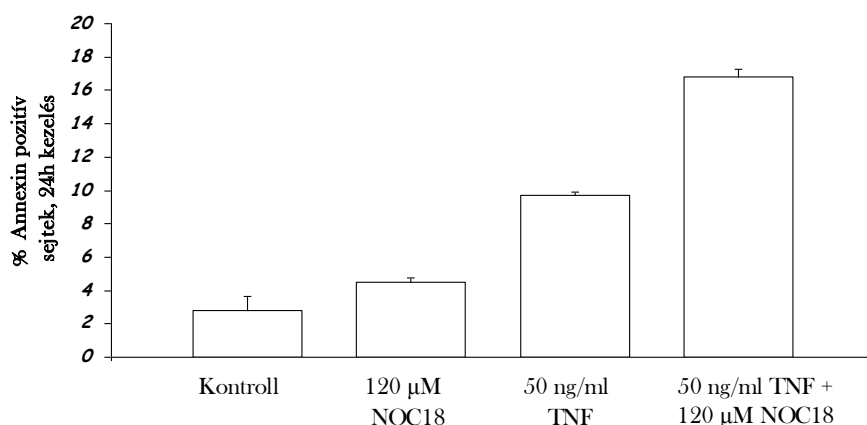


## OTKA 61030 ZÁRÓJELENTÉS

A nitrogén monoxid (NO) egy rövid féléletidejű, számos szabályozó szabályozó funkciót betöltő molekula, immunmoduláns hatása jól ismert. Korábbi eredményeink szerint NO befolyásolja a T limfocita aktivációt (*J Immunol* 2003;171:5188-5197; *Trends Immunol* 2004;25:360-367; *Free Radical Biology and Medicine* 2007;11:1625-1631; *Clinical Immunology* 2006;2-3:145-151). (A zárójelentésben az eddig közölt adatok szövegesen, az eddig még nem közölt adatok ábrákkal is szerepelnek).

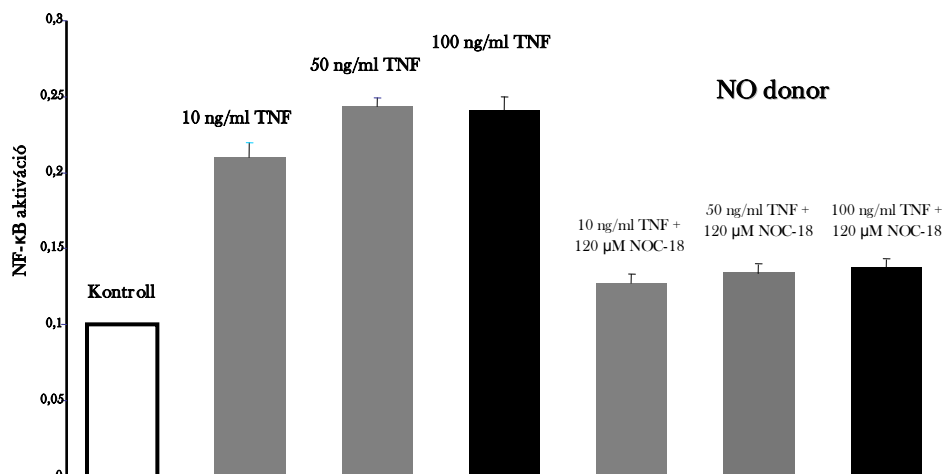
1: Eredményeink szerint a NO szabályozza a TNF-alfa T limfocitákra kifejtett sejt aktiváló és apoptózis indukáló hatását. 10, 50 és 100 ng/ml rekombináns TNF- $\alpha$  előkezelést követően adott NO donor (60, 120, 300  $\mu$ M NOC-18) jeletősebben fokozta az apoptózist, mint NO donor önmagában (p>0,001 mindhárom esetben).

### Az NO befolyásolja a TNF által indukált apoptózist Jurkat sejteken



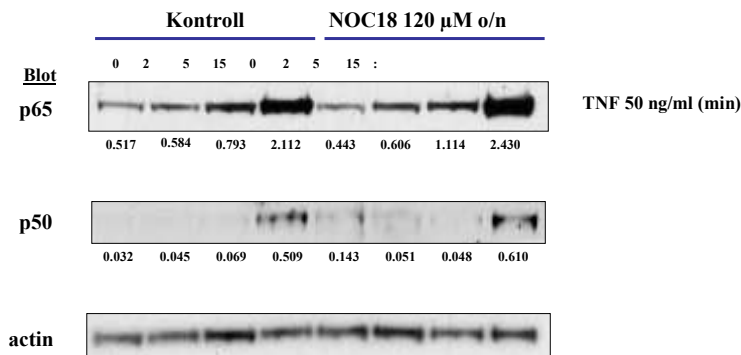
2: TNF kezelés NF- $\kappa$ B aktivációt indukál limfocitákban. NF- $\kappa$ B riporter plazmidot tartalmazó Jurkat sejteken vizsgáltuk az NF- $\kappa$ B aktivációt. Eredményeink szerint NO hatékonyan gátolja a TNF kezelésre és CD3 stimulációra mérhető NF-kappa aktivációt is.

### Az NO gátolja a TNF által indukált NF- $\kappa$ B aktivációt $\beta$ galaktozidáz riporter plazmidot tartalmazó Jurkat sejteken



3: Vizsgálatuk az NO NF- $\kappa$ B gátló hatásának mechanizmusát is. Eredményeink szerint az NF-kappa aktiváció korai lépéseit képviselő P50, P65, I-kB $\alpha$  és I-kB $\epsilon$  nukleáris transzlokáció is független NO donor előkezeléstől. Ezen adataink szerint az NF-kappa útvonal későbbi lépéseit, így a transzkripciót és transzlációt szabályozza NO, míg a nukleáris transzlokáció NO-tól független.

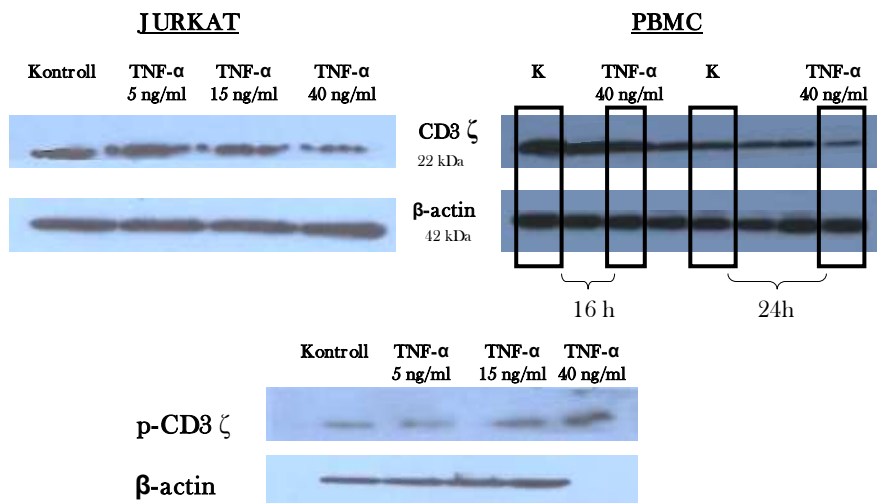
### NO nem befolyásolja NF-kB nukleáris transzlokációt Jurkat sejteken



4: Eredményeink szerint a TNF által indukált P38 aktiváció szintén nem különbözött szignifikánsan NO donor előkezelést követően és annak hiányában, western blot módszerrel és intracelluláris flow citometriával mérve egyaránt (p=0,4 és p=0,5).

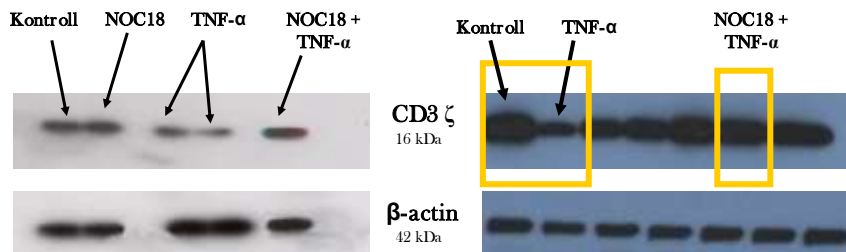
Irodalmi adatok szerint rheumatoid arthritisben (RA) csökken a T limfociták CD- $\zeta$  lánc expresszója. A TNF alapvető szerepet játszik az RA pathogenézisében, ezért vizsgálatuk a TNF szerepét a CD- $\zeta$  lánc expresszójára. Eredményeink szerint TNF (10-50 ng per ml) dózis függően csökkenti a CD- $\zeta$  lánc expressziót Jurkat sejteken és frissen szeparált human T limfocitákon is (p<0,001) áramlási citometriával és western blot módszerrel mérve egyaránt. Ugyanakkor a foszforilált CD3- $\zeta$  lánc expresszió fokozódik TNF kezelés hatására.

### TNF kezelés dóziszfüggő módon csökkenti a CD3 $\zeta$ lánc expressziót



5: NO szabályozza a TNF által indukált NF- $\kappa$ B aktivációt és apoptózist, további kísérleteink során vizsgáltuk az NO hatását a TNF által indukált CD3- $\zeta$  lánc expresszióra. Eredményeink szerint NO donorral történő előkezelés (40  $\mu$ mol NOC 18) gátolta a TNF által okozott CD3- $\zeta$  lánc expressziót csökkentő hatását, Jurkat sejteken és frissen szeparált humán limfocitákon egyaránt ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ).

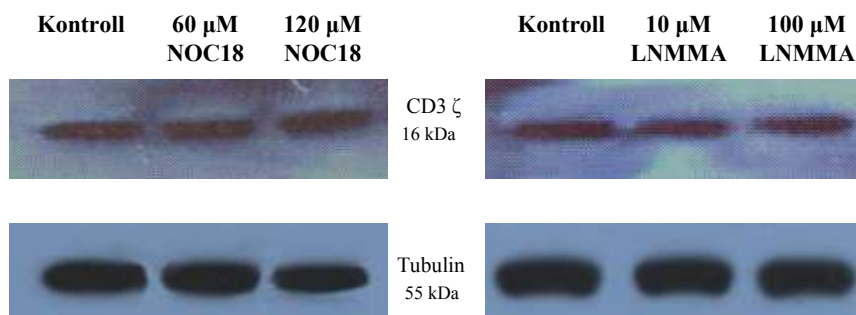
### NO donorral történő előkezelés gátolja a TNF kezelés hatására kialakuló $\zeta$ lánc csökkenést



3 h 180  $\mu$ M NOC18 előkezelés,  
16h inkubáció 40 ng/ml TNF

6: Vizsgáltuk az NO donor és NO termelődést gátló NOS inhibitor hatását a CD3- $\zeta$  lánc expressziójára. Eredményeink szerint NO donor, vagy NO gátlás nem befolyásolja a CD3- $\zeta$  lánc expressziót.

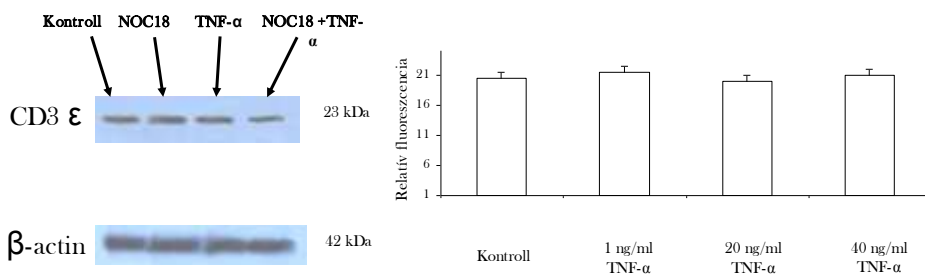
### A NO és az LNMMA önmagában nem befolyásolja a zéta lánc mennyiségét



Inkubáció: 16 h

7: Ugyanakkor TNF kezelés nem befolyásolta a CD3-ε lánc expressziót, mely a CD3-ζ és CD3-ε láncok expressziójának eltérő szabályozására utal.

## TNF kezelés hatására nem változik a CD3 ε lánc mennyisége



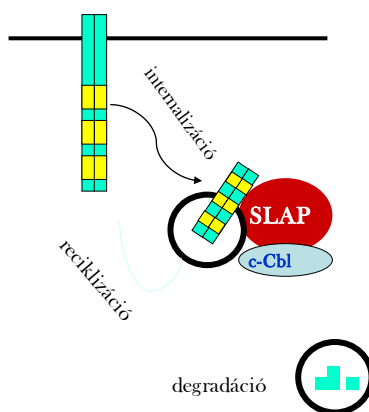
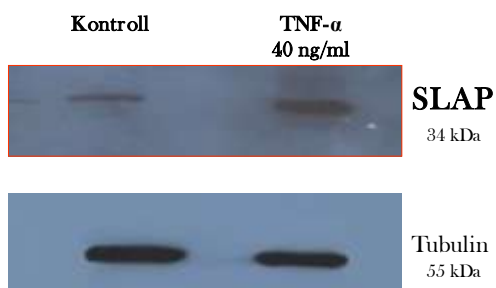
NOC18: 180 μM előkezelés 3 h } 16 h  
 TNF-α: 40 ng/ml

Inkubáció: 16 h

8: SRC adaptor (SAP) protein irodalmi adatok szerint csökkenti a CD3-ζ expressziót, saját adataink szerint TNF kezelés SAP expresszió növekedéssel jár, melynek szerepe lehet a TNF CD3-ζ csökkentő hatásában is.

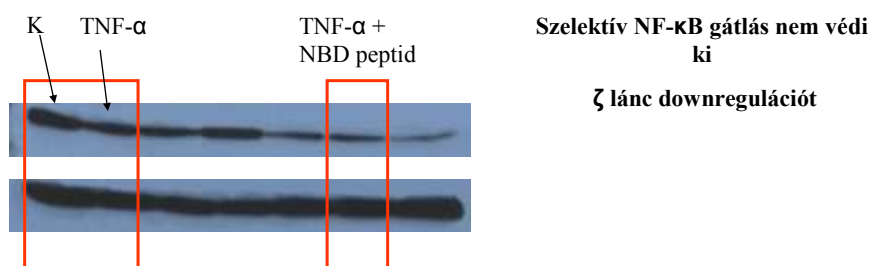
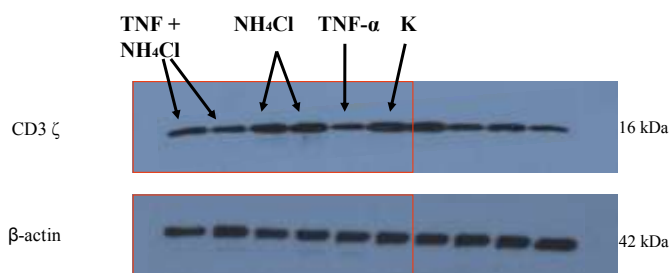
## TNF hatására megnő SLAP src adaptor protein expressziója

Src adaptor protein expressziója  
 TNF kezelés hatására



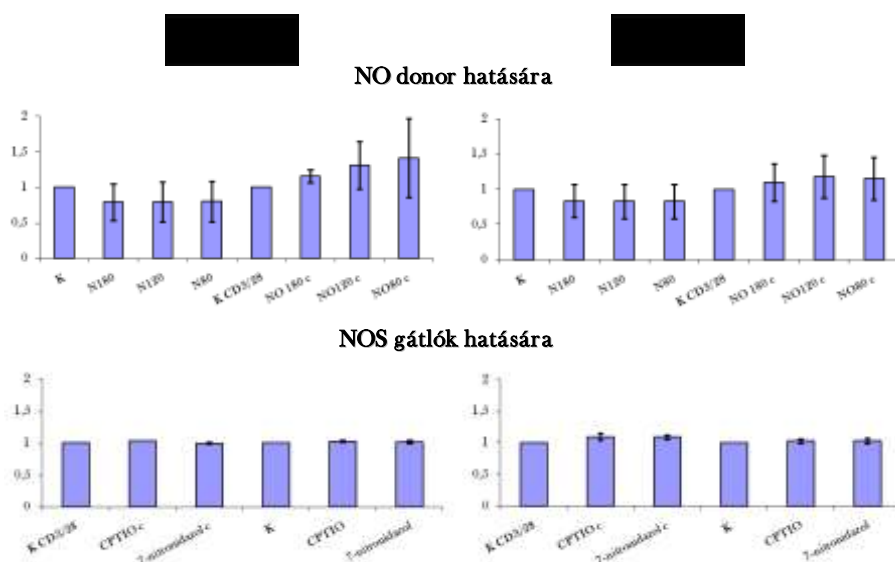
9: Vizsgáltuk a TNF által indukált CD3 $\zeta$  expresszió csökkenés mechanizmusát is. Eredményeink szerint lizoszóma gátló NH<sub>4</sub>Cl nem befolyásolja a TNF CD3 $\zeta$  expressziót csökkentő hatását. Továbbá szelektív NF- $\kappa$ B gátló NBD peptid szintén nem védi ki a TNF CD3 $\zeta$  lánc csökkentő hatását.

### Lizoszómagátlás hatása a TNF által indukált $\zeta$ lánc expresszióra



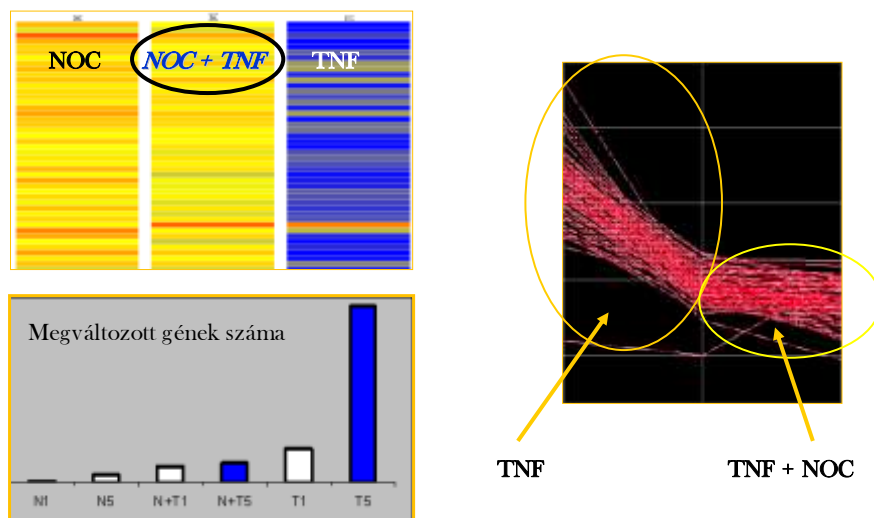
10: A NO TNF hatásait módosíthatja receptorának expresszióján keresztül is, ezért megvizsgáltuk az NO szerepét I és II típusú TNF receptorok kifejeződésére. Eredményeink szerint NO nem befolyásolja szignifikánsan az I és II típusú TNF receptor expressziót.

### NO nem befolyásolja a TNF receptor expressziót



11: Microarray eredményeink alapján a NO számos TNF által indukált protein expresszióját szabályozza, így többek között gátolja a relB protein expressziót human T limfocitákon. Eredményeink az NO számos, a TNF által aktivált gén expresszóját gátolja. Mindezek az eredmények alátámasztják a NO TNF hatásait befolyásoló szerepét.

## NO befolyásolja a TNF által indukált génexpressziót



12: Eredményeink szerint szénhidrát antigének processzálását szignifikánsan nem befolyásolja NO donor és NOS inhibitor kezelés.

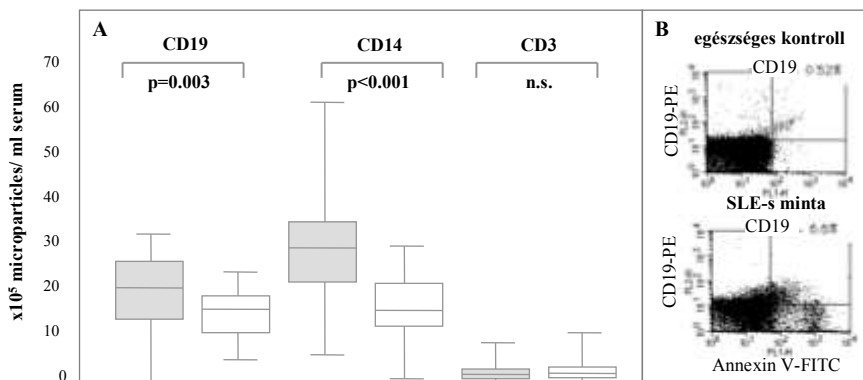
13: Eredményeink szerint NO szabályozza T limfociták citokin termelését és differenciálódását. Hisztidin dekarboxiláz hiányos (HDC-KO) eger T sejtjeinek IFN-gamma termelése fokozott mRNS és protein szinten ( $p > 0,001$ ,  $p > 0,001$ ) (Koncz A et al *J Immunol* 2007;10:6613-6619). HDC-KO T limfociták NO termelése szintén fokozott vad típusú kontrollokéhoz képest ( $p < 0,01$ ) és hisztamin szabályozza az NO szintézist, HDC-KO és vad típusú T limfocitákban egyaránt. Eredményeink szerint NO donor kezelés INF-gamma termeléssel jár, míg NOS inhibitorok az IFN-gamma szintézist szignifikánsan gátolták. Hisztamin a NO termelésen keresztül szabályozza az IFN-gamma szintézist. Hisztamin hiány nem véd az aggregán indukálta artritistől, melynek oka a Th1 citokinek nagyobb arányú termelése.

14: Eredményeink szerint TNF szabályozza T limfociták nitrogén monoxid (NO) termelését *in vivo* és *in vitro*, továbbá NO szabályozza a T limfociták NF-Kappa aktivációját. Rheumatoid arthritises (RA) betegek T limfocitáinak NO termelése fokozott ( $p < 0,001$ ) és TNF blokkoló kezelés mellett az NO termelés csökken ( $p = 0,01$ ). (Nagy G et al. *Immunol Lett.* 2008 Jun 15;118(1):55-8). Ugyanakkor RA-es betegek T limfocitáinak NO termelése nem korrelál a betegség aktivitásával. RA-es betegek szinoviális mintáiból szeparált fibroblasztok és makrofágok NO termelése nem különbözött arthrosisban szenvedő betegek szinoviális mintáiból szeparált fibroblasztok és makrofágok NO termelésétől.

15: RA-es betegek szérum nitrit és nitrát szintje hasonló egészséges kontrollokéhoz és nem korrelál a betegség aktivitásával és a rheumatoid faktor szintjével.

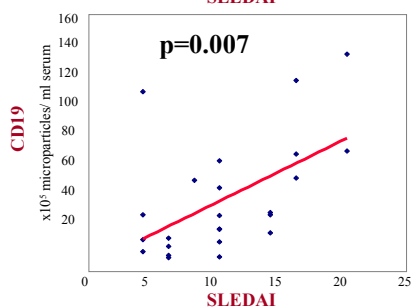
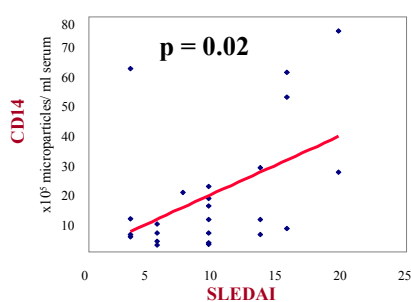
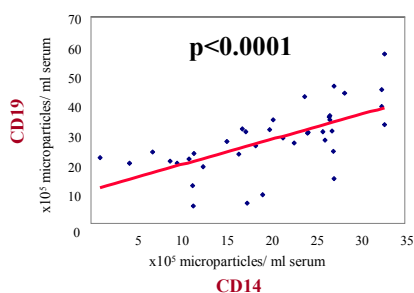
16: 100nm 1000nm méretű mikropartikulumok egér ízületbe juttatva szinovitist okoznak. B limfocita es monocita eredetű partikulumok mennyisége magasabb SLE-ben es polymyositisben, mig a T limfocita eredetű mikropartikulumok szintje jelentősen emelkedett polymyotitisben de SLE ben az egészseges kontrollokéhoz hasonló.

## Mikropartikulák SLE-ben



CD14, CD19 hordozó (monocita és B limfocita eredetű) mikropartikulák mennyisége korrelál egymással. Továbbá a CD14 és a CD19 hordozó partikulák mennyisége is szignifikánsan korrelál az SLE aktivitását mutató SLEDAI index értékével.

## Mikropartikulák és SLEDAI közötti korreláció



nincs szignifikáns korreláció a B sejt eredetű mikropartikulák száma és a C3 / anti-C1q szintek között.