A-C).

Az eredmények alapján elmondható, hogy a spreading nem aktivált sejtek esetén dendritikus sejtekre, de még inkább makrofágokra jellemző. Mindkét sejtípus esetében a 90 perces inkubációs idő tűnik alkalmasnak a spreading jövőbeli vizsgálatára.



6. ábra 30 (A), 60 (B), illetve 90 (C) percig inkubált adherens monociták, mikroszkópos vizsgálat (Egy reprezentatív kísérlet eredménye három függetlenből)

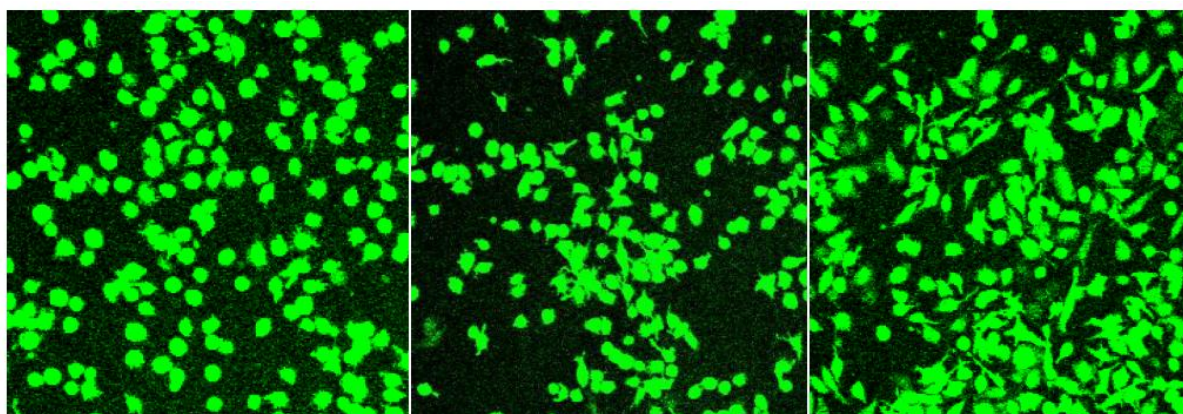


A

B

C

7. ábra 30 (A), 60 (B), illetve 90 (C) percig inkubált adherens dendritikus sejtek, mikroszkópos vizsgálat (Egy reprezentatív kísérlet eredménye három függetlenből)



A

B

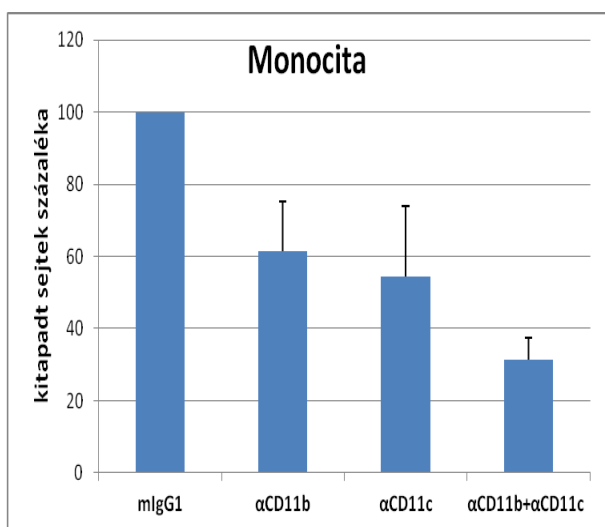
C

8. ábra 30 (A), 60 (B), illetve 90 (C) percig inkubált adherens makrofágok mikroszkópos vizsgálat (Egy reprezentatív kísérlet eredménye három függetlenből)

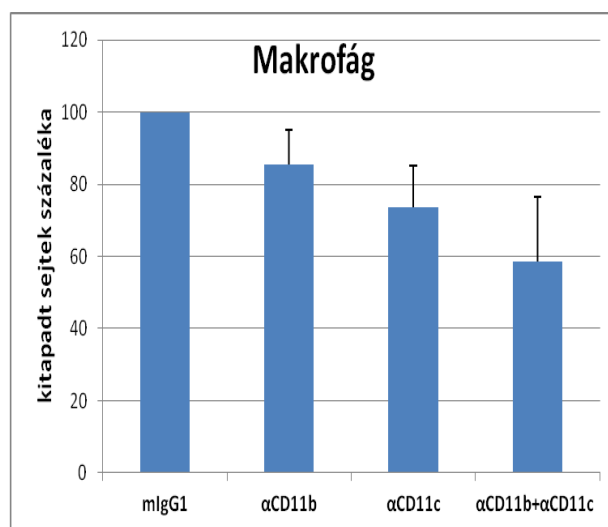
4.3 CD11b és CD11c specifikus ellenanyagokkal történő kezelés hatása monociták, makrofágok és dendritikus sejtek adherenciájára

Ismert, hogy az adherenciát a fibrinogénhez a leukocitákon expresszáldó β_2 integrinek befolyásolják. Kísérleteinkben a CR3 és CR4 receptorok α -láncait specifikusan blokkoló ellenanyagokkal vizsgáltuk a két receptor szerepét a különböző sejtípusok fibrinogénhez történő kitapadásában. Anti-CD11b és anti-CD11c ellenanyagokat 20 μ g/ml-es koncentrációban külön-külön, illetve együtt alkalmaztunk. Kontrollként megfelelő izotípusú ellenanyagot használtunk azonos koncentrációban. Eredményeink alapján mind a CD11b mind a CD11c hozzájárul a monociták, makrofágok és dendritikus sejtek kitapadásához.

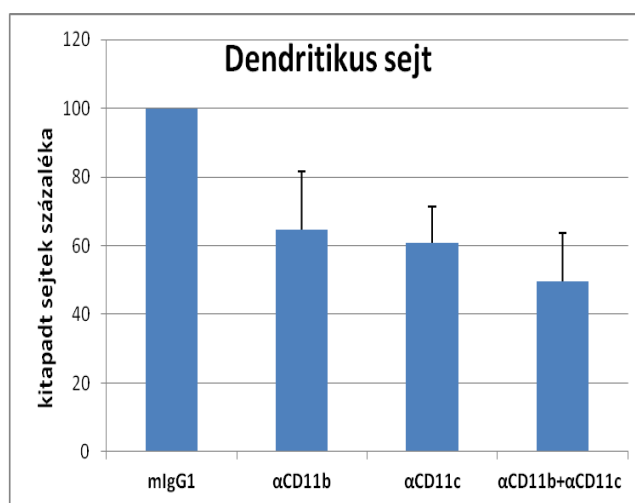
Mindhárom sejttípusról elmondható, hogy a CR4 receptor nagyobb mértékben vesz részt az adherencia folyamatában, mint a CR3 (9.,10.,11. ábra).



9. ábra Anti-CD11b és anti-CD11c ellenanyagok hatása monociták adherenciájára
(Három független kísérletből vont átlag és szórása)



10. ábra Anti-CD11b és anti-CD11c ellenanyagok hatása makrofágok adherenciájára
(Négy független kísérletből vont átlag és szórása)



11. ábra Anti-CD11b és anti-CD11c ellenanyagok hatása dendritikus sejtek adherenciájára
(Három független kísérletből vont átlag és szórása)

Az irodalomban eddig megjelent adherencia-vizsgálatokban főként gyulladásos szituációt tanulmányoznak. Kísérleteinkben előzetesen nem aktivált sejtekkel dolgoztunk, így fiziológiás, nem-gyulladásos körülményeket igyekeztünk létrehozni. Georgakopoulos és munkatársai előzetesen fMLP (N-formil.metionil-leucilfenilalanin), GM-CSF valamint Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok által stimulált monociták adherenciáját vizsgálták. Az agonisták hatására

monocitákon fokozódik a CD11b, de főleg a CD11c expressziója, a kationok pedig az integrinek ligandumkötését fokozzák. Ebben a kísérleti rendszerben a frissen izolált monociták CD11b/CD18-, a szérummal kezelt monociták CD11c/CD18-mediáltan tapadtak ki fibrinogénhez. Loike és munkatársai azt tapasztalták, hogy neutrofil granulocitákat forbol-észterrel aktiválva CD11b, míg TNF α hozzáadása CD11c közvetítette adhéziót indukál fibrinogénhez (Loike et al. 1991). A szakirodalom szerint a CD11c küszöbértéket meghaladó mennyisége szükséges ahhoz, hogy részt vehessen az adherenciában (Georgakopoulos et al. 2008). Szérummal történő kezelés hatására a monociták CD11c expressziója fokozódik és CR4 közvetített módon adherálnak a fibrinogénhez. (Georgakopoulos et al. 2008). Mi a vizsgálataink során a sejteket szérummentes médiumban tartottuk és tapasztalataink szerint az izolált monociták adherenciájában a CR4 receptor ebben az esetben is nagyobb szerepet játszott, mint a CR3.

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a háromféle sejttípus különböző mértékben reagál a CR3 és CR4 receptorok α -láncát blokkoló ellenanyagok kezelésekre. Monocitáknál tapasztaltuk a legnagyobb mértékű csökkenést a kitapadó sejtek számában (9. ábra). Ez összhangban van az áramlási citofluorimetriás eredményekkel, miszerint a vizsgált sejttípusok közül a monociták rendelkeznek a legkisebb mértékű CD11b és CD11c expresszióval (1. táblázat). A két blokkoló ellenanyagot együtt alkalmazva kostimulatív hatást figyeltünk meg. Makrofágok esetében a kettős gátlás sokkal kevésbé volt hatékony, a sejtek túlnyomó része képes volt az adherenciára a két receptor közvetítése nélkül is (10. ábra). Makrofágokról ismert, hogy fokozott adheráló képességgel rendelkeznek, amely folyamatot számos receptor közvetíti. Valószínű, hogy ezek a sejtek a CR3 és CR4 receptorokon kívül egyéb fibrinogén-kötő molekulákat is expresszálnak. Ezt támasztja alá Smiley és munkatársainak eredménye, miszerint a CR3 és CR4 receptorok gátlásával nem csökkent a makrofágok fibrinogén indukálta kemokin-termelése (Smiley et al. 2001). Dendritikus sejteknél a CD11b és CD11c láncok gátlása erősebben csökkentette a kitapadó sejtek számát, mint makrofágok esetén (11. ábra). Mivel a három sejttípus közül a dendritikus sejtek jellemezhetők a legnagyobb mértékű CD11b és CD11c expresszióval (1. táblázat), arra következtethetünk, hogy dendritikus sejteknél a CR3 és CR4 receptor meghatározóbb szerepet játszik az adherencia közvetítésében, mint makrofágok esetében.

4.4 A fibrinogén hatása a differenciációra

A monociták makrofággá, illetve dendritikus sejté érése során az adherencia meghatározó szerepet játszik. A monociták szöveti makrofággá történő végleges differenciációjához elengedhetetlen feltétel a sejtek adherenciája. Szervezetünkben gyulladásos körülmények között a monocitákból dendritikus sejtek is kialakulhatnak. Aktivációs jel hatására a dendritikus sejtek adherensekké válnak. Mások eredményei igazolták, hogy az endotél sejtekhez történő kapcsolódásban, az extravazációban, valamint az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódásban szerepet játszik a CD11b és a CD11c molekula. A CR3 és CR4 molekula fő liganduma az iC3b mellett a fibrinogén. Mivel a kétféle receptor expressziója monocita eredetű makrofágok és dendritikus sejtek esetében eltérő, ezért megvizsgáltuk, hogy a receptorok közös liganduma, a fibrinogén hogyan befolyásolja a monocitából makrofággá, illetve dendritikus sejté történő fejlődést. Az izolált monocitákat fibrinogénnel előzetesen fedett sejtenyésztő tálcán megfelelő citokinek jelenlétében differenciáltattuk a két különböző sejttypussá. Áramlási citofluoriméterrel vizsgáltuk monocitákon, 5 napos makrofágokon, dendritikus sejteken a CD11c, CD14, MHCII és CD86 molekulák felszíni expresszióját. Ezt összevetettük a fibrinogénnel nem fedett felszínen differenciálódó sejtek sejtfelszíni molekuláinak expressziójával. A kapott eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a fibrinogén jelenlétében differenciáltatott makrofágok és dendritikus sejtek CD11c, CD14 és MHCII expressziója kisebb mértékű volt, mint a fibrinogén nélkül fejlődő sejtek esetében (2., 3. táblázat, 12. ábra). A CD86 kostimulációs molekula nagyon fontos szerepet játszik a DC-k által közvetített T-sejt aktivációban. Ezen molekula nagyfokú növekedését tapasztaltuk fibrinogénnel fedett felszínen tenyésztett dendritikus sejtek esetében (2. táblázat, 12. ábra). Makrofágoknál is a CD86 molekula expressziójának növekedését figyeltük meg, azonban sokkal kisebb mértékben, mint dendritikus sejteknél (3. táblázat, 12. ábra).

Az eddig megjelent tanulmányokban a már differenciálódott sejtek fibrinogénnel történő kezeléséről olvashatunk, a fibrinogén hatását a differenciációra eddig még nem vizsgálták. Az irodalomban megjelent eredmények főként a sejtek citokin szekréciójával kapcsolatosak, a sejtfelszíni molekulák expressziójának változását eddig csak nagyon kevés tanulmány vizsgálta. Tobiášová-Czetőová és munkatársai 6 napos éretlen dendritikus sejteket szolubilis fibrinogénnel kezelve figyelte a CD83 molekula expressziójának változását. Azt találták, hogy a CD83 molekula expressziója nagymértékben fokozódott fibrinogén hatására (Tobiášová-Czetőová et al. 2005).

További kísérleteinkben tervezzük megvizsgálni, hogy a CD11b és CD11c receptorok blokkolása hogyan hat a monociták fibrinogén felszínén történő makrofággá vagy dendritikus sejté differenciálódására. Terveink közt szerepel továbbá a vizsgált sejtípusok fibrinogén indukálta citokin szekréciójának vizsgálata.

2. táblázat Fibrinogénnel fedett felszínen tenyésztett dendritikus sejtek felszíni molekuláinak mennyiségi változása

	Monocita	5 napos dendritikus sejt	
		kontroll	fibrinogénnel fedett felszínen
CD11c	1246 ± 75	3744 ± 387	1612 ± 597
CD14	767 ± 45	70 ± 5	24 ± 6
MHCII	188 ± 106	579 ± 355	476 ± 257
CD86	18 ± 5	43 ± 25	104 ± 38

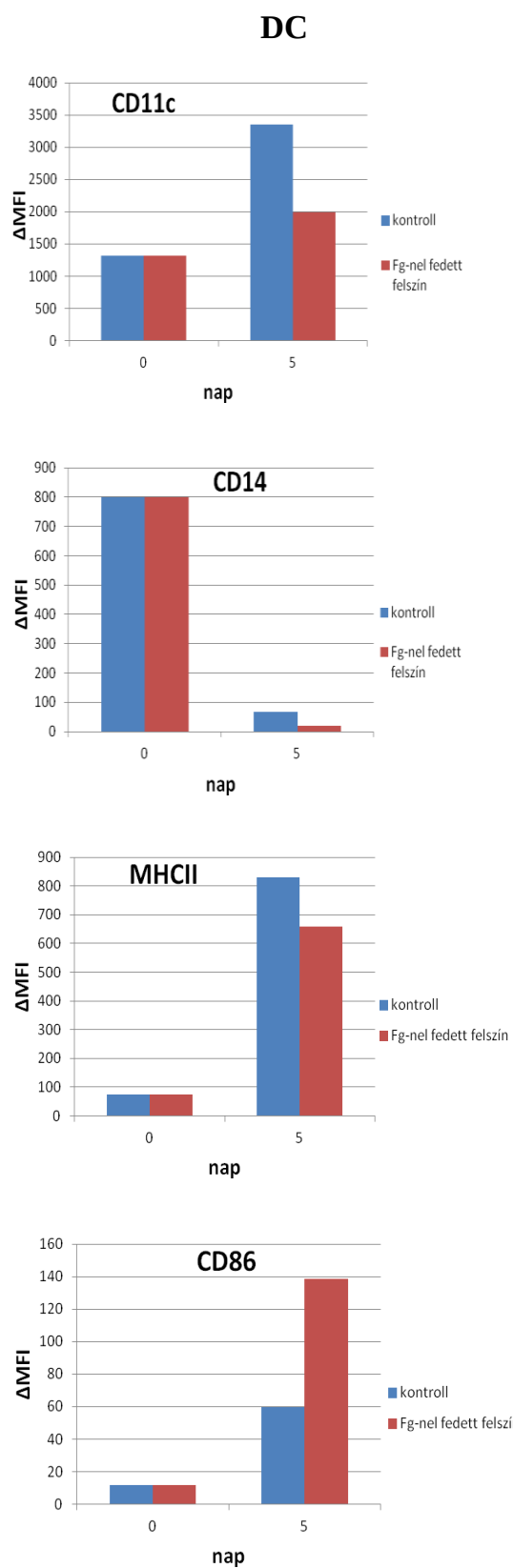
A bemutatott eredmények három független donorból származó ΔMFI értékek átlaga ± szórása

3. táblázat Fibrinogénnel fedett felszínen tenyésztett makrofágok felszíni molekuláinak mennyiségi változása

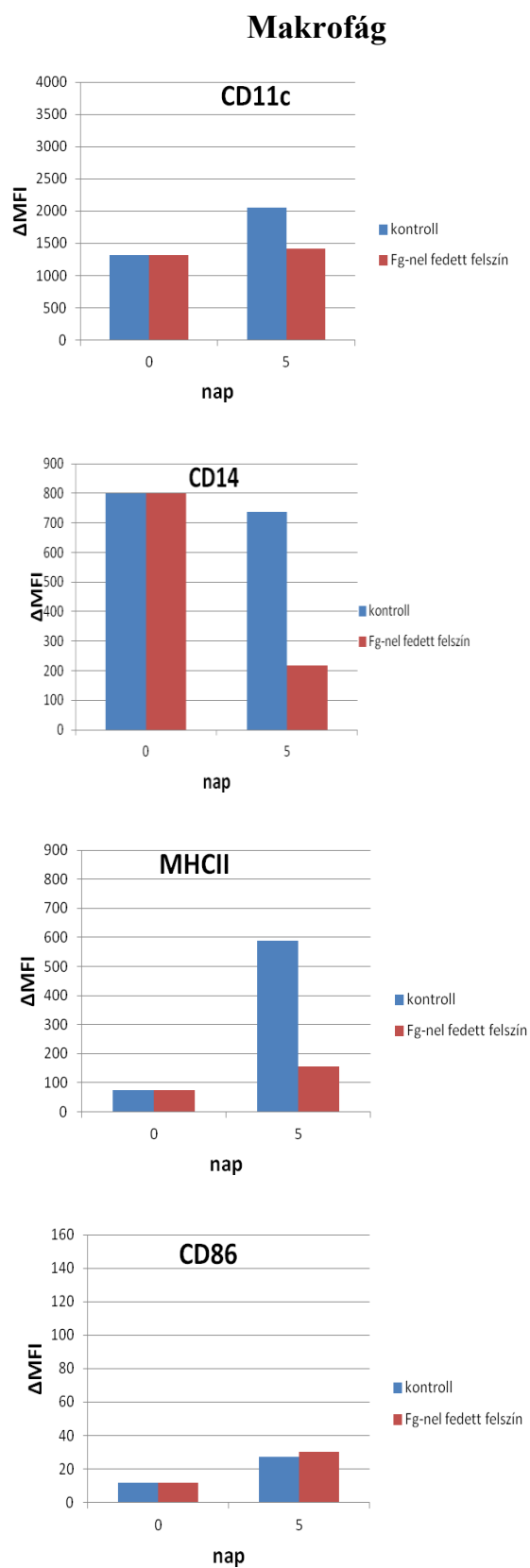
	Monocita	5 napos makrofág	
		kontroll	fibrinogénnel fedett felszínen
CD11c	1246 ± 75	1990 ± 208	1111 ± 289
CD14	767 ± 45	609 ± 180	186 ± 22
MHCII	188 ± 106	521 ± 230	226 ± 110
CD86	18 ± 5	17 ± 10	21 ± 8

A bemutatott eredmények három független donorból származó ΔMFI értékek átlaga ± szórása

A



B



12. ábra Dendritikus sejtek (A) és makrofágok (B) CD11c, CD14, MHCII és CD86 expressziójának összehasonlítása fibrinogén jelenlétében, illetve hiányában (Egy reprezentatív kísérlet eredménye három függetlenből)

5. Összefoglalás

A CR3 (CD11b/CD18) és CR4 (CD11c/CD18) komplement receptorok a β_2 integrinek családjába tartoznak. Szerepük meghatározó a citoszkeletális átrendeződéssel kapcsolatos folyamatokban, mint az iC3b komplement fragmentummal opsonizált részecskék fagocitózisa, a transzendenteliális migráció és az adherencia. A CR3 és CR4 receptorok nagyban átfedő ligandum-specifitással (iC3b, fibrinogén, ICAM-1, stb.) és rendkívül hasonló molekuláris szerkezettel rendelkeznek. Ezen tulajdonságok miatt funkciójukat is sokáig hasonlóknak tekintették. Kutatócsoportunk legújabb eredményei szerint az iC3b-vel opsonizált mikrobák fagocitózisában a CR3 szerepe meghatározó, míg a CR4 elhanyagolható. Jelen kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a monocitából makrofággá illetve dendritikus sejtté történő differenciálódáshoz szükséges adherenciában milyen szerepet játszik a CR3 és CR4. Különböző sejttípusok (monocita, makrofág, dendritikus sejt) adherenciáját vizsgáltuk fibrinogénhez, mely a két receptor közös liganduma. Először áramlási citofluorimetriás mérésekkel összehasonlítottuk a vizsgált sejttípusok CD11b és CD11c expresszióját. Fluoreszcens mikroszkópiával megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a sejtek kitapadását az idő, a fibrinogén koncentrációja és a hőmérséklet. Vizsgálataink alapján beállítottuk a primer humán monociták, makrofágok és dendritikus sejtek adherencia-vizsgálatának optimális körülményeit. Ezt követően megnéztük, hogy a CD11b és CD11c láncok specifikus ellenanyaggal történő blokkolása hogyan hat az adherenciára. Azt tapasztaltuk, hogy mind a CD11b, mind a CD11c szerepet játszik a sejtek kitapadásában, de eltérő mértékben. Adataink alapján a folyamatban a CR4 szerepe meghatározóbb normál körülmények közt. Eddig az irodalomban a CR4 adhézióban betöltött meghatározó szerepét csak előzetesen aktivált sejteken igazolták. Megvizsgáltuk, hogy a fibrinogénhez történő adherencia hogyan befolyásolja monociták makrofággá és dendritikus sejtté differenciálódását. Azt találtuk, hogy fibrinogénnel fedett felszínen történő fejlődés esetén mind a makrofágok, mind a dendritikus sejtek CD11c, CD14, MHCII expressziója csökken, a CD86 felszíni kifejeződése viszont nő. További kísérleteinkben tervezzük megvizsgálni, hogy a CD11b és CD11c receptorok blokkolása hogyan hat a monociták fibrinogén felszínen történő makrofággá vagy dendritikus sejtté differenciálódására.

6. Summary

CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) complement receptors are members of the β_2 -integrin family of adhesion molecules. These integrins play key role functions that are linked to cytoskeletal rearrangement, like adhesion, transendothelial migration, phagocytosis of complement-opsonized particles, spreading and chemotaxis. CR3 and CR4 have overlapping ligand specificity (iC3b, fibrinogen, ICAM-1) and similar molecular structure. Compared with CR3, CR4 is less well functionally characterized, generally thought to have overlapping functions with CR3. According to recent results published by our group CR3 -in contrast to CR4- has dominant role in iC3b mediated phagocytosis. The aim of our present work was to examine how CR3 and CR4 take part in the process of adherence, that is essential for monocytes to differentiate toward macrophages or dendritic cells. We analyzed integrin-mediated adhesion to fibrinogen (the common ligand of CR3 and CR4) of human monocytes, monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. We initially compared the level of expression of the α -chain of CR3 and CR4, the CD11b and CD11c of the three observed celltypes by flow cytometry. We tested how different conditions (time, fibrinogen concentration, temperature) can influence the adherence of monocytes, macrophages and dendritic cells to fibrinogen. Based on these results we set up the optimal circumstances of the adherence-assay to fibrinogen of primer, non-activated human monocytes, monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. After this, we investigated the role of CR3 and CR4 in adhesion to fibrinogen by blocking the receptors with specific antibodies for CD11b and CD11c. We found that both receptor contributes to adhesion to fibrinogen, although CR4 plays a more important role under normal conditions. Previously, the dominant role of CR4 in adhesion was addressed only on stimulated cells under inflammatory conditions. We examined the effect of fibrinogen on the differentiation of monocyte derived macrophages and monocyte derived dendritic cells. We observed decreased level of CD11c, CD14 and MHCII and increased level of CD86 expression by cells which developed on fibrinogen coated surface. We plan to assess the different role of CD11b and CD11c in this process by antibody blocking experiments.

7. Irodalom

Ammon, C., Meyer, S.P., Schwarzfischer, L., Krause, S.W., Andreesen, R., Kreutz, M. (2000) Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 100, 364-369.

Arnaout, M.A. (1990) Leukocyte adhesion molecule deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol. Rev.* 114, 145–180.

Arnaout, M.A. (1996) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75, 1037-1050.

Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., Humphries, M.J. (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci.* 122,165-70.

Critchley, D.R., Holt, M.R., Barry, S.T., Priddle, H., Hemmings, L., Norman, J. (1999) Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection. *Biochem Soc Symp.* 65,79-99.

Diamond, M.S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J.K., Corbi, A.L., Springer, T.A. (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J. Cell Biol.* 120, 1031–1043.

Fan, S.T., Edgington, T.S. (1993) Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor- α responses of monocytes. *J. Immunol.* 150, 2972–2980.

Freundlich, B. és Avdalovic, N. (1983) Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. *J. Immunol. Methods* 62, 31-37.

Georgakopoulos, T., Moss, S.T., Kanagasundaram, V. (2008) Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. *Molecular Immunology* 45, 3671-3681.

Hogg, N., Takacs, L., Palmer, D.G., Selvendran, Y., Allen, C. (1986) The p150,95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: comparison with expression of class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 16, 240–248.

Kuijper, P.H., Gallardo Torres, H.I., Lammers, J.W., Sixma, J.J., Koenderman, L., Zwaginga, J.J. (1997) Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood* 89, 166-175.

Loike, J.D., Sodeik, B., Cao, L., Leucona, S., Weitz, J.I., Detmers, P.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C. (1991) CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A α chain of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1044-1048.

Lu, H., Smith, C.W., Perrard, J., Bullard, D., Tang, L., Shappell, S.B., Entman, M.L., Beaudet, A.L., Ballantyne, C.M. (1997) LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 99, 1340-1350.

Miller, L.J., Schwarting, R., Springer, T.A. (1986) Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation. *J. Immunol.* 37, 2891-2900.

Prudovsky, I., Popov, K., Akimov, S., Serov, S., Zelenin, A., Meinhardt, G., Baier P., Sohn, C., Hass, R. (2002) Antisense CD11b integrin inhibits the development of a differentiated monocyte/macrophage phenotype in human leukemia cells. *European Journal of Cell Biology* 81, 36 – 42.

Sándor, N., Kristóf, K., Pap, D., Erdei, A., Bajtay, Zs. (2012) CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology* PMID: 22906751.

Schymeinsky, J., Sperandio, M., Walzog, B. (2011) The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trend sin Cell Biology* 21, 247-255.

Smiley, S.T., King, J.A., Hancock, W.W. (2001) Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4. *The Journal of Immunology* 167, 2887–2894.

Sriramarao, P., Languino, L.R., Altieri, D.C. (1996) Fibrinogen mediates leukocyte-endothelium bridging in vivo at low shear forces. *Blood* 88, 3416-3423.

Tushinski, R.J., Oliver, I.T., Guilbert, L.J., Tynan, P.W., Warner, J.R., Stanley, E.R., (1982) Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell* 28(1), 71-81.

Thacker, R.I. és Retzinger, G.S. (2008) Adsorbed fibrinogen regulates the behavior of human dendritic cells in a CD18-dependent manner. *Experimental and Molecular Pathology* 84, 122–130

Tobiášová-Czetőová, Z., Palmorg, A., Lundqvist, A., Karlsson, G., Adamson, L., Bartunková, J., Masucci, G., Pisa, P. (2005) Effects of human plasma proteins on maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology Letters* 100, 113-119.

Vorup-Jensen, T., Carman, C.V., Shimaoka, M., Shuck, P., Svitel, J., Springer, T.A. (2004) Exposure of acidic residues as a danger signal for recognition of fibrinogen and other macromolecules by integrin $\alpha_X\beta_2$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1614-1619.

Zhang, H., Schaff, U.Y., Green, C.E., Chen, H., Sarantos M.R., Hu, Y., Wara, D., Simon, S.I., Lowell, C.A.(2006) Impaired Integrin-Dependent Function in Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-Deficient Murine and Human Neutrophils. *Immunity* 25, 285-295.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Sándor Noéminek és Dr. Bajtay Zsuzsának, akikhez elméleti és gyakorlati kérdéseimmel mindig fordulhattam, hasznos tanácsaikkal mindvégig segítettek munkámban.

Szeretném megköszönni a tanszék valamennyi dolgozójának is a segítséget és a barátságos légkört, amelyben dolgozhatok.

9. Nyilatkozat

Alulírott Kriston Csilla a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül

- monociták izolálását
- monocitákból makrofágok, dendritikus sejtek differenciálását
- áramlási citofluorimetriás vizsgálatokat
- adherencia vizsgálatokat
- fibrinogénnel fedett felszínen történő differenciációs vizsgálatokat

végeztem el.